

Tesis Doctoral

Propiedades funcionales del péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con componentes de la matriz alimentaria

Morales, Rocío

2017-12-20

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

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

Cita tipo APA:

Morales, Rocío. (2017-12-20). Propiedades funcionales del péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con componentes de la matriz alimentaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Morales, Rocío. "Propiedades funcionales del péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con componentes de la matriz alimentaria". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-12-20.



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

**Propiedades funcionales del péptido bioactivo
caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con
componentes de la matriz alimentaria**

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

Lic. Rocío Morales

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

Director Asistente: Dra. María Julia Martinez

Consejero de Estudios: Dra. Ana M. Rojas

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

Buenos Aires, 2017.

Propiedades funcionales del péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con componentes de la matriz alimentaria.

Resumen

El caseinoglicomacropéptido (CMP) es un péptido de 64 aminoácidos liberado por acción de la quimosina o renina sobre la κ -caseína durante la elaboración del queso y se encuentra entre las proteínas del suero. El CMP presenta valiosas propiedades bioactivas que lo hacen un ingrediente particularmente útil para aumentar la calidad de diversos productos alimenticios. Con este fin sus propiedades funcionales y su interacción con componentes de la matriz alimentaria deben ser exploradas. El objetivo de este trabajo fue en primer lugar evaluar las interacciones entre CMP y caseinato de sodio (CasNa) en solución. Se encontró que el CMP influye en el autoensamblaje del CasNa, ya sea porque secuestra calcio o porque interactúa directamente con las moléculas de caseinato principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, reduciendo el estado de agregación del CasNa. En segundo lugar, se estudió el impacto de dichas interacciones en la gelificación del CasNa en sistemas que simulan un producto lácteo fermentado como el yogur, así como en las propiedades interfaciales y de espumado del CasNa. Se encontró que el CMP influye en la gelificación ácida del CasNa, promoviendo la formación de un gel a valores de pH más altos. Por otro lado, las interacciones sinérgicas que tienen lugar entre el CMP y el CasNa influyen en la formación de espuma a pH 5,5, mejorando la capacidad de espumado y la estabilidad de las mismas. El papel del CMP es el de reducir el estado de agregación del CasNa, haciéndolo más eficiente para la formación de geles y para la estabilización de la película interfacial de la espuma, y contribuir a una mayor capacidad de espumado e incorporación de líquido a la espuma. Por lo tanto, el CMP podría contribuir a extender el uso de CasNa como agente gelificante y espumante, principalmente en alimentos acidificados. Finalmente, se estudiaron las propiedades emulsionantes del CMP y en combinación con otros emulsionantes y su efecto sobre la lipólisis en modelos *in vitro* de la digestión gastrointestinal. Si bien el CMP presentó excelente actividad interfacial, las emulsiones formadas fueron poco estables. Una propiedad singular de estas emulsiones es su gelificación ácida y su reversibilidad por aumento de pH; no obstante, durante este proceso las emulsiones se desestabilizan parcialmente. La incorporación de un co-emulsionante como Tween 80 no sólo

incrementó su estabilidad, sino que dio lugar a la formación de estructuras gelificadas estables para su almacenamiento, como también sistemas estables a la reversión por pH. Tanto las emulsiones de CMP solo como la de CMP-Tween 80, presentaron un alto grado de lipólisis, que podría ser atribuido a la presencia de CMP. Estas emulsiones serían útiles para transportar aceites bioactivos o compuestos solubles en aceite. Se concluye que más allá de utilizar el CMP por su bioactividad, este péptido contribuye tecnológicamente al diseño de ingredientes funcionales innovadores con propiedades funcionales mejoradas para su uso en productos lácteos.

Palabras clave: Caseinoglicomacropéptido, geles, interfaces, espumas, emulsiones.

Functional properties of the bioactive peptide casein glycomacropeptide (CMP) and the impact of its interaction with components of the food matrix.

Abstract

Casein glycomacropeptide (CMP) is a peptide of 64 amino acids, released by action of chymosin or renin on κ -casein during cheese manufacture and is found in whey proteins. CMP presents valuable bioactive properties, which make it a particularly useful ingredient for increasing the quality of many food products. For this purpose, its functional properties and its interaction with components of the food matrix should be explored. The objective of this work was, firstly, to evaluate the interactions between casein glycomacropeptide (CMP) and sodium caseinate (NaCas) in aqueous solution. CMP affected NaCas self-assembly, either by calcium sequestering or by interactions with caseinate molecules, mainly through hydrophobic bonds, reducing the state of aggregation of NaCas. In a second instance, the impact of these interactions in the gelation of NaCas in systems that simulate a fermented milk product, like yoghurt, and in the interfacial and foaming properties of NaCas was studied. CMP influenced the acid gelation of NaCas, promoting gel formation at higher pH values. Also, the synergistic interactions between CMP and NaCas influenced the foaming properties at pH 5.5, improving foaming ability and stability. The role of CMP in the mixed system was to reduce the aggregation state of NaCas, making it more efficient for gels formation and for the stabilization of the interfacial film in foams, and to contribute to a higher foam ability and liquid incorporation in foams. Therefore, CMP could contribute to extend the use of NaCas as a gelling and foaming agent, mainly in acidified foods. Finally, the emulsifying properties of CMP and in combination with other biopolymers and their effect on lipolysis in an *in vitro* model of gastrointestinal digestion were studied. Although CMP showed great interfacial activity, emulsions were instable. A unique property of these emulsions is their acid gelation and reversibility by increasing pH; however, emulsions partially destabilized during the reversibility process. The incorporation of a co-emulsifier, like Tween 80, not only increased emulsions stability, but also promoted the formation of gelled structures stable for storage as well as stable for pH reversibility. Both, CMP emulsions alone and CMP-Tween 80 emulsions, showed a high degree of lipolysis, which could be attributed to the presence of CMP. These gelled

emulsions would be useful for the delivery of bioactive oils or oil soluble compounds. In conclusion, in spite of using CMP for its bioactive properties, this peptide contributes from the technological point of view to the design of innovative functional ingredients with improved functional properties for milk products applications.

Keywords: Casein glycomacropeptide, gels, interfaces, foams, emulsions.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Pilosof, por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación y de trabajar en su grupo. Por su ayuda en el análisis de resultados, su aporte durante el proceso de escritura y por su gran contribución en mi formación académica.

A la Dra. Julia Martinez, por su apoyo durante la realización de esta tesis, tanto profesional como personal. Por haberme guiado en el trabajo experimental y dedicarle su tiempo y paciencia. Por su invaluable contribución en la escritura de este trabajo y principalmente por transmitirme su alegría y alentarme a cumplir mis objetivos.

A mis padres Celia y Carlos, mis hermanas Dai y Aldi, por estar a mi lado apoyándome en todo momento y por alegrarse por cada logro cumplido.

Agradecer de manera especial a mis compañeros de laboratorio porque de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo. A Caro, por responder siempre a mis preguntas y dar solución a mis inquietudes. A Víctor por su ayuda y paciencia en las medidas del tensiómetro. A Fer, Pau, Julieta, Karina, Mariana y Federico, por compartir no solo sus conocimientos sino también momentos de distensión que hacen mejores los días de trabajo.

A mis amigas, por impulsarme siempre a seguir con mis objetivos, a pesar de las dificultades. Por compartir conmigo cada decisión, haberme apoyado y entendido siempre.

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

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

INDICE

Introducción	1
1. Leche.....	2
1.1. Caseínas	3
1.2. Proteínas del suero	7
2. Caseinoglicomacropéptido.....	9
2.1. Actividades biológicas del CMP.....	13
2.2. Propiedades funcionales del CMP	16
3. Interacciones entre el CMP y otros componentes de la matriz alimentaria.....	33
4. Referencias.....	39
Objetivos.....	57
Materiales y métodos	59
1. Materiales.....	60
1.1. Caseinoglicomacropéptido (CMP)	60
1.2. Caseinato de sodio (CasNa).....	60
1.3. β -lactoglobulina (β -lg)	60
1.4. Co-emulsionantes.....	60
1.5. Aceite vegetal	61
1.6. Preparación de soluciones.....	61
2. Métodos	61
2.1. Distribución de tamaño de partícula	61
2.2. Gelificación ácida mediada por GDL	64
2.3. Determinación de la transición sol-gel	65
2.4. Elaboración de yogur	65
2.5. Propiedades texturales	66
2.6. Microscopía	67
2.7. Viscosidad.....	67
2.8. Propiedades de espumado	68
2.9. Propiedades de emulsificación.....	69
2.10. Propiedades interfaciales	72
2.11. Digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de las emulsiones O/W	76
3. Referencias.....	79

Resultados	82
Sección I- Interacción entre el caseinoglicomacropéptido (CMP) y el caseinato de sodio (CasNa): impacto sobre propiedades funcionales	84
Capítulo I-1- Caracterización de la interacción entre el CMP y el CasNa en solución acuosa	85
I.1. Introducción.....	86
I-1.1. Estudio de las interacciones entre el CMP y el CasNa en solución por dispersión dinámica de luz (DLS)	86
I-1.2. Caracterización de sistemas mixtos CasNa/CMP	90
I-1.3. Efecto de la disminución de pH en la interacción entre CMP y CasNa.....	94
I-1.4. Estudio de las interacciones entre CMP y CasNa en solución por análisis del comportamiento de flujo	97
I-1.5. Estudio de las interacciones entre CMP y CasNa en condiciones de temperatura y pH que simulan la fermentación de un producto lácteo.....	99
I-1.5.1. Evolución del tamaño de partícula durante el calentamiento/enfriamiento	99
I-1.5.2. Evolución del tamaño de partícula con la disminución de pH.....	101
I-1.6. Conclusión.....	103
I-1.7. Referencias	105
Capítulo I-2- Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa sobre las propiedades de gelificación	109
I-2. Introducción	110
I-2.1. Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa en la gelificación.....	110
I-2.1.1. pH de gelificación	110
I-2.1.2. Propiedades texturales de los geles	113
I-2.1.3. Estudio microestructural de los geles.....	117
I-2.2. Efecto del enriquecimiento de yogur con CMP	119
I-2.3. Conclusiones	124
I-2.4. Referencias	125
Capítulo I-3- Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa sobre las propiedades interfaciales y espumantes	128
I-3. Introducción	129
I-3.1. Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa en interfases y espumas	129

I-3.1.1. Comportamiento interfacial	129
I-3.1.2. Capacidad de espumado	132
I-3.1.3. Estabilidad de las espumas al drenado	134
I-3.1.4. Estabilidad de las espumas al colapso	139
I-3.2. Conclusiones	145
I-3.3. Referencias	147
Sección II- <i>Propiedades emulsionantes e interfaciales del CMP y el impacto de otros emulsionantes</i>.....	150
Capítulo II-1- <i>Propiedades emulsionantes e interfaciales del CMP</i>.....	151
II-1. Introducción	152
II-1.1. Caracterización de las emulsiones de CMP	152
II-1.2. Caracterización interfacial aceite/agua de CMP	156
II-1.3. Gelificación de emulsiones de CMP por pH	159
II-1.4. Reversión de la gelificación de emulsiones de CMP por pH	161
II-1.5. Conclusiones	167
II-1.6. Referencias.....	168
Capítulo II-2- <i>Impacto del agregado de co-emulsionantes sobre las emulsiones de CMP</i>.....	172
II-2. Introducción	173
II-2.1. Caracterización de las emulsiones de CMP en presencia de co-emulsionantes	173
II-2.2. Caracterización de la estabilidad de emulsiones de CMP en presencia de co-emulsionantes.....	177
II-2.3. Gelificación de emulsiones mixtas por pH y reversibilidad	181
II-2.4. Comportamiento interfacial del CMP y sus mezclas con diferentes co-emulsionantes.....	186
II-2.4.1. Adsorción competitiva entre las moléculas de emulsionantes.....	187
II-2.5. Rol del CMP y el T_w en la estabilidad de las emulsiones mixtas	195
II-2.6. Conclusiones	204
II-2.7. Referencias.....	205
Capítulo II-3- <i>Estudio de la lipólisis de emulsiones de CMP y CMP/co-emulsionante</i>.....	209

II-3. Introducción	210
II-3.1. Lipólisis de emulsiones de CMP: efecto de la gelificación	212
II-3.2. Lipólisis de emulsiones mixtas de CMP/co-emulsionante: efecto de la gelificación.....	218
II-3.3. Conclusiones	223
II-3.4. Referencias.....	224
Conclusiones generales	228

Introducción

La relación entre la dieta y la salud es una de las claves para prevenir las enfermedades y promover el bienestar. Sobre esta base es que se ha producido un importante crecimiento en el mercado de los alimentos funcionales, que son los alimentos que ejercen un efecto positivo en la salud de las personas más allá de su valor nutritivo.

El empleo de péptidos bioactivos como ingredientes funcionales ha atraído la atención de los investigadores, debido a la variedad de propiedades biológicas atribuidas a dichos péptidos tales como, propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, actividad opiácea, antioxidante, antihipercolesterolémica, antitrombótica, antihipertensiva (Cánovas et al., 2011). Las proteínas lácteas se han convertido en una de las fuentes principales de estos péptidos, en particular el suero de quesería. Este subproducto adquiere gran importancia en países como el nuestro, con una arraigada tradición quesera y niveles de producción significativos. El suero contiene proteínas de especial interés para ser utilizado como ingrediente. Estas proteínas pueden ser una fuente adicional de péptidos bioactivos, por lo que el estudio de dichos péptidos permitiría el aprovechamiento de este subproducto de la industria alimentaria, incrementando simultáneamente su valor funcional.

Esta tesis tiene como objeto el estudio de las propiedades tecnológicas del CMP, un péptido bioactivo presente en el suero de quesería.

1. Leche

La leche es una de las fuentes de proteínas más completas. La leche de vaca contiene alrededor de 3,5 % p/p de proteína (Brunner, 1976). La proteína de la leche bovina está compuesta por aproximadamente 80 % de caseína y 20 % de proteínas del suero. La caseína es una heteroproteína que contiene α_1 -, α_2 -, β - y κ -caseínas. Las proteínas del suero son α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica e inmunoglobulina (Tamime y Robinson, 2000) (**Tabla 1**). Las proteínas de la leche no sólo proporcionan los nutrientes necesarios para el cuerpo humano, sino que también desempeñan importantes funciones tanto biológicas como funcionales. Por ejemplo, la α -lactoalbúmina participa activamente en la biosíntesis de lactosa (Ng-Kwai-Hang, 2011). Las proteínas del suero se utilizan como ingredientes importantes en los alimentos para impartir propiedades espumantes, emulsionantes y gelificantes (Hoffman y Falvo, 2004).

Tabla 1. Proteínas principales de la leche (Tamime y Robinson, 2000).

Proteínas	% Proteínas totales	Composición	% cada componente
Caseínas	76-88	α_1 - α_2	45-55
		β -	25-35
		κ -	8-15
Proteínas del suero	15-22	Albúmina	0,7-1,3
		β -lactoglobulina	7-12
		α -lactoalbúmina	2-5
		Inmunoglobulina	1,9-3,3

1.1. Caseínas

Las caseínas son un grupo de proteínas con pesos moleculares que oscilan entre 20.000 y 25.000 Da (Farrell et al., 2004). Bajo esta denominación se incluyen tres tipos de cadenas polipeptídicas, α -caseína (α_1 -CN y α_2 -CN), β -caseína (β -CN) y κ -caseína (κ -CN), que representan, respectivamente, el 50, 30 y 15 % del total de las caseínas. Las secuencias de sus estructuras primarias son complejas y muy diferentes a las de otras proteínas, debido al alto contenido de prolina y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina (Creamer y Macgibbon, 1996). La conformación secundaria de las caseínas está poco organizada (α -hélice y lámina β -plegada de longitudes cortas), similar a la estructura de las proteínas globulares desnaturalizadas (Walstra y Jenness, 1984). Debido a su distribución de cargas y a su hidrofobicidad, las caseínas se unen entre sí formando agregados coloidales denominados micelas, compuestos por un 92 % de proteína y un 8 % de sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico (Ferrandini et al., 2006; Grasselli et al., 1997).

Las distintas variantes genéticas conocidas de la α_1 -CN se diferencian en el grado de fosforilación, pudiendo presentar entre 8 y 9 grupos fosfatos. Esta proteína monomérica se compone de 199 aminoácidos sin cisteína. Se pueden distinguir tres zonas claramente hidrofóbicas, f(1-44), f(90-113) y f(132-199) y un dominio de alta polaridad situado en el segmento f(41-80), en el que se encuentra la mayor parte de la carga de la proteína (Swaisgood, 1996; Wong et al., 1996).

La α_2 -CN, compuesta por 207 aminoácidos, es la proteína más hidrofílica del grupo de las caseínas. Puede tener entre 10 y 13 grupos fosfato distribuidos a lo largo de su cadena.

Es una proteína caracterizada por tener diferentes dominios con altas cargas netas, lo que la hace fuertemente sensible a la acción del calcio y de otros cationes.

La β -CN, compuesta por 209 aminoácidos, tiene entre 4 y 5 residuos de fosfoserina situados en el extremo N-terminal y presenta un fuerte carácter hidrofóbico en la mitad del extremo C-terminal f(136-209). Esta separación de la molécula en dos dominios de diferente hidrofobicidad hacen que esta proteína sea altamente anfipática (Swaisgood, 1996).

La κ -CN es la proteína más diferente dentro del grupo de las caseínas, presentando cisteína en su estructura primaria (Creamer y MacGibbon, 1996). Tiene 169 aminoácidos y hasta 5 cadenas glicosídicas unidas a los residuos de treonina o serina. Se dividen dos dominios claramente diferenciados, el segmento N-terminal hidrofóbico y con carga neta positiva y el extremo C-terminal, de alto carácter hidrofílico.

Todas estas caseínas se encuentran en la leche asociadas en partículas esféricas coloidales conocidas como micelas de caseína. Hay múltiples modelos que tratan de explicar la conformación espacial de las micelas de caseínas (Dalgleish, 1998; Dalgleish, 2011; Dalgleish y Corredig, 2012; de Kruif, 1999; de Kruif y Holt, 2003; de Kruif et al., 2012; Farrell et al., 2006; Ferrandini et al., 2006; Fox, 2008; Holt et al., 2013; Horne, 2006; McMahon y Oommen, 2013; Phadungath, 2005).

El más antiguo, propuesto por primera vez por Schmidt (1982) es denominado modelo de submicelas (**Figura 1 A**). Este modelo considera que las micelas de caseína son partículas esféricas con una superficie rugosa, constituida por pequeñas submicelas con un diámetro entre 12-15 nm. Las submicelas contienen aproximadamente 20-25 moléculas de caseína con una composición variable (α_1 , α_2 , β , κ -CN) y presentan centros hidrofóbicos y superficies hidrofílicas. Se pueden diferenciar dos tipos de submicelas, unas que contienen α - y β -CN y otras formadas por α - y κ -CN, estas últimas más hidrofílicas debido a los residuos glucídicos de la κ -CN. Las distintas submicelas se encuentran unidas mediante fosfato cálcico (CCP). Las moléculas de κ -CN se encuentran orientadas hacia el exterior de la micela con la parte hidrofílica del grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie micelar en forma de vellosidad, constituyendo una “capa pilosa” que previene la agregación de la micela mediante un mecanismo de estabilización estérica y electrostática (Ferrandini et al., 2006).

Este modelo fue posteriormente modificado por Walstra (1987, 1999), en el que se sugiere que el CCP en lugar de situarse hacia el exterior de las submicelas y actuar como nexo de unión entre las mismas, más bien se localiza en el interior de las submicela (**Figura 1 B**).

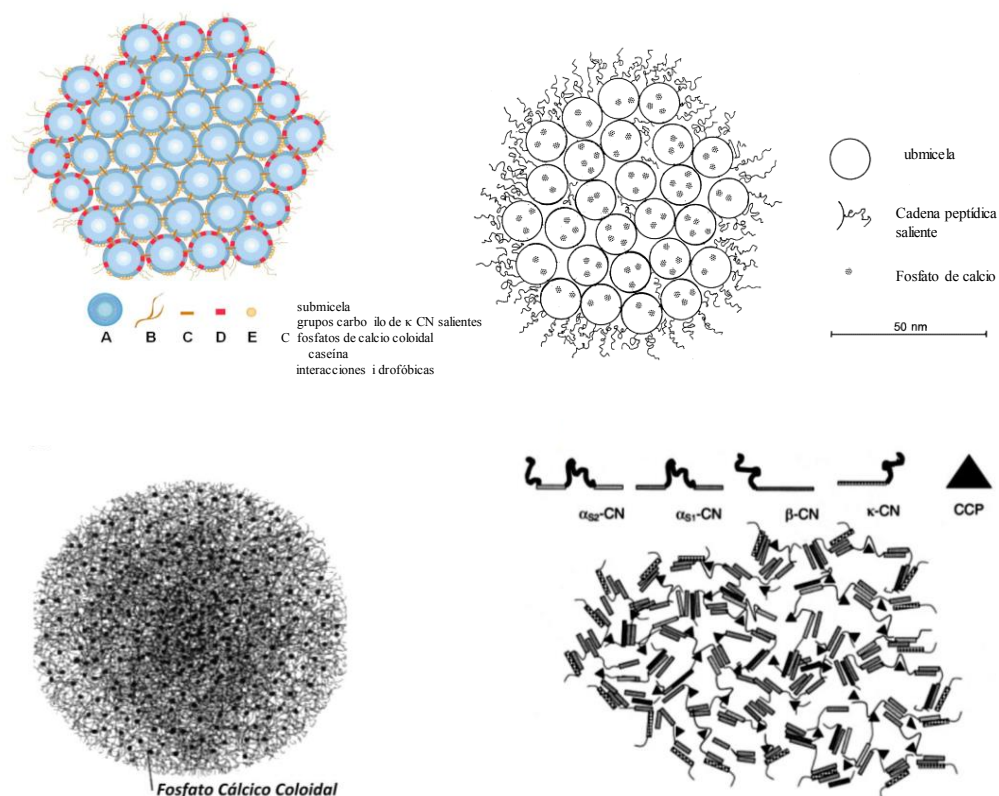


Figura 1. A) Modelo de submicela (Schmidt, 1982); B) Modelo de Walstra (Walstra, 1989, 1990); C) Modelo de Holt (Holt, 1992); D) Modelo de Horne (Horne, 1998).

Otro de los modelos (Holt, 1992) rechaza el concepto de submicela y describe la micela como un entramado flexible de caseína aproximadamente esférico y fuertemente hidratado y mineralizado (**Figura 1 C**). En este modelo, las moléculas de caseína forman una estructura gelatinosa con nanogránulos (nanoclusters) de CCP, donde el extremo C-terminal de la κ -CN se extiende hacia el exterior de la superficie micelar contribuyendo a la formación de la capa pilosa. Los nanogránulos constituyen el centro de crecimiento de la micela.

Y, por último, el modelo más reciente sugiere que hay un sistema de doble unión sobre las caseínas, donde las proteínas están unidas en las micelas mediante dos tipos de uniones diferentes (Horne, 1998) (**Figura 1 D**). Tiene lugar, así, un balance entre las interacciones hidrofóbicas atractivas y la repulsión electrostática. La fuerza hidrofóbica es esencial para la formación de las micelas, mientras que las fuerzas de repulsión limitan el tamaño de las micelas. Las agrupaciones de CCP consolidan la unión entre las caseínas neutralizando las cargas negativas de los residuos de fosfoserina y reduciendo la repulsión electrostática.

1.1.1. Caseinato de sodio

El caseinato de sodio (CasNa) es una mezcla de las cuatro caseínas (α_1 -, α_2 -, β - y κ -), el cual se produce a partir de leche descremada por: (1) acidificación a pH 4,6 (punto isoelectrico de las caseínas) para solubilizar el CCP, (2) lavado para eliminar las sales solubles, lactosa y proteínas de suero y (3) re-neutralización a pH 7 (Mulvihill, 1989). Si el aumento del pH se lleva a cabo mediante la adición de NaOH, es posible llegar a la obtención de CasNa, una de las formas más solubles de caseína. En estas condiciones, la estructura micelar original se destruye y el CasNa forma agregados o submicelas debido a la alta proporción de cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos que se autoasocian en soluciones acuosas (Farrell et al., 1990).

El calcio coloidal, que es parte del CCP, participa en la neutralización de los residuos de fosfoserina de las proteínas y en la unión de las caseínas (Rollema y Fox, 1992; Silva et al., 2013). La eliminación del calcio de la micela de caseína produce su disociación (Oakenfull et al., 1999), al menos parcialmente, y el CasNa resultante existe en solución principalmente como una mezcla de monómeros de caseína y agregados de tamaño variable de caseína.

Las partículas de CasNa surgen de un sistema de asociación-disociación reversible que contiene diferentes formas autoensambladas, con cantidades variables de ellas, la existencia de un equilibrio entre estas formas depende de la concentración, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de iones calcio, etc. (Vinceković et al., 2014). Las mediciones del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz indican que en soluciones de CasNa coexisten submicelas, con diámetro hidrodinámico de $17,8 \pm 1$ nm, y agregados supra-moleculares de 148 ± 4 nm (Chu et al., 1995). Otros autores también reportan distribuciones polimodales para soluciones de CasNa (HadjSadok et al., 2008; Müller-Buschbaum et al., 2007; Nash et al., 2002; Semenova et al., 2009), e incluso algunos reportan distribuciones monomodales con diámetros hidrodinámicos de alrededor de 200 nm (Belyakova et al., 2003; Dickinson et al., 2001; Loveday et al., 2013).

La estabilidad del CasNa está determinada, entre otras cosas, por la temperatura y el pH. Un ajuste del pH hacia el punto isoelectrico provoca una disminución de las interacciones repulsivas, lo que conduce a un aumento en la extensión y la fuerza de la agregación de las proteínas (Allen, Dickinson y Murray, 2006; Braga, Menossi y Cunha 2006; Lucey et al., 1997). Como consecuencia de ello, si la concentración de proteína es lo

suficientemente alta, dicha agregación puede conducir a la formación de un gel. Estas estructuras gelificadas juegan un rol importante en las propiedades reológicas/texturales de los alimentos, tales como elasticidad, resistencia y dureza (Foegeding, 2007).

El CasNa se emplea comúnmente como ingrediente en una gran variedad de productos alimenticios debido a su alto poder emulsionante, capacidad de retención de agua, propiedades de gelificación, propiedades epumantes y su estabilidad térmica (Chen et al., 2017; Fox y McSweeney, 2003; Hadjsadok et al., 2008; Kamath et al., 2011; Lazzaro et al., 2017). Estas propiedades se utilizan para mejorar las propiedades reológicas, de textura, estabilidad y apariencia de muchos productos alimenticios tales como carnes procesadas, queso, yogur y productos de confitería (Mulvihill y Fox, 1989).

1.2. Proteínas del suero

Durante la elaboración de quesos, luego de la coagulación enzimática de la caseína por el cuajo, se separa un líquido remanente llamado suero dulce. También existe el suero ácido, que es obtenido a partir de la producción de queso cottage y caseína ácida, luego de la coagulación ácida (Cayot y Lorient, 1996). Los dos tipos de suero tienen un contenido de proteínas que ronda los 6 g/l y dichas proteínas presentan propiedades funcionales específicas y un alto valor biológico, siendo por esto muy utilizadas como ingredientes en la industria alimentaria. En relación a su valor nutricional, incluso superan a las proteínas de huevo ya que se requieren 17,4 g de proteínas de huevo para satisfacer los requerimientos diarios de aminoácidos esenciales, mientras que sólo se requiere 14,5 g de proteínas del lactosuero para lograr el mismo fin (FAO/WHO, 1991; Lagrange, 1999). Este elevado valor biológico es una de las razones por las que los concentrados de suero se emplean también en formulaciones alimentarias infantiles (Martín Diana, 2001).

Por esta razón, estas proteínas se recuperan del suero y se comercializan como concentrados o aislados, dependiendo de la concentración proteica final. Las proteínas de suero representan el 20 % del total de las proteínas de la leche (**Tabla 2**) y están constituidas principalmente por β -lactoglobulina (β -lg) (50 %), α -lactoalbúmina (α -la) (20 %), caseinoglicomácopeptido (CMP) (15 %) (en el caso del suero dulce) y en menor proporción por albúmina sérica bovina (ASB), inmunoglobulinas y proteínas menores (Cayot y Lorient, 1996; de Wit, 1998; Martín Diana, 2001).

Tabla 2. Composición proteica del suero lácteo.

	COMPOSICIÓN PROMEDIO (g/l)	
	Suero Dulce	Suero Ácido
β -lactoglobulina	3,5	3,5
α -lactalbúmina	1,3	1,3
Sero albúmina	0,1	0,1
Inmunoglobulinas	0,4	0,4
Lipoproteínas	0,2	–
Proteosa-peptona	0,2	0,2
Caseinoglicomacropéptido	1	–
Proteína de suero total	6,7	5,5

Fuente: Oakenfull, Pearce y Burley (1997).

Además, numerosas investigaciones sugieren que las proteínas del suero son capaces de brindar diferentes beneficios nutricionales, biológicos y fisiológicos. Algunos de estos incluyen actividad antioxidante, mejora de la inmunidad de inmunodeprimidos, actividad anticancerígena, efectos antitumorales, efectos sobre la movilidad gastrointestinal, actividad bacteriostática, etc. (Brody, 2000; Choi et al., 2012; Demetriades, Bryant y McClements, 1998; El-Salam, El-Shibiny y Buchheim, 1996; Madureira et al., 2007; Thomä-Worringer, Sørensen y López-Fandiño, 2006).

En nuestro país el suero de queso se utiliza para preparar ricota, precipitando las proteínas por calentamiento en medio ácido. En este procedimiento se aprovechan solamente las propiedades nutricionales de las proteínas, ya que el procedimiento las desnatura, es decir que las proteínas se despliegan, pierden su estructura y por lo tanto también muchas de sus propiedades funcionales (Grasselli et al., 1997).

Las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son amplísimas. Los concentrados (WPC, por las siglas en inglés de whey protein concentrates) son obtenidos por técnicas de ultrafiltración. Durante este proceso las proteínas del suero no se desnaturizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas. También se encuentran los aislados de proteínas (WPI, por sus siglas en inglés de whey protein isolates) y proteínas aisladas como la α -la, β -lg, lactoferrina, CMP y otras inmunoglobulinas. Todos estos productos se obtienen por

técnicas suplementarias tales como la cromatografía de intercambio iónico y diafiltración, lo que permite concentrar aún más las proteínas hasta valores superiores al 90 %.

Los productos derivados del suero de queso son considerados como productos GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por las siglas en inglés de generally recognized as safe) por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA), y presentan un amplio rango de aplicaciones debido a su variada funcionalidad.

2. Caseinoglicomacropéptido

El péptido conocido como caseinomacropéptido (CMP) o caseinoglicomacropéptido, es un péptido heterogéneo de 64 aminoácidos que se forma en la primera etapa de coagulación enzimática de la leche durante la elaboración de quesos. En esta etapa la quimosina o renina ocasiona la ruptura del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆, de la κ -caseína (**Figura 2**), provocando la desestabilización de las micelas de caseína.

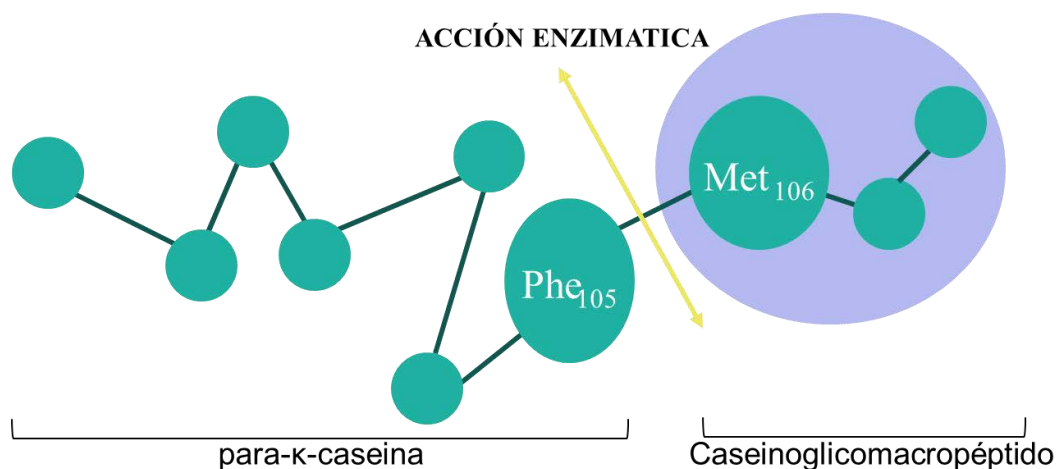


Figura 2. Acción de la quimosina sobre la κ -caseína.

De la ruptura de este enlace se originan dos polipéptidos: la para- κ -caseína (que comprende los residuos del 1-105), ligeramente catiónica a pH 6,6, hidrofóbica, poco soluble y que posee una estructura secundaria relativamente estable, y el CMP, polar, muy soluble y que contiene todas las modificaciones post-traduccionales de la κ -caseína de partida (fosforilación, glicosilación, etc.) y las variantes genéticas (Cherkaoui et al., 1997; Mikkelsen et al., 2005; Mollé y Leonil, 2005). El perfil de aminoácidos de este último y su contenido en azúcares lo hacen fuertemente polar, por lo que es eliminado

durante el desuerado con el suero de quesería, mientras que la para- κ -caseína pasa a formar parte de la masa del queso.

Se han descrito en la literatura muchos métodos para la obtención del CMP, en su mayoría patentados (Burton y Skudder, 1987; da Silva et al., 2009; Kawasaki et al., 1993a; Kreuß y Kulozik, 2009a; Saito et al., 1991; Silva-Hernández et al., 2002). La combinación de diferentes técnicas es la mejor forma de obtención del CMP (Tullio et al., 2007) y puede categorizarse en tres enfoques diferentes: (a) precipitación selectiva usando temperatura, alcohol, ácido acético, TCA, (b) filtración por membrana utilizando ultrafiltración (UF), diálisis, ósmosis inversa, electrodiálisis, y (c) adsorción selectiva usando cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de afinidad (AC).

Kreuß et al. (2009c) sugirieron un modelo teórico de estructura tridimensional de CMP con una gran parte del péptido que presenta una fuerte carga negativa, y tres pequeños dominios con carga positiva en el extremo N-terminal (**Figura 3**).

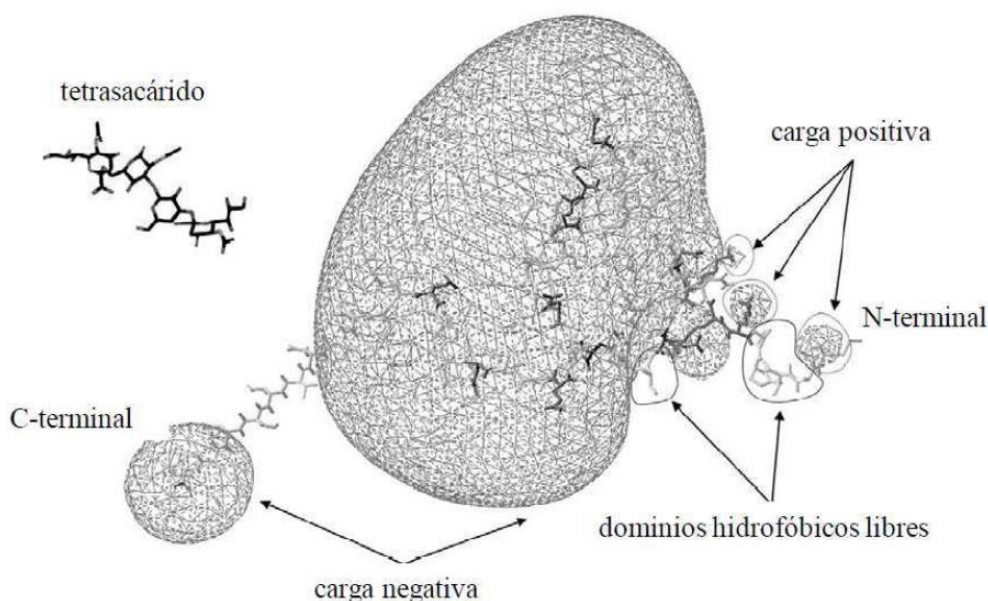


Figura 3. Estructura tridimensional del aCMP variante genética A y el gCMP (si se une al tetrasacárido) a pH 7 y fuerza iónica nula. Se indican las zonas C- y N-terminal y los dominios hidrofóbicos libres (Kreuß et al., 2009c).

Además, se ha reportado que el CMP es un péptido intrínsecamente desordenado sin una estructura secundaria o terciaria definida (Ono et al., 1987) y que su conformación se modifica con cambios en la fuerza iónica, el pH y la presencia de otras moléculas.

EL CMP es significativamente rico en los aminoácidos Pro, Glu, Ser y Thr, pero con bajo contenido en Trp, Tyr, Phe y Cys (**Figura 4**). De los tres aminoácidos de cadena ramificada, Leu, Ile y Val, el CMP es rico en Ile y Val.

La κ -caseína bovina existe, generalmente, en dos variantes genéticas, A y B, que difieren en dos aminoácidos: en la posición 136 la variante A posee treonina y la B isoleucina, mientras que en la 148, la A posee un residuo de ácido aspártico y la B alanina (**Figura 4**). La variante A tiende a ser la más frecuente en la mayoría de las razas. Lo mismo ocurre en el CMP, ya que las 2 posiciones mencionadas corresponden a la secuencia del CMP.

A pesar de la existencia de diferentes variantes genéticas, la principal causa de heterogeneidad del CMP la constituye el grado de glicosilación y fosforilación. Los carbohidratos se unen a la κ -CN en las posiciones Thr131, 133, 135, 142 y Ser141 a través de enlaces de O-glicosilación (Eigel et al., 1984). Estas posiciones se localizan principalmente en el centro del esqueleto peptídico.

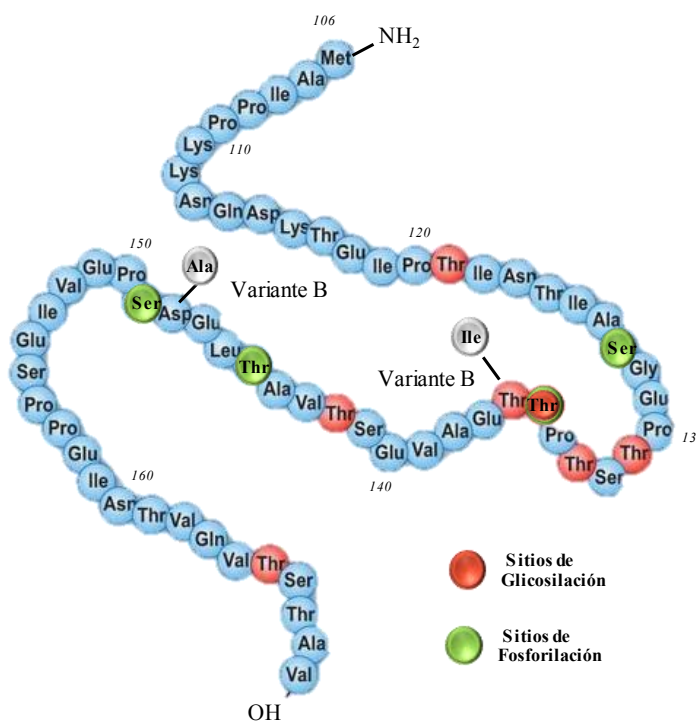


Figura 4. Estructura primaria de la variante genética A del CMP (Eigel et al. 1984). Los aminoácidos en gris son los sitios correspondientes a diferencias en la variante B. Los números en cursiva indican la secuencia de aminoácidos en base a la κ -caseína. Se señalan los sitios de glicosilación y fosforilación en color rojo y verde, respectivamente (Brody, 2000).

Las cadenas heterogéneas de carbohidratos son las características únicas del CMP, que no se encuentran en la parte restante de κ -CN (1 a 105). La distribución de las cadenas de

monosacárido, disacárido, trisacárido y tetrasacárido es de 0,8 %, 6,3 %, 18,4 % y 56 %, respectivamente, según fue determinado por HPLC (Saito et al., 1991). Mollé et al. (1995), utilizando espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI-MS) descubrieron que, de cinco sitios potenciales de glicosilación, un máximo de tres se sustituye con cadenas de carbohidratos altamente glicosiladas que pueden contener residuos de ácido N-acetil neuramínico (NeuNAc). El CMP es particularmente rico en diferentes formas de ácido siálico que derivan del ácido neuramínico sustituido, y las principales formas representativas del ácido siálico son NeuNAc y ácido N-glicolilneuramínico (Salcedo et al., 2011). En base a la glicosilación, el CMP puede clasificarse en dos fracciones principales: el glicopéptido glicosilado y fosforilado (gCMP), y el aglicopéptido no glicosilado pero fosforilado (aCMP) (Kreuß et al., 2009 c). Se han identificado catorce formas glicosiladas del CMP (Mollé, 1995).

El calentamiento de la leche o suero de leche antes del aislamiento del CMP tiene una influencia en el grado de glicosilación del CMP aislado; un mayor calentamiento produce un CMP con menos glicosilación (Taylor y Woonton, 2009).

Muchas de las propiedades biológicas y funcionales de CMP se han atribuido al ácido siálico (Li y Mine, 2004), tanto a la naturaleza del mismo como a su contenido (Tran et al., 2001).

Con respecto al grado de fosforilación, de los tres sitios de fosforilación, sólo dos son conocidos: las ser 127 y 149 (**Figura 4**) (Brody, 2000; Dziuba y Minkiewicz, 1996; Yuleiys et al., 2002). El tercer grupo fosfato presenta dos aceptores potenciales: las Thr 135 y 145. Algunos estudios han reportado la presencia de una forma difosforilada del CMP que posee una sola cadena del tetrasacárido. La poca abundancia de cadenas di y trifosforiladas, indica que la multifosforilación inhibe drásticamente la capacidad de la molécula de κ -caseína de glicosilarse. Posiblemente esto se debe a que los sitios de glicosilación y fosforilación se encuentran situados en un corto segmento de apenas 20 aminoácidos (Mollé, 1995).

Debido a la heterogeneidad en el grado de glicosilación y fosforilación, el CMP no tiene un único punto isoeléctrico (pI) (Cherkaoui et al., 1997; Lieske et al., 2004; Silva-Hernández et al., 2002). Mediante cromatografía de intercambio aniónico, Nakano y Ozimek (2000) reportaron que todas las formas gCMP presentaban un pI < 3,8. Kreuß et al. (2009 c), mediante electroforesis láser doppler y medición del potencial zeta, encontraron que el pI de gCMP y aCMP era 3,15 y 4,15, respectivamente. Estos valores de pI relativamente ácidos fueron relacionados con la gran cantidad de cadenas laterales

de aminoácidos ácidos (Glu y Asp) y con la presencia del ácido siálico, en la fracción glicosilada, que tiene un valor de pKa relativamente bajo (2,2).

Mediante cromatografía líquida (ESI-MS), Mollé y Léonil (2005) observaron que la forma aCMP presentaba una masa molecular entre 6755 y 6787 Da dependiendo de la variante genética de κ -CN de la que derivó, mientras que la masa molecular media del gCMP era de aproximadamente 7500 Da y la más alta de hasta 9631 Da, que correspondía a una forma altamente glicosilada. Otros autores sugirieron que la masa molecular del aCMP y del estado de máxima glicosilación de gCMP difiere de 7000 Da a 11000 Da con una contribución global de 36,4 % en peso molecular de glicanos (Kreuz et al., 2009a). El comportamiento del CMP en SDS-PAGE indicó que el péptido se encuentra en forma polimérica con un peso molecular de 20,9 kDa cuando es aislado por precipitación con ácido tricloroacético, posterior tratamiento con etanol-éter y resuspensión en buffer Tris-HCl a pH 7,2 (Galindo-Amaya et al., 2006). En relación al estado de asociación del CMP en solución, Kawasaki et al. (1993 a) obtuvieron una forma monomérica del CMP de 9 kDa a $\text{pH} \leq 4$ y una forma polimérica de 45-50 kDa a pH mayor que 4. Por el contrario, Nakano y Ozimek (1998) utilizando cromatografía en gel sugirieron que el CMP es un agregado de tres monómeros, y que el peso molecular no fue afectado por cambios en el pH. Estas diferencias pueden estar relacionadas a los procedimientos utilizados en la aislación del CMP.

En nuestro grupo de trabajo se comprobó que el estado de asociación del CMP es altamente dependiente del pH (Fariás et al., 2010). Mediante determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz, se determinó que a $\text{pH} \geq 6$ el CMP se encuentra como monómero, a $\text{pH} < 6$ se forman dímeros, trímeros y tetrámeros y a $\text{pH} < 4,5$ se encuentra inicialmente en forma polimérica, pero se observa un autoensamblaje espontáneo con el tiempo que finalmente puede conducir a la formación de geles. En dicho trabajo se comprobó además que las estructuras autoensambladas formadas a temperatura ambiente son parcialmente reversibles al aumentar el pH (Fariás et al., 2010).

2.1. Actividades biológicas del CMP

Las actividades biológicas del CMP han sido muy estudiadas en los últimos años (Aimutis et al., 2004; Brody, 2000; Daliri et al., 2017; Dziuba y Minkiewicz, 1996; El-Salam et al., 1996; Manso y López Fandiño, 2004; Park y Nam, 2015; Robitaille et al., 2012; Thomä-Worringer et al., 2006). Entre ellas se pueden destacar:

Actividad antitrombótica: Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la κ -CN bovina y fundamentalmente el fragmento f(106-116) son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (Jollés et al., 1986), ya que dichas secuencias peptídicas de la κ -CN, denominadas casoplatelinas son similares a la cadena γ del fibrinógeno (Caen et al., 1992). La característica estructural similar entre la cadena γ del fibrinógeno y las casoplatelinas, responsable de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de los aminoácidos Ile, Lys y Asp en las posiciones 108, 112 y 115, respectivamente (Fiat y Jollés, 1989).

Actividad quelante de metales: La mayoría de los caseinofosfopéptidos, como es el caso del CMP, contienen una secuencia con tres grupos de fosfoserina seguida de dos glutámicos. Las cadenas laterales negativas, en particular las de los grupos fosfato son las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Sato et al., 1986). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseinofosfopéptidos (Schlimme y Meisel, 1995). Estos péptidos ejercen efectos en la absorción del calcio y de otros elementos traza en el intestino, además de inhibir la caries mediante la recalcificación dental (Reynolds, 1987). Por ello, dichos péptidos podrían emplearse como suplementos dietéticos y preparaciones farmacéuticas en el tratamiento de alteraciones dentales o para mejorar la mala absorción mineral (Brule et al., 1982). Por otro lado, Kelleher et al. (2003) hallaron que suplementando una fórmula para monos lactantes con CMP aumentó la absorción de Zinc, permitiendo una reducción en la fórmula de este mineral.

Actividad antimicrobiana: Mediante estudios *in vitro*, se ha comprobado que el CMP inhibe la adhesión de varias bacterias, virus y toxinas, incluyendo el virus de la influenza y el *Vibrio cholerae* causante de la toxina del cólera, uniéndose a los sitios receptores en la membrana del patógeno (Kawasaki et al., 1992, 1993b).

Brück et al. (2003) reportaron que la suplementación de una fórmula infantil con α -la y CMP tiene un efecto potencial en la microflora humana y observaron una significativa reducción de *Salmonella* con ambos sustratos.

La inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas patógenas tiene lugar por la acción de fragmentos de las caseínas. El efecto antimicrobiano de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos. Un

gran porcentaje de los aminoácidos constituyentes son básicos y entre ellos forman un bucle en forma de α -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang et al., 1996), que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (Agawa et al., 1991), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Bellamy et al., 1992).

Otras actividades biológicas: Otras actividades biológicas de interés en la aplicación dietética y farmacéutica ejercidas por el CMP incluyen la inhibición de la secreción ácida de gastrina y de la motilidad gastrointestinal (Fiat et al., 1993), así como la inducción de la producción de colecistoquinina en ratas, hormona relacionada con la saciedad (Requena et al., 2009). Además, se han realizado estudios preliminares que demostraron este mismo efecto en el hombre (Corring et al., 1997).

El contenido de ácido siálico también otorga bioactividad, ya que se encuentra involucrado en interacciones intermoleculares e intercelulares, y en la diferenciación y proliferación celular incluyendo la carcinogénesis. Existen evidencias en animales, que indican que el ácido siálico exógeno influye en el crecimiento del cerebro y en la habilidad de aprender (Wang et al., 2001). Las membranas de las neuronas contienen 20 veces más ácido siálico que otro tipo de membranas. Como los neurotransmisores tienen carga positiva, el ácido siálico de carga negativa asiste a la neurotransmisión facilitando la unión de las moléculas a la membrana sináptica (Wang et al., 2001).

También cumple un rol beneficioso en la modulación de la microflora, ya que este macropéptido es promotor del crecimiento de bifidobacterias (*Bifidobacterium breve*, *B. Bifidum*, *B. Infantis* tanto como *Lactococcus lactis*) debido a su contenido de grupos glicosilados (Idota et al., 1994; Manso y López Fandiño, 2004).

Otra particularidad del CMP es que tiene poca cantidad del aminoácido metionina, lo que lo hace un ingrediente útil para pacientes con problemas hepáticos. Además, el hecho de que el CMP no tiene fenilalanina en su composición aminoacídica, lo hace adecuado para la nutrición para pacientes con fenilcetonuria. La ventaja que ofrece el CMP sobre los otros preparados de aminoácidos sintéticos para fenilcetonúricos es que éstos carecen de sabor y propiedades funcionales (Marshall, 1991; Ney et al., 2008). Sin embargo, el alto contenido de Thr puede causar hipertreoninemia (Rigo et al., 2001).

Todas las actividades biológicas mencionadas explican el interés de la incorporación del CMP en alimentos. Sin embargo, para ello es muy importante, además, conocer sus propiedades funcionales.

2.2. Propiedades funcionales del CMP

El término funcionalidad, que es aplicado a ingredientes alimenticios, ha sido definido como “cualquier propiedad más allá de los atributos nutricionales que influencia la utilidad de un ingrediente en los alimentos” (Pour-El, 1981). Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con sus propiedades físicas, químicas y conformacionales, como su tamaño, forma, composición y secuencia aminoacídica, carga y distribución de carga (Boye, Ma y Harwalkar, 1997). El comportamiento funcional de las proteínas del suero está definido por la manera en la cual las proteínas interactúan con otros componentes de un alimento, tales como azúcares, lípidos, sales y otras proteínas. Estas propiedades también están afectadas por otros factores tanto intrínsecos, extrínsecos como los efectos producidos durante su procesamiento (**Tabla 3**).

Tabla 3. Factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (adaptado de de Wit, 1998).

<i>FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES</i>	
<i>Factores Extrínsecos</i>	Temperatura pH Sales Concentración
<i>Factores Intrínsecos</i>	Composición Carga neta Hidrofobicidad
<i>Componentes del alimento</i>	Lípidos Hidratos de carbono Sales Proteínas
<i>Efectos del procesamiento</i>	Homogeneización Calentamiento Congelación Almacenamiento

El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para deducir y controlar las propiedades funcionales.

Las proteínas del suero son muy usadas como ingredientes en alimentos debido a sus propiedades funcionales únicas: gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavour (Cayot y Lorient, 1996; de Wit, 1998; Ennis y Mulvihill, 2000), entre otras.

El CMP, uno de los constituyentes de mayor proporción de las proteínas del suero luego de la β -lg y α -la (**Tabla 2**), es una molécula altamente hidrofílica, soluble en agua aún a bajo pH (Chobert et al., 1989). Según Kreuz et al., (2009c) la solubilidad de las dos fracciones (aCMP y gCMP) es del 100 % en un amplio rango de pH (entre 2 y 10). Al igual que las propiedades biológicas, las propiedades funcionales se ven igualmente afectadas por la glicosilación del CMP. Entre sus propiedades funcionales más importantes se encuentran la gelificación y las propiedades interfaciales, espumantes y emulsionantes.

2.2.1. Gelificación

Las proteínas se utilizan como ingredientes funcionales en muchos alimentos debido a su capacidad para hacer que la fase acuosa gelifique (por ejemplo, yogures, quesos, postres, huevos y productos cárnicos) (Clark y Lee-Tuffnell, 1986; Morris, 1986; Ziegler y Foegeding, 1990). La formación de gel imparte atributos texturales y sensoriales deseables. La gelificación proteica puede ser promovida por temperatura, cambios en el pH, presencia de sales (por ejemplo, adición de iones Ca^{+2} en micelas de caseína), hidrólisis enzimática moderada, altas presiones, etc. La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua (Hermansson, 1988).

El tipo de interacción que mantiene a las moléculas juntas en los geles varía de biopolímero a biopolímero. Algunas proteínas y polisacáridos forman zonas de unión helicoidal a través de una formación extensa de enlaces de hidrógeno (por ejemplo, gelatina y gomas) (Dea, 1982; Ledward, 1986; Morris, 1986). Este tipo de zona de unión tiende a formarse cuando un gel se enfría y se interrumpe cuando se calienta y, por lo tanto, es responsable de los geles de fijación en frío. Por debajo de la temperatura de

gelificación, los enlaces de hidrógeno atractivos favorecen la formación de la zona de unión, pero por encima de esta temperatura, la entropía configuracional favorece una estructura de tipo bobina aleatoria. Los biopolímeros con grupos no polares tienden a asociarse mediante interacciones hidrófobas (por ejemplo, caseínas o proteínas de suero desnaturalizadas) (Ziegler y Foegeding, 1990).

El hecho de que un gel sea reversible o irreversible depende del tipo de enlaces que mantienen juntas las moléculas de biopolímero, así como de cualquier cambio en la estructura molecular y organización de las moléculas durante la gelificación. Los geles de biopolímero que se estabilizan mediante interacciones no covalentes y que no implican grandes cambios en la estructura de las moléculas individuales antes de la gelificación, tienden a ser reversibles. Por otra parte, los geles de biopolímeros que se mantienen unidos por enlaces covalentes, o que implican grandes cambios en la estructura de las moléculas individuales antes de la gelificación, tienden a formar geles irreversibles. Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la determinación del comportamiento de gelificación de muchos biopolímeros, por lo que la gelificación es particularmente sensible al pH y a la fuerza iónica (McClements y Keogh, 1995). Por ejemplo, a valores de pH lo suficientemente alejados de su punto isoeléctrico, se puede impedir que las proteínas gelifiquen debido a la fuerte repulsión electrostática entre las moléculas; sin embargo, si el pH se ajusta cerca del punto isoeléctrico, o si se añade sal, las proteínas tienden a agregarse y formar un gel (Mulvihill y Kinsella, 1987, 1988). La adición de iones multivalentes, tales como Ca^{2+} , puede promover la gelificación de moléculas de biopolímero cargadas formando puentes salinos entre las moléculas (Morris, 1986; Mulvihill y Kinsella, 1988). Las proteínas con grupos tiol son capaces de formar enlaces covalentes a través de intercambios tiol-disulfuro, que ayudan a fortalecer y mejorar la estabilidad de los geles (Mulvihill y Kinsella, 1987). La tendencia de un biopolímero a formar un gel bajo ciertas condiciones y las propiedades físicas del gel formado dependen de un delicado equilibrio de diversos tipos de interacciones biopolímero-biopolímero, biopolímero-disolvente y disolvente-disolvente.

La esencia del proceso de gelificación es sin duda el punto gel, es decir el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requerimientos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del rango de la respuesta lineal, debe proveer magnitudes

físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica (Pilosof, 2000).

En la literatura existen datos contradictorios en relación a la capacidad de gelificación del CMP. Burton y Skudder (1987) obtuvieron un gel a partir de una solución de CMP a una concentración de 9,3 % (p/p) a pH 4,5 y 20 °C, pero esta solución no gelificó cuando fue calentada a mayor temperatura (90 °C). Sin embargo, Marshall (1991) estudiando las mismas condiciones no reprodujo esos resultados. Ahmed y Ramaswamy (2003) reportaron la gelificación de una solución de CMP al 12,5 % (p/p) a 80 °C y pH 7. Estudios realizados con diferentes concentrados de suero comerciales (15 % p/v, pH 7) (Veith y Reynolds, 2004) revelaron que la presencia de CMP fue perjudicial en la fuerza de gel y la capacidad de retención de agua, ya que el CMP no se incorporó a la red de proteínas y compitió con las otras proteínas del suero por el agua. Sin embargo, Martin-Diana, Peláez y Requena (2004) investigaron las propiedades reológicas de leche fermentada de cabra suplementada con CMP (pH 4,6) y concluyeron que la adición de CMP incrementó la estabilidad, redujo el ángulo de fase y resultó en un gel más ordenado y estructurado comparado con geles hechos con concentrado de suero proteico. El CMP presumiblemente actuó como puente interconectando las micelas de caseína, acercando así las estructuras y favoreciendo el cross-linking interno. Estos resultados contrapuestos posiblemente estén relacionados con el origen y la forma de obtención del CMP.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación describió por primera vez el fenómeno de autoensamblaje del CMP a pH menor a 4,5, que lleva a una gelificación espontánea a temperatura ambiente con el tiempo (Farías et al., 2010). Se postuló un modelo en dos etapas (**Figura 5**) para explicar dicho proceso:

pH \geq 6,5, se encontró, mediante la determinación del tamaño de partícula, que el CMP está presente en forma monomérica y que no se autoensambla en el tiempo a temperatura ambiente, ni tampoco bajo calentamiento. Esto se debe a que en estas condiciones de pH la mayoría de los dominios hidrófobos (que contienen Val, Pro, Ile, Ala y Met) no pueden interactuar, ya que están enmascarados por una fuerte densidad de carga negativa de los Glu y Asp (Kreuß et al., 2009c). Este efecto es más pronunciado aún para gCMP debido a la carga negativa de los residuos de ácido siálico.

A pH menor a 6,5, se observó una fuerte disminución del valor absoluto del potencial zeta hasta el pI (Kreuß et al., 2009c) debido a un aumento de la protonación de las cadenas de aminoácidos acídicos. Por lo tanto, el apantallamiento por las cargas negativas comienza

a disminuir permitiendo que el dominio hidrofóbico terminal (AA 1–5), que no está apantallado por carga negativa, interactúe primero, seguido por dominios hidrofóbicos ubicados en el centro de la cadena peptídica. De esta forma, por acidificación a temperatura ambiente se produciría la primera etapa del autoensamblaje del CMP para formar dímeros (Etapa I de la **Figura 5**).

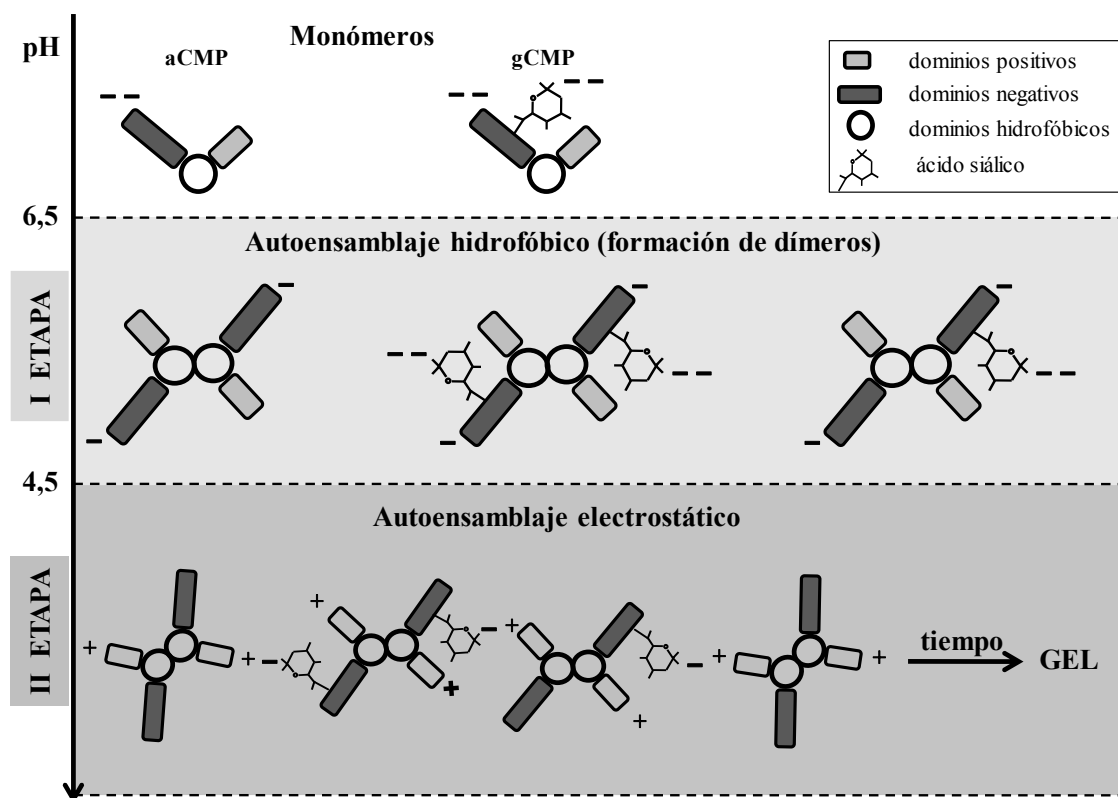


Figura 5. Esquema del modelo propuesto para explicar el autoensamblaje dependiente del pH del CMP y la formación de una estructura tipo red (gel) a temperatura ambiente (Fariás et al., 2010).

La segunda etapa de autoensamblaje ocurriría a pH menor a 4,5 por medio de interacciones electrostáticas entre dímeros de aCMP con carga positiva neta y dímeros cargados negativamente de gCMP, o dímeros mixtos aCMP-gCMP (Etapa II de la **Figura 5**). A pH 4, el aCMP alcanza su pI, mientras que el gCMP se encuentra en su estado isoeléctrico a pH 3,15 (Kreuß et al., 2009c). Sin embargo, debido al bajo pKa de los residuos de ácido siálico (2,2), a pH cercanos a 2,0 podrían permanecer aún cargas negativas locales, permitiendo la interacción con cargas positivas. Así en el rango de pH entre 2 y 4,5, el autoensamblaje podría proceder mediante fuerzas electrostáticas para formar geles con el tiempo a temperatura ambiente (Etapa II de la **Figura 5**).

Se encontró, además, que la temperatura acelera la gelificación del CMP (Martinez et al., 2011), debido al aumento de la velocidad del primer paso del autoensamblaje descrito en la **Figura 5** mediado por interacciones hidrofóbicas, ya que éstas se ven favorecidas a altas temperaturas.

Adicionalmente, dado que el autoensamblaje del CMP ocurre a temperatura ambiente en forma espontánea a $\text{pH} < 4,5$, se estudió si este proceso era capaz de revertir al aumentar el pH por encima de 4,5 (Fariás et al., 2010). Para evaluar la reversibilidad por pH del autoensamblaje del CMP se analizaron las distribuciones de tamaños de partículas del CMP antes del autoensamblaje ($\text{pH} 7,0$), durante el autoensamblaje a $\text{pH} 3,5$ y luego al retornar el pH a 7,0. Ellos observaron que cuando se ajustó el pH a 3,5 el tamaño de partícula aumentó rápidamente con el tiempo, debido al autoensamblaje del CMP y cuando fue restaurado a $\text{pH} 7$ este tamaño decreció rápidamente hasta alcanzar un valor cercano al inicial. Sin embargo, se observó que la población predominante de la muestra luego de la reversión por pH se desplazó hacia tamaños mayores, desde 2,3 a 3,6 nm, lo cual correspondería a las formas monomérica y dimerica del CMP, respectivamente (calculadas a partir del software del Zetasizer Nano-Zs). Se concluyó entonces, que la reversibilidad del autoensamblaje del CMP mediante el aumento de pH no fue total ya que luego de revertir la asociación obtenida a $\text{pH} 3,5$ no se encontró la forma monomérica, lo cual indicó la estabilidad de la forma dimérica del CMP una vez formada.

2.2.2. Propiedades interfaciales

Muchos alimentos naturales o procesados son dispersiones o han consistido en una dispersión durante alguna de las etapas de su producción. La mayoría de estas dispersiones son emulsiones y espumas (Dickinson, 1992; McClements, 2015). Las dispersiones alimentarias no se forman espontáneamente, sino que se requiere el aporte de una gran cantidad de energía mecánica para incrementar el área interfacial de las gotitas de una emulsión o de las burbujas de una espuma. Esta energía libre es proporcional a la tensión superficial o interfacial. Pero, además, las dispersiones son termodinámicamente inestables. Sin embargo, desde un punto de vista práctico es posible producir una dispersión cinéticamente estable (o metaestable) por un período de tiempo, que es el requerido para cada producto en cuestión. Para ello, es necesario incluir en la formulación determinadas sustancias conocidas como emulsionantes o agentes espumantes llamados tensioactivos (Dickinson, 2005; McClements, 2015). Los tensioactivos son sustancias con actividad interfacial debido a que sus moléculas son

anfifílicas (tienen una parte polar y otra no polar). El mecanismo de acción de los tensioactivos consiste en lograr que se sitúen en la interfase aire/agua o aceite/agua, a través de su migración desde el seno de cada fase. Debido a su estructura química, las moléculas de tensioactivo tienden a orientarse en la interfase de forma que los grupos hidrofílicos estén localizados en la fase acuosa y la parte hidrófoba (lipófila) en la fase oleosa o gaseosa, respectivamente (Rodríguez Patino et al., 1990; McClements, 2015; Maldonado-Valderrama, 2006), disminuyendo la tensión interfacial (γ) y facilitando la formación del sistema disperso de interés (Dickinson, 2009; Guzey y McClements, 2006). El descenso de γ se suele expresar en términos de la presión interfacial (π)

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

iendo γ_0 la tensión interfacial del solvente puro y γ el valor de la tensión interfacial en presencia del tensioactivo.

En formulaciones de alimentos se incluyen dos categorías de tensioactivos (Wilde, 2000):

- i) Surfactantes o tensioactivos de bajo peso molecular: detergentes, fosfolípidos y lípidos. Son solubles en agua o aceite, y normalmente forman una película compacta con baja tensión interfacial.
- ii) Biopolímeros: macromoléculas anfifílicas, principalmente proteínas, aunque también incluye algunos polisacáridos o hidrocoloides. Estos polímeros forman una película viscoelástica irreversible.

Ambos grupos de sustancias tensioactivas suelen coexistir en la película interfacial presentando funciones específicas en el procesado y las propiedades del producto final. El empleo óptimo de ellas depende del conocimiento que se tenga de sus propiedades fisicoquímicas interfaciales (actividad interfacial, cantidad adsorbida, estructura, espesor, estabilidad, movilidad lateral, interacciones entre las moléculas adsorbidas, capacidad de cambiar la conformación, propiedades reológicas interfaciales, etc.). También es importante conocer la cinética de formación de la película y otras propiedades fisicoquímicas en las interfases fluidas.

La cinética de adsorción de un tensioactivo en la interfase aire/agua (o aceite/agua) puede ser evaluada a partir de la variación de la tensión interfacial con el tiempo. En la **Figura 6** se muestra, a modo de ejemplo, un esquema de las etapas de la cinética de adsorción para el caso de una proteína (Graham y Phillips, 1979; MacRitchie, 1990; Tornberg, 1978) y la variación de la tensión interfacial en cada etapa: (i) difusión de la proteína

desde el seno de la fase acuosa hacia la interfase aire/agua o aceite/agua; durante los primeros instantes se produce un aumento de la densidad interfacial que no va acompañado de una disminución de la tensión interfacial; (ii) adsorción (penetración) y desplegamiento interfacial; una vez que se ha alcanzado un cierto recubrimiento interfacial se produce una brusca disminución de la tensión interfacial que se debe, no sólo a la difusión de las moléculas desde la solución a la interfase, sino también a la reorganización estructural que sufren las moléculas adsorbidas (reacomodamiento de grupos polares hacia la fase acuosa y de los no polares hacia la fase oleosa o aire) y (iii) agregación (reordenamiento) en la interfase; una vez que la interfase se encuentra saturada por la proteína se alcanza un valor de tensión constante.

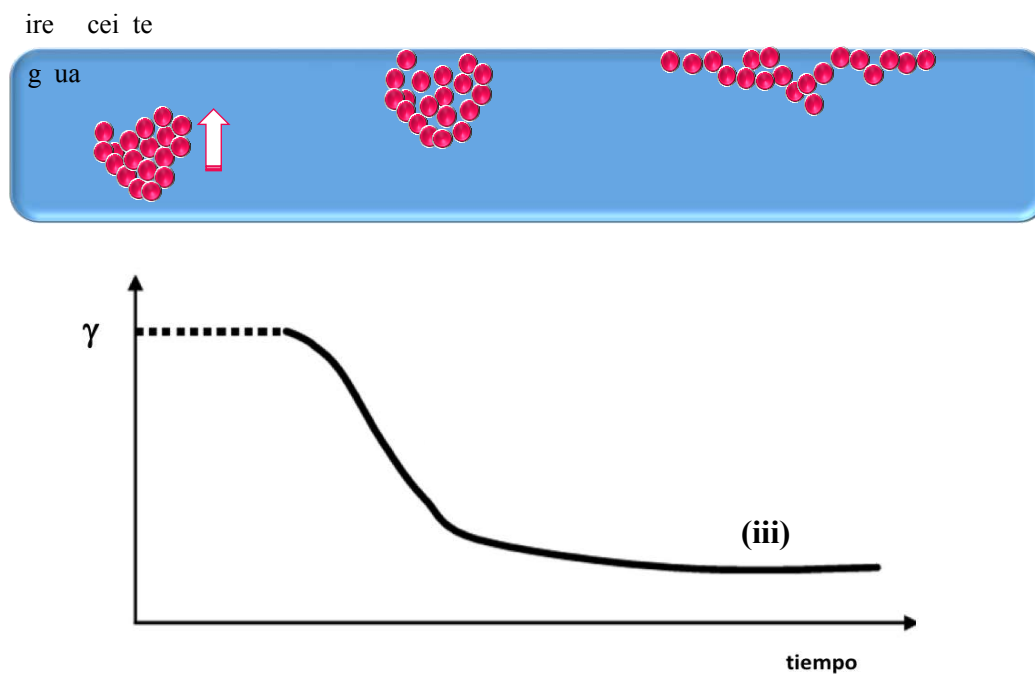


Figura 6. A) Procesos de adsorción: (i) difusión de la proteína hacia la interfase; (ii) penetración de la proteína en la interfase; (iii) reordenamiento de la proteína en la interfase. B) Variación de la tensión interfacial durante el tiempo de adsorción de una proteína a la interfase aire/agua o aceite/agua.

Sin embargo, experimentalmente se observa que la tensión entra en una fase de disminución muy lenta, debido a diversos fenómenos que tienen lugar en la región interfacial, como el desplegamiento gradual de los biopolímeros, agregación de proteínas, e incluso gelificación interfacial (Beverung, Radke y Blanch, 1999; Freer et al., 2004).

Las moléculas de tensioactivo tienden a acumularse en la interfase formando películas monomoleculares llamadas monocapas. En la **Figura 7** se esquematiza la conformación que pueden presentar algunas moléculas de tensioactivo en la interfase aire/agua (o aceite/agua) dependiendo del tipo de estructura que presentan: (i) los tensioactivos de bajo peso molecular forman monocapas con un alto grado de empaquetamiento en la interfase, lo que los hace muy efectivos en reducir la tensión interfacial; (ii) los biopolímeros flexibles, tales como las caseínas, se ubican en la interfase en una forma expandida, con segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos incluidos en la fase aire y agua, respectivamente, en forma de lazos y colas, y (iii) las sustancias tensioactivas de alto peso molecular con estructura compacta (tales como las proteínas globulares) pueden cambiar considerablemente su conformación en la interfase inmediatamente después de la adsorción (Bos y Van Vliet, 2001). Tales cambios conformacionales pueden ser vistos como una desnaturalización interfacial de la proteína en la que sus residuos hidrofóbicos se orientan hacia la fase aire o aceite y los hidrofílicos hacia la acuosa (Dalglish, 1996).

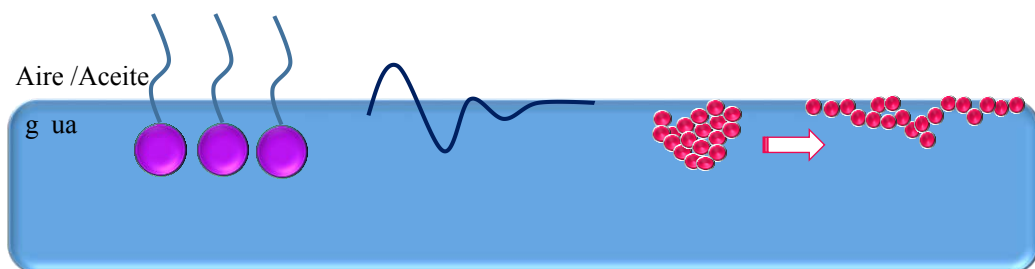


Figura 7. Conformación de moléculas tensioactivas en interfases aire/agua (o aceite/agua): (i): tensioactivos de bajo peso molecular, (ii): biopolímeros flexibles y (iii): proteínas globulares.

Adaptado de Bos y Van Vliet (2001).

Además, las moléculas de proteína también pueden cambiar su conformación, luego de la adsorción, en respuesta a las condiciones del medio como pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa (Damodaran, 1996; McClements, 2015). La velocidad a la que la conformación de una proteína cambia en la interfase depende de su estructura molecular (Dickinson, 1992). Las moléculas más flexibles pueden alterar rápidamente su conformación, mientras que las moléculas más rígidas, de conformación globular, cambian más lentamente.

En mezclas proteína-proteína, la adsorción es más compleja, ya que puede existir competencia, incompatibilidad o interacción de diferentes tipos entre las moléculas de

proteína en el seno de la fase y en la interfase aire/agua o aceite/agua (Damodaran, 2004; Damodaran y Sengupta, 2003; Dickinson y Matsumura, 1991; Mackie et al., 2001; Sengupta y Damodaran, 2000; Xu y Damodaran, 1994).

Por otro lado, el conocimiento de la reología interfacial de las películas que se forman en las interfases es importante en relación a la estabilización de espumas y emulsiones (Dickinson (1999) y Wilde (2000)). Las propiedades viscoelásticas de las películas interfaciales han sido correlacionadas con la funcionalidad (Halling, 1981; Kim y Kinsella, 1985; Nakai, 1983; Phillips, 1981). Por otro lado, Rodríguez Patino et al. (2002) afirman que la estructura de una película, que es una consecuencia de la existencia de interacciones entre las moléculas que la componen, determina las propiedades reológicas de la misma. Es decir, que las características reológicas interfaciales son muy sensibles a la existencia de esas interacciones entre las moléculas presentes en la interfase y entre las moléculas de la interfase y las de la subfase (Murray, 2002).

Con respecto a las propiedades interfaciales, el CMP ha demostrado ser un péptido con una buena actividad superficial (Martinez et al., 2009 a; Martinez et al., 2013). Ha sido descrito y caracterizado su comportamiento en interfases aire/agua (A/W) a diferentes concentraciones de CMP (0,01-4 % p/p) y diferentes condiciones de pH (5 y 7) (Martinez et al., 2009). Los resultados de dicho trabajo indicaron que la presión interfacial es función tanto de la concentración como de la conformación de la proteína en la interfase W , y reportaron mayores valores de π a mayor concentración de CMP y a pH 7. icio comportamiento fue atribuido al menor tamaño de partícula que presenta el CMP a pH 7, lo que promueve un aumento de su velocidad de migración a la interfase. Por otro lado, dichos autores reportaron una disminución de la velocidad de reordenamiento con el aumento de la concentración de CMP, lo que fue atribuido a la existencia de una restricción estérica debido a la mayor carga proteica en la interfase. A partir de dichos resultados, estos autores concluyeron que el CMP (a altas concentraciones y a pH 7), migra rápidamente a la interfase A/W; sin embargo, esta rápida ocupación restringiría el despliegue en la interfase y su reordenamiento, dando como resultados valores de elasticidad (E) de la película interfacial inferiores a los obtenidos a concentraciones menores.

Kreuß et al. (2009 c) estudiaron las propiedades interfaciales aceite/agua (O/W) de ambas fracciones de CMP (gCMP y aCMP), a diferentes concentraciones (1-5 % p/p) y

diferentes pH (2-8) y observaron una disminución inicial de la tensión superficial muy rápida para ambas fracciones a pH 6, y una mayor disminución a mayor concentración. La disminución de la tensión superficial con el aumento de la concentración para la fracción aCMP fue superior a la obtenida para la fracción glicosilada, sugiriendo una mayor actividad superficial de la fracción aCMP. Por otro lado, ambas fracciones mostraron un cambio significativo en la actividad superficial en función del pH, presentando una mayor adsorción a pH cerca del pI de cada fracción (4,15 para aCMP y 3,15 para gCMP), lo que se atribuyó a la pérdida de repulsión por cargas al disminuir el pH por debajo de 6.

2.2.3. Propiedades espumantes

Una espuma es un sistema bifásico en el que una fase dispersa de naturaleza gaseosa está rodeada de una fase continua de naturaleza líquida (Kinsella, 1981; Dickinson, 1992). Las características de una espuma están íntimamente relacionadas con las propiedades de las películas líquidas que la forman, así como de las propiedades dilatacionales de las películas de moléculas adsorbidas en la interfase aire/agua.

2.2.3.1. Formación y estabilidad de espumas

El proceso de formación de espumas y su estabilidad son dos fenómenos que no se pueden evaluar de manera independiente puesto que paralelamente a la formación de una espuma tienen lugar fenómenos de desestabilización (Langevin, 2000).

La creación eficaz de espumas y su estabilidad dependen de distintas propiedades interfaciales del agente espumante añadido a la formulación para tal fin, tales como la velocidad de adsorción sobre la interfase aire/agua y su capacidad de formar una película con unas propiedades mecánicas adecuadas para impedir su inmediata ruptura. Además, las propiedades reológicas de la fase continua tienen un gran impacto en la estabilidad.

Una espuma, como cualquier dispersión es termodinámicamente inestable, el proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa dispersa a formar una fase continua por aproximación y/o fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un mínimo de área superficial (condición de mínima energía libre). Existen tres mecanismos de desestabilización de una espuma que pueden actuar simultáneamente (**Figura 8**). Estos mecanismos son: drenaje, difusión o desproporción y colapso o coalescencia.

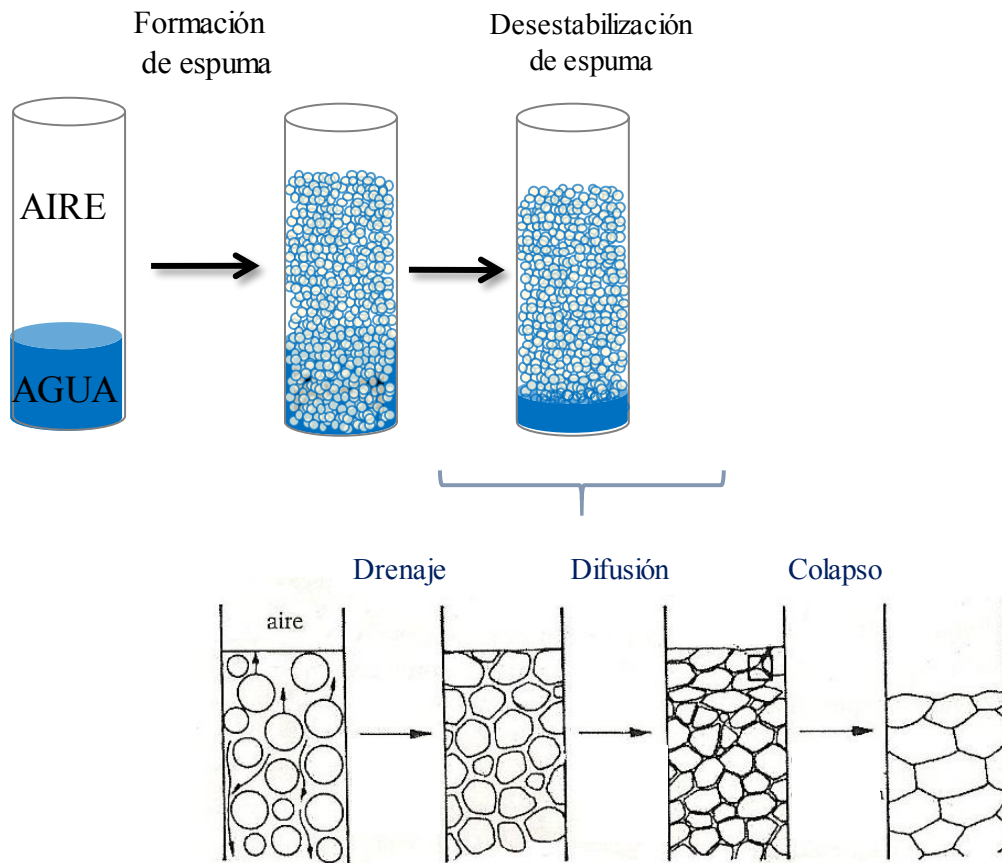


Figura 8. Formación y fenómenos de desestabilización de espumas.

El *drenaje* consiste en la migración del líquido contenido en la espuma hacia el seno de la fase líquida debido a factores tales como la acción de la gravedad, viscosidad y densidades de la subfase y de la película interfacial expuesta a la subfase acuosa. La *difusión*, *maduración de Ostwald* o *desproporción* consiste en el transporte o movimiento del gas contenido en las burbujas pequeñas hacia las más grandes (Ettelaie et al., 2008; Murray, 2002). La fuerza impulsora de este proceso es un gradiente en la presión de Laplace a nivel de la superficie curvada de las burbujas, resultando en una mayor presión superficial para las burbujas pequeñas. Esto conduce a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras. De acuerdo con la ley de Henry, la solubilidad de un gas es proporcional a su presión, por lo tanto, la solubilidad es mayor dentro de una burbuja pequeña que en el interior de una grande. Este proceso es auto-acelerado, ya que las burbujas pequeñas se hacen cada vez más pequeñas debido a la difusión y por lo tanto la fuerza impulsora aumenta. Finalmente, el *colapso* de espumas es la fusión de dos burbujas causada por la ruptura de la pared que las separa.

La presencia de un agente tensioactivo o espumante en la disolución acuosa, promueve la formación de una capa de moléculas anfifílicas adsorbidas sobre la superficie de las burbujas, de tal manera que la energía superficial del sistema disminuye. Así, durante el proceso de espumado, la formación de esta película delgada determina la estabilidad de la espuma frente a la coalescencia y la ruptura de las burbujas de gas inicialmente formadas (Dickinson, 1992, 2001; Foegeding et al., 2006; Rodríguez Patino et al., 2008). No obstante, la estabilidad de una espuma no sólo está determinada por las propiedades de la película interfacial, sino que también depende de otros factores importantes como la viscosidad de la fase continua, la temperatura, el movimiento a que se somete, la naturaleza de la fase gaseosa dispersa, el tamaño de las burbujas de la fase dispersa, la naturaleza de las interacciones existentes entre ellas, la relación en volumen entre ambas fases y la diferencia de densidad de las mismas.

Como se mencionó, el CMP presenta una buena actividad superficial (Martinez et al., 2009 a; Thomä-Worringer et al., 2007 a, 2007 b) lo que influye positivamente en su capacidad para formar espumas (Kreuß et al., 2009 b; Martinez et al., 2012 a). Marshall (1991) encontró que una solución de CMP al 10 % posee una mayor capacidad de espumado pero una menor estabilidad comparándola con la clara de huevo. Kreuß et al. (2009b) determinaron las propiedades espumantes de ambas fracciones de CMP (la glicosilada y la no glicosilada, a una concentración del 1 % p/p y diferentes pH (2-8) y observaron que las espumas estabilizadas con aCMP mostraron una estabilidad significativamente superior a las estabilizadas con gCMP, mientras que ambas fracciones mostraron una alta capacidad de formación de espuma, alrededor del 600 %. Además, en general las propiedades espumantes del gCMP fueron más influenciadas por la variación del pH en comparación con las propiedades de la fracción aCMP, presentando propiedades reducidas a pH por encima del pI. Los autores sugirieron que este comportamiento está relacionado con la carga negativa de los residuos de ácido siálico terminales a valores de pH por encima del pI. La combinación de barreras eléctricas, estéricas e hidrofílicas causada por la glicosilación de la fracción gCMP parece no permitir una adsorción ordenada en la interfase aire/agua, mientras que la fracción aCMP podría dar lugar a la formación de una película interfacial más estable.

2.2.4. Propiedades emulsionantes

Las emulsiones son clasificadas de acuerdo a la organización espacial de las gotas de aceite y agua (McClements, 2010; McClements, Decker y Weiss, 2007), tal como se muestra en la **Figura 9**. Las categorías utilizadas en la industria pueden dividirse en los siguientes grupos: i) emulsiones de tipo aceite/agua (O/W, acrónimo en inglés), donde gotas de aceite se dispersan en agua, por ejemplo: la leche, emulsiones para bebidas, yogur, crema batida, helados, aderezos para ensaladas, crema para café; y ii) emulsiones de tipo agua/aceite (W/O), donde gotas de agua están dispersas en aceite, por ejemplo: mantequilla, margarina, etc. (McClements, 2015).

Además de las emulsiones O/W y W/O tradicionales, existe otro grupo de emulsiones algo más complejas, denominadas emulsiones múltiples, como las emulsiones O/W/O (es decir, aceite/agua/aceite) o bien las W/O/W (agua/aceite/agua). Esta última emulsión, consiste en gotas de agua dispersas en gotas de aceite mayores, que a su vez están dispersas en un medio acuoso continuo (McClements y Li, 2010). El tipo de emulsión determina sus propiedades físicas y químicas.

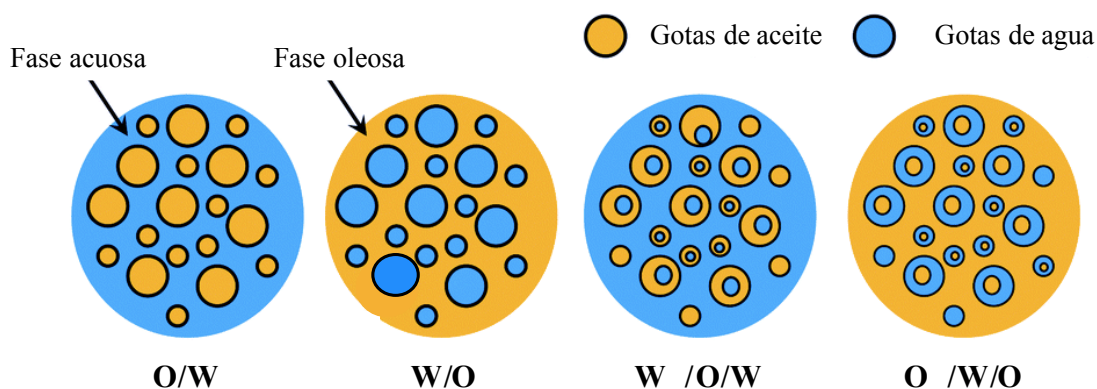


Figura 9. Diferentes tipos de emulsiones: (a) O/W, (b) W/O, (c) W/O/W, (d) O/W/O según la naturaleza de sus fases.

El tamaño de las gotas en la emulsión modifica los atributos como la apariencia, textura, color, aroma y sabor. Cabe destacar que la calidad y reproducibilidad de la formación de las emulsiones, depende en gran medida del tipo de materias primas y del control del proceso.

En la mayoría de las emulsiones alimentarias los diámetros de las gotas que conforman la fase dispersa se encuentran entre los 100 nm y 100 μm , aunque en los últimos años se ha mostrado un interés creciente en la obtención de emulsiones con diámetros de gotas

inferiores a los 200 nm (nanoemulsiones), debido a sus novedosas propiedades fisicoquímicas, como su estabilidad y apariencia (Alzorqi et al., 2016; Hu et al., 2016; Teo et al., 2016). Se ha estudiado el empleo de nanoemulsiones para el transporte de fármacos hidrófobos disueltos en la fase oleosa (Karamanidou et al., 2016; Sarker, 2005). En la industria alimenticia, las nanoemulsiones se han utilizado para desarrollar bebidas inteligentes que consisten en componentes hidrófobos saludables como el β -caroteno y curcumina en la fase oleosa (McClements, 2011; Rao y McClements, 2011). A diferencia de las emulsiones y nanoemulsiones, las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente bajo condiciones particulares (Liu y McGrath, 2005 ; Warisnoicharoen et al., 2000 ; Wasutrasawat et al., 2010; Yaghmur et al., 2002). Las microemulsiones tienden a tener gotas muy pequeñas (diámetro < 50 nm), lo que implica que son transparentes o translúcidas (Graves y Mason, 2008; Lawrence y Rees, 2000). Debe observarse que la terminología históricamente desarrollada para describir las dispersiones coloidales se ha vuelto confusa, siendo las gotas de microemulsiones generalmente más pequeñas que las de las nanoemulsiones aunque "micro" significa 10^{-6} y "nano" significa 10^{-9} . La principal distinción entre estos dos sistemas es su estabilidad termodinámica: con las microemulsiones estables y las nanoemulsiones inestables (McClements y Rao, 2011).

2.2.4.1. Proceso de formación de emulsiones

A partir de diferentes definiciones de diversos autores puede establecerse un concepto general según el cual “una emulsión es un sistema coloidal consistente en, al menos, un líquido íntimamente disperso en forma de gotas (fase dispersa), en el seno de otro inmisible con él (fase continua)” (Angelo, 1989; Khan et al., 2006; Mason et al., 2006; McClements, 1999, 2015). El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización (McClements, 2015). De acuerdo al proceso involucrado en la obtención de una emulsión, la homogeneización suele clasificarse en dos categorías: la *homogeneización primaria*, que consiste en la creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas; mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas de una emulsión ya existente o pre-emulsión se denomina *homogeneización secundaria* (**Figura 10**). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

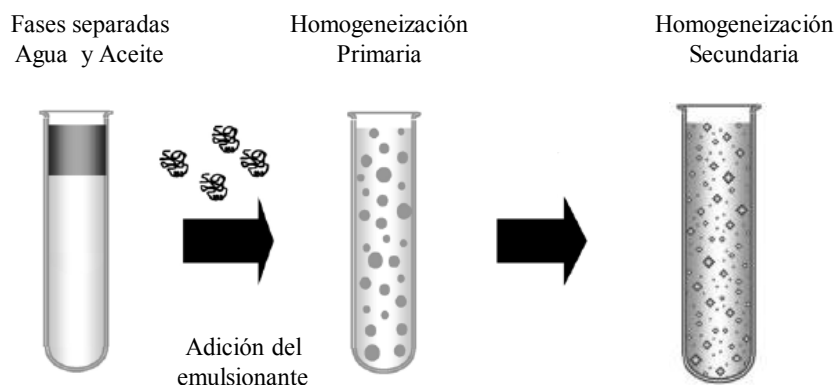


Figura 10. Proceso de homogeneización para la formación de una emulsión aceite/agua (O/W).

2.2.4.2. Estabilidad de las emulsiones

De manera similar a lo descrito en espumas, desde el momento en que se forma una emulsión comienza el proceso de desestabilización, el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existen distintos mecanismos que contribuyen a la desestabilización de una emulsión, consecuencia de la diferencia de densidad entre las fases continua y dispersa, las interacciones entre las gotas y la estructura y elasticidad del film interfacial (McClements, 1999).

Los principales mecanismos físicos de desestabilización que ocurren en las emulsiones son: *cremado*, *sedimentación*, *floculación* y *coalescencia* (**Figura 11**).

El cremado y la sedimentación se originan debido a efectos gravitacionales. Este fenómeno puede reducirse minimizando la diferencia de densidad de las fases inmiscibles (Chanamai y McClements, 2000). El *cremado* puede describirse como el movimiento ascendente de las gotas de aceite, principalmente porque la densidad es menor que el líquido acuoso que los contiene; mientras que la sedimentación ocurre cuando las gotas de aceite tienen densidad mayor que el medio que los contiene. Durante el proceso de cremado se forma una fase inferior o suero, empobrecida en gotas y una fase superior (fase crema), enriquecida en gotas de aceite. Ambos procesos son reversibles.

Los mecanismos de *floculación* y *coalescencia* son procesos de agregación de las gotas de la fase dispersa (**Figura 11**). La *floculación* se produce cuando más de dos gotas se agregan conservando su forma y dimensión individual, mientras que la *coalescencia* ocurre cuando dos o más gotas se fusionan y forman un glóbulo de mayor volumen. La

agregación continua de gotas y formación de gotas de mayor volumen, conducen a la formación de una capa superficial de la fase menos densa, y, por ende, a la ruptura de la emulsión.

Estos mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada, de manera que una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, el tipo de agente emulsificante empleado y su concentración, la adición de otros componentes, el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación.

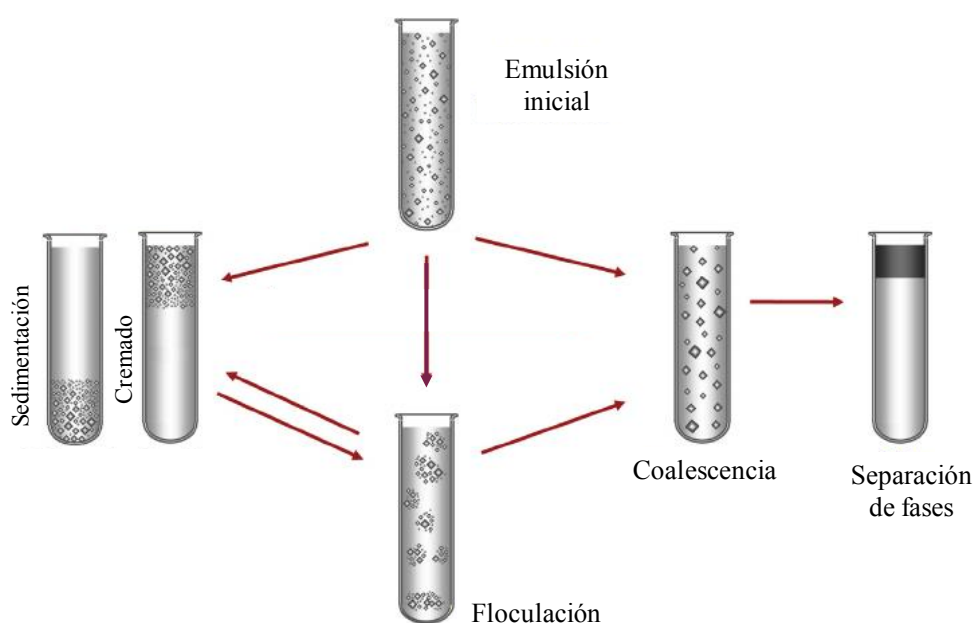


Figura 11. Mecanismos de desestabilización de emulsiones: cremado, sedimentación, floculación y coalescencia. Si el proceso de coalescencia continua en el tiempo, se forma una capa de aceite libre en la parte superior, que culmina con la separación total de las fases.

Existen pocos trabajos referidos a la evaluación de las propiedades emulsionantes del CMP (Kreuß et al., 2009 c; Moreno et al., 2002; Wong et al., 2006; Martin-Diana et al., 2005). Kreuß et al. (2009 c) estudiaron las propiedades emulsificantes de las dos fracciones de CMP (gCMP y aCMP) y encontraron que el aCMP presenta un mayor poder emulsionante y brinda una mejor estabilidad a la emulsión, indicando que existe una influencia negativa de las cadenas laterales de glicano sobre la actividad interfacial.

Además, indicaron que el pH de las emulsiones influye significativamente tanto en la formación como en la estabilidad de las mismas, siendo menores sus propiedades a pH cercano a los puntos isoeléctricos (pI). Por otro lado, Chobert et al. (1989) estudiaron las propiedades emulsionantes del CMP en comparación con las de κ -caseína y reportaron que el CMP mostró una actividad emulsionante similar a la de la κ -caseína, pero una menor estabilidad, particularmente en el intervalo de pH neutro y alcalino. Cuando se estudiaron las propiedades emulsionantes del CMP en comparación con concentrados de suero lácteo (WPC) (Martin-Diana et al., 2005), se reportó una menor actividad emulsionante del CMP con respecto al WPC; sin embargo, la actividad del CMP no fue tan afectada por el pH como la del WPC.

Se han reportado algunas modificaciones sobre el CMP, en la búsqueda de modificar sus propiedades emulsionantes. Por ejemplo, Moreno et al. (2002) estudiaron la conjugación del CMP con lactosa mediante la reacción de Maillard y se reportó que dicha conjugación aumentó la actividad emulsionante sin reducir significativamente la solubilidad del macropéptido. En otro trabajo, se conjugaron ácidos grasos de cadena larga con CMP mediante una reacción de lipofilización que involucra ésteres grasos de N-hidroxisuccinimida y se demostró que el CMP modificado tiene una funcionalidad mejorada no sólo como tensioactivo, sino también como antibacteriano (Wong et al., 2006).

Los estudios de las propiedades emulsionantes del CMP son escasos lo que genera un campo atractivo de estudio.

3. Interacciones entre el CMP y otros componentes de la matriz alimentaria

Las propiedades funcionales y las interacciones entre biopolímeros en los alimentos están fuertemente influenciadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e hidrofobicidad (Damodaran, 1996; Dea, 1982; Kinsella, 1982). Estas características moleculares son determinadas por el tipo, número y secuencia de los monómeros que conforman las cadenas de biopolímeros (van Holde, 1977). Las interacciones intramoleculares que determinan la conformación de proteínas se representan en la **Figura 12**.

Debido a que la estructura de una proteína es dinámica, el equilibrio entre las fuerzas estabilizantes de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de modificaciones en las condiciones ambientales tales como pH, temperatura, características del solvente y

condiciones de procesamiento. Como consecuencia de estos cambios, las fuerzas que la estabilizan pueden debilitarse, permitiendo el desplegamiento o la desnaturalización proteica y exponiendo aminoácidos activos antes ocultos en el interior de la estructura proteica. Así, estos aminoácidos pueden interactuar con otros segmentos de la misma molécula o bien con segmentos presentes en otras macromoléculas vecinas. El potencial de una proteína para modificar su conformación determina sus propiedades funcionales. El conocimiento de la naturaleza de las interacciones moleculares involucradas en los sistemas alimentarios, puede ser utilizado para diseñar nuevas estructuras y modificar propiedades fisicoquímicas, y por lo tanto crear atributos funcionales diferentes en un sistema alimentario.

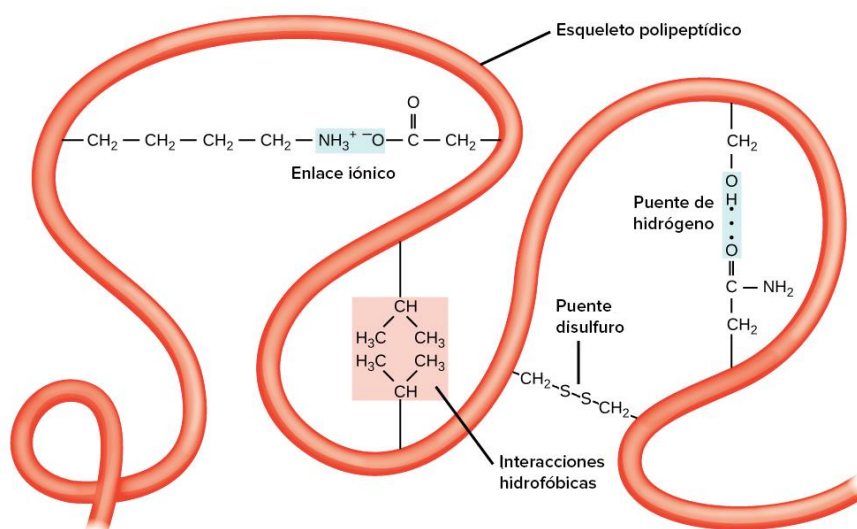


Figura 12. Interacciones intramoleculares que determinan la estructura conformacional de una proteína.

Las interacciones entre macromoléculas son variadas y son determinadas por las características fisicoquímicas de cada biopolímero, concentración y condiciones de disolución. Las interacciones proteína-proteína juegan un rol importante en las investigaciones modernas en la ciencia y tecnología de los alimentos debido a que ellos influyen la formación de su microestructura, que son determinantes en la textura, estabilidad mecánica, consistencia, así como su apariencia y sabor (Semenova, 2007). Los biopolímeros pueden crear estructuras nuevas y sistemas de liberación como micelas, vesículas, cristales líquidos, emulsiones para proteger y liberar ingredientes bioactivos o funcionales tales como lípidos, sabores, péptidos, enzimas, fibra dietaria, minerales y

vitaminas e incluso fármacos (Garti et al., 2005; Golding y Sein, 2004; McClements et al., 2007; Salminen y Weiss, 2014; Weiss et al., 2006).

Las interacciones hidrofóbicas ejercen un rol determinante sobre la estructura molecular, agregación y actividad superficial de aquellos biopolímeros que poseen cantidades apreciables de residuos no polares (Alber, 1989; Damodaran, 1996). La hidrofobicidad superficial es un parámetro utilizado para predecir el potencial de una proteína para asociarse bajo condiciones de calentamiento o bajo cambios de las condiciones ambientales y se relaciona con propiedades funcionales, tal como espumado y gelificación (Kato y Nakai, 1980).

Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la determinación de la estructura conformacional e interacción de biopolímeros (Damodaran, 1996; Dickinson y McClements, 1995). Las proteínas poseen aminoácidos que se ionizan para dar lugar a grupos con carga positiva, o grupos con carga negativa (Damodaran, 1996; Lehninger et al., 1993). Las interacciones electrostáticas no actúan sólo localmente entre grupos específicos estabilizando la estructura terciaria de una proteína, sino también interactúan entre diferentes proteínas. La distribución de las cargas de la proteína causa atracción o repulsión electrostática. La carga neta de una proteína depende de los valores de pK de sus grupos ionizables y del pH del medio acuoso. Las interacciones electrostáticas entre proteínas son particularmente sensibles al pH de la fase acuosa (Launay et al., 1986; Rha y Pradipasena, 1986). Al cambiar el pH en una solución proteica, ocurre una redistribución de cargas en la cadena polipeptídica, los grupos ácidos tienen una carga negativa a pH neutro mientras que los grupos básicos están cargados positivamente a nivel de este pH debido a que su pK es alto.

Las proteínas poseen monómeros capaces de formar enlaces o puentes de hidrógeno (Lehninger et al., 1993). Un enlace de hidrógeno se define como la fuerza atractiva (dipolo-dipolo) entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo como nitrógeno, oxígeno o un halógeno. Los enlaces de hidrógeno son un tipo relativamente fuerte de interacción molecular y, por lo tanto, una proteína en solución tratará de maximizar el número y la fuerza de los enlaces de hidrógeno formados dando origen a la formación de regiones ordenadas como hélices y hojas plegadas (Lehninger et al., 1993). La formación de puentes de hidrógeno también juega un rol importante en la determinación de la estructura cuaternaria de proteínas. Por ejemplo, la asociación de monómeros de β -lg en dímeros es conducida por puentes de

interacción entre las estructuras lámina β de dos monómeros adyacentes (Brownlow et al., 1997).

La interacción del CMP con otros componentes de la matriz alimentaria y el impacto que dicha interacción genera sobre diferentes propiedades funcionales ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. Thomä-Worringer et al. (2007 a) estudiaron el efecto de la interacción del CMP con proteínas del suero sobre las propiedades espumantes y encontraron que el CMP y las proteínas del suero se complementan porque mientras el CMP es más eficiente para reducir la tensión superficial y asegurar un alto contenido de gas durante la formación de la espuma, las proteínas del suero son capaces de reducir la permeabilidad del gas y de inhibir la coalescencia de las burbujas debido a la generación de películas estables en la interfase.

Martinez et al. (2009 b) demostraron la existencia de interacciones entre el CMP y la β -lg en la fase acuosa, mediante el estudio del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz. Los autores reportaron que el análisis de la distribución del tamaño de los sistemas mixtos, respalda el hecho que ambas proteínas interactúen posiblemente por enlaces electrostáticos o de hidrógeno en la fase acuosa, debido a que el CMP tiene una carga negativa a pH neutro debido a la presencia de aminoácidos ácidos. La disociación de grupos carboxílicos de ácido siálico puede ser la fuente de carga negativa adicional. De modo que el CMP también podría interactuar electrostáticamente con parches proteínicos positivos de β -lg (residuos de lisina). En un trabajo posterior, Martinez et al. (2011) estudiaron el efecto de dichas interacciones en fase acuosa de CMP y β -lg sobre la dinámica de la gelificación térmica de mezclas CMP/ β -lg a pH 3,5 y 7 y demostraron que las interacciones entre CMP y β -lg impactaron de forma diferente en la formación de geles: a pH 7,0 se observó un fuerte efecto sinérgico, ya que el CMP no gelifica a este pH, pero permitió que la β -lg gelificara incluso a concentraciones muy por debajo de la concentración crítica. Por el contrario, a pH 3,5 donde tanto el CMP como la β -lg gelifican por sí solos, las interacciones entre el CMP/ β -lg fueron fuertemente perjudiciales, esto fue atribuido a que en estas condiciones se vio impedida la gelificación del CMP.

En otro trabajo, Martinez et al., (2012 a) estudiaron las propiedades espumantes de estos mismos sistemas mixtos CMP/ β -lg, a pH 6,5 y 3,5 y observaron una mayor capacidad de espumado y estabilidad en las espumas mixtas a pH 3,5 frente a las obtenidas a pH 6,5 y las obtenidas con CMP y β -lg solos. Este comportamiento fue relacionado con las fuertes interacciones en la fase acuosa entre CMP y β -lg a este pH.

Por otro lado, Croguennec et al. (2014), estudiaron el efecto de la concentración de CMP sobre la cinética de desnaturalización de β -lg y sobre el tamaño y estructura de los agregados inducidos por calor, en un amplio rango de pH (3,0-6,7) y temperatura (65-95 °C). Estos autores observaron que el CMP aceleró la cinética de desnaturalización de β -lg en todo el rango de temperaturas y pH estudiados y sugirieron que este comportamiento puede explicarse por la interacción entre CMP y β -lg en solución demostrado por Martínez et al. (2009b). También reportaron que el efecto del CMP en la cinética de desnaturalización de la β -lg fue más pronunciado a pH 4,0 probablemente porque existen asociaciones favorables impulsadas por interacciones electrostática entre CMP (con carga negativa) y β -lg (con carga positiva).

Teniendo en cuenta que los sistemas espumados de CMP presentan la desventaja de tener baja estabilidad, Martínez et al., (2012 b) analizaron el impacto de la mezcla de CMP y una variedad comercial de alginato de propileno glicol (PGA) sobre las propiedades interfaciales y de formación de espumas a pH 7,0 y determinaron que en estos sistemas mixtos el CMP dominó la presión superficial y que la presencia de PGA mejoró sinérgicamente las propiedades viscoelásticas de la película superficial. La presencia de PGA mejoró la estabilidad frente al drenado y colapso de las espumas mixtas lo que fue atribuido al aumento sinérgico en la elasticidad dilatacional y la viscosidad de las películas mixtas, que podrían ser más resistentes al drenaje y la ruptura.

En otro trabajo, Martínez et al., (2013), evaluaron las propiedades interfaciales y espumante de los sistemas mixtos CMP/gelatina a pH 6,5 y 3,5 y reportaron que el CMP fue más activo superficialmente que la gelatina y dominó la velocidad de difusión a la interfase aire/agua de los sistemas mixtos. Además, se observó un efecto sinérgico sobre la capacidad de espumado y la estabilidad de la espuma (más evidente a pH 3,5) de los sistemas mixtos, que fue atribuida a la formación de un complejo entre CMP y gelatina que presentaría una alta actividad superficial impartida por CMP y una gran estabilidad otorgada por la gelatina. Además, en un trabajo reciente se estudió cómo estas interacciones entre CMP y gelatina impactan sobre las propiedades de gelificación (Morales et al., 2016) y se reportó que a pH 3,5 la gelificación de gelatina fue acelerada en presencia de CMP. Esto fue atribuido a que el CMP y la gelatina podrían interactuar por medio de enlaces hidrofóbicos y estas interacciones se verían reforzadas a pH 3,5 mediante interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados negativamente o ácido siálico en CMP y gelatina cargada positivamente.

Estos estudios muestran que el CMP tiene una tendencia especial a interactuar espontáneamente con otros componentes de la matriz alimenticia y en particular con proteínas. De tal manera que su presencia puede influir sobre las propiedades de la matriz en la que se incorpore.

4. Referencias

- Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Taniguchi, T. & Kirino, Y. (1991). Interaction with phospholipid-bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (30), 20218-20222.
- Ahmed, J. & Ramaswamy, H.S. (2003). Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*, 86, 1535-1540.
- Aimutis, W.R., Anderson, G.H. & Moore, S.E. (2004). The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *Journal of Nutrition*, 134 (4), 974-979.
- Alber, T. (1989). Stabilization energies of protein conformation. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation. Fasman, G.D. (Ed.), p. 161. Plenum Press, New York.
- Allen, K.E., Dickinson, E. & Murray, B. (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream, 39, 225-234.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M.R., Sudheer, S. & Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 71-84.
- Angelo, A. (1989). A brief introduction to food emulsions and emulsifiers. En: *Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications* Charalambous, G. & Doxastakis, G. (Eds.).
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T. & Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution: Still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. & Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1121 (1-2), 130-136.
- Belyakova, L.E., Antipova, A.S., Semenova, M.G., Dickinson, E., Matia-Merino, L. & Tsapkina, E. N. (2003). Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 31-46.

- Beverung, C.J., Radke, C.J. & Blanch, H.W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: Characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81 (1), 59-80.
- Bos, M.A. & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471.
- Boye, J., Ma, C.Y. & Harwalkar, V. R. (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. En: *Food proteins and their applications*. S. Damadoran & A. Paraf (Eds.), pp. 25-56. Marcel Dekker, Inc: New York.
- Braga, A.L.M., Menossi, M. & Cunha, R.L. (2006). The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, 16 (5), 389-398.
- Brody, E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84 (1), 39-46.
- Brück, W.M., Kelleher, S.L., Gibson, G.R., Nielsen, K.E., Chatterton, D.E.W. & Lönnerdal, B. (2003). rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 37 (3), 273-280.
- Brule, G., Roger, L., Fauquant, J. & Piot, M. (1982). Phosphopeptides from casein-based material. US 4358465 A.
- Brunner, R. (1976). Milk proteins. En: *Food Proteins*. Whitaker J.R. & Tannenbaum, S.R. (Eds.), pp. 175-208. AVI Publishing Company: Westport, Connecticut, USA.
- Burton, J. & Skudder, P.J. (1987). Whey proteins. UK patent application GB 2188526 A1.
- Caen, J.P., Jollès, P., Fiat, A.M. & Mazoyer, E. (1992). Activité anti-thrombotique de séquences peptidiques de protéines de lait. *Cah. Nutr. Diét.*, 27, 33-35.
- Cánovas, J.M., Renteroa, P.Z., Martínez, A.M., Hernández, M.L. & Alemán, J.A. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23 (5), 219-227
- Cayot, P. & Lorient, D. (1996). Structure-function relationship of whey proteins. En: *Food Proteins and their applications*. Damodaran, S. & Paraf, A. (Eds.), pp. 225-256. New York: Marcel Dekker.
- Chanamai, R. & McClements, D.J. (2000). Creaming stability of flocculated monodisperse oil-in-water emulsions. *Journal Colloid Interface Science*, 225 (1), 214-218.

- Cherkaoui, S., Doumenc, N., Tachon, P., Neeser, J.R. & Veuthey, J.L. (1997). Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropptide determination. *Journal of Chromatography A*, 790 (1-2), 195-205.
- Chen, M., Sala, G., Meinders, M.B.J., van Valenberg, H.J.F., van der Linden, E. & Sagis, L.M.C. (2017). Interfacial properties, thin film stability and foam stability of casein micelle dispersions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 56–63
- Chobert, J.M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalorrondo, M. & Nicolas, M.G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ -casein and its caseinomacropptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457-473.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A. & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (1), 1-12.
- Chu, B., Zhou, Z., Wu, G. & Farrell Jr, H.M. (1995). Laser light scattering of model casein solutions: effects of high temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170(1), 102-112.
- Corring, T., Levenez, F., Cuber, J. C., Beaufrère, B., Bories, A., Maubois, J.L. & Fauquant, J. (1997). Release of CCK in humans after the ingestion of GMP. En: *International Whey Conference, American Dairy Products Institute/ International Dairy Federation*. Rosemount, Illinois, USA.
- Clark, A.H. & Lee-Tuffnell, C.D (1986). Gelation of globular proteins. En: *Functional Properties of Food Macromolecules*. Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.). Elsevier Applied Science, London.
- Creamer, L. & Macgibbon, K.H. (1996). Review article some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*, 6, 539-568.
- Croguennec, T., Leng, N., Hamona, P., Rousseau, F., Jeantet, R. & Bouhallab, S. (2014). Caseinomacropptide modifies the heat-induced denaturation aggregation process of beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 36, 55-64.
- Damodaran, S. (1996). Functional properties. En: *Food proteins*. Nakai, S. & Modler, H. W. (Eds.), pp. 167-234. VCH: New York.
- Damodaran, S. & Sengupta, T. (2003). Dynamics of competitive adsorption of alphas-casein and beta-casein at planar triolein-water interface: evidence for incompatibility of mixing in the interfacial film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1658-1665.
- Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 328-339.
- Daliri, E., Oh, D. & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides Foods, 6 (5), 32.

- Dalgleish, D.G. (1996). Food emulsions. En *Emulsions and emulsion stability*, Sjoblom, J. (Ed.), (pp. 287-321). New York, USA: Marcel Dekker.
- Dalgleish, D.G. (1998). Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81 (11), 3013-3018.
- Dalgleish, D.G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—Review and possible improvements. *Soft Matter*, 7, 2265– 2272.
- Dalgleish, D.G. & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449–467.
- da Silva, C.A.S., Coimbra, J.S.R., Rojas, E.E.G. & Teixeira, J.A.C. (2009). Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44(11), 1213-1216.
- Dea, I.C.M. (1982). Polysaccharide conformation in solutions and gels. En: *Food Carbohydrates*. Lineback, D.R. & Inglett, G.E.(Eds.), AVI Publishing, Westport, CT.
- de Kruif, C.G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9 (3-6), 183-188.
- de Kruif C.G. & Holt C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. En *Advanced Dairy Chemistry 1, Proteins 3rd edition, Part A*. Fox P.F. & Sweeney P.L.H. (Eds.), pp. 233-276. Kluwer Academic, New York.
- de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S. & Petukhov, A.V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172, 36-52.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- Demetriades, K., Bryant, C.M. & McClements, D.J. (1998). Optimizing the functional properties of whey proteins to enhance nutritional benefits. *Recent Nutrition Research Articles in Nutrition Research*, 2, 131-153.
- Dickinson, E. & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 (1), 26-30.
- Dickinson, E. (1992). *An introduction to Food Colloids*. Oxford: Oxford University Press.
- Dickinson, E. & McClements, D.J. (1995). Protein-polysaccharide interactions. En *Advances in food colloids*. Dickinson, E & McClements D.J. (Eds.), pp. 81-101. London: Chapman & Hall.

- Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15 (2), 161-176.
- Dickinson, E., Semenova, M.G., Elyakova, L. . . , Ntipova, . . . , Li'in, M.M., Tsapkina, E. N. & Ritzoulis, C. (2001). Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 239, 87–97.
- Dickinson, E. (2005). *Food colloids - Interactions, microstructure and processing*. Dickinson, E (Ed). Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1473-1482.
- Dziuba, J. & Minkiewicz, P. (1996). Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *International Dairy Journal*, 6 (11-12), 1017-1044.
- Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R. & Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631.
- El-Salam, M.H.A., El-Shibiny, S. & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6 (4), 327-341.
- Ennis, M.P. & Mulvihill, D.M. (2000). Milk proteins. En: *Handbook of Hydrocolloids*. G. Phillips & P. Williams (Eds.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited & CRC Press.
- Ettelaie, R., Akinshina, A. & Dickinson, E. (2008). Mixed protein polysaccharide interfacial layers: a self consistent field calculation study. *Faraday Discussions*, 139,161-178.
- FAO/WHO. (1991). *Proteins quality evaluation-Report of the Joint FAO/WHO*.
- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.
- Farrell, H.M., Pessen, H., Brown, E.M. & Kumosinski, T.F. (1990). Structural insights into the bovine casein micelle-small-angle x-ray-scattering studies and correlations with spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 73, 3592-3601.
- Farrell, Jr. H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. & Swaisgood, H.M. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal Dairy Science*, 87, 1641–1674.

- Farrell, H. M., Malin E. L., Brown E. M. & Qi P.X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 135-147.
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M. & Laencina, J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 22, 5-18.
- Fiat, A.M. & Jollés, P. (1989). Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 87 (1), 5-30.
- Fiat, A., Migliore-Samour, D., Drouet, L., Sollier, C. & Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76, 301-310.
- Foegeding, E.A., Luck, P.J. & Davis, J.P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20, 284-292.
- Foegeding, E.A. (2007). Rheology and sensory texture of biopolymer gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.*, 12, 242-250.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B: Protein*, Kluwer Academic/Plenum.
- Fox, P.F. & Brodkorb, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18,677–684.
- Freer, E.M., Yim, K.S., Fuller, G.G. & Radke, C.J. (2004). Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: comparison of shear and dilatation deformation. *Journal of Physical Chemistry B*, 108 (12), 3835–3844.
- Galindo-Amaya, L.M., Valbuena-Colmenares, E. & Rojas-Villarreal, E. (2006). Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 16 (3), 308-314.
- Garti, N., Spornath, A., Aserin, A. & Lutz, R. (2005). Nano-sized self-assemblies of nonionic surfactants as solubilization reservoirs and microreactors for food systems. *Soft Matter*, 1 (3), 206- 218.
- Golding, M. & Sein, A. (2004). Surface rheology of aqueous casein–monoglyceride dispersions. *Food Hydrocolloids*, 18 (3), 451-461.
- Guzey, D. & McClements, J.D. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128 (130), 227-248.

- Grasselli, M., Navarro del Cañizo, A.A., Fernández Lahore, H.M., Miranda, M.V., Camperi, S.A. & Cascone, O. (1997). ¿Qué hacer con el suero de leche?. *Ciencia Hoy*, vol. 8. Buenos Aires, Argentina: Copyright Asociación Civil Ciencia Hoy.
- Graham, D.E. & Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70 (3), 415-426.
- Graves, S.M. & Mason, T.G. (2008). Transmission of visible and ultraviolet light through charge-stabilized nanoemulsions. *The Journal of Physical Chemistry*, 112 (33), 12669–12676.
- Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 155-203.
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L. & Moulai-Mostefa, N. (2008). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22 (8), 1460-1466.
- Hermansson, A.M. (1988). Gel structure of food biopolymers. En: *Food Structure — Its Creation and Evaluation*. Blanshard, J.M.V. & Mitchell, J.R. (Eds.). Butterworths, London.
- Hoffman, J.R. & Michael J. Falvo, M.J. (2004). Protein – Which is Best?. *Journal Sports Science Medicine*, 3 (3), 118–130.
- Holt C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43, 63-151.
- Holt, C., Carver, J.A., Ecroyd, H. & Thorn, D.C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 96 (10), 6127-6146.
- Horne D.S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8, 171-177.
- Horne D.S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 148-153.
- Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K. & Luo, Y. (2016). Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 130-140.
- Idota, T., Kawakami, H. & Nakajima, I. (1994). Growth-promoting effects of Nacetylneuraminic acid-containing substances on Bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1720-1722.

- Jollés, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A. & Caen, J.P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. *European Journal of Biochemistry*, 158, 379–382.
- Kamath, S., Webb, R.E. & Deeth, H.C. (2011). The composition of interfacial material from skim milk foams. *Journal of Dairy Science*, 94, 2707–2718.
- Kang, J.H., Lee, M.K., Kim, K.L. & Hahm, K.S. (1996). Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International journal of peptide and protein research*, 48 (4), 357-363.
- Karamanidou, T., Bourganis, V., Kammona, O. & Kiparissides, C. (2016). Lipid-based nanocarriers for the oral administration of biopharmaceutics. *Nanomedicine*, 11(22), 3009-3032.
- Kato, A. & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13-20.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. & Ahiko, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and kappa-casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Bioscience Biotechnoly Biochemistry*, 56, 195-198.
- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M. & Nakajima, I. (1993a). pH-dependent molecular-weight changes of κ -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 48, 191–196.
- Kawasaki, Y., Isoda, K., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. & Nakajima, I. (1993b). Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience Biotechnoly Biochemistry*, 57, 1214–1215.
- Kelleher, S., Chatterton, D., Nielsen, K. & Lönnerdal, . (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1261-1268.
- Khan, A.Y., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Ahmed, F.J. & Khar, R.K. (2006). Multiple emulsions: an overview. *Current Drug Delivery*, 3 (4), 429-443
- Kim, S.H. & Kinsella, J.E. (1985). Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 50, 1526-1530.
- Kinsella, J.E. (1981). Functional properties in foods, possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry*, 7, 273-288.

- Kinsella, J.E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. En: Food Proteins. Fox, P.F. & Condon, J.J. (Eds.). Applied Science Publishers, London.
- Kreuz, M. & Kulozik, U. (2009a). Separation of glycosylated caseinomacropeptide at pilot scale using membrane adsorption in direct-capture mode. *Journal of Chromatography A*, 1216 (50), 8771-8777.
- Kreuz, M., Krause, I. & Kulozik, U. (2009b). Influence of glycosylation on foaming properties of bovine caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 19 (12), 715-720.
- Kreuz, M., Strixner, T. & Kulozik, U. (2009c). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1818-1826.
- Lagrange, V. (1999). Reference manual for U.S whey and lactose products. Page, J., Meyer, D. & Haines, B. (Eds.).
- Langevin, D. (2000). Foams and Emulsions. Sadoc, J.F. & Rivier, N. (Eds.). Dordrecht: Kluwer.
- Launay, B., Doublier, J.L. & Cuvelier, G. (1986). Flow properties of aqueous solutions of polysaccharides. En: Functional Properties of Food Macromolecules. Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.). Elsevier, London.
- Lawrence, M. & Rees, G. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (1), 89–121.
- Lazzaro, F., Saint-Jalmes, A., Violleau, F., Lopez, C., Gaucher-Delmas, M., Madec, M.N., Beaucher, E. & Gaucheron, F. (2017). Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids*, 63, 189-200.
- Ledward, D.A. (1986). Gelation of gelatin. En: Functional Properties of Food Macromolecules. Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.), cap. 4. Elsevier Applied Science, London.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers, New York.
- Li, E. & Mine, Y. (2004). Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. *Journal of Dairy Science*, 87, 174-177.
- Lieske, B., Konrad, G. & Kleinschmidt, T.H. (2004). Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multistage ultrafiltration process. III. Influence of pH in the first ultrafiltration-step on the chemical properties of isolated caseinomacropeptide. *Milchwissenschaft*, 59, 408-410.

- Liu, E.H. & McGrath, K.M. (2005). Emulsion microstructure and energy input, roles in emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 262 (1-3), 101-112.
- Loveday, S.M., Ye, A., Anema, S.G. & Singh, H. (2013). Heat-induced colloidal interactions of whey proteins, sodium caseinate and gum arabic in binary and ternary mixtures. *Food Research International*, 54 (1), 111-117.
- Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. & Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, 7 (6-7), 389-397.
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Ridout, M.J., Wilde, P.J. & Morris, V.J. (2001). Orogenic displacement in mixed β -lactoglobulin/ β -casein films at the air/water interface. *Langmuir*, 17(21), 6593-6598.
- MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA.: Academic Press.
- Madureira, A.R., Pereira, I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- Maldonado-Valderrama, J. (2006). *Caracterización Interfacial de Proteínas y Tensioactivos: Aplicación a Dispersiones Alimentarias*. Universidad de Granada, Granada, España.
- Manso, M.A. & López Fandiño, R. (2004). κ -casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20, 329-355.
- Marshall, S. (1991). Casein macropeptide from whey - a new product opportunity. *Food Research Quarterly*, 51, 86-91.
- Martín-Diana, A.B., Pelaez, C. & Requena, T. (2004). Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropeptide and whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 86, 1535-1540.
- Martin-Diana A.B, Frias, J. & Fontecha, J. (2005). Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. *Milchwissenschaft*, 60, 363-366.
- Martin Diana, A.B. (2001). *Estudio del caseinmacropeptido de suero de quesería, procedente de leche de oveja y cabra*. Instituto del Frío, CSIC. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009a). Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 230-237.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009b). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air–water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 39–47.
- Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 860-867.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012a). Interactions between β -lactoglobulin and casein glycomacropeptide on foaming. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89(1), 234-241.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosaa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012b). Interfacial and foaming interactions between casein glycomacropeptide (CMP) and propylene glycol alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 214– 221.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2013). Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide - gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 48–57.
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B. & Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18 (41), 635-666.
- McClements, D.J. & Keogh, M.K. (1995). Physical properties of cold-setting gels prepared from heatdenatured whey protein isolate. *Journal of Food Chemistry and Agriculture*, 69, 7-14.
- McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*. Boca raton, FL: CRC Press.
- McClements, D.J., Decker, E.A. & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72 (8), 109-124.
- McClements, D.J. & Decker, E.A. (2007). Lipids. En: *Food Chemistry*. 4th edition. Damodaran, S, Parkin K.L. & Fennema, O.R. (Eds.), pp.155-216. Boca raton, FL: CRC Press.
- McClements, D.J. & Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food and Function*, 1, 32-59

- McClements, D.J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7 (6), 2297-2316.
- McClements, D.J. & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (4), 285-330.
- McClements, D.J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. (CRC Press, Ed.) (3.a ed.).
- McMahon, D.J. & Oommen, B.S. (2013). *Advanced Dairy Chemistry*. McSweeney, P.L.H & Fox, P.F (Eds.), cap. 6. New York: Springer Science and Business Media.
- Mikkelsen, T., Frøkiær, C., Topp, C., Onomichi, F., Iametti, S., Picariello, G. & Barkholt, V. (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. *Journal of Dairy Science*, 88, 4228-4238.
- Mollé, D. (1995). Heterogeneity of the bovine κ -casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 708, 223-230.
- Mollé, D. & Leonil, J. (2005). Quantitative determination of bovine κ -casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LS-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*, 15, 419-428.
- Morales, R., Martinez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2016). Dynamics of gelation, textural and microstructural properties of gelatin gels in the presence of casein glycomacropeptide. *Food Research International*, 84, 102–107.
- Moreno, F.J., López-Fandiño, R. & Olano, A. (2002). Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (18), 5179-5184.
- Morris, V.J. (1986). Gelation of polysaccharides. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*. Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.), cap. 3. Elsevier Applied Science, London.
- Müller-Buschbaum, P., Gebhardt, R., Roth, S.V, Metwalli, Z.E. & Doster, W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*, 93 (3), 960-968.
- Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (1987). Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technology*, 41, 102-111.

- Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (1988). Gelation of β -lactoglobulin: Effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. *Journal of Food Science*, 53, 231-236.
- Mulvihill, D.M. & Fox, P.F. (1989). Caseins and caseinates: manufacture. En *Development in Dairy Chemistry*. Fox, P.F. (Ed.), pp. 97-130. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Murray, B.S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7 (5-6), 426-431.
- Nakano, T. & Ozimek, L. (1998). Gel chromatography of glycomacropeptide (GMP) from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pH's and Dephadex G-75 in 6 M guanidine hydrochloride. *Milchwissenschaft*, 53, 629-633.
- Nakano, T. & Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotechnology Letters*, 22, 1081-1086.
- Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 676-683.
- Nash, W., Pinder, D.N., Hemar, Y. & Singh, H. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30, 269-271.
- Ney, D.M., Hull, A.K., Van Calcar, S.C., Liu, X. & Etzel, M.R. (2008). Dietary Glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria. *Journal of Nutrition*, 138, 316-322.
- Ng-Kwai-Hang, K.F. (2011). Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. En *Encyclopedia of Dairy Science*. Amsterdam: Academic Press, pp. 751-764.
- Oakenfull, D., Pearce, J. & Burley, R.W. (1997). Protein gelation. En: *Food protein and their applications*. Damodaran, S. & Paraf, A. (Eds.). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Oakenfull, D., Miyoshi, E., Nishinari, K. & Scott, A. (1999). Rheological and thermal properties of milk gels formed with κ -carrageenan. I. Sodium Caseinate. *Food Hydrocolloids*, 13, 525-533.
- Ono, T., Yada, R., Yutani, K. & Nakai, S. (1987). Comparison of conformations of κ -casein, para- κ -casein and glycomacropeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 911, 318-325.
- Park, Y.W. & Nam, M.S. (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (6), 831-840.

- Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: a concise review. *Journal of Science and Technology*, 27, 201-212.
- Pilosof, A.M.R. (2000). Gelificación. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A.M.R. & Bartholomai, G.B (Eds.), pp. 75-95. Buenos Aires, Argentina: Eudeba.
- Pour-El, A. (1981). Protein and functionality: classification, definition and methodology. En: Protein Functionality in Foods. Cherry J.P (Ed.) Cap 1, pp 1–19. ACS Symposium series, American chemical society: Washintong.
- Phillips, P.M. (1981). Protein Conformation at Liquid Interfaces and Its Role in Stabilizing Emulsions and Foams. *Food Technology*, 35, 50-58.
- Rao, J. & McClements D.J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25, 1413–1423.
- Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., De Medina, F.S., & Martínez-Augustin, O. (2009). Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF-κB signal transduction pathways. *British Journal of Pharmacology*, 157 (7), 1232-1240.
- Reynolds, E. (1987). International Patent Application WO87/07615 A1.
- Rigo, J., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., Nyambugabo, K., Sawatzki, G. & Studzinski, F. (2001). An infant formula free of glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32, 127-130.
- Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D. & Britten, M. (2012). Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of Dairy Science*, 95 (1), 1-8.
- Rodríguez Patino, J.M., de la Fuente Fera, J. & Gómez Herrera, C. (1990). Monocapas de emulsionantes alimentarios. *Grasas y Aceites*, 41, 179-189.
- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R. & Carrera Sánchez, C. (2002). Propiedades funcionales de lípidos y proteínas de interés para la formulación de dispersiones alimentarias. En: Proteínas y Polisacáridos como ingredientes funcionales. Añón, M.C & Pilosof, A.M.R (Eds.), pp. 11-28. La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.

- Rodríguez Patino, J.M., Rodríguez Niño, M.R. & Carrera, C. (2008). Implications of interfacial characteristics of food emulsifiers in foam formulations. *Advances in Colloid Interface Science*, 140, 95-113.
- Rollema, H.S. & Fox, P.F. (1992). Casein association and micelle formation. *Advanced dairy Chemistry-1: Proteins*, 2, 111-140.
- Rha, C.K. & Pradipasena, P. (1986). Viscosity of proteins. En: *Functional Properties of Food Macromolecules*. Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds.). Elsevier, London.
- Saito, T., Yamaji, A. & Itoh, T. (1991). A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 74 (9), 2831.
- Salcedo, J., Lacomba, R., Alegría, A., Barbera, R., Matencio, E. & Lagarda, M.J. (2011). Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chemistry*, 127 (4), 1905-1910.
- Salminen, H. & Weiss, J. (2014). Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein—pectin complexes. *Food Biophysics*, 9 (1), 29-38.
- Sarker, D.K. (2005). Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, 2, 297-310.
- Sato, R., Noguchi, T. & Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 32 (1), 67-76.
- Schlimme, E. & Meisel, H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Food/Nahrung*, 39 (1), 1-20.
- Schmidt, D.G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. En *Developments in Dairy Chemistry 1—Proteins*. Fox, P.F. (Ed), pp. 61-85. Applied Science Publishers, London.
- Semenova, M.G. (2007). Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. *Food Hydrocolloids*, 21 (1), 23-45.
- Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Polikarpov, Y.N., Antipova, A.S. & Dickinson, E. (2009). Light scattering study of sodium caseinate+dextran sulfate in aqueous solution: Relationship to emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23, 629–639.
- Sengupta, T. & Damodaran, S. (2000). Incompatibility and phase separation in a bovine serum albumin/ β -casein/water ternary film at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229 (1), 21-28.

- Silva-Hernández, E., Nakano, T. & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2034-2038.
- Silva, N.N., Piot, M., Fernandez de Carvalho, A., Violleau, A.F., Fameau, A.L. & Gaucheron, F. (2013). pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. *Food Hydrocolloids*, 32 (2), 322-330.
- Swaigood H.E. (1996). Characteristics of milk. En *Food Chemistry*. Fennema, O. R. (ed.), pp. 841-878. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Tamime, A.Y. & Robinson, R.K. (2000). *Yoghurt: Science and Technology* (2nd ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Taylor, C.M. & Woonton, B.W. (2009). Quantity and carbohydrate content of glycomacropeptide fractions isolated from raw and heat-treated milk. *International Dairy Journal*, 19 (12), 709-714.
- Teo, A., Goh, K.K.T., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H.-S. & Lee, S.J. (2016). Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*, 197, Part A, 297-306.
- Thomä-Worringer, C., Sörensen, J. & López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16 (11), 1324-1333.
- Thomä-Worringer, C., Siegert, N. & Kulozik, U. (2007a). Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. *Milchwissenschaft*, 62, 249-252.
- Thomä-Worringer, C., Siegert, N. & Kulozik, U. (2007b). Foaming properties of caseinomacropeptide - 2. Impact on pH and ionic strength. *Milchwissenschaft*, 62 (3), 253-255.
- Tornberg, E. (1978). The application of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 64 (3), 391-402.
- Tran, N.T., Daali, Y., Cherkaoui, S., Taverna, M., Neeser, J.R. & Veuthey, J.L. (2001). Routine O-glycan characterization in nutritional supplements - A comparison of analytical methods for the monitoring of the bovine kappa-casein macropeptide glycosylation. *Journal of Chromatography A*, 929 (1-2), 151-163.
- Tullio, L., Karkle, E. & Cândido, L. (2007). Review: Isolation and purification of milk whey glycomacropeptide. *B. CEPPA, Curitiba*, 25, 121-135.

- Van Holde, K.E. (1977). Effects of amino acid composition and microenvironment on protein structure. En: Food Proteins. Whitaker, J.R. & Tannenbaum, S.R. (Eds.). AVI Publishing, Westport, CT.
- Veith, P.D. & Reynolds, E.C. (2004). Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *Journal Dairy Science*, 87, 831–840.
- Vinceković, M., Ćurlin, M. & Jurašin, . (2014). Impact of cationic surfactant on the self-assembly of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (34), 8543-8554.
- Walstra, P. & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry and physics* (1st ed.). New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Walstra P. & Jenness R. (1987). *Química y Física Lactológica*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.
- Walstra P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*, 9, 189- 192.
- Wang, B., Brand-Miller, J., Mcveagh, P. & Petocz, P. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 510-515.
- Warisnoicharoen W., Lansley, A.B. & Lawrence, M.J. (2000). Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, 198 (1), 7–27.
- Wasutrasawat, P., Warisnoicharoen, W., Al-Obaidi, H. & Lawrence, M.J. (2010). Incorporation of solid and liquid long chain triglyceride oils into non-ionic oil-in-water micro- and nanoemulsions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62 (10), 1336–1337.
- Weiss, J., Takhistov, P. & McClement, D.J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71 (9), 107-116.
- Wilde, P.J. (2000). Interfaces: Their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5 (3-4), 176-181.
- Wong, D.W.S., Camirand, W.M. & Pavlath, A.E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
- Wong, P.Y.Y., Nakamura, S. & Kitts, D.D. (2006). Functional and biological activities of casein glycomacropeptide as influenced by lipophilization with medium and long chain fatty acid. *Food Chemistry*, 97 (2), 310-317.
- Xu, S. & Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, 10, 472-480.

- Yaghmur, A., Aserin, A. & Garti, N. (2002). Phase behavior of micro- emulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols. *Colloids Surface A*, 209 (1), 71–81.
- Yuleiys, O., Escobar, A., Ponce, P., Oliva, Y., Escobar, A. & Ponce, P. (2002). Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. *Revista Salud Animal*, 24 (2), 73-81.
- Ziegler, G.R. & Foegedding, E.A. (1990). The gelation of proteins. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. Kinsella, J.E. (Ed.), Vol. 34. Academic Press, San Diego.

Objetivos

Si bien existen estudios sobre las propiedades funcionales del caseinoglicomacropéptido (CMP), algunos son contradictorios y no definitivos, lo que puede estar relacionado con los diferentes métodos de obtención del CMP. Sin embargo, muchos de los estudios previos muestran que el CMP tiene una tendencia especial a interactuar espontáneamente con otros componentes de la matriz alimenticia y en particular con proteínas. De tal manera que su presencia puede influir sobre las propiedades de la matriz en la que se incorpore.

En este trabajo se abordarán los siguientes objetivos:

- 1) Evaluar la existencia de interacciones entre CMP y caseinato de sodio (CasNa).
Se ha demostrado una alta afinidad del CMP para interactuar con otros componentes de la matriz alimentaria. El interés de estudiar los sistemas CMP-CasNa reside en que el CasNa es un ingrediente lácteo muy utilizado en formulaciones de alimentos y es habitual usarlo en productos lácteos junto con productos derivados del suero lácteo que pueden contener CMP.
- 2) Determinar el impacto que las interacciones entre CMP y CasNa tienen sobre las propiedades gelificantes y espumantes.
- 3) Estudiar las propiedades emulsionantes del CMP y en presencia de otros emulsionantes y la capacidad de dichas emulsiones de gelificar por disminución de pH.
La motivación de evaluar la gelificación de estas emulsiones reside en que el CMP es capaz de gelificar a temperatura ambiente a $\text{pH} < 4,5$ y a la mayor estabilidad que podría brindar la emulsión en estado gelificado.
- 4) Caracterizar el comportamiento de las emulsiones de CMP y de CMP con otros emulsionantes frente a la lipólisis durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.
Dado que la composición de la película interfacial que estabiliza a las gotas en una emulsión puede afectar a la velocidad/grado de digestión de los lípidos emulsionados, y por ende a su bioaccesibilidad, resulta de suma importancia conocer si el CMP solo o en presencia de co-emulsionantes asegura la bioaccesibilidad del aceite emulsionado.

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Caseinoglicomacropéptido (CMP)

Se utilizó un CMP comercial BioPURE CMP, provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición fue: 86,3 % de CMP, 0,6 % de grasa, 6,3 % de ceniza y 6,4 % de humedad. El grado de glicosilación es de alrededor del 50 % (dato proporcionado por el proveedor). El valor de pH del CMP luego de su disolución en agua bidestilada fue de 6,7. Este CMP es obtenido a partir de suero de queso, el cual se pasteuriza y posteriormente es aislado mediante la técnica de intercambio iónico. Finalmente, es concentrado por ultrafiltración/diafiltración y secado spray. El método de intercambio iónico utilizado en la obtención de esta muestra de CMP garantiza la uniformidad en sus propiedades funcionales.

1.2. Caseinato de sodio (CasNa)

Se utilizaron dos muestras comerciales de CasNa, una de ellas fue provista por Fonterra (Nueva Zelanda), cuya composición en base seca fue: 91,7 % de proteínas, 3,6 % de cenizas y 4,6 % de humedad. La otra muestra de CasNa fue de MP Biomedicals (Estados Unidos), cuya composición en base seca fue: proteínas 92 %, cenizas 4 % y humedad 5 %. El valor de pH de ambas muestras de CasNa luego de su disolución en agua bidestilada fue de 6,8.

1.3. β -lactoglobul na β -lg)

La β -lg utilizada fue ioPUR β -lactoglobulina provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición fue: 97,8 % de proteína base seca) siendo β -lactoglobulina el 93,6 % del total de proteínas, 0,3 % de grasa, 1,8 % de ceniza y 5,0 % de humedad.

1.4. Co-emulsionantes

Se utilizaron los siguientes compuestos como co-emulsionantes: gelatina ácida (pI 6,04) bovina (GEL) provista por Rousselot Argentina S.A. (Hurlingham, Argentina), polisorbato 80 (Tween[®] 80 (Tw)) de Merck (Alemania); goma arábiga (GA) Quick Gum type 8074 RD de Norevo (Alemania); lecitina de soja (LEC) Metarin[®] P de Cargill (Alemania); CasNa MP Biomedicals (Estados Unidos).

1.5. Aceite vegetal

Se empleó aceite de girasol comercial (de uso común en la industria de alimentos) sin purificación posterior como fase oleosa en la preparación de las emulsiones. El aceite de girasol contiene triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos saturados e insaturados. La longitud de la cadena alquílica varía entre 14 y 22 (Wüstneck y Muschiolik, 1999).

Para las determinaciones de las propiedades interfaciales se utilizó el mismo aceite de girasol purificado. Para ello, se dejó interactuar al aceite comercial de girasol con un compuesto (Florisil 60-100 Mesh, Sigma Aldrich®) atrapante de las sustancias tensioactivas del aceite (fosfolípidos, ácidos grasos libres, monoglicéridos) durante 24 h. A continuación, se filtró (0,22 μm) la fase superior con la cual se trabajó (Bahtz et al. 2009).

1.6. Preparación de soluciones

Las soluciones fueron preparadas en agua bidestilada, a las cuales se les ajustó el pH por medio del agregado de HCl o NaOH 0,1 o 1 N según el caso.

Los sistemas mixtos CasNa/CMP se prepararon mezclando el volumen apropiado de cada solución de proteína para alcanzar la concentración final requerida. Se estudiaron las mezclas de CasNa/CMP en las siguientes relaciones: 1/1, 3/1, 5/1, 11/1, en las cuales se mantuvo constante una concentración final del 12 % p/p para ensayos de gelificación y de 1 % p/p para ensayos de viscosidad, espumas, interfase y determinación de tamaño de partícula.

Para los estudios de emulsiones se trabajó con una concentración de CMP del 8 % p/p y diferentes concentraciones de los otros emulsionantes estudiados (entre 0,5 y 4 % p/p).

Todas las soluciones fueron preparadas por agitación y mantenidas en la heladera (4 °C) por 24 h previo a la medición. Además, a todas las muestras se les agregó 0,02 % p/p de NaN_3 para prevenir el crecimiento bacteriano.

2. Métodos

2.1. Distribución de tamaño de partícula

El tamaño de partícula en las soluciones se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) con un analizador Zetasizer Nano-Zs, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido) (Figura 13). El equipo cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlator

digital Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173° , dentro de un rango de 0,6 nm a 6 μm , según especificaciones del equipo.

Se realizaron mediciones de tamaño de partícula a temperatura ambiente y también durante la exposición de la muestra a una rampa de calentamiento dentro del equipo. Dicha rampa constó de un aumento de temperatura desde 25°C hasta 85°C , luego una etapa constante a 85°C durante 20 minutos y posteriormente un enfriamiento hasta 43°C . La muestra se coloca en una celda dentro del compartimento que se observa abierto en la **Figura 13 13**. La celda utilizada fue de poliestireno para las mediciones realizadas a temperatura ambiente y de vidrio cuando se aplicó un tratamiento térmico. Las soluciones fueron filtradas a través de microfiltros Whatman International Ltd. (Maidstone, Reino Unido) de 0,45, 0,22 y 0,02 μm , según corresponda.



Figura 13. Equipo de dispersión dinámica de luz láser, Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments.

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

de la partícula y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes-Einstein (2):

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

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

Se utilizaron dos aproximaciones para obtener la información del tamaño. Primero, se empleó el algoritmo de CONTIN para analizar los datos de distribución porcentual de tamaños de partícula/agregados (Stepanek, 1993). La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varias clases de tamaño y es, por lo tanto, conocida como una distribución de tamaño en intensidad. Si la distribución presenta una “cola” sustancial o más de un pico, entonces puede aplicarse la teoría de Mie (1908) para convertir la distribución en intensidad en una distribución en volumen o en número con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman. Considerando por ejemplo dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro presentes en igual cantidad, graficando una distribución de número de estas dos poblaciones de partículas, el gráfico consistirá en dos picos (ubicados a 5 y 50 nm) obteniendo una relación 1:1 (**Figura 14 A**). Si en cambio se grafica una distribución en volumen (**Figura 14 B**), entonces la relación de estos dos picos cambia a 1:1.000 (porque el volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi\left(\frac{d}{2}\right)^3$). Por último, si quisiéramos graficar una distribución de intensidad (**Figura 14 C**), la relación entre los dos picos sería de 1:1.000.000 (porque la intensidad de dispersión es proporcional al *diámetro*⁶ a partir de la aproximación de Rayleighs) (Malvern-Instruments).

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

Se informa el promedio de dos repeticiones por muestra.

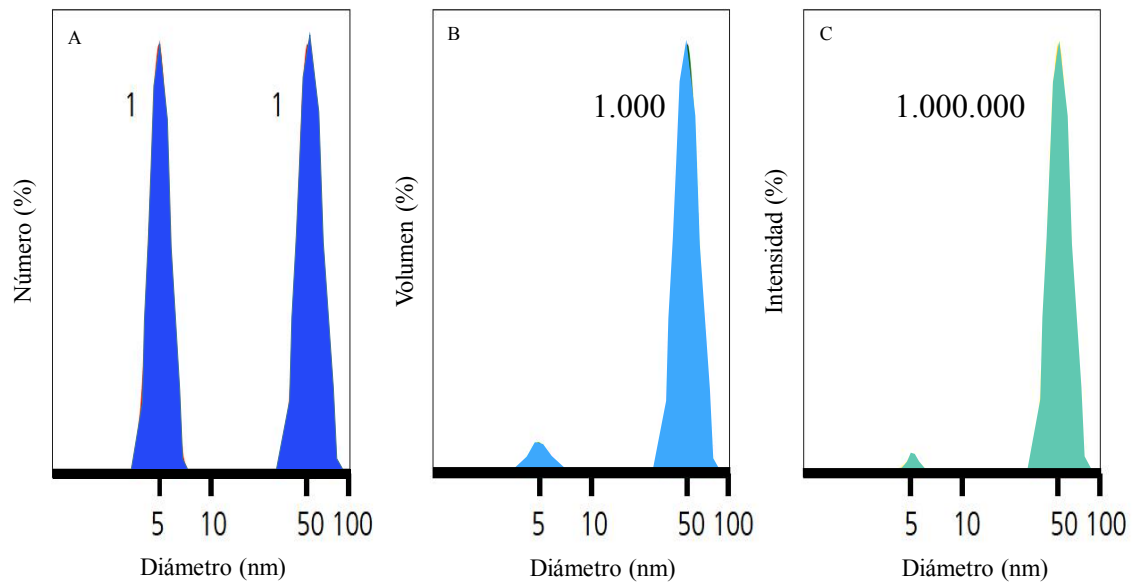


Figura 14. Distribución en número, volumen e intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad. Fuente: Malvern Instruments Ltd.

2.2. Gelificación ácida mediada por GDL

Con el fin de simular condiciones de gelificación en un sistema modelo de yogur, se utilizó glucono δ lactona (GDL), un éster que se hidroliza espontáneamente para formar ácido glucónico a partir de una reacción de hidrólisis con cinética de primer orden (de Kruif, 1997). Al hidrolizarse y formar ácido glucónico disminuye el pH de la solución en la que se encuentra. El uso de GDL evita algunas de las dificultades asociadas con bacterias *starter*, tales como una actividad variable y la variación con el tipo de cultivo utilizado. Adicionalmente, durante la gelificación con GDL, el pH final del sistema es función de la cantidad de GDL añadida, mientras que las bacterias iniciadoras producen ácido hasta que se inhiben por el bajo pH (Lucey et al., 1998).

La GDL previamente diluida en agua bidestilada, se añadió a los respectivos sistemas CasNa/CMP, con agitación por 5 minutos a una temperatura de 10 °C. Posterior a su adición, la acidificación tuvo lugar a una temperatura de 43 °C. La cantidad de GDL adicionada, determinada en ensayos previos sobre cada uno de los sistemas, fue suficiente para inducir una disminución del pH hasta 4,6 en un tiempo de 1-1,5 h.

2.3. Determinación de la transición sol-gel

El tiempo de transición solución-gel se determinó por un test de inclinación modificado (Relkin, 1998). Se prepararon tubos con 5 ml de los diferentes sistemas (acidificados con GDL) que se colocaron a temperatura constante (43 °C) en un baño seco. Con el objetivo de prevenir la evaporación de líquido, los tubos fueron cerrados herméticamente. Se registró como tiempo de gelificación (t_{gel}) al tiempo en el cual no se observó ninguna deformación del menisco bascular al inclinar el tubo. Este ensayo se realizó por triplicado con un error experimental < 10 %.

En el siguiente esquema se muestra el procedimiento de obtención del punto gel (**Figura 15**).

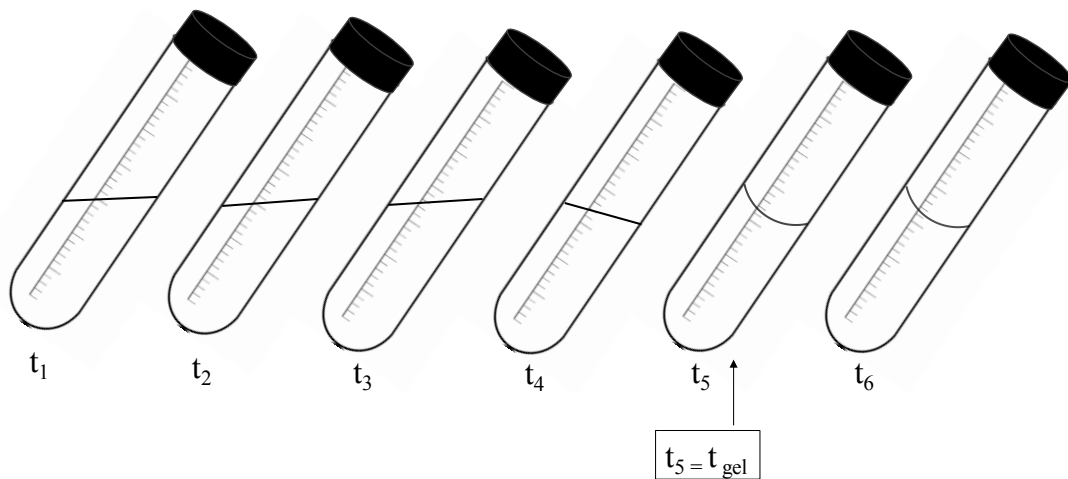


Figura 15. Esquema del procedimiento de determinación del punto gel mediante el test de inclinación. En la figura se indican diferentes tiempos de observación y la determinación del t_{gel} .

2.4. Elaboración de yogur

Se elaboraron yogures set a partir de leche en polvo descremada (LD) (Sancor), reconstituida al 9 % de sólidos no grasos totales (SNG). Se aumentó el contenido de SNG hasta un 12 % en base a distintos ingredientes lácteos, según se indica en la **Tabla 4**. A cada una de las formulaciones se le adicionó además un 10 % de azúcar.

Las diferentes formulaciones se prepararon disolviendo todos los sólidos en agua a 50 °C. Posteriormente, se elevó la temperatura hasta 85 °C y se mantuvo durante 20 min, con el objetivo de lograr la pasteurización. Luego, fueron rápidamente enfriadas a 43 °C e inoculadas con el *starter* o cultivo iniciador (Fargo™ 404, mezcla de *Lactobacillus*

bulgaricus y *Streptococcus thermophilus*) previamente activado. Inmediatamente, se realizó un fraccionamiento de cada una de las formulaciones en envases individuales y se llevó a una cámara a 43 °C para comenzar el proceso de fermentación. La fermentación se detuvo cuando se alcanzó un pH de 4,6. Los yogures se enfriaron rápidamente en un baño de hielo y fueron almacenados a 4 °C para su posterior análisis.

Activación del starter o cultivo iniciador: debido a que el starter es una pasta liofilizada y congelada fue necesaria su activación previa al uso; para ello, la cantidad requerida fue activada la noche anterior en leche descremada a 32 °C. Luego de 12-15 h a dicha temperatura, el pH de la mezcla de leche con starter alcanzó un valor de 4,2-4,4 y se almacenó a 4 °C hasta el momento de la elaboración de los yogures.

Tabla 4. Porcentaje de SNG agregado a cada formulación.

Formulación	CasNa (%)	CMP (%)
1	3	-
2	2,25	0,75
3	1,5	1,5

2.5. Propiedades texturales

Los geles de CasNa y de las mezclas CasNa/CMP se prepararon acidificando las soluciones con GDL a una temperatura de 43 °C y fueron evaluados mediante un análisis de perfil de textura (TPA) por medio de un analizador de textura TA-XT2i (MicroSystems, Ltd., Godalming, Reino Unido) usando una sonda cilíndrica (P/36R de 36 mm de diámetro). Los geles, de forma cilíndrica, desmoldados de los tubos (13 mm de diámetro x 11 mm de altura) se comprimieron un 30 % de la altura inicial a una velocidad de compresión de 0,5 mm/s.

Para el análisis de los yogures se realizó un test de retroextrusión en el mismo equipo, utilizando una celda de retroextrusión con anillo de 35 mm. La distancia de penetración fue de 30 mm.

Tanto los ensayos de TPA como los de retroextrusión se realizaron por duplicado sobre los geles, 24 h después de su elaboración, almacenados a 4 °C. La temperatura de medición fue de entre 10-12 °C (temperatura habitual de consumo de geles lácteos).

2.6. Microscopía

Se utilizaron dos técnicas diferentes para estudiar las microestructuras de los geles de CMP, CasNa, CasNa/CMP (preparados como se describe en el apartado 2.2. de esta sección): microscopía confocal de barrido láser (CSLM) y microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM).

CSLM: Se utilizó un microscopio láser confocal de barrido (Modelo FV300, Olympus, Londres, Reino Unido), provisto de un láser He-Ne (543 nm) y un objetivo PLAN APO 60x (también se realizó un zoom de 2,5x). Se empleó el fluoróforo rhodamina B (longitud de onda de excitación 560 nm; emisión máxima 625 nm). Las imágenes digitales fueron obtenidas en formato multiple.tif con una resolución 1024 x 1024 píxeles.

ESEM: Se utilizó un microscopio electrónico de barrido FEI-Quanta 200 (FEITM, Hillsboro, OR, Estados Unidos) equipado con un detector de electrones secundario gaseoso (GSED) en condiciones específicas: 12,5 kV, un tamaño de punto de 5, 1200x de aumento y una distancia de trabajo de 7,9-8,2 mm. Los archivos de imagen digital se adquirieron en formato multiple.tif con una resolución de 1024 x 943 píxeles.

2.7. Viscosidad

Se emplearon dos metodologías para la determinación de viscosidad: En primer lugar, se obtuvieron las curvas de flujo de las soluciones de CMP, CasNa y sus mezclas (concentración proteica total: 1 % p/p) en un viscosímetro Brookfield DV-LVT a 25 °C con un sistema cono y plato (cono CP-40) y una velocidad de deformación desde 250 a 1500 s⁻¹. Las curvas de flujo se ajustaron al modelo de Ostwald o la ley de la potencia de acuerdo a:

$$\tau = k \times \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

donde τ es el esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, n es el índice de comportamiento de flujo y k es el índice de consistencia. Se informó la viscosidad aparente (n_{ap}) a 450 s⁻¹.

Por otro lado, para determinar la viscosidad aparente de las soluciones de CasNa y CasNa/CMP (concentración proteica total: 12 % p/p) durante la acidificación con GDL se utilizó un reómetro oscilatorio dinámico Paar Physica MCR 300 (Anton Paar, Graz, Austria) con esfuerzo de corte controlado. Inmediatamente después de la adición de GDL, la muestra fue colocada en el reómetro utilizando un sistema cono-plato con un ángulo

de 2 ° (CP75-2). La temperatura del plato inferior fue mantenida a 43 °C mediante un sistema Peltier y un baño termostatzado (Viscotherm VT2, Paar Physica). Se programó un aumento de la velocidad del rotor de 0 a 10 s⁻¹ en 1,5 minutos. Se informó la viscosidad aparente (n_{ap}) a 2 s⁻¹. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

2.8. Propiedades de espumado

2.8.1. Formación de las espumas

Las espumas de CMP, CasNa y sus mezclas se obtuvieron agitando veinte mililitros de solución (1 % p/p) a temperatura ambiente durante 3 minutos, en una probeta graduada (3 cm de diámetro) con un agitador Griffin & George a 200 rpm. La capacidad de espumado (CE) fue calculada como:

$$CE (\%) = [(vol. espuma - 20) / 20] * 100 \quad (4)$$

donde *vol. espuma* es el volumen de espuma luego de los 3 minutos de agitación y 20 es el volumen inicial de líquido utilizado para hacer la espuma.

Los datos reportados son promedio de dos repeticiones.

2.8.2. Drenado y colapso de la espuma

Se registró el volumen de líquido drenado en la parte inferior del tubo graduado y la disminución del volumen de espuma (colapso) luego de la formación de la misma.

El colapso se analizó, además, en relación al volumen inicial de espuma formada, mediante la gráfica de $(V_t - 20) / (V_e - 20)$ en función del tiempo, donde V_t es el volumen de espuma al tiempo t , V_e es el volumen de espuma inmediatamente después de la formación de la misma y los 20 ml corresponden al volumen inicial de líquido utilizado para hacer la espuma. Por lo tanto, esta relación tendrá valores entre 0 y 1.

Por otro lado, el volumen de líquido drenado (V_l) tendrá valores entre 0 y 20 ml, que es el volumen inicial de líquido utilizado para realizar la espuma. Los datos reportados son promedio de dos repeticiones.

2.9. Propiedades de emulsificación

2.9.1. Preparación de la emulsión

Se prepararon emulsiones aceite/agua (O/W) de CMP al 8 % p/p solas y adicionadas con diferentes emulsionantes (lecitina al 2 %, gelatina al 0,5 %, Tween 80 al 2 y 4 %, CasNa al 2 y 4 % y goma arábica al 2 % p/p) con aceite de girasol comercial en una relación 10:90.

Para formar la emulsión se utilizó en primer lugar un homogeneizador Ultraturax T-8 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) con velocidad del rotor (S8N-5G, Staufen, Alemania) ajustada en 25.000 rpm siendo el tiempo de homogeneización de 3 minutos. Luego, se aplicó ultrasonido de alta intensidad (USAI) durante 10 minutos, usando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, Estados Unidos) (potencia neta máxima: 750 W) (**Figura 16**) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20 %. Se empleó una sonda de aleación de titanio acoplada a un microtip de 3 mm de diámetro. La muestra se sónico a temperatura controlada, colocándola en un tubo de vidrio de 10 ml sumergido en un baño de glicerina. El baño se mantuvo a temperatura constante mediante una camisa con circulación de agua a 0,5 °C (Polystat, Cole-Parmer). A esta temperatura se disipa totalmente el calor producido durante el proceso de sonicación, manteniendo la muestra por debajo de los 25 °C (Camino y Pilosof, 2011).



Figura 16. Equipo de ultrasonido de alta intensidad utilizado para la obtención de emulsiones O/W.

2.9.2. Gelificación y reversión de emulsiones

Posteriormente a la formación de la emulsión, se disminuyó el pH a pH 2 y 3 con el agregado de HCl 1 N, con el fin de promover su gelificación, ya que el CMP es capaz de gelificar a temperatura ambiente por efecto de la disminución del pH (Fariás et al., 2010). Luego de 24 horas de preparadas las emulsiones gelificadas, se diluyeron en buffer a pH 6,5 (dilución 1:4) y se ajustó el pH de las mismas hasta pH 6,5 utilizando NaOH 0,1 N, con el objetivo de revertir la gelificación.

2.9.3. Determinación del tamaño de gota por dispersión estática de luz (SLS)

El tamaño de gota de las emulsiones se determinó por dispersión estática de luz (SLS) en un equipo Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) (**Figura 17**). El rango de medición del equipo es de 0,1 μm a 1000 μm . La velocidad de la hélice se mantuvo en 1800 rpm. Se utilizó el índice de refracción (IR) de la fase dispersa (aceite de girasol: 1,354) y su parámetro de absorción (0,001).

El tamaño de gota se informa como diámetros promedio D_{32} y D_{43} . D_{32} es el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter (Ecuación (5)) y D_{43} es el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro De Broucker (Ecuación (6)):

$$D_{32} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (5)$$

$$D_{43} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^4}{\sum n_i \cdot d_i^3} \quad (6)$$

donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Galazka et al., 1996; Gülseren et al., 2007; Huang et al., 2001; Leroux et al., 2003).

El diámetro D_{32} brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas. El diámetro D_{43} está relacionado con cambios en el tamaño de gota que involucran procesos de desestabilización.

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



Figura 17. Equipo de dispersión estática de luz láser, Mastersizer 2000, Malvern Instruments.

2.9.4. Determinación de parámetros de desestabilización

Para evaluar el grado de floculación de las emulsiones se determinó la distribución de tamaño de gota en ausencia y presencia de SDS (Relkin y Sourdet, 2005; Ye y Singh, 2001). La emulsión se diluyó (1:4) en agua o SDS (0,5 % p/p) para el caso de la determinación en ausencia y presencia de SDS, respectivamente. La dilución en SDS asegura la completa defloculación de la emulsión (Anton, 2000; Palazolo, 2006).

A partir de los valores de D_{32} y D_{43} obtenidos con y sin el agregado de SDS, se calcularon los índices de coalescencia (IC %) (Ecuación (7)) y el grado de floculación (GF %) (Ecuación (8)) (Palazolo, Sorgentini y Wagner, 2005)

$$IC(\%) = [(D_{32 + SDS} - D_{32i + SDS}) / D_{32i + SDS}] * 100 \quad (7)$$

$$GF(\%) = [(D_{43 - SDS} - D_{43 + SDS}) / D_{43 + SDS}] * 100 \quad (8)$$

donde $D_{32 + SDS}$ es el diámetro promedio de la gota de emulsión en presencia de SDS; $D_{32i + SDS}$ es el diámetro promedio de gota de la emulsión inicial con SDS y $D_{43 - SDS}$ y $D_{43 + SDS}$ son los diámetros promedio de gota de las emulsiones gelificadas a pH 2 y pH 3 almacenadas a un tiempo t (en este trabajo 24 h), luego revertidas a pH 6,5 y medidos en ausencia y presencia de SDS, respectivamente.

La principal diferencia entre IC % y GF % es que el primero toma como referencia a la emulsión inicial y los cambios producidos en el tamaño de gota (por coalescencia y floculación) respecto a la misma. En cambio, GF % refleja simplemente la variación del tamaño de gota cuando la distribución se determina en ausencia y presencia de SDS y,

por ende, puede calcularse para las emulsiones iniciales y las sometidas a cualquier tratamiento.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y se informa el promedio y la desviación estándar.

2.10. Propiedades interfaciales

Las mediciones interfaciales se realizaron en un tensiómetro interfacial PAT-1 (SINTERFACE Technologies, Berlín, Alemania) empleando el método de la gota pendiente.

El equipo utilizado (**Figura 18**) cuenta con un sistema de inyección que permite la formación de una gota (12 μ l), con la solución del agente interfacial, en la punta de un capilar inmerso en una cubeta de vidrio, la cual contiene el aceite de girasol purificado utilizado como fase oleosa en el estudio de interfaces aceite/agua (O/W) y la cubeta vacía en el estudio de interfaces aire/agua (A/W).

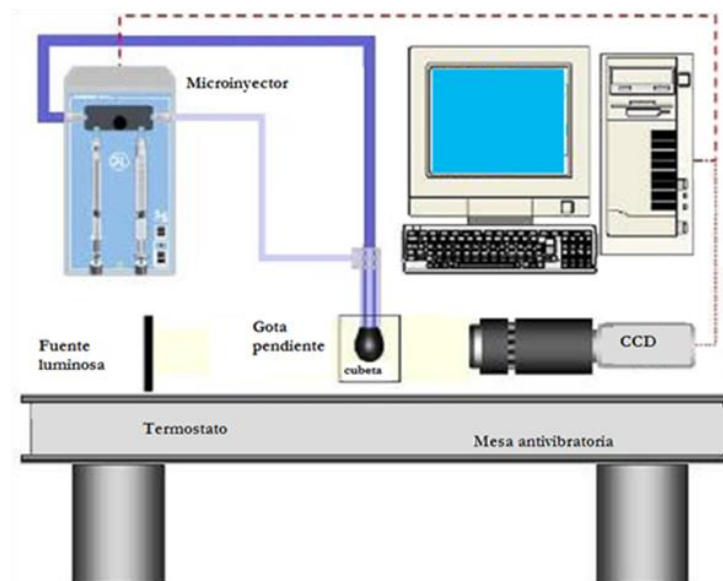


Figura 18. Esquema del tensiómetro interfacial PAT-1.

El tensiómetro, además cuenta con un sistema óptico formado por una fuente de luz, lentes y una cámara CCD que permite obtener imágenes de la gota en una computadora. El perfil de la gota es ajustado a la ecuación de Young-Laplace (Ecuación (9)), lo que permite determinar de manera automática y en cortos períodos de tiempo la variación de la tensión interfacial:

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{d}{dx} \cdot (x \cdot \text{sen} \Phi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad (9)$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas de cualquier punto del perfil de la gota; b es el radio de curvatura en el punto más bajo de la gota; Φ es el ángulo de la tangente al perfil de la gota y C es la constante de capilaridad ($C = g \cdot \Delta\rho / \gamma$; ; donde γ es la tensión superficial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de los dos fluidos y g es la aceleración de la gravedad).

A partir de los valores de γ , es posible obtener la cinética de adsorción interfacial de cada emulsionante analizando los cambios de presión interfacial (π) con el tiempo. La presión interfacial se define como $\pi = \gamma - \gamma_0$, donde γ_0 es la tensión interfacial de la disolución sin emulsionante, y γ es el valor de la tensión interfacial en presencia del mismo.

Además de la variación de γ con el tiempo, se puede obtener la respuesta de γ al someter el área de la interfase a una deformación (**Figura 19**), llevada a cabo mediante expansiones y contracciones de carácter sinusoidal del volumen de la gota (de amplitud y frecuencia fijas), lo cual produce la variación de la concentración interfacial del agente tensioactivo adsorbido en la interfase, causante de esa respuesta (Ecuación (10)). En este caso, la amplitud se mantuvo en un valor inferior al 10 % (referido al volumen inicial de la gota (12 μl)) y en una frecuencia de oscilación de 0,1 Hz, para garantizar que los parámetros obtenidos tras la deformación fueran independientes de la misma. Como respuesta a la variación de la tensión interfacial (Ecuación (10)) causada por la deformación sinusoidal aplicada en el área (Ecuación (11)), se obtiene el valor del módulo elástico dilatacional (E) de la película de emulsionante (Ecuación (12)) que permitirá describir el comportamiento reológico de cada interfase.

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega\theta + \Phi) \quad (10)$$

$$A = A_0 \cdot \text{sen}(\omega\theta) \quad (11)$$

$$E = d\gamma / (dA / A) = -d\pi / d \ln A \quad (12)$$

donde γ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación respectivamente, ϕ es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, θ es el tiempo y ω la frecuencia de la oscilación.

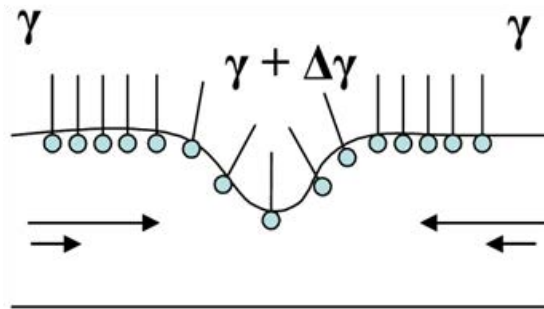


Figura 19. Respuesta de γ ante una deformación del área interfacial.

El módulo dilatacional es un término complejo que se compone de una parte real y otra imaginaria (Ecuación (13)).

$$E = E_d + i \cdot E_v \quad (13)$$

La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional interfacial, $E_d = |E| \cdot \cos \phi$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, representa a la viscosidad dilatacional interfacial y se define como: $E_v = |E| \cdot \sin \phi$.

A partir de la relación entre la componente de pérdida y la de almacenamiento puede determinarse también la tangente del ángulo de pérdida (Ecuación (14)), que es el desfase existente entre la respuesta de la tensión interfacial (Ecuación (10)) con respecto a la deformación que se ha realizado (Ecuación (11)). Esta magnitud proporciona una idea de cuán elástico es el comportamiento de la película interfacial, de forma que, si su valor es muy pequeño, se considera que la película es prácticamente elástica, y por ello, la respuesta de la película a la perturbación a la que se somete será inmediata. Si por el contrario se trata de un valor alto, nos indicará que en la película hay pérdida de energía suministrada, por lo cual no responderá tan rápidamente a esa perturbación. En estos casos, se asocia a la película un comportamiento viscoso, en cierto grado, que depende del valor del ángulo de pérdida.

$$\tan \phi = E_v / E_d \quad (14)$$

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\phi = 0^\circ$), y el término de la parte imaginaria del módulo es cero. En este caso, la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \phi$) es 0. En el caso de un material perfectamente viscoso, $\phi = 90^\circ$, la parte real del módulo es cero y $\tan \phi = 1$.

Para los ensayos de adsorción secuencial se utilizó un sistema de doble capilar como el esquematizado en la **Figura 20**. La metodología consiste en formar una gota con la disolución de emulsionante a través del capilar externo y, transcurrido un tiempo, se intercambia la subfase que se encuentra dentro de esa gota, inyectando la disolución del otro emulsionante en estudio por el capilar interno. Como se observa en la **Figura 20**, este equipo cuenta con dos jeringas conectadas a un doble capilar que permite el intercambio de líquido sin alterar la película interfacial. Una de las jeringas se conecta al capilar interno por el que se introducen pequeños volúmenes de la solución de emulsionante, mientras que la segunda jeringa se conecta al capilar externo, que es el que mantiene el tamaño de gota constante.

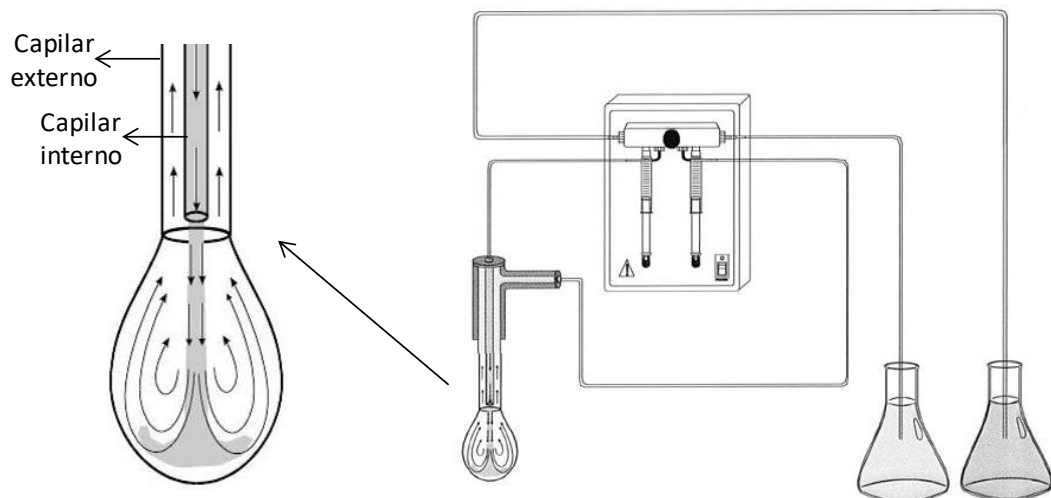


Figura 20. Esquema del sistema de doble capilar con el que se realiza el intercambio de la subfase.

Concluidas las mediciones se procedió con el protocolo de limpieza que consta de repetidos lavados de las jeringas (y sus capilares) con etanol, hexano y finalmente con abundante agua bidestilada. El ensayo se realizó por duplicado en dos muestras individuales.

2.11. Digestión gastroduodenal *in vitro* de las emulsiones O/W

2.11.1. Fluidos que simulan las condiciones de digestión gástrica y duodenal

Las condiciones de digestión gástrica fueron simuladas a partir de la utilización de un fluido (fluido gástrico simulado (SGF)) que representa las condiciones de pH y fuerza iónica características del estómago humano (Kalantzi et al., 2006). El mismo consistió en una mezcla de sales (100 mM de NaCl, 3 mM de CaCl₂, 5 mM de NaH₂PO₄ y 22 mM de KCl) ajustada a pH 2,5 con cantidad suficiente de HCl (1 M). En el SGF se diluyen los componentes característicos del medio gástrico como fosfatidilcolina (PC, P3556 Sigma Aldrich®) y pepsina (mucosa gástrica porcina, P7000 Sigma Aldrich®) a concentraciones fisiológicas (Macierzanka et al., 2009).

Por otra parte, las condiciones de digestión duodenal fueron simuladas a partir de la utilización del fluido intestinal simulado (SIF), consistente en una mezcla compleja de iones (39 mM de K₂HPO₄, 150 mM de NaCl y 30 mM de CaCl₂) ajustada a pH 7, según el protocolo reportado por Sarkar, Horne y Singh (2010). En este último, se llevó a cabo la dilución de los diferentes componentes fisiológicos que participan en la digestión duodenal, entre ellos: sales biliares (SB) (Páncreas bovino, B3883 Sigma Aldrich®), tripsina (Páncreas bovino, T8003 Sigma Aldrich®), α -quimotripsina (Páncreas bovino, C4129 Sigma Aldrich®) y lipasa pancreática tipo II (Páncreas porcino, L0382 Sigma Aldrich®), todos a concentración fisiológica.

2.11.2. Proceso de simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro* de las emulsiones O/W

Las emulsiones O/W se sometieron a un proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, consistente en una etapa gástrica (1 hora a pH 2,5) seguida de una etapa duodenal (2 horas a pH 7,0) en un equipo de titulación automática (Metrohm) (**Figura 21**). En primer lugar, se colocaron 10 ml de emulsión en el recipiente de reacción con doble camisa (**a**), donde se temostatizó a 37 °C desde un baño de agua (**g**) durante 10 minutos, bajo agitación constante con el agitador magnético (**b**). A continuación se incorporaron 10 ml SGF en presencia de concentraciones fisiológicas de PC (relación proteína:PC = 1:1,2) y pepsina (182 U/mg de proteína) (Macierzanka et al., 2009) lo que dio comienzo a la etapa gástrica. El electrodo de pH (**c**) mide el pH del medio y de ser necesario, la mezcla resultante se

ajusta a pH 2,5 utilizando HCl 1 M desde la unidad pH-stat (d) que regula la dosificación de HCl (e) y de NaOH (f).

Finalizada la digestión gástrica (1 h), la mezcla resultante se ajustó a pH 7 con NaOH 1 M. El aumento de pH (de 2,5 a 7) pone fin a la etapa gástrica de la digestión, originando la inactivación de la pepsina (Piper y Fenton, 1965).

A continuación, la etapa intestinal de la digestión comenzó con el agregado, a la mezcla gástrica, del SIF en presencia de concentraciones fisiológicas de SB (5 mg/ml), lipasa pancreática (200.000 U) y las proteasas (tripsina y α -quimotripsina en una proporción de 34,5 U/mg de proteína y 0,44 U/mg de proteína, respectivamente). La mezcla se mantuvo por 2 horas en condiciones de digestión duodenal, manteniendo el pH en un valor constante (pH 7) a partir de la adición de cantidad necesaria de NaOH (1 M) (Jiménez-Saiz et al., 2012; McClements y Li, 2010; Sarkar et al., 2009; Sarkar, Horne, y Singh, 2010).

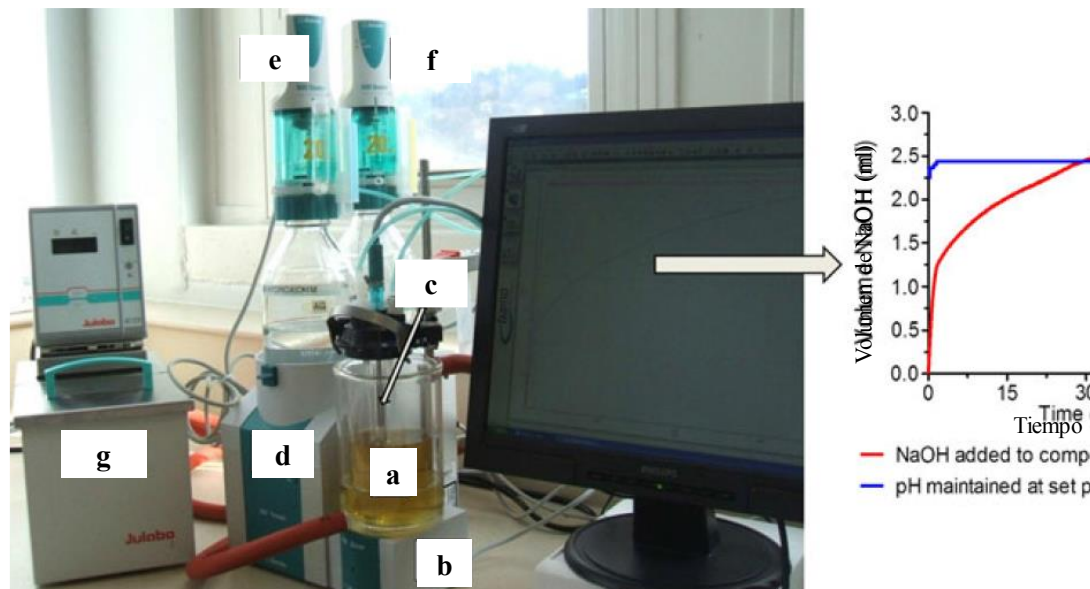


Figura 21. Equipo de titulación automática. a) recipiente de reacción con camisa térmica; b) agitador magnético; c) electrodo de pH; d) unidad pH-stat; e) dosificador de HCl; f) dosificador de NaOH; g) baño de agua.

2.11.3. Determinación del grado de lipólisis

El grado de lipólisis se determinó a partir del porcentaje de ácidos grasos (AG) liberados (% AGL), durante la etapa duodenal, por acción de la lipasa pancreática. Para tal fin se procedió a la neutralización de los AG producidos durante el proceso de digestión,

utilizando una solución de NaOH 1 M (**Figura 21**). De esta manera, el volumen de NaOH utilizado (V_{NaOH}) para mantener el sistema a pH constante (pH 7) puede vincularse al % AGL, a partir de la siguiente ecuación (15) (Li y McClements, 2010):

$$\% \text{ AGL} = [(V_{NaOH}(t) * M_{NaOH} * M_{wTG}) / mTG * 2] * 100 \quad (15)$$

donde M_{NaOH} es la concentración molar de la solución de NaOH utilizada, M_{wTG} es el peso molecular promedio de un triglicérido (TG) y mTG corresponde a la masa de triglicéridos presentes al momento de incorporar la lipasa pancreática. El valor de M_{wTG} se estimó a partir de la composición promedio de un TG típico de aceite de girasol, considerando la composición de éste en ácidos grasos y el peso molecular de cada uno (Chowdhury et al., 2008; Rosa et al., 2009). Para la determinación de mTG se tuvo en cuenta que el 99 % del aceite utilizado corresponde a TG y como la mezcla de digestión contiene 10 ml de emulsión O/W (10/90), el aporte total de aceite será de 1 ml, o bien 0,925 g (considerando que la densidad del aceite de girasol es 0,925 g/ml). En base a esto, el valor de mTG surge de considerar que el 99 % de 0,925 g será el aporte de TG en la muestra.

La Ecuación (15), utilizada para la estimación del % AGL, tiene en cuenta el hecho de que una molécula de TG es capaz de dar origen a dos moléculas de AG (titulables) y una molécula de monoglicérido (MG), durante el proceso de lipólisis. Es decir, que por cada equivalente de TG (que dará lugar a dos equivalentes de AG), se requieren dos equivalentes de NaOH para su titulación (Li y McClements, 2010; McClements y Li, 2010).

2.12. Análisis estadístico

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

3. Referencias

- Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G. & LeDenmat, M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: Food emulsions and dispersions. Anton, M (Ed.), pp. 15-28. Kerala, India: Research Singpost.
- Bahtz, J., Knorr, D., Tedeschi, C., Leser, M.E., Valles-pamies, B. & Miller, R. (2009). Adsorption of octanoic acid at the water / oil interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74, 492–497.
- Chowdhury, K., Banu, L., Khan, S. & Latif, A. (2008). Studies on the fatty acid composition of edible oil. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 42 (3), 311–316.
- de Kruif, C.G. (1997). Skim milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185 (1), 19–25.
- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88
- Galazka, V.B., Dickinson, E. & Ledward, D.A. (1996). Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10 (2), 213–219.
- Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B.D. & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (2), 173–183.
- Huang, X., Kakuda, Y. & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and the interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15, 533–542.
- Jiménez-Saiz, R., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., López-Fandiño, R. & Molina, E. (2012). *In vitro* digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. *Food Research International*, 48, 404–409.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. & Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, 23 (1), 165–176.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick Vaishnav, V.G. & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455–462.

- Li, Y. & McClements, D.J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on *in vitro* digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13), 8085–8092.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P.A. (1998). A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Research International*, 31 (2), 147–155.
- Macierzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E.N.C., Rigby, M.N. & Mackie, A.R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 5 (3), 538–550.
- Malvern-Instruments. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note, www.malvern.co.uk, 1-8.
- Mie, G. (1908). Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Annalen der Physik*, 25 (3), 377-345.
- McClements, D.J. & Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food and Function*, 1 (1), 32–59.
- Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. & Wagner, J.R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19, 595–604.
- Palazolo, G. (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Piper, D.W., & Fenton, B.H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*, 6 (5), 506–8.
- Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22, 59–66.
- Relkin, P. & Sourdets, S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19 (3), 503–511.
- Rosa, P.M., Antoniassi, R., Freitas, S.C., Bizzo, H.R., Zanotto, D.L., Oliveira, M.F. & Castiglioni, V.B.R. (2009). Chemical composition of brazilian sunflower varieties. *Helia*, 32 (50), 145–156.

- Sarkar, A., Goh, K.K.T., Singh, R.P. & Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an *in vitro* gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1563–1569.
- Sarkar, A., Horne, D.S. & Singh, H. (2010). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24 (2–3), 142–151.
- Stepanek, P. (1993). Data analysis in light scattering. En *Dynamic light scattering. The Methods and Some Applications*. Brown, W (Ed.), pp. 177–241. London, UK: Clarendon Press.
- Wüstneck, B.M. & Muschiolik, G. (1999). Interfacial dilational behaviour of adsorbed β -lactoglobulin layers at the different fluid interfaces, 15, 263–273.
- Ye, A. & Singh, H. (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 15 (2), 195–207.

Resultados

Los resultados de este trabajo se dividirán en dos secciones que abordarán diferentes aspectos de la interacción del péptido bioactivo CMP con otros componentes de la matriz alimentaria y el impacto que dicha interacción tiene sobre diferentes propiedades funcionales:

Sección I- Interacción entre el caseinoglicomacropéptido (CMP) y el caseinato de sodio (CasNa): impacto sobre propiedades funcionales.

i) Capítulo I-1: Caracterización de la interacción entre el CMP y el CasNa en solución acuosa.

ii) Capítulo I-2: Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa sobre las propiedades de gelificación.

iii) Capítulo I-3: Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa sobre las propiedades interfaciales y espumantes.

Sección II- Propiedades emulsionantes e interfaciales del CMP y el impacto de otros emulsionantes.

i) Capítulo II-1: Propiedades emulsionantes e interfaciales del CMP.

ii) Capítulo II-2: Impacto del agregado de otros co-emulsionantes sobre las emulsiones de CMP.

iii) Capítulo II-3: Estudio de la lipólisis de emulsiones de CMP y CMP/Co-emulsionante.

Sección I

*Interacción entre el
caseinoglicomacropéptido (CMP) y el
caseinato de sodio (CasNa): impacto
sobre propiedades funcionales*

Capítulo I-1

*Caracterización de la interacción entre el
CMP y el CasNa en solución acuosa*

I.1. Introducción

La importancia de estudiar la posible interacción entre el CMP y el CasNa, radica en que el CMP está presente en el suero en concentraciones considerables. Como se mencionó en la Introducción, luego de la β -lg y la α -la, el CMP es el componente proteico más abundante en el suero de queso con concentraciones que alcanzan el 15 – 20 % del total de las proteínas (Oakenfull et al., 1997; Thomä-Worringer et al., 2006). Ambos componentes, CMP (como parte del suero) y CasNa suelen emplearse juntos en diferentes productos lácteos y no lácteos (Longares et al., 2005; Morell et al., 2015; Nunes et al., 2009).

Además, el CMP demostró tener la capacidad de unirse a diferentes componentes de los alimentos como proteínas (Croguennec et al., 2014; Martínez, Farías, y Pilosof, 2010; Morales, Martínez, y Pilosof, 2016; Svanborg et al., 2016), minerales (Farías, 2012; Kelleher et al., 2003), polisacáridos (Burgardt et al., 2014; Burgardt et al., 2015; Martínez et al., 2012), por lo cual resulta interesante evaluar si también presenta una interacción con el CasNa.

I-1.1. Estudio de las interacciones entre el CMP y el CasNa en solución por dispersión dinámica de luz (DLS)

En el presente trabajo se utilizó como metodología para caracterizar la posible interacción entre el CMP y el CasNa, la determinación del tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS). Si las dos especies proteicas en solución no interaccionarán se esperaría que los tamaños de partícula característicos de cada especie se mantengan. Un cambio en el tamaño sería indicativo de una interacción molecular. Esta metodología se ha utilizado con este fin en diferentes trabajos (Martinez et al., 2009a; Martinez et al., 2009b; Martinez et al., 2010; Pizones Ruiz-Henestrosa et al., 2012; Semenova et al., 2009; Vinceković et al., 2014). De hecho, la misma muestra de CMP ha sido caracterizada por esta técnica (Farías et al., 2010; Martínez et al., 2011) así como también en combinación con otras proteínas (Martinez et al., 2012; Martínez et al., 2013).

Se caracterizó en primer lugar el comportamiento de cada componente solo y luego el de sus mezclas. Adicionalmente, se estudió el efecto de diferentes variables de interés como pH y tratamiento térmico en la posible interacción entre CasNa y CMP.

Tanto el CMP como el CasNa fueron evaluados a una concentración de 0,5 % p/p a pH natural (6,8) y a pH 5,5. Se evaluaron dos muestras de CasNa de diferentes firmas,

Fonterra y MPBiomedicals. Los sistemas mixtos CasNa/CMP se estudiaron en relación 1/1 y 3/1 a una concentración total de proteína del 1 % p/p.

La distribución de tamaño de partícula de la solución de CMP al 0,5 % p/p a pH natural (6,8) y a 25 °C se muestra en la **Figura 22**. En dichas condiciones, el CMP presentó una distribución en intensidad multimodal con una población principal a tamaños pequeños, mostrando un valor máximo de pico a 2,3 nm (**Figura 22 A**). El software del Zetasizer Nano-Zs permite estimar el diámetro hidrodinámico ($d(H)$) que tendría una proteína globular de masa molecular conocida. La estimación del $d(H)$ para la forma monomérica del CMP (aproximadamente 7,5 kDa) arrojó un valor de 2,6 nm. De esta forma, relacionando el tamaño de partícula con el peso molecular de la proteína se puede inferir que el pico reportado corresponde al tamaño del monómero de CMP (Farías et al., 2010). Esta estimación debe ser tratada con precaución porque el CMP no es una proteína globular (Smith et al., 2002); sin embargo, puede ser considerada como una buena aproximación. Adicionalmente, el CMP mostró una población con tamaños de partícula mayores a 10 nm, sin embargo, su número fue despreciable como puede deducirse de la distribución en volumen (**Figura 22 B**). Es importante señalar que en esta técnica la intensidad de la luz dispersada es proporcional al diámetro de la partícula elevado a la sexta potencia por la aproximación de Rayleighs (Malvern-Instruments), por lo cual las partículas de mayores tamaños producirán una intensidad de luz muy significativa aún estando presentes en una proporción muy baja. Por esta razón, el análisis de la distribución de tamaño de partícula por volumen dará idea de cuáles son las poblaciones de partículas mayoritarias.

Por otra parte, se analizó la distribución del tamaño de partículas de las dos muestras de CasNa (de la firma Fonterra y MPBiomedicals), obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 23**. El CasNa de la firma MPBiomedicals presentó dos poblaciones (círculos negros en **Figura 23 A**), una entre 20 y 70 nm con un valor máximo de pico a 40,7 nm, correspondiente a pequeños agregados de caseína, y una población de mayor tamaño entre 70 y 1000 nm, con un pico en 255 nm correspondiente a grandes agregados de caseína, ambas poblaciones también se observaron en la distribución en volumen (**Figura 23 B**) aunque con una diferencia en la proporción de cada pico, lo que indica la importancia relativa de cada uno.

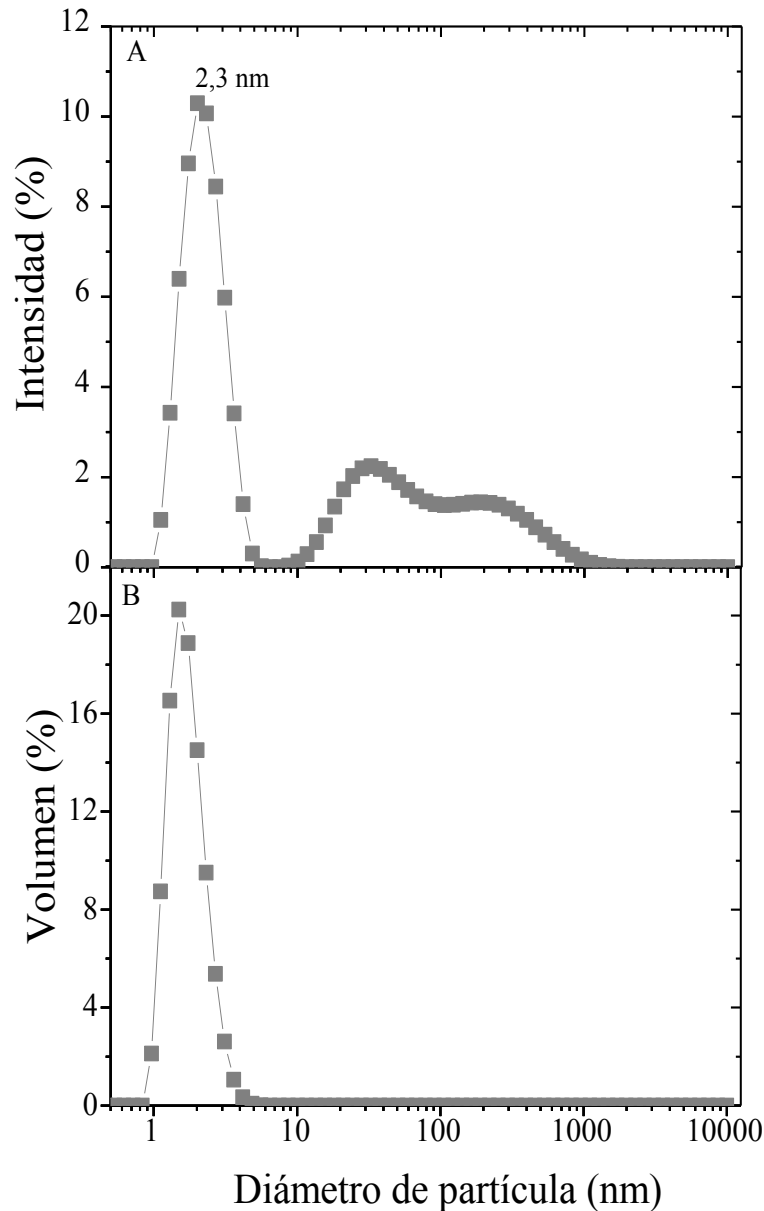


Figura 22. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de una solución de CMP 0,5 % p/p (■). Temperatura: 25 °C, pH: 6,8.

La muestra de CasNa de la firma Fonterra presentó una distribución en intensidad monomodal (círculos blancos en **Figura 23 A**) con un pico entre 100-800 nm y un valor máximo de pico en 275 nm. La distribución de tamaño de partícula por volumen de esa misma muestra de CasNa (**Figura 23 B**) confirmó que la mayor parte de la proteína se encuentra asociada formando grandes partículas, aunque alcanza a observarse un pequeño pico en tamaños más pequeños que se corresponde con el pico de menor tamaño de la otra muestra de caseinato estudiada.

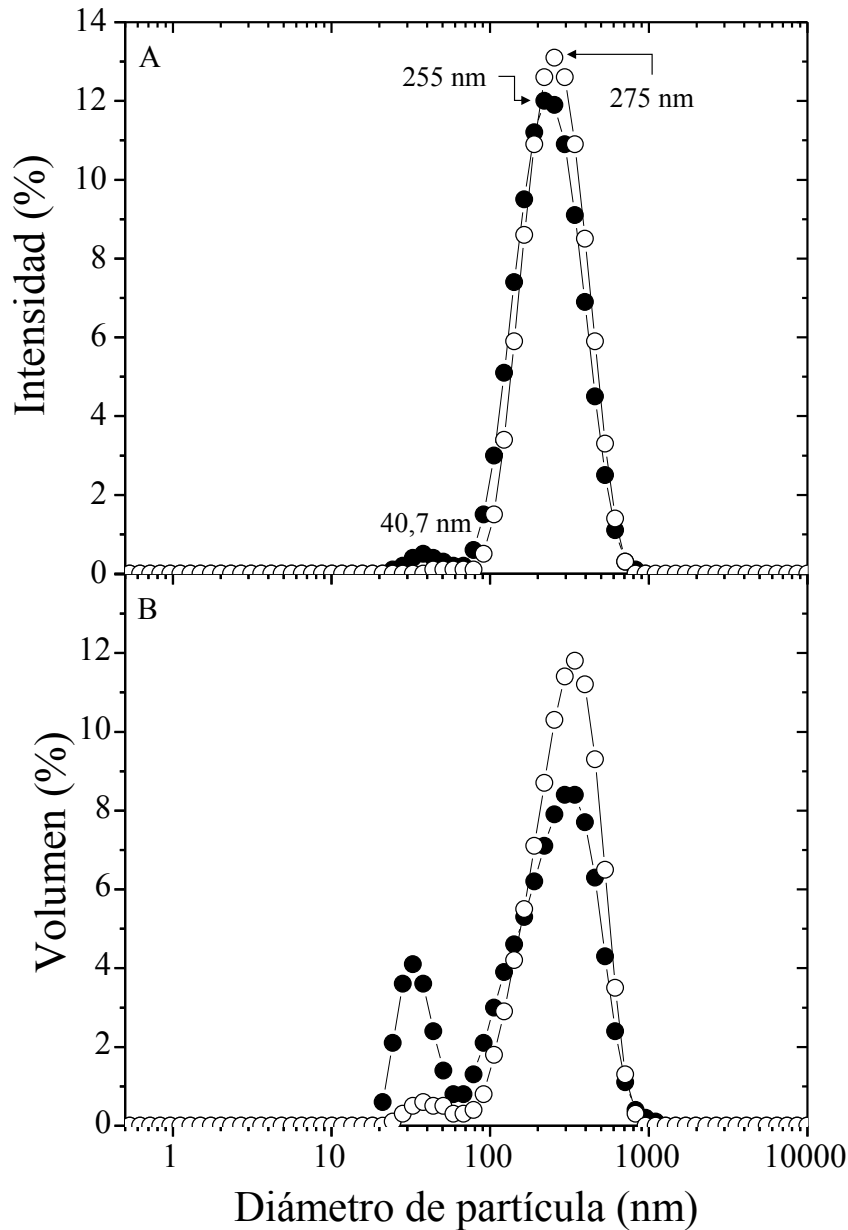


Figura 23. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de CasNa 0,5 % p/p de las firmas: MPBiomedicals (●) y CasNa Fonterra (○). Temperatura: 25 °C, pH: 6,8.

Loveday et al., (2013) reportaron una distribución monomodal con valores de tamaños similares (241 nm) para la misma muestra de CasNa (Fonterra). Otros autores reportaron un radio hidrodinámico de 100 nm en muestras de CasNa de diferentes orígenes (Belyakova et al., 2003; Dickinson et al., 2001). Semenova et al. (2009), determinaron el tamaño de partícula de una muestra de CasNa a pH 6 por DLS y reportaron la existencia de tres poblaciones de partículas con diámetros hidrodinámicos que incluían caseínas individuales (< 4 nm), agregados pequeños de caseínas (4–16 nm) y grandes agregados

de caseínas (80–1000 nm). Otros autores también han reportado distribuciones polimodales para soluciones de CasNa (Chu et al., 1995; HadjSadok et al., 2008; Müller-Buschbaum et al., 2007; Nash et al., 2002). Las diferencias de tamaños encontradas entre las diferentes muestras de CasNa, tanto las presentadas en este trabajo como las observadas por otros autores, pueden ser atribuidas al origen de la muestra, condiciones de manufactura, ambientales y de almacenaje.

El CasNa es una mezcla de las cuatro caseínas (α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -), que se obtiene por acidificación de la leche y posterior re-neutralización a pH 7 (Mulvihill, 1989). En estas condiciones, la estructura micelar se destruye y el CasNa forma agregados o submicelas debido a la alta proporción de cadenas laterales de aminoácidos hidrófobicos que se autoasocian en solución acuosa (Farrell et al., 1990). Después de eliminar el fosfato de calcio coloidal (CCP), quien consolida la unión entre las caseínas neutralizando las cargas negativas de los residuos de fosfoserina y reduciendo la repulsión electrostática, el CasNa resultante existe en solución principalmente como una mezcla de monómeros de caseína y agregados de tamaño variable de caseína. Las partículas de CasNa surgen de un sistema de asociación-disociación reversible que contiene diferentes formas autoensambladas, con cantidades variables de ellas, la existencia de un equilibrio entre estas formas depende de la concentración, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de iones calcio, etc. (Vinceković et al., 2014). La presencia de iones calcio en la muestra de CasNa podría aumentar la unión entre las caseínas más fosforiladas y formar puentes iónicos entre los grupos fosfato (Marchesseau et al., 2002), contribuyendo así al aumento de la agregación de proteínas (Muller-Buschbaum et al., 2007).

I-1.2. Caracterización de sistemas mixtos CasNa/CMP

La existencia de interacciones entre CMP y CasNa en solución a temperatura ambiente (25 °C) y a pH natural (6,8) se estudió a una relación CasNa/CMP de 3/1 (**Figura 24**) y 1/1 (**Figura 25**) (concentración final 1% p/p), utilizando las muestras de CasNa de diferentes firmas (Fonterra y MPBiomedicals). Para ambas mezclas se observó en la distribución de partículas por intensidad un comportamiento bimodal, independientemente del origen del CasNa, pero con diferentes proporciones de cada población de partículas dependiendo de la relación CasNa/CMP. Para la mezcla 3/1 (**Figura 24 A**), se observó un pequeño pico con un valor máximo en 27,6 nm y otro pico a tamaños más grandes (valor máximo entre 250-300 nm), semejante a la población

observada en la muestra de CasNa (**Figura 23 A**). Cuando se evaluó la distribución por volumen para esta relación (**Figura 24 B**), se observó que la proporción de estas dos poblaciones difieren según el CasNa utilizado. La mezcla preparada con el CasNa de la firma Fonterra presentó una mayor proporción de la población de mayor tamaño, mientras que la mezcla preparada con el CasNa de la firma MPBiomedicals presentó una población mayoritaria de las partículas de menor tamaño.

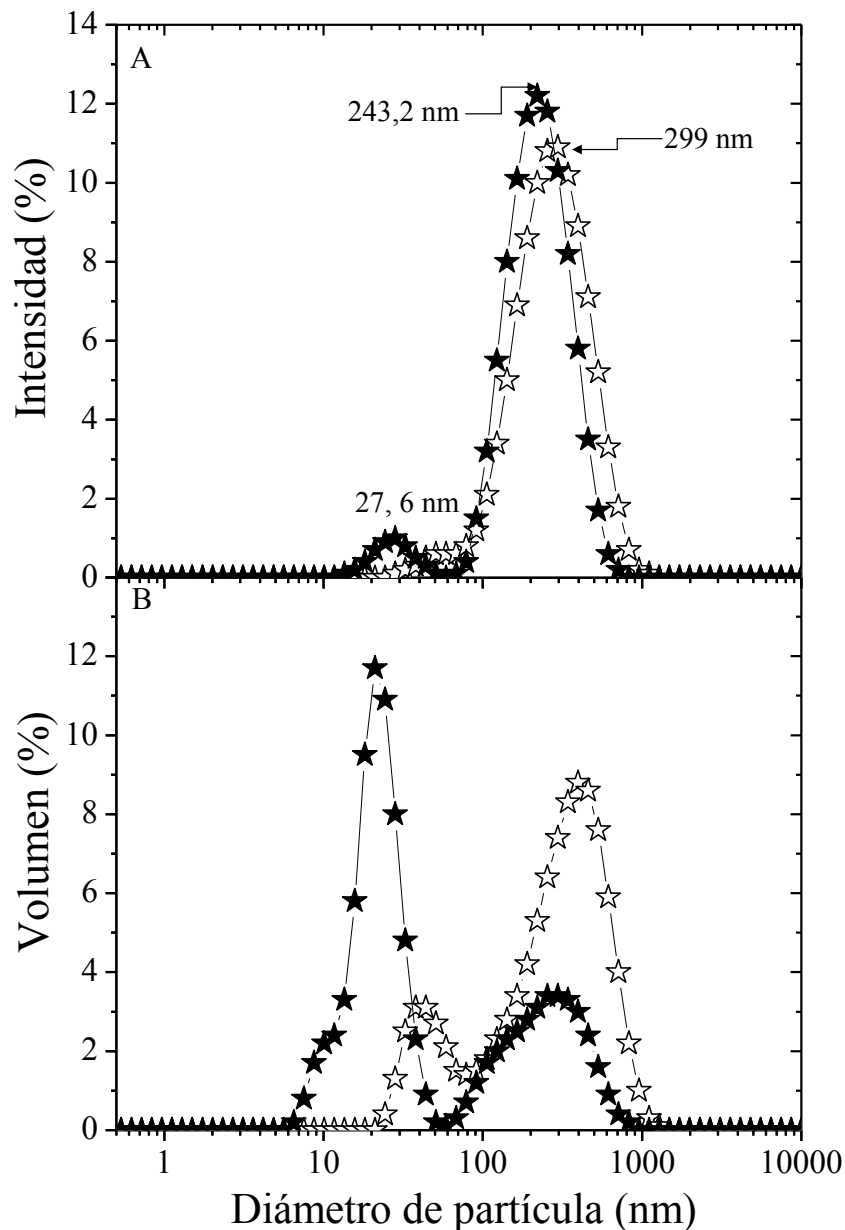


Figura 24. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de CasNa/CMP en relación 3/1. Concentración total: 1 % p/p. Obtenidas con CasNa MPBiomedicals (★), CasNa Fonterra (☆). Temperatura: 25 °C, pH: 6,8.

Para las mezclas CasNa/CMP 1/1 (**Figura 25 A**), se observaron distribuciones bimodales y similares entre sí. Las distribuciones en intensidad presentaron una población con valor máximo de pico alrededor de 26 nm y también la misma población observada en la mezcla 3/1 y en CasNa (valor máximo ~ 250 nm). Las distribuciones por volumen de las mezclas 1/1 (**Figura 25 B**) indican que la población predominante para ambos casos es la de menor tamaño.

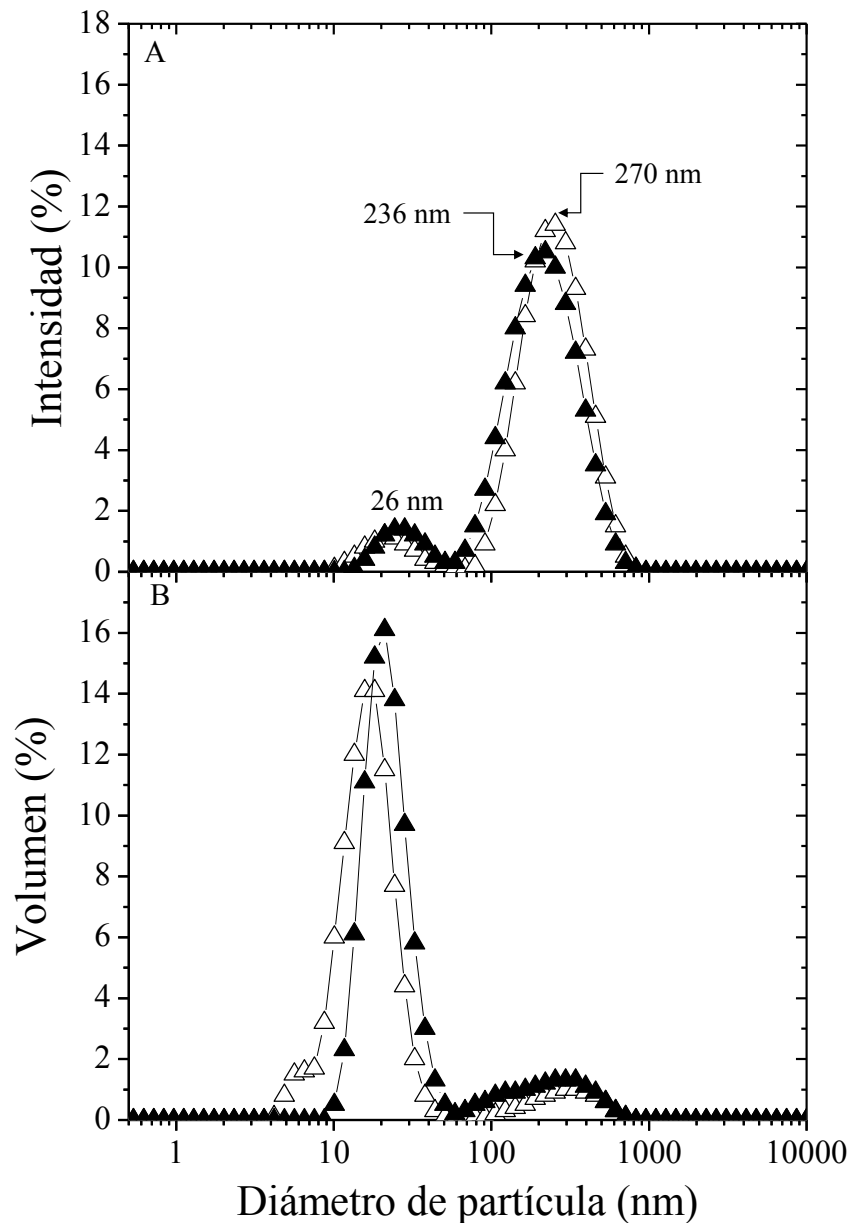


Figura 25. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) para soluciones de CasNa/CMP en relación 1/1. Concentración total: 1 % p/p. Obtenidas con CasNa MPBiomedicals (▲), CasNa Fonterra (△). Temperatura: 25 °C, pH: 6,8.

Si se comparan las poblaciones de las mezclas con las poblaciones predominantes en las distribuciones de los componentes individuales (**Figura 22 B** y **Figura 23 B**) se pueden hacer tres observaciones importantes: 1) el pico de la distribución del CMP desaparece; 2) la población encontrada para el CasNa disminuye o desaparece y 3) aparece o aumenta la población de partículas entre 20-30 nm. Esta población de menor tamaño puede atribuirse al debatido término de “submicelas”, encontrado en muchos sistemas de caseinato (Qi, 2007).

Estos resultados sugieren que la presencia de CMP (en mayor proporción en el sistema CasNa CMP 1/1) inhibe la asociación de las “submicelas” para formar micelas. Esta “inhibición” de la formación de micelas puede atribuirse a diferentes razones

1) La capacidad de CMP para unir el calcio presente en el CasNa, impidiendo la asociación micelar. Semenova et al. (2009) reportaron que la presencia de iones Ca^{+2} promueve la unión entre los grupos fosfato de las moléculas de caseína, aumentando así el tamaño de partícula de CasNa; y de manera inversa cuando agregaron EDTA (secuestrante de calcio), observaron un aumento en el área del pico de las partículas pequeñas ($d \sim 20$ nm), acompañado por una disminución en la contribución de las partículas más grandes ($d \sim 220$ nm), es decir, una disminución en el tamaño del CasNa. Como se mencionó en la introducción, el CMP es un péptido heterogéneo con diferente grado de fosforilación y glicosilación (Thomä-Worringer, Sörensen y López-Fandiño, 2006), que presenta carga negativa a pH neutro debido a la presencia de aminoácidos ácidos. La forma glicosilada del CMP (gCMP) representa aproximadamente el 50 % de la muestra de CMP utilizada y contiene un 8,5 % (base seca) de ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc), conocido como ácido siálico, que proporciona una carga negativa adicional. Todas estas cargas negativas explican la capacidad del CMP para unirse a moléculas cargadas positivamente, como minerales (Kelleher et al., 2003; Traving y Schauer, 1998). En cuanto a la unión al calcio, Farías (2012) reportó una fuerte interacción entre el mismo CMP utilizado en este trabajo y calcio, indicando que existen tres posibles maneras de unión del calcio con el CMP: i) a través de los residuos de aminoácidos ácidos; ii) por las serinas fosforiladas; y iii) por los residuos de ácido siálico, y que dicha unión promueve el autoensamblaje del CMP. Por lo tanto, podemos sugerir que el CMP podría interactuar con los iones calcio, presentes en la muestra de CasNa, por lo que dichos iones estarían menos disponibles para su participación en la estabilización de los agregados de CasNa. Esto podría explicar el menor tamaño de partícula observado en la mezcla 1/1, donde el CMP está presente en mayor proporción.

2) La ausencia del pico de CMP en las distribuciones de tamaño de partícula de las mezclas, que sugiere la existencia de interacción entre CMP y CasNa, posiblemente por medio de interacciones hidrofóbicas. Además, a pH 6,8, el CMP tiene una carga negativa elevada (Kreuz et al., 2009), de modo que la unión del CMP al CasNa podría aumentar la carga negativa y la repulsión electrostática, contribuyendo a la reducción del tamaño de los agregados.

De manera similar, se ha reportado la interacción de CMP con otras proteínas como β -Ig (Martinez et al., 2009 b) mediante estudios de tamaño de partícula, temperatura de desnaturalización e hidrofobicidad superficial. Dicha interacción fue atribuida a la formación de complejos CMP- β -Ig por medio de uniones hidrógeno o electrostáticas. Debido a la elevada carga negativa que presenta el CMP a pH neutro por la presencia de aminoácidos ácidos y la carga negativa adicional que le otorgan los grupos carboxílicos del ácido siálico, podría interactuar electrostáticamente con zonas con cargas positivas de la β -Ig (por ejemplo, residuos de lisina). En otro trabajo, Martinez et al. (2013) también reportaron la existencia de interacción entre CMP y gelatina mediante determinación de tamaño de partícula y potencial zeta (ζ). Ellos reportaron que a pH 6,5 la gelatina tiene una carga cercana a 0 ($\zeta = 1,93$ mV) debido a la proximidad a su punto isoeléctrico (6), mientras que el CMP mantiene una fuerte carga negativa ($\zeta = 24,12$ mV), y sugirieron que esta diferencia de carga les permitiría interactuar mediante uniones hidrofóbicas debido a la baja repulsión electrostática.

I-1.3. Efecto de la disminución de pH en la interacción entre CMP y CasNa

Un cambio de pH podría afectar la interacción entre moléculas debido a que las mismas presentan diferente distribución de carga y comportamiento al disminuir el pH. Se ha reportado que el CMP al disminuir el pH por debajo de 6,5 comienza a autoensamblarse dando lugar a formas más asociadas (Farías et al., 2010). Por otro lado, las soluciones de CasNa se desestabilizan al disminuir el pH y atravesar su punto isoeléctrico, debido a que se agregan y precipitan (Walstra et al., 1999). Por dicha razón, al evaluar el efecto del pH se eligió un valor de 5,5, menor al natural (6,8) pero mayor al punto isoeléctrico del CasNa (4,6) para evitar dicha desestabilización.

En este caso se caracterizaron las interacciones en solución entre CasNa de la firma MPBiomedicals y CMP.

Las distribuciones de tamaño de partícula para CMP y CasNa a temperatura de 25 °C y pH 5,5, se muestran en la **Figura 26**.

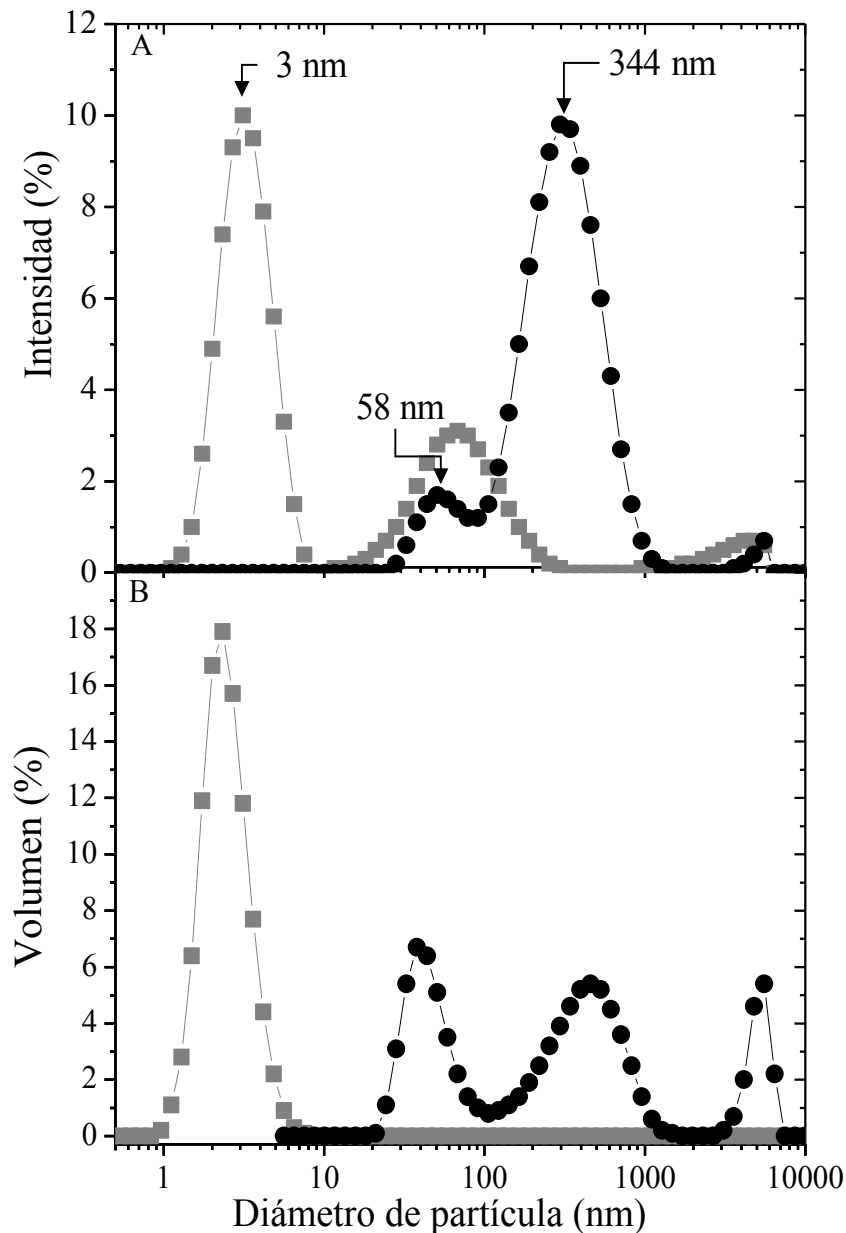


Figura 26. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de CMP (■) y CasNa (●). Concentración total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C, pH: 5,5.

Como se describió en el inciso anterior, a pH natural, el CMP está presente en su forma monomérica con un pico predominante en tamaños cercanos a 2,3 nm (Farías et al., 2010) (**Figura 22**). A pH 5,5 (**Figura 26**) el CMP mostró un pico predominante de mayor tamaño, cercano a 3 nm, que correspondería a su forma dimérica. Como fue mencionado anteriormente el estado de asociación del CMP es dependiente del pH, observando desde

monómeros a pH neutro hasta polímeros a pH ácido (por ejemplo, por debajo de pH 4,5), pasando por dímeros, tetrámeros y hexámeros a valores de pH intermedios (Farías et al., 2010). De hecho, en dicho trabajo fue reportado que los polímeros observados a valores de pH por debajo de 4,5 son capaces de autoensamblarse en el tiempo a temperatura ambiente hasta formar estructuras gelificadas.

La distribución de tamaño de partícula del CasNa a este pH (**Figura 26 A**) presentó tres poblaciones (30-100 nm, 100-1000 nm y > 3000 nm) mostrando una mayor asociación que a pH natural (**Figura 23 A**). Este aumento en el tamaño de los agregados de CasNa a pH 5,5, puede explicarse por la disminución en la repulsión electrostática a medida que el pH se aproxima al punto isoeléctrico, 4,6 (Allen et al., 2006), lo que conduce a una mayor interacción entre las caseínas, dando lugar a estructuras de mayor tamaño.

Para el caso de las mezclas CasNa/CMP (relación: 3/1 y 1/1) a pH 5,5 (**Figura 27**), se observó para ambos sistemas mixtos, una distribución de tamaño de partícula amplia (**Figura 27 A**) con un pico principal con valor máximo de 160 nm y un hombro a tamaños más bajos (valor máximo del hombro entre 21-25 nm), siendo esta población de menor tamaño la predominante en ambos sistemas (deducido de la distribución de tamaño de partícula por volumen en la **Figura 27 B**).

La ausencia del pico correspondiente al CMP en las distribuciones de tamaño de partícula de las mezclas, sugiere la existencia de interacción entre CMP y CasNa, posiblemente por medio de interacciones hidrofóbicas.

Los resultados del estudio de la interacción del CMP y CasNa en solución acuosa a diferentes pH (6,8 y 5,5), indican que la modificación en el estado de agregación del CasNa (producido por la presencia de CMP), es dependiente del pH. Es así que, a pH 5,5, las mezclas CasNa/CMP se encuentran formando principalmente partículas de un tamaño de 20-30 nm mientras que, a pH 6,8, además de esta población de partículas pequeñas existe una cantidad significativa de los agregados de CasNa de mayor tamaño (250 nm). Esto indicaría un mayor grado de interacción entre el CMP y el CasNa a pH 5,5. Si las interacciones fueran de naturaleza hidrofóbica se verían favorecidas a medida que baja el pH, debido a que el acercamiento entre las moléculas se ve favorecido al disminuir la repulsión electrostática, permitiendo establecer uniones entre sus sitios hidrófobos.

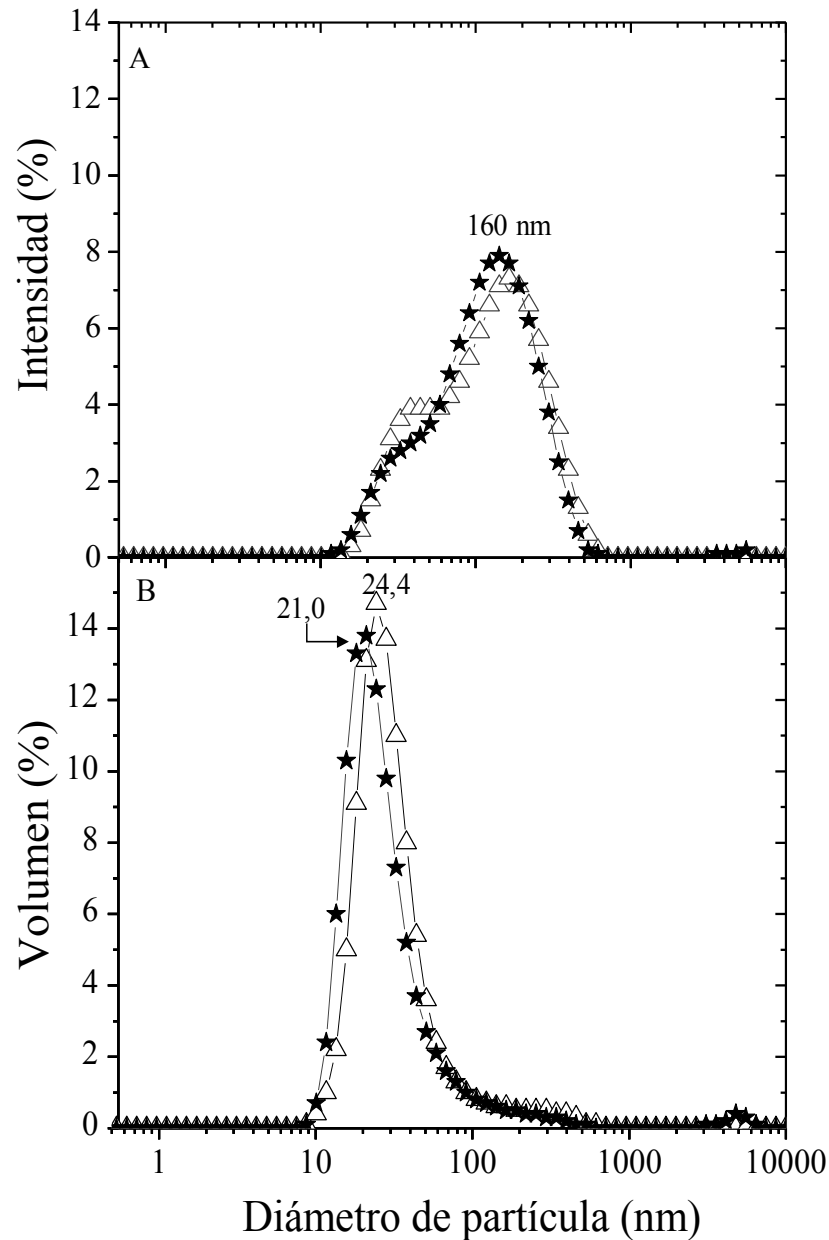


Figura 27. Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de soluciones de CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△). Concentración total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C, pH: 5,5.

I-1.4. Estudio de las interacciones entre CMP y CasNa en solución por análisis del comportamiento de flujo

Las propiedades reológicas presentan la habilidad de revelar cambios en la estructura de las moléculas, ya sea su tamaño, rigidez y su grado de ramificación (Domenek et al., 2008) o el grado de asociación de las mismas (Robinson, Ross-murphy y Morris, 1982). Estos cambios estructurales contribuyen a la variación del volumen hidrodinámico de las

moléculas lo cual se revela en la modificación de sus propiedades de flujo (Domenek et al., 2008).

Se obtuvieron las curvas de flujo para soluciones de CMP, CasNa y CasNa/CMP (relación 1/1 y 3/1) a una concentración de 1 % p/p, las cuales mostraron que todas las soluciones presentan un comportamiento newtoniano (resultados no mostrados). En la **Figura 28** se muestra la viscosidad determinada a partir de la pendiente de las curvas de flujo a pH 5,5 y pH 6,8.

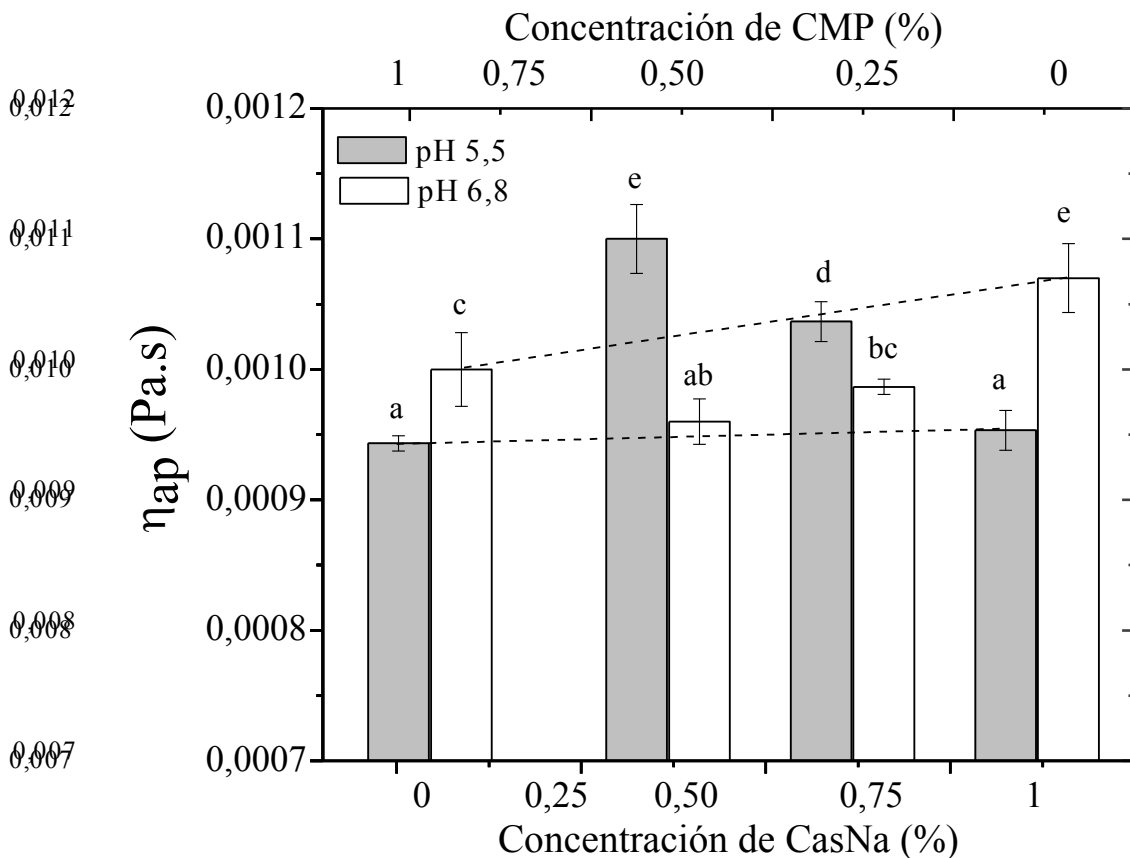


Figura 28. Viscosidad de soluciones de CMP, CasNa, CasNa/CMP 1/1 y CasNa/CMP 3/1 a pH 5,5 (barras grises) y pH 6,8 (barras blancas). Las líneas punteadas indican el comportamiento esperado por la relación CasNa/CMP en las soluciones mixtas a cada pH. Concentración total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

La solución de CasNa a pH 6,8 presentó una viscosidad significativamente mayor a la solución de CMP, pero a pH 5,5 ambas exhibieron viscosidades similares. Si no hubiera interacciones entre CasNa y CMP, se esperaría en las soluciones mixtas, una viscosidad proporcional al contenido de cada componente (líneas punteadas en la **Figura 28**). Sin

embargo, las mezclas mostraron una viscosidad más alta a la esperada a pH 5,5 y más baja a pH 6,8. La concentración de proteínas, el estado de agregación, el tamaño y forma de los agregados pueden modificar la viscosidad de las soluciones (Gillespie, 1983). Además, la capacidad de absorción de agua de las proteínas, que depende del pH, también puede influir. De todos modos, debido a que la concentración total de proteína fue la misma en todos los sistemas, las diferencias de viscosidad encontradas en las soluciones mixtas en relación a lo esperado, se pueden atribuir a interacciones entre CMP y CasNa, como también se reveló mediante la determinación del tamaño de partícula. La mayor viscosidad de los sistemas mixtos a pH 5,5 podría atribuirse a una mayor interacción entre CasNa y CMP a este pH, lo que podría bloquear un mayor número de zonas hidrofóbicas del CasNa por interacción con grupos hidrofóbicos del CMP, incrementando así la afinidad del sistema mixto por el agua, ya que el CMP es altamente soluble (Chobert et al., 1989).

I-1.5. Estudio de las interacciones entre CMP y CasNa en condiciones de temperatura y pH que simulan la fermentación de un producto lácteo

Se estudió el efecto de la temperatura y la disminución del pH sobre la distribución de tamaño de partícula de CMP, CasNa y CasNa/CMP (relación 1/1) a una concentración del 1% p/p, simulando las condiciones de fermentación de un producto lácteo. A tal fin, las muestras (a pH natural) se sometieron a una rampa de temperatura de 25 °C a 85 °C, manteniendo la temperatura a 85 °C durante 20 minutos y enfriando posteriormente hasta 43 °C. El proceso térmico a 85 °C correspondería a la etapa de pasteurización durante la elaboración de un producto lácteo fermentado, por ejemplo, un yogur. Mientras que la segunda etapa correspondería al enfriamiento previo a la fermentación.

La disminución del pH hasta 4,6 que ocurre durante la fermentación se simuló a 43 °C mediante la adición de glucono- δ -lactona (GDL) que al hidrolizarse produce una disminución del pH en un tiempo de 1-1,5 h.

I-1.5.1. Evolución del tamaño de partícula durante el calentamiento/enfriamiento

Con el objetivo de comparar la evolución del tamaño de partícula de las soluciones de CMP, CasNa y del sistema mixto CMP/CasNa (relación 1/1) durante toda la rampa de temperatura, se analizó la evolución del Z-average. Este parámetro se obtiene mediante el análisis de Cumulantes en la determinación del tamaño de partícula, el cual ajusta una

exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño de diámetro promedio (diámetro hidrodinámico promedio o z-average). El valor del z-average corresponde a la media del tamaño de partícula en la distribución de intensidad. Este parámetro es adecuado para obtener un simple valor con el propósito de comparación, pero inadecuado para dar una completa descripción de los resultados para sistemas polidispersos.

A partir de este estudio, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 29**, en la cual se puede observar que las muestras de CasNa y CasNa/CMP presentaron un leve aumento en el tamaño del pico predominante (300-400 nm) al ser sometidas a un calentamiento a 85 °C, indicando una leve modificación en su estado de agregación. Sin embargo, durante el enfriamiento hasta 43 °C se observó que dicha asociación revirtió, en ambos sistemas, obteniéndose tamaños similares a los iniciales (~ 250 nm). HadjSadok et al. (2008) estudiaron el efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula de soluciones de CasNa a pH entre 7,8 y 5 y encontraron que luego de un aumento de temperatura hasta 70 °C y una posterior disminución, se produjo una variación en el radio hidrodinámico promedio que fue totalmente reversible al enfriar el sistema, de manera similar a la observada en este estudio.

No se observaron cambios en el tamaño de partículas de la solución de CMP (resultado no mostrado), manteniendo el tamaño de la población predominante en valores entre 2-2,3 nm). Este comportamiento está de acuerdo con lo reportado por Farías et al. (2010), quienes estudiaron el efecto del calentamiento sobre el autoensamblaje del CMP mediado por pH, mediante DLS y reportaron que las soluciones de CMP a pH 6,5 no mostraron ningún cambio en la distribución del tamaño de partícula durante el calentamiento, manteniendo constante el tamaño de partícula de la población predominante con un valor de 2,5 nm. Dichos autores, reportaron también que, por el contrario, las soluciones de CMP a pH inferior a 4,5 mostraron una disminución importante en la intensidad del pico de CMP de menor tamaño y un aumento de las poblaciones de mayor tamaño, indicando la formación de estructuras ensambladas por aumento de la temperatura.

Estos resultados indican que los cambios de temperatura que ocurren durante la elaboración de un producto lácteo fermentado, prácticamente no modifican el tamaño de partícula de ninguno de los tres sistemas.

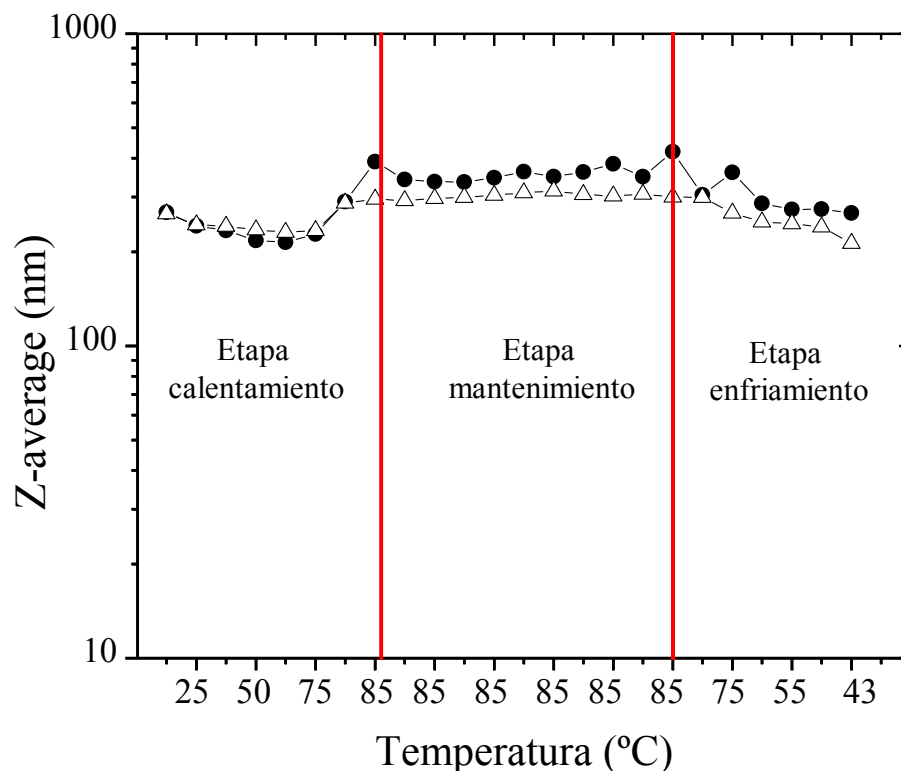


Figura 29. Evolución del Z-average durante el calentamiento, mantenimiento y el posterior enfriamiento de soluciones de CasNa (●) y CasNa/CMP 1/1 (△). Concentración total: 1 % p/p, pH: 6,8.

I-1.5.2. Evolución del tamaño de partícula con la disminución de pH

La **Figura 30** muestra el efecto de la disminución del pH sobre el Z-average de las soluciones de CMP, CasNa y del sistema mixto CasNa/CMP (relación 1/1 y 3/1) a una temperatura de 43 °C. El análisis de esta figura debe hacerse en el sentido de pH decreciente para evaluar el efecto de la acidificación por acción de GDL.

En general, se observó que la disminución del pH causada por la hidrólisis de GDL promovió un aumento del Z-average de la solución de CasNa y de las mezclas CasNa/CMP (relación 1/1 y 3/1); sin embargo, no se observaron cambios significativos en el Z-average de la solución de CMP dentro del intervalo de pH evaluado ($\text{pH} > 5$), lo cual era de esperarse, ya que como se mencionó previamente el autoensamblaje del CMP ocurre a pH por debajo de 4,5 (Farías et al., 2010).

El aumento del Z-average de CasNa y de las mezclas CasNa/CMP refleja la asociación del caseinato producida al disminuir el pH hacia su punto isoeléctrico ($\text{pH} 4,6$) debido a la disminución de la carga negativa y su consiguiente disminución de la repulsión

electrostática. Dicha disminución de la repulsión, provoca que las moléculas de caseína se acerquen entre sí, de modo que aumenta la interacción entre ellas aumentando así el tamaño de partícula. El grado de asociación de las caseínas, y el tamaño de los agregados, depende fuertemente de factores tales como la concentración de proteínas, la concentración de iones de calcio, la fuerza iónica, la temperatura y el pH (Chu et al., 1995). Este comportamiento fue también observado y reportado previamente por varios autores (Belyakova et al., 2003; de Kruif, 1999; Semenova et al., 2005), indicando que la reducción del pH desde la neutralidad hacia el punto isoelectrico conduce a la neutralización parcial de la carga y la consiguiente asociación proteica.

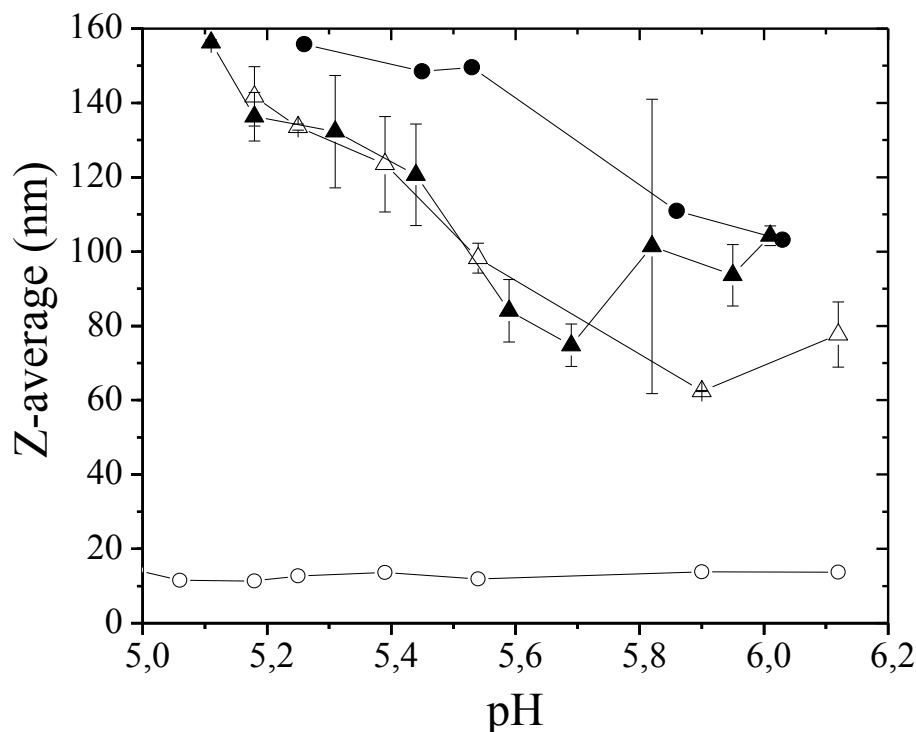


Figura 30. Evolución del Z-average en función del pH para soluciones de CasNa 0,5 % p/p (●), CMP 0,5 % p/p (○), y sus mezclas a una concentración total de 1 % p/p en relaciones CasNa/CMP: 1/1 (Δ), y 3/1 (▲). Temperatura: 43 °C.

En este trabajo, no se pudo determinar el tamaño de partícula de CasNa y las mezclas CasNa/CMP por debajo de pH 5,2, porque se generaban muchos errores durante la medición debido a la aparición de agregados floculados que excedían el límite superior de tamaño que puede detectar el equipo (6000 nm).

Los valores de Z-average de las mezclas CasNa/CMP 3/1 y 1/1 fueron menores a los obtenidos para la muestra de CasNa en todo el rango de pH valuado. Esto puede atribuirse a que la presencia de CMP disminuye el valor inicial del tamaño de partícula de CasNa, como fue explicado anteriormente.

I-1.6. Conclusión

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten evidenciar la existencia de interacción entre el CMP y el CasNa en solución. Además, se comprobó que la interacción entre CMP y CasNa se ve afectada por el pH, ya que a pH 5,5 el tamaño de partícula de las mezclas CasNa/CMP es menor que a pH natural.

A continuación, se propone un esquema del posible efecto que tendría la presencia del CMP sobre el estado de asociación del CasNa en las mezclas a los dos pH evaluados (**Figura 31**).

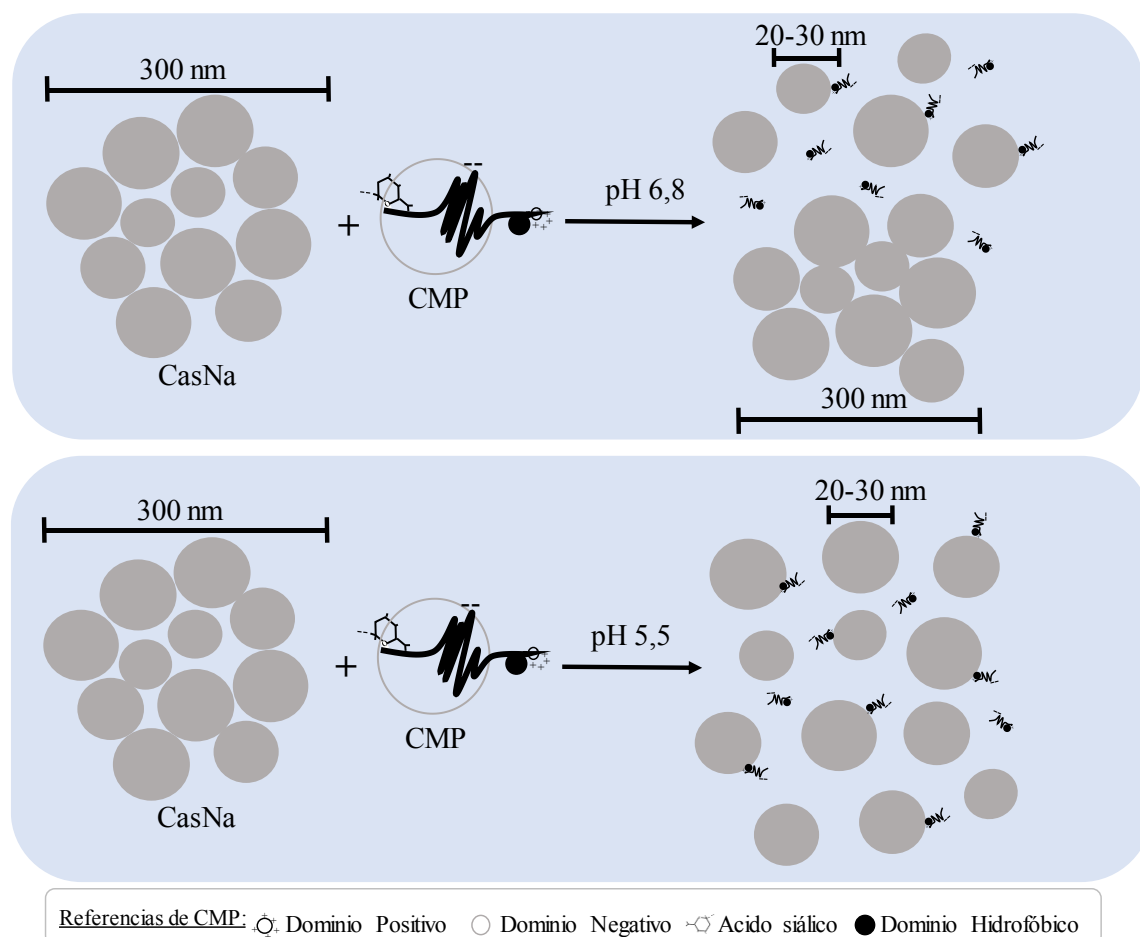


Figura 31. Esquema del modelo propuesto para explicar el efecto de la interacción entre el CMP y el CasNa en solución acuosa a diferentes pH.

La interacción entre CasNa y CMP en solución a pH 6,8, redujo el tamaño de partícula de una parte de los agregados de CasNa de mayor tamaño (≥ 300 nm) a agregados o submicelas de menor tamaño (aproximadamente 20-30 nm) como fue comprobado por DLS (**Figura 24** y **Figura 25**), mientras que a pH 5,5 todos los agregados de CasNa de 300 nm fueron disociados a submicelas de menor tamaño (**Figura 27**). Los resultados evidenciaron que el rol del CMP es el de modificar el estado de asociación de las moléculas de CasNa, ya sea por interacción con las caseínas o uniendo el calcio presente en el CasNa, lo que impediría su asociación micelar. El mayor grado de interacción entre el CMP y el CasNa a pH 5,5 podría atribuirse a que a este pH disminuye la repulsión electrostática, lo que podría favorecer el acercamiento entre las moléculas aumentando la posibilidad de interacciones hidrofóbicas.

Por último, con el estudio de simulación de las condiciones de fermentación de un producto lácteo se observó que el tamaño de partícula tanto del CMP, como el CasNa y el sistema mixto no son afectados por el tratamiento térmico; sin embargo, la disminución del pH provoca un aumento del Z-average de los sistemas con CasNa. Este estudio brinda información que puede ser útil para el empleo de estos sistemas en diversos productos lácteos fermentados.

I-1.7. Referencias

- Allen, K.E., Dickinson, E. & Murray, B. (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 225–234.
- Belyakova, L.E., Antipova, A.S., Semenova, M.G., Dickinson, E., Matia-Merino, L. & Tsapkina, E.N. (2003). Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 31–46.
- Burgardt, V.C.F., Oliveira, D.F., Evseev, I.G., Coelho, A.R., Haminiuk, C.W.I. & Waszczynskyj, N. (2014). Influence of concentration and pH in caseinomacropptide and carboxymethylcellulose interaction. *Food Hydrocolloids*, 35, 170–180.
- Burgardt, V.C.F., Züge, L.C.B., Sartor, G.B., Waszczynskyj, N., Silveira, J.L.M. & Haminiuk, C.W.I. (2015). The Addition of Carboxymethylcellulose in Caseinomacropptide Acid Gels: Rheological, Optical and Microstructural Characteristics. *Food Hydrocolloids*, 49, 11–17.
- Chobert, J.M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalarondo, M. & Nicolas, M.G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ -casein and its caseinomacropptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457–473.
- Chu, B., Zhou, Z., Wu, G. & Farrell Jr, H.M. (1995). Laser light scattering of model casein solutions: effects of high temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170 (1), 102–112.
- Croguennec, T., Leng, N., Hamona, P., Rousseau, F., Jeantet, R. & Bouhallab, S. (2014). Caseinomacropptide modifies the heat-induced denaturation aggregation process of beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 36, 55-64
- de Kruif, C.G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9, 183–188.
- Dickinson, E., Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Antipova, A.S., LI'in, M.M., Tsapkina, E.N. & Ritzoulis, C. (2001). Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 239, 87–97.
- Domenek, S, Petit, E., Ducept, F., Mezdour, S., Brambati, N., Ridoux, C., Guedj, S. & Michon, C. (2008). Influence of Concentration and Ionic Strength on the Adsorption Kinetics of Gelatin at the Air/water Interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 331 (1–2), 48–55.

- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79–88.
- Fariás, M.E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Farrell, H.M., Pessen, H., Brown, E.M. & Kumosinski, T.F. (1990). Structural insights into the bovine casein micelle-small-angle x-ray-scattering studies and correlations with spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 73, 3592-3601.
- Gillespie, T. (1983). The effect of aggregation and particle size distribution on the viscosity of newtonian suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 94 (1), 166–173.
- HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L. & Moulai-Mostefa, N. (2008). Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, 22 (8), 1460–1466.
- Kelleher, S., Chatterton, D., Nielsen, K. & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1261–1268.
- Kreuz, M., Strixner, T. & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1818–1826.
- Longares, A., Monahan, F.J., Riordan, E.D.O. & OSullivan, M. (2005). Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. *International Dairy Journal*, 15, 1255–1260.
- Loveday, S.M., Ye, A., Anema, S G. & Singh, H. (2013). Heat-induced colloidal interactions of whey proteins, sodium caseinate and gum arabic in binary and ternary mixtures. *Food Research International*, 54 (1), 111–117.
- Malvern-Instruments. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note, www.malvern.co.uk, 1-8.
- Marchesseau, S., Mani, J.C., Martineau, P., Roquet, F., Cuq, J.L. & Pagniere, M. (2002). Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique. *Journal of Dairy Science*, 85, 2711–2721
- Martínez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009a). Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 230-237.
- Martínez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009b). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air–water interface of

- caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 39–47.
- Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2010). The dynamics of gelation of casein glycomacropeptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. *International Dairy Journal*, 20, 580-588.
- Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 860-867.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012). Interactions between β -lactoglobulin and casein glycomacropeptide on foaming. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89 (1), 234-241.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2013). Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide - gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 48–57.
- Morales, R., Martinez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2016). Dynamics of gelation, textural and microstructural properties of gelatin gels in the presence of casein glycomacropeptide. *Food Research International*, 84, 102–107.
- Morell, P., Piqueras-fiszman, B., Hernando, I. & Fiszman, S. (2015). How is an ideal satiating yogurt described? A case study with added-protein yogurts. *FRIN*, 78, 141–147.
- Mulvihill, D.M. & Fox, P.F. (1989). Caseins and caseinates: manufacture. En *Development in Dairy Chemistry*. Fox, P.F. (Ed.), pp. 97-130. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Müller-Buschbaum, P., Gebhardt, R., Roth, S.V, Metwalli, Z.E. & Doster, W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*, 93 (3), 960–968.
- Nash, W., Pinder, D.N., Hemar, Y. & Singh, H. (2002). Dynamic light scattering investigation of sodium caseinate and xanthan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30, 269–271.
- Nunes, A.P., Oliveira, M.N., Damin, M.R. & Alca, M.R. (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrates and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1744–1750.
- Oakenfull, D., Pearce, J. & Burley, R.W. (1997). Protein gelation. En *Food protein and their applications*. Damodaran, S & Paraf (Eds.). New York: Marcel Dekker, Inc.

- Pizones Ruiz-Henestrosa V.M., Martínez M.J., Rodríguez Patino, J.M & Pilosof A.M.R. (2012). A dynamic light scattering study on the complex assembly of glycinin soy globulin in aqueous solutions. *Journal of American oil Chemistry and Society*, 89, 1183-1191.
- Qi, P.X. (2007). Studies of casein micelle structure: The past and the present. *Dairy Science and Technology*, 87 (4-5), 363-383.
- Robinson, G., Ross-Murphy, S.B & Morris, E.R. (1982). Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydrate Research*, 107, 17-32.
- Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Dickinson, E., Eliot, C. & Polikarpov Yu, N. (2005). Caseinate interactions in solution and in emulsions: effect of temperature, pH and calcium ions. En *Food Colloids: Interactions, microstructure and processing*. Dickinson, E. (Ed.), pp. 209-217. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Polikarpov, Y.N., Antipova, A.S. & Dickinson, E. (2009). Light scattering study of sodium caseinate+dextran sulfate in aqueous solution: Relationship to emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23, 629-639.
- Smith, M.H., Edwards, P.J.B., Palmano, K.P. & Creamer, L.K. (2002). Structural features of bovine caseinomacropeptide A and B by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Dairy Research*, 69, 85-94.
- Svanborg, S., Johansen, A.G., Abrahamsen, R.K., Schüller, R.B. & Skeie, S.B. (2016). Caseinomacropeptide influences the functional properties of a whey protein concentrate. *International Dairy Journal*, 60, 14-23.
- Thomä-Worringer, C., Krause, I. & Kulozik, U. (2006). Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International Dairy Journal*, 16, 285-293.
- Traving, C. & Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54 (12), 1330-1349.
- Vinceković, M., Čurlin, M. & Jurašin, . (2014). Impact of cationic surfactant on the self-assembly of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8543-8554.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M.A. (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. New York: Marcel Dekker Inc.

Capítulo I-2

*Impacto de la interacción entre el CMP y el
CasNa sobre las propiedades de
gelificación*

I-2. Introducción

Tanto el CMP como el CasNa tienen la particularidad de gelificar a temperaturas relativamente bajas por disminución de pH. El CasNa gelifica cuando el pH se acerca a su pI (4,6) (Walstra et al., 1999) debido al aumento de las fuerzas de atracción neta entre las moléculas, que da como resultado una auto-asociación de la proteína (Allen et al., 2006). Por otro lado, el CMP también gelifica por disminución de pH, tanto a temperatura ambiente (Farías et al., 2010) como bajo calentamiento (Martinez et al., 2011) por debajo de pH 4,5.

En el capítulo anterior se comprobó la existencia de interacciones entre el CMP y el CasNa en solución, tanto a pH 6,8 como a pH 5,5. En particular se observó que el CMP modifica el estado de asociación del CasNa lo que podría impactar sobre sus propiedades gelificantes, moduladas por el pH. El producto lácteo por excelencia donde la caseína presenta esta gelificación ácida es el yogur. La posibilidad de enriquecer un yogur con CMP plantea el interrogante de cómo afectaría la presencia de CMP a la gelificación/textura final de este producto lácteo funcional.

I-2.1. Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa en la gelificación

Para determinar las propiedades de gelificación de CasNa y sus mezclas con CMP se evaluó en primera instancia el pH de gelificación mediante el test de inclinación y las propiedades de flujo. Posteriormente, se caracterizó la textura de los geles mediante un análisis de perfil de textura (TPA) y la microestructura mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido ambiental.

I-2.1.1. pH de gelificación

La muestra de CasNa se evaluó a diferentes concentraciones: 6, 9, 10, 11 y 12 % p/p. Se trabajó con la muestra de CasNa de la firma Fonterra. La relación CasNa/CMP en los sistemas mixtos estudiados fue: 1/1, 3/1, 5/1 y 11/1 con una concentración proteica total del 12 % p/p. La gelificación de las muestras se realizó adicionando GDL a los respectivos sistemas CasNa/CMP y tuvo lugar a una temperatura de 43 °C. La cantidad de GDL adicionada, determinada en ensayos previos sobre cada uno de los sistemas, fue suficiente para inducir una disminución del pH hasta 4,6 en un tiempo de 1-1,5 h.

Se determinó el pH de gelificación (pH_{gel}) mediante el test de inclinación (**Tabla 5**). Este pH fue de aproximadamente 4,84-4,89 para las muestras de CasNa independientemente

de la concentración y para la mezcla CasNa/CMP 1/1. Un valor ligeramente superior ($\text{pH}_{\text{gel}} 5,0-5,1$) fue informado por Lucey et al. (1997) y Braga et al. (2006) para sistemas de CasNa acidificado con GDL y también por Dickinson y Davies, (1999) para la gelificación de la leche. O'Kennedy et al. (2006) y Ruis et al. (2007) también informaron que el inicio de la gelificación (estudiado por reología) de soluciones de caseinato de sodio acidificadas por GDL se producía a $\text{pH} \sim 5,0$.

Tabla 5. Valores de pH de gelificación (pH_{gel}) para CasNa y mezclas CasNa/CMP

Concentración (% p/p)		pH_{gel}
CasNa	6	$4,86 \pm 0,03^a$
	9	$4,89 \pm 0,01^a$
	10	$4,88 \pm 0,05^a$
	11	$4,84 \pm 0,06^a$
	12	$4,86 \pm 0,03^a$
Relación		pH_{gel}
CasNa/CMP *	1/1	$4,86 \pm 0,01^a$
	3/1	$5,02 \pm 0,01^b$
	5/1	$5,14 \pm 0,03^c$
	11/1	$5,07 \pm 0,04^{bc}$

*Concentración proteica total: 12 % p/p.

Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$, $n = 2$).

La presencia de bajas concentraciones de CMP (relación CasNa/CMP 11/1, 5/1 y 3/1), aumentó significativamente el pH_{gel} en comparación con las soluciones de CasNa solo a la misma concentración (11, 10 y 9 % p/p, respectivamente) e incluso de CasNa al 12 % p/p (concentración proteica total en los sistemas mixtos), indicando que la gelificación del CasNa está influenciada por la presencia de CMP. Es importante recordar que en estas condiciones de pH el CMP no gelifica (Fariás et al., 2010); el CMP sólo gelifica a $\text{pH} \leq 4,0$ siendo el tiempo de gelificación (minutos a días) dependiente de la concentración de CMP y del pH (Fariás et al., 2010).

Con el objetivo de determinar si la etapa en la cual hay formación creciente de agregados, pero donde aún no se forma una matriz gelificada, denominada etapa pre-gel, se ve influenciada por la presencia de CMP, se evaluó la evolución de la viscosidad de una

solución de CasNa solo y de una de las mezclas con CMP (relación CasNa/CMP 3/1) a una misma concentración total de proteína (12 % p/p), durante la acidificación con GDL (**Figura 32**) a temperatura de 43 °C. Nuevamente, esta figura debe ser analizada en el sentido de pH decreciente.

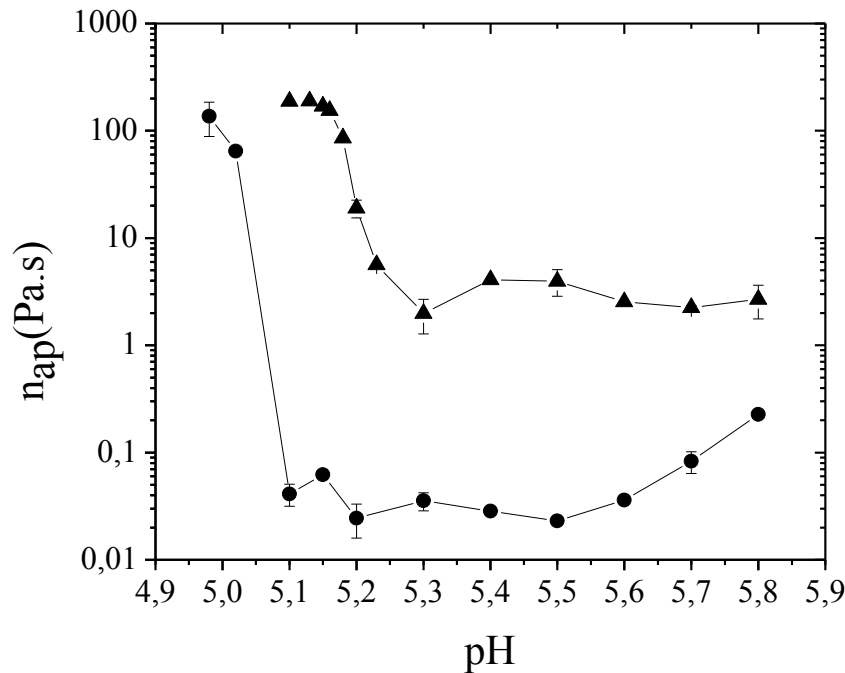


Figura 32. Viscosidad aparente (Pa.s) en función del pH de soluciones de CasNa 12 % p/p (●), y CasNa/CMP en relación 3/1 a concentración proteica total de 12 % p/p (▲). Temperatura: 43 °C.

En primer lugar, se puede observar que la viscosidad no aumentó inmediatamente después de la adición de GDL. Este período (tiempo lag), en el que no se observaron cambios en la viscosidad aparente de las muestras a pesar de la disminución del pH, fue más corto en presencia de CMP. El incremento en la viscosidad de las soluciones a valores de pH superiores al pH_{gel} (4,84 para CasNa y 5,02 para la mezcla 3/1) puede atribuirse a la formación de agregados de proteínas antes de que se produzca la gelificación.

La mezcla 3/1 mostró un aumento brusco de la viscosidad a un pH por debajo de 5,3, mientras que el aumento de viscosidad en la solución de CasNa fue por debajo de pH 5,1, evidenciando que la agregación del caseinato ocurre a pH más alto en presencia de CMP. Es importante resaltar que la mezcla mostró una viscosidad más alta que CasNa, incluso durante el tiempo lag. El aumento de la viscosidad en presencia de CMP podría atribuirse, como se mencionó en el Capítulo I-1, a la interacción de CasNa con el CMP que por su

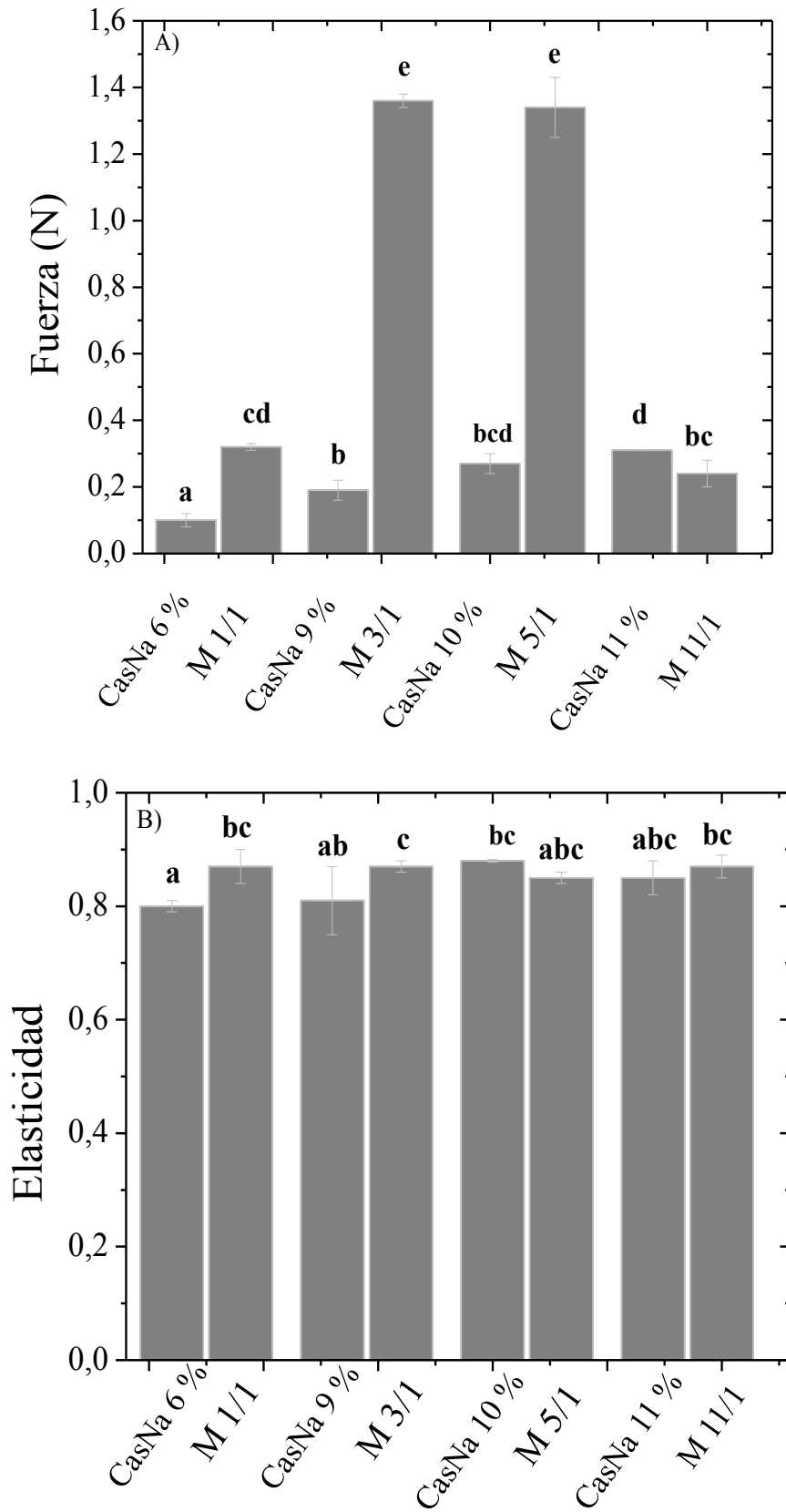
fuerte carácter hidrófilo podría mejorar las interacciones proteína-agua (Chobert et al., 1989). Además, en trabajos previos de mezclas de CMP con otras proteínas se observó que la interacción CMP-proteína generalmente es mayor a medida que el pH disminuye (Martinez et al., 2010; Martinez et al., 2012; Martinez et al., 2013). Como se mencionó en el Capítulo I-1 de esta misma Sección, Martinez et al., (2013) reportaron la formación de complejos CMP-gelatina por medio de interacciones hidrofóbicas a pH cercano a la neutralidad, y sugirieron que a pH 3,5 esta interacción se vería reforzada por interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados negativamente o ácido siálico del CMP y la gelatina cargada positivamente, lo que produjo una mejora en la estabilidad de las espumas mixtas CMP-gelatina a este pH. También fue reportado por Martinez et al., (2010) la existencia de fuertes interacciones no covalentes entre CMP y β -Ig en solución acuosa a pH 3,5 (además de a pH neutro, ya mencionado en el Capítulo I-1), determinadas por medio de calorimetría diferencial de barrido y, determinación de tamaño de partícula y que dichas interacciones influenciaron el comportamiento reológico de los sistemas mixtos. Finalmente, concluyeron que estas interacciones son más fuertes a pH ácido debido a la carga eléctrica de cada proteína.

I-2.1.2. Propiedades texturales de los geles

Las propiedades texturales de los geles de CasNa/CMP en relaciones 1/1, 3/1, 5/1 y 11/1 a una concentración total del 12 % p/p, obtenidos por acidificación con GDL hasta un pH final de 4,5 se muestran en la **Figura 33**. La diferencia más notable se observó en la fuerza del gel (**Figura 33 A**), donde la presencia de CMP aumentó significativamente la fuerza, en comparación con los geles de CasNa solo a la misma concentración, excepto en la muestra con menor contenido de CMP (relación CasNa/CMP 11/1).

Es evidente que la presencia del CMP promueve y mejora las interacciones entre los agregados de CasNa al disminuir el pH, lo que produce una red de proteínas más firme, que se refleja en la mayor fuerza obtenida por el análisis de textura.

En cuanto al resto de los parámetros de textura, no se observaron diferencias tan evidentes como en el parámetro de fuerza (**Figura 33 B, C y D**), sin embargo, la presencia de CMP en las mayores concentraciones estudiadas (relaciones CasNa/CMP 1/1 y 3/1) aumentó levemente la elasticidad y cohesividad de los geles en comparación a los geles de CasNa solo a la misma concentración que se encuentra en la mezcla.



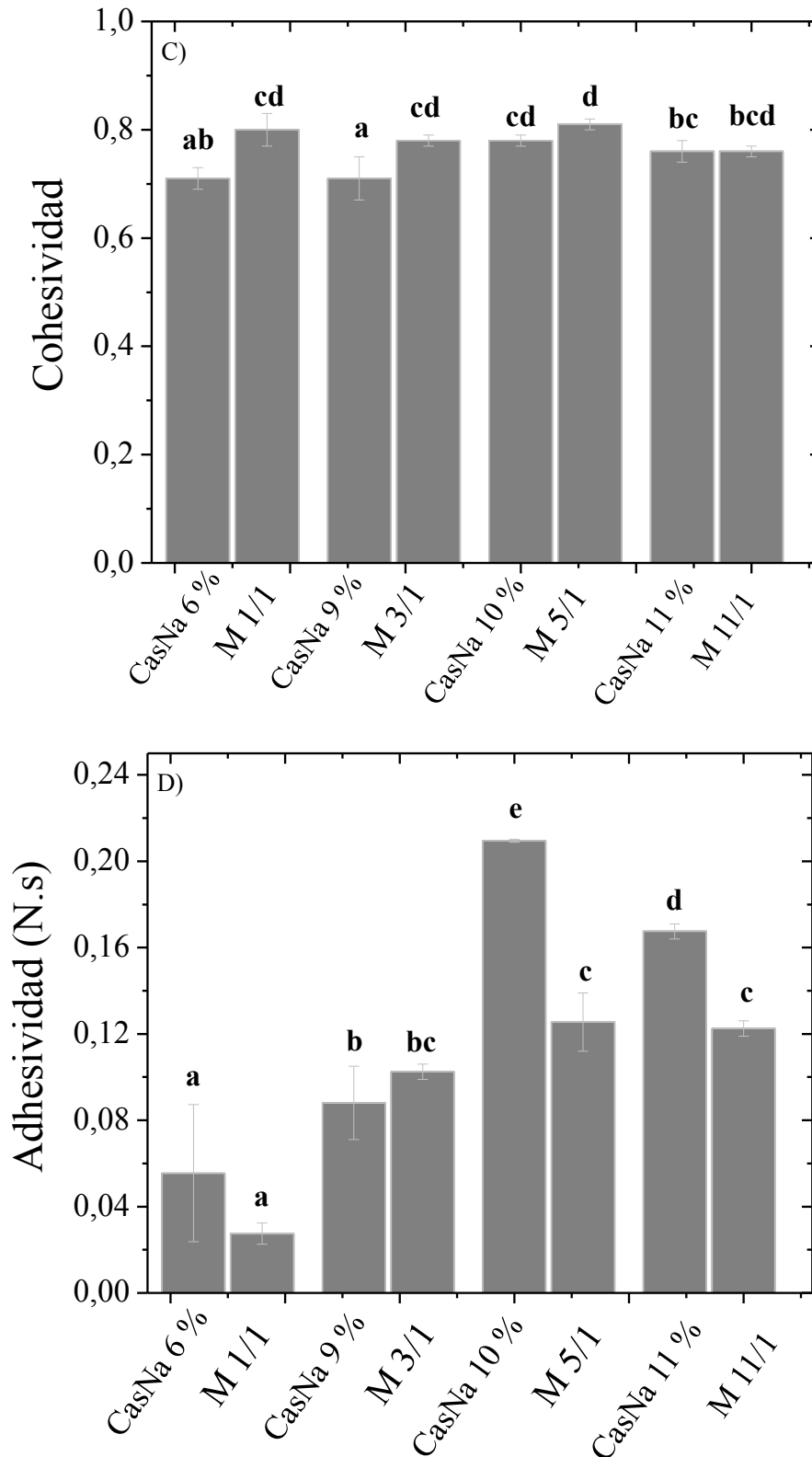


Figura 33. Parámetros de textura obtenidos por análisis de perfil de textura, de gels CasNa (6, 9, 10 y 11 % p/p) y gels mixtos CasNa/CMP (M) (relaciones 1/1, 3/1, 5/1 y 11/1, concentración proteica total: 12 % p/p); A) Fuerza, B) Elasticidad, C) Cohesividad y D) Adhesividad.

La **Figura 34** muestra la apariencia macroscópica de los geles, donde se puede observar que todos los geles son blancos y opacos. El gel de la mezcla CasNa/CMP en relación 3/1 mostró una estructura más homogénea y lisa, comparada con el resto de los geles en los cuales se observó una estructura más granulada. Roefs et al., (1990) estudiaron la gelificación de caseinato de sodio y reportaron la formación de un gel más homogéneo cuando éste es formado por la agregación de pequeñas partículas, mientras que si la agregación prosigue más lentamente, se favorece la formación de agregados de mayor tamaño que generan una estructura menos homogénea. Esto guarda cierta relación con el mayor aumento de viscosidad y la mayor velocidad de gelificación de las soluciones CasNa/CMP respecto a la de las soluciones de CasNa (**Figura 32**).

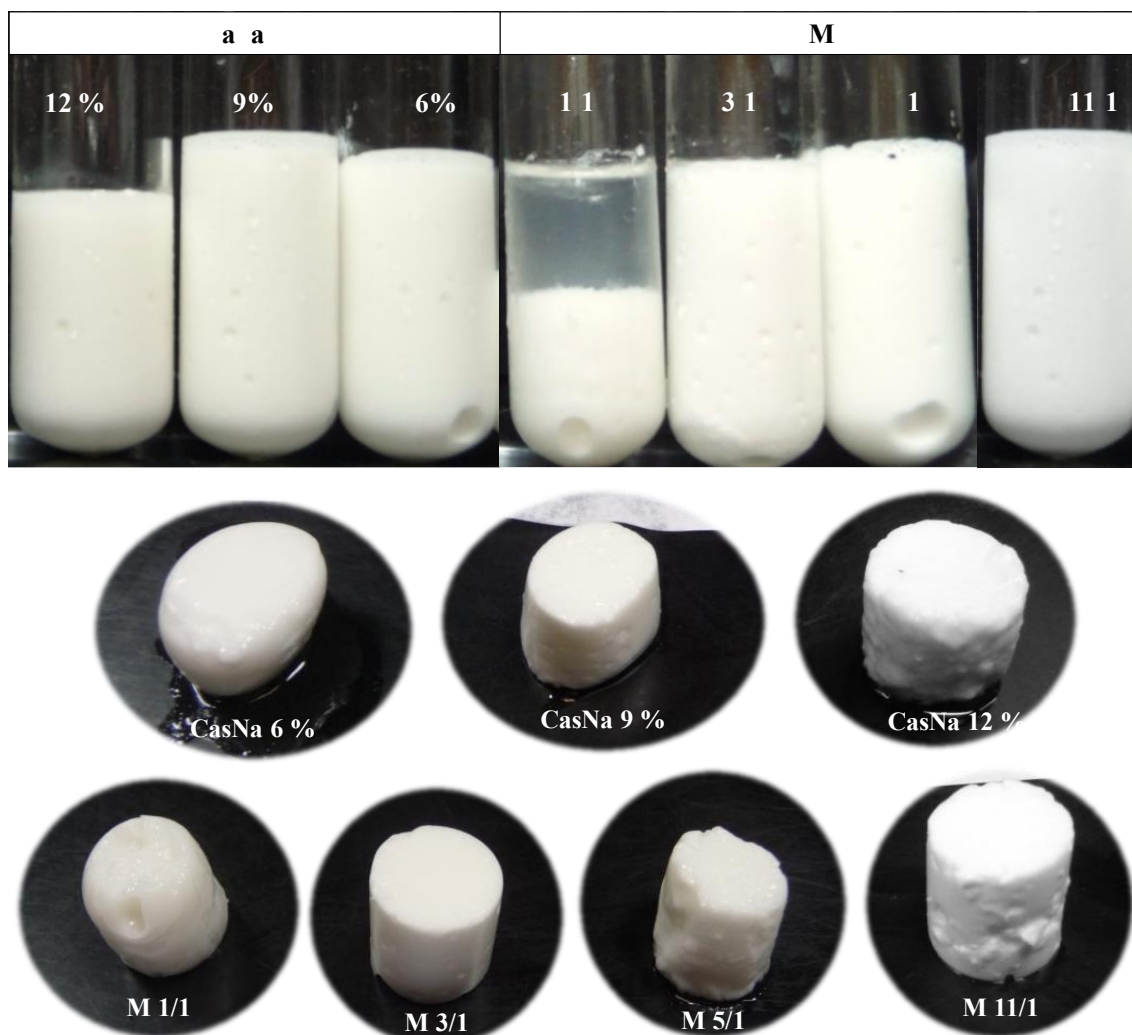


Figura 34. Fotografías de geles obtenidos por acidificación con GDL de soluciones de CasNa 6, 9 y 12 % p/p (a) y mezclas de CasNa/CMP (M) a concentración total de 12 % p/p en diferentes relaciones: 1/1; 3/1; 5/1; 11/1.

También se pudo observar que el gel de CasNa puro y las mezclas con mayores concentraciones de CasNa (5/1 y 11/1) no mostraron sinéresis, mientras que los geles de las mezclas de CasNa/CMP en relación 1/1 y 3/1 drenaron un 50 % y 10 %, respectivamente, lo que sugiere que la presencia de CMP en dichos sistemas mixtos disminuye la retención de agua de los geles, comparados con los geles con igual concentración de CasNa. Este resultado es consistente con el hecho de que el CMP no gelifica a este pH.

I-2.1.3. Estudio microestructural de los geles

Existen numerosas técnicas microscópicas para analizar sistemas proteicos, pero algunas de ellas presentan limitaciones: la baja resolución de la imagen en la microscopía tradicional tanto en muestras translúcidas u opacas (como en el caso de los geles), como así también el tratamiento previo de la muestra, que puede modificar el sistema en estudio, en el caso de técnicas como microscopía de fuerza atómica (AFM), electrónica de barrido (SEM), entre otras.

Con el fin de estudiar las muestras gelificadas tal como fueron obtenidas se decidió utilizar dos técnicas microscópicas: la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y la microscopía láser confocal (CSLM). La primera es una modificación sustancial de la técnica convencional que permite la visualización de prácticamente cualquier muestra sin previa deshidratación ni baño conductor, porque permite la introducción de una atmósfera gaseosa en la cámara de la muestra (Kang et al., 2013). La segunda es una técnica de observación microscópica que ofrece importantes ventajas frente a la microscopía óptica tradicional como imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc. y, sobre todo, la posibilidad de eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco, de manera de obtener una imagen con mayor calidad (Martínez Nistal, 2003).

La **Figura 35** muestra la microestructura de los geles ácidos de CasNa y su mezcla con CMP en relación 3/1 observada por CSLM y ESEM. Las fotomicrografías de los geles de CasNa (**Figura 35 A y C**) muestran una superficie rugosa y una microestructura constituida por grandes agregados. Partanen et al. (2008) estudiaron por CSLM geles de CasNa obtenidos por acidificación con GDL a diferentes temperaturas y observaron que la microestructura de estos geles fue gruesa y porosa, aún más cuando los geles fueron acidificados a una temperatura de 50 °C, similar a los geles obtenidos en este trabajo.

Por el contrario, los geles de CasNa/CMP en relación 3/1 (**Figura 35 B y D**) presentan una microestructura lisa y continua, mostrando una red gelificada de manera más regular donde las partículas parecen ser más pequeñas que las que se forman en los geles de CasNa. En la micrografía confocal de la mezcla 3/1, se observa además la presencia de gotas de agua (área oscura) que podrían estar asociadas con la sinéresis observada en dichos geles (**Figura 34**).

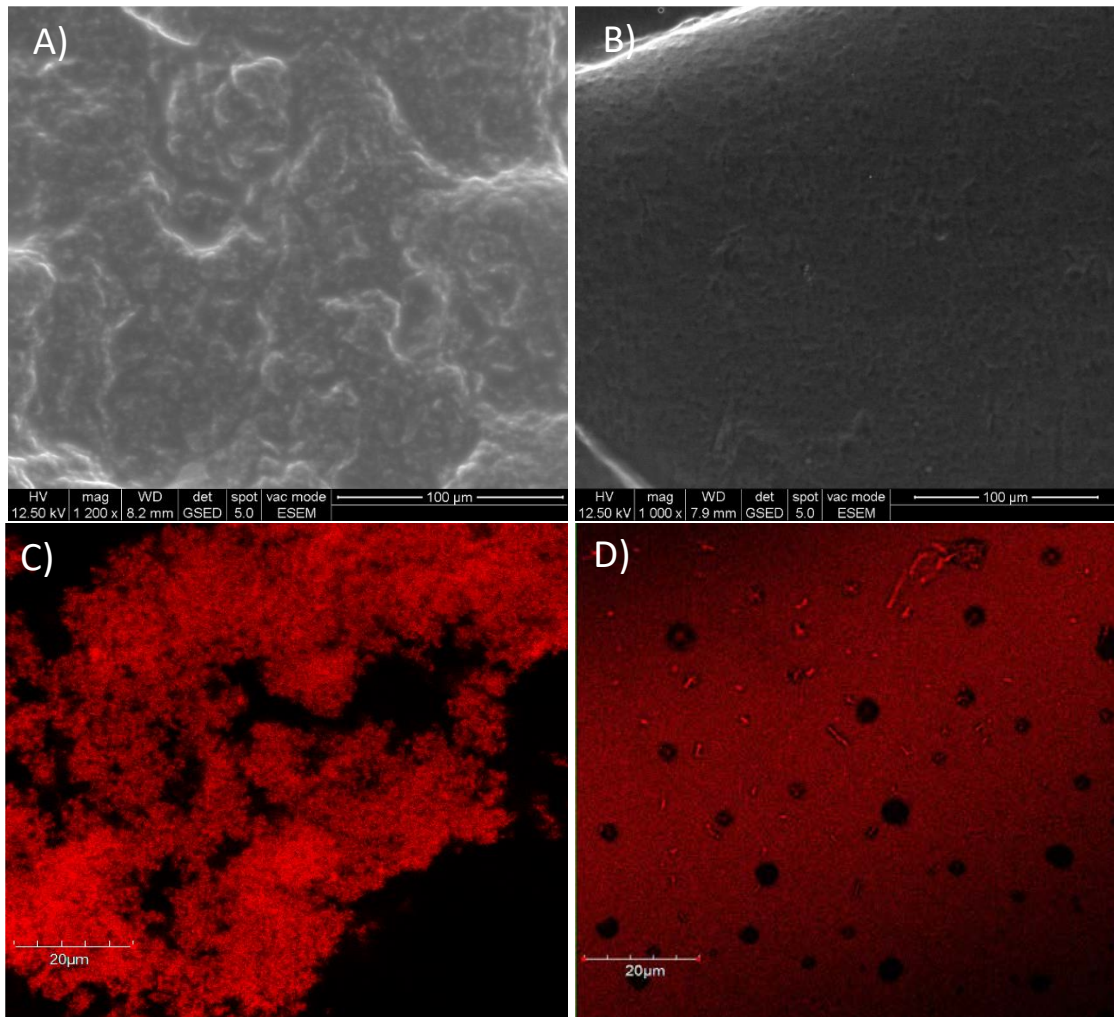


Figura 35. Micrografías de geles al 12 % p/p de CasNa (A y C) y CasNa/CMP en relación 3/1 (B y D) obtenidos por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM): A y B; y microscopía confocal (CSLM): C y D.

En general, tanto en las micrografías obtenidas por CSLM como las obtenidas por ESEM mostraron que, en presencia de CMP, el tamaño de los agregados observados en los geles ácidos de CasNa se redujo, lo que condujo a una distribución más homogénea del material proteico en la estructura gelificada, lo que se corresponde con lo observado visualmente

en la **Figura 34**. Martín-Diana et al. (2004) estudiaron por microscopía Cryo-SEM el efecto de la adición de CMP o WPC a leche fermentada de cabra y reportaron que la presencia de CMP favoreció la formación de gel de un modo más ordenado y estructurado comparado al efecto que produjo la adición de WPC.

La textura de los alimentos está fuertemente influenciada por la microestructura de los componentes individuales y por la interacción entre ellos (Auty et al., 1999). La resistencia mecánica de los geles de caseínas está determinada por el número y el tamaño de los agregados que forman parte de su red estructural; sus propiedades reológicas dependerán del número de enlaces proteína-proteína y de su fuerza (Roefs et al., 1990). Madadlou et al. (2010) estudiaron la dinámica de gelificación, textura y microestructura de geles de caseína obtenidos por acidificación con GDL con y sin aplicación de ultrasonido previo. Dichos autores observaron la microestructura particulada típica de los geles ácidos de caseína (Horne, 1999), como también fue observada en este trabajo (**Figura 35 A y C**) y reportaron una tendencia hacia una estructura más densa con partículas más pequeñas en los geles producidos a partir de las soluciones sonicadas. Además, relacionaron el aumento en la firmeza de los geles obtenidos con la muestra sonicada con su estructura formada por partículas más pequeñas. Este comportamiento fue explicado por el aumento de la superficie de las partículas, que se encuentra disponible para interconexiones generalizadas, lo que resulta en una microestructura más interconectada. De manera similar, en nuestro trabajo los geles obtenidos por la mezcla CasNa/CMP, presentó una microestructura más homogénea (**Figura 35 B y D**), que podría relacionarse con un menor tamaño de los agregados que forman este gel lo que podría explicar la mayor firmeza observada en dichos geles (**Figura 33 A**), por esa mayor superficie disponible para interconexiones. En contraste, los geles de CasNa que consisten en partículas más grandes mostraron menores valores de firmeza.

I-2.2. Efecto del enriquecimiento de yogur con CMP

Uno de los alimentos lácteos que debe su estructura a la formación de un gel es el yogur. Este gel está formado por micelas de caseína asociadas que retienen el suero y los glóbulos de grasa (Cantor, 2008) y se obtiene al fermentar la leche utilizando un cultivo mixto de bacterias acidolácticas simbióticas que consta de *Lactobacillus delbrueckii*, subespecie *bulgaricus*, y *Streptococcus salivarius*, subespecie *termophilus*. Como resultado de esta fermentación se produce ácido láctico (proveniente de la lactosa de la

leche) y una serie de compuestos que le imparten sabor y aroma característicos (Hernández et al., 2003). El yogur es un alimento funcional, ya que posee acciones beneficiosas para el organismo, como contribuir a equilibrar la flora bacteriana intestinal y potenciar las defensas contra infecciones y otras enfermedades. Debido a su natural funcionalidad es un candidato preferencial para vehiculizar sustancias bioactivas. Varios estudios han reportado efectos probióticos en productos fermentados mediante la incorporación de *Lactobacillus (L.) acidophilus* (ATCC® 4356™), *L. casei* (ATCC® 393™) y *L. paracasei* subespecie *paracasei* (ATCC® 52™) (Ortakci y ert, 2012). Lo importante a destacar de estos es que, al contrario de las especies de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, son habitantes naturales del intestino y promueven la absorción de nutrientes y secretan compuestos, entre ellos, antimicrobianos que promueven la inhibición de bacterias causantes de infecciones (Tamime y Robinson, 2000). También es reconocido como alimento saludable dado su alto contenido de proteínas y una mayor biodisponibilidad de calcio que en la leche, ya que el pH ácido ioniza el calcio facilitando su absorción en el intestino y reduciendo el efecto inhibitorio del ácido fítico dietario sobre el calcio (Singh y Muthukumarappan, 2008).

La elaboración del yogur consiste básicamente en cuatro etapas: 1) enriquecimiento de la leche en sólidos no grasos, 2) tratamiento térmico y 3-4) fermentación y formación del gel. El objetivo principal de aumentar el porcentaje de SNG a la leche (que naturalmente tiene aproximadamente 9 %) y, más concretamente, la proporción de caseína y proteínas del suero, es otorgarle al yogur una mayor consistencia, reduciendo la tendencia a la separación del suero (Tamime y Robinson, 2000; Amatayakul et al., 2006). A escala industrial, el aumento de SNG se puede lograr mediante los procesos de evaporación (EV), ultrafiltración (UF) u ósmosis inversa (OI) o bien por la adición de leche en polvo descremada, caseinatos, proteínas lácteas, sueros lácteos, concentrados de sueros lácteos. Generalmente se aumenta el contenido de SNG en un 3 % (con el fin de obtener un contenido final de SNG de 12 g/100 g de producto) (Gösta Bylund, 2002; Tamime y Robinson, 2000).

La segunda etapa es el tratamiento térmico que tiene como objetivo la pasteurización de la leche. Durante el proceso de pasteurización ocurren cambios en las proteínas del suero mientras que las caseínas permanecen estables debido a que son termoestables. En la **Figura 36** se esquematizan los cambios que ocurren en esta etapa y que se deben principalmente a la desnaturalización de las proteínas del suero a temperaturas superiores a 80 °C, en particular la β -lg, lo que promueve su interacción con las caseínas.

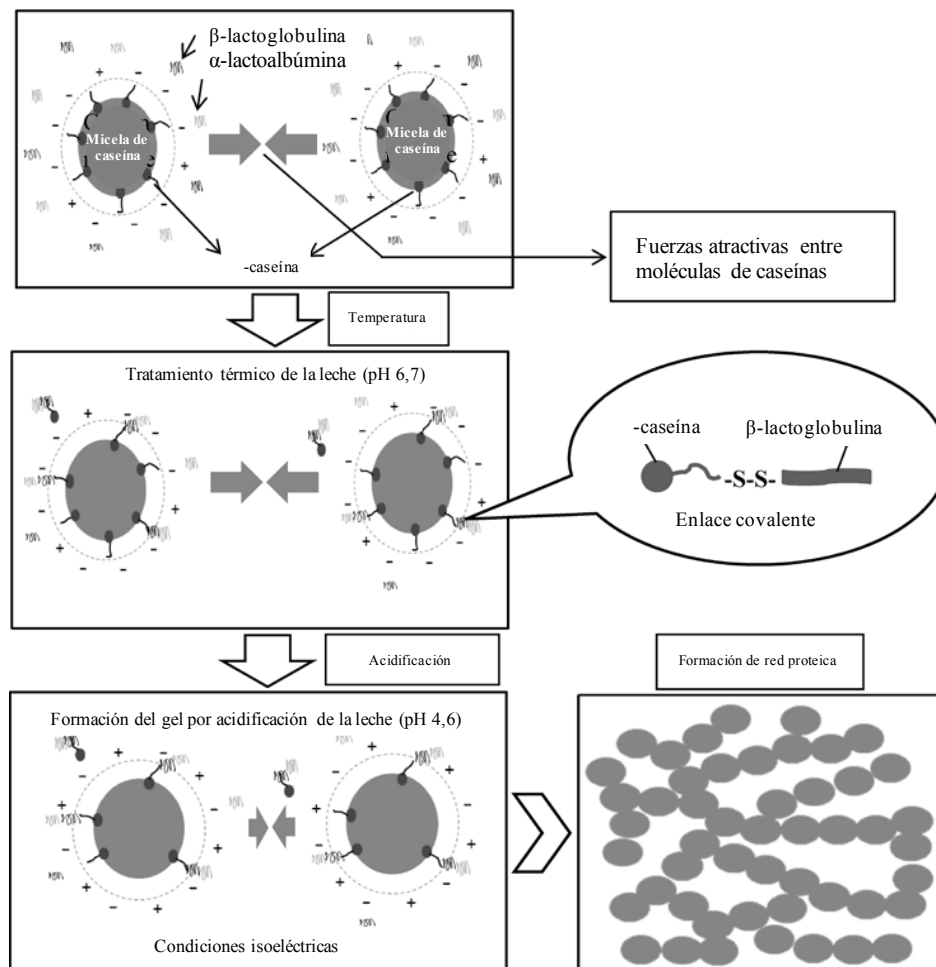


Figura 36. Esquema de la interacción de las proteínas de suero con las caseínas debido al tratamiento térmico de la leche y el proceso de fermentación con la consecuente formación del gel de yogur. Adaptado de Mahomud et al. (2017).

Esta interacción ocurre mediante la formación de enlaces disulfuro con la fracción de κ -caseína formando una micela más estable, lo cual tiene un impacto favorable en las propiedades del gel y en la sinéresis (Mahomud et al., 2017).

Por último, la formación del gel del yogur ocurre como consecuencia de la fermentación ácida (segunda parte del esquema de la **Figura 36**). Conforme a sus requerimientos energéticos, el cultivo aprovecha como sustrato la lactosa, el agua y otros componentes para producir ácido láctico. La formación de ácido láctico reduce la carga superficial de las micelas de caseína, que originalmente tenían una carga neta negativa alta a pH 6,7, a una carga neta cercana a cero con el acercamiento al punto isoelectrico (pH 4,6). Este cambio en la carga de la superficie permite que las micelas de caseína formen agregados unidos a través de enlaces hidrófobos y electrostáticos. Además, el descenso de pH

produce la solubilización del calcio, mediante el paso del fosfato de calcio coloidal (que forma parte de las micelas), a una forma soluble. La producción de ácido sigue aumentando y cuando se alcanza un pH de 4,6 se llega al punto isoeléctrico de la caseína. Es aquí cuando las caseínas comienzan a agregarse gracias a interacciones hidrófobas formando la red que constituye el gel (**Figura 36**).

El agregado de CMP podría impactar en la interacción entre las caseínas y β -lg. De hecho, en un estudio previo se reportó la interacción entre CMP y β -lg y se estudió cómo dichas interacciones modificaron diferentes propiedades funcionales (gelificantes, interfaciales, espumantes) (Martinez et al., 2009; Martinez et al., 2010; Martinez et al., 2012). Adicionalmente, en la sección anterior se mostró que las mezclas CasNa/CMP presentaron un aumento en la fuerza de los geles en comparación con los geles de CasNa solo, por lo tanto, sería de interés la evaluación del aumento de SNG de yogures con esta mezcla.

Se elaboraron yogures set a partir de leche en polvo descremada (LD) (Sancor), reconstituida al 9 % de SNG y se aumentó el contenido de los mismos hasta un 12 % con diferentes proporciones de CasNa y CMP según lo indicado en la **Tabla 6**.

Luego de elaborados, los yogures se almacenaron 24 h a 4 °C y posteriormente se los sometió a un test de retroextrusión para evaluar su textura. En ningún caso se observó sinéresis visualmente.

Tabla 6. Porcentaje de SNG agregado a cada formulación.

Formulación	CasNa (%)	CMP (%)
1	3	-
2	2,25	0,75
3	1,5	1,5

En la **Figura 37** se muestran los resultados obtenidos por el análisis de retroextrusión de las diferentes formulaciones de yogures. Se puede observar que a medida que se aumenta el contenido de CMP en la formulación el perfil se desplaza hacia valores menores de fuerza, disminuyendo la firmeza de los yogures.

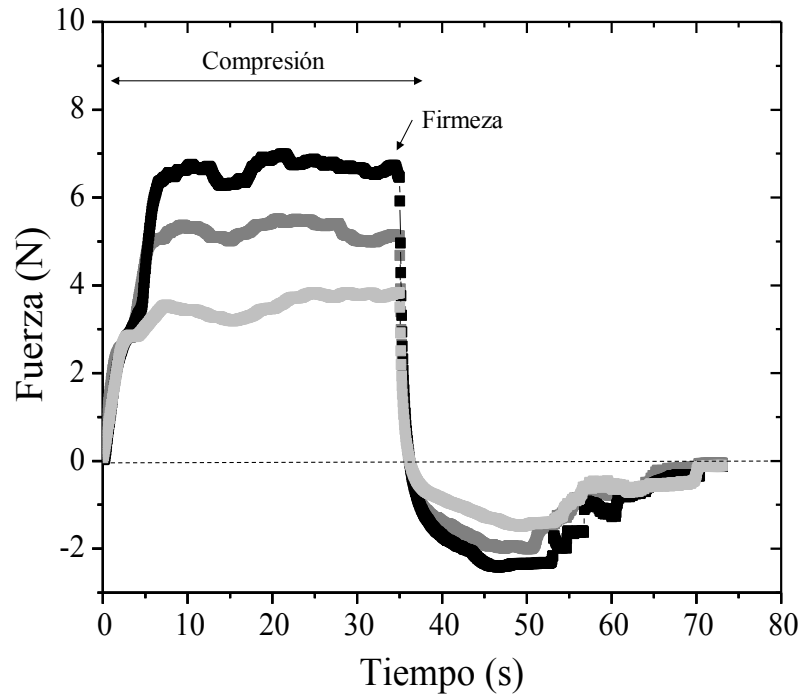


Figura 37. Caracterización textural por ensayo de retroextrusión de las diferentes formulaciones de yogures enriquecidos con: CasNa (Formulación 1) (■), CasNa/CMP 3/1 (Formulación 2) (■) y CasNa/CMP 1/1 (Formulación 3) (■).

A partir de estos perfiles se obtuvo la fuerza máxima (firmeza) de los geles que se grafica en la **Figura 38**, donde se observa cómo con la incorporación del CMP al yogur en mezclas de CasNa/CMP (formulaciones 2 y 3) la firmeza del yogur fue significativamente inferior respecto a su control enriquecido sólo con CasNa (formulación 1).

Por lo tanto, el aumento del contenido proteico con un compuesto bioactivo como lo es el CMP, produce una disminución en la firmeza del yogur dado que el CMP interfiere en la interacción entre β -lg y las caseínas. Esto se debe a que como fue reportado anteriormente, este péptido es capaz de interactuar con ambas proteínas pudiendo reducir la interacción entre ellas y por lo tanto afectando negativamente en la firmeza del yogur.

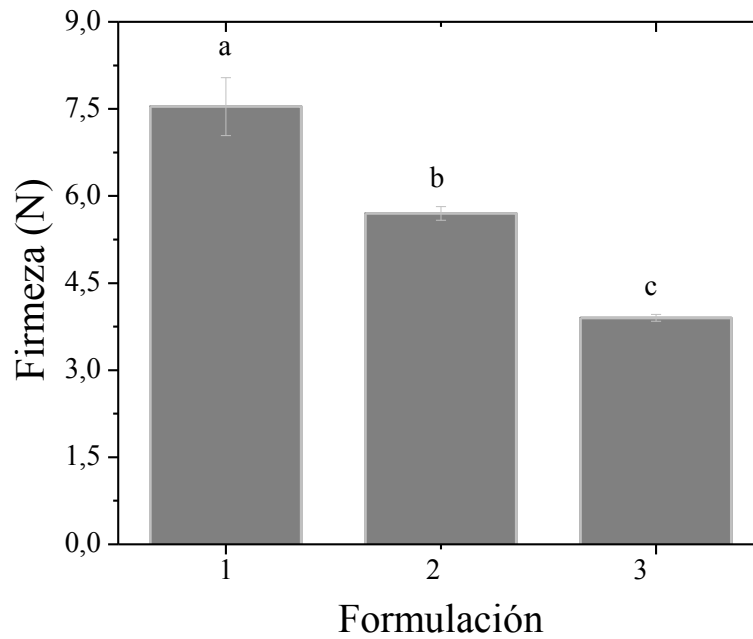


Figura 38. Firmeza de los yogures enriquecidos en SNG (3 %) con CasNa (Formulación 1), CasNa/CMP 3/1 (Formulación 2) y CasNa/CMP 1/1 (Formulación 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

I-2.3. Conclusiones

Las interacciones entre el CMP y el CasNa afectan el proceso de gelificación del CasNa, ya que la presencia de CMP genera un aumento en la viscosidad de las mezclas (agregación), promoviendo la formación de un gel a valores de pH más altos.

Además, la presencia de CMP provocó una disminución en el tamaño de las partículas que forman la red gelificada; esto afecta su microestructura resultando en una red más homogénea y más firme en presencia de CMP.

Sin embargo, cuando se aplicaron las mezclas CasNa/CMP para normalizar el contenido proteico en yogur set, se observó un efecto adverso en la firmeza, lo cual se atribuye a que el CMP interferiría en la interacción caseína- β -lg.

I-2.4. Referencias

- Allen, K.E., Dickinson, E. & Murray, B. (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 225-234.
- Amatayakul, T., Sherkat, F. & Shah, N.P. (2006). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14 % total solids. *Food Hydrocolloids*, 20, 314–324.
- Auty, M.A.E., Fenelon, M.A., Guinee, T.P., Mullins, C. & Mulvihill, D.M. (1999). Dynamic confocal scanning laser microscopy methods for studying milk protein gelation and cheese melting. *Scanning*, 21 (5), 299–304.
- Braga, A.L.M., Menossi, M. & Cunha, R.L. (2006). The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, 16 (5), 389–398.
- Cantor, J. M. (2008). *Progress in food engineering research and development*. New York, Nova Science Publishers: pp. 294.
- Chobert, J.M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalorrondo, M. & Nicolas, M.G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ -casein and its caseinomacropéptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457–473.
- Dickinson, E. & Davies, E. (1999). Influence of ionic calcium on stability of sodium caseinate emulsions. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 203–212.
- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropéptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79–88.
- Gösta Bylund, M. (2002). *Manual de industrias lácteas*. (A. Madrid Vicente, Ed.).
- Hernandez, A., Alfaro, I. & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. San Carlos Costa Rica. Ediciones EUNED: pp. 269.
- Horne, D.S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9 (3–6), 261–268.
- Kang, K., Echarri, J. & Llorente, C. (2013). Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del limf – Facultad de ingeniería – UNLP, 660–665.
- Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T. & Walstra, P. (1997). Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, 7 (6–7), 389–397.

- Madadlou, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M. E., Mohamadifar, M. & Ehsani, M. (2010). Acid-induced gelation behavior of sonicated casein solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17 (1), 153–158.
- Martín-Diana, A.B., Pelaez, C. & Requena, T. (2004). Rheological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropeptide and whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 86, 1535–1540.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air–water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 39–47.
- Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2010). The dynamics of gelation of casein glycomacropeptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. *International Dairy Journal*, 20, 580–588.
- Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 860–867.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012). Interactions between β -lactoglobulin and casein glycomacropeptide on foaming. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89 (1), 234–241.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M. & Pilosof, A.M.R. (2013). Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide - gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 48–57.
- Martínez Nistal, Á. (2003). Microscopía láser confocal. En *Técnicas de imagen en biología* (pp. 1–20).
- Mahomud, S., Katsuno, N. & Takahisa Nishizu, T. (2017). Role of whey protein-casein complexes on yoghurt texture. *Reviews in Agricultural Science*, 5, 1-12.
- O’Kennedy, T., Mounsey, J., Murphy, F., Uggan, S. & Kelly, P.M. (2006). Factors affecting the acid gelation of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 16 (10), 1132–1141.
- Partanen, R., Autio, K., Myllärinen, P., Lille, M., Buchert, J. & Forsell, P. (2008). Effect of transglutaminase on structure and syneresis of neutral and acidic sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, 18 (4), 414–421.
- Roefs, S.P., De Groot-Mostert, A.E.A. & Van Vliet, T. (1990). Structure of acid casein gels 1. Formation and model of gel network. *Colloids and Surfaces*, 50, 141–159.

- Ruis, H.G.M., Venema, P. & van der Linden, E. (2007). Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. *Food Hydrocolloids*, 21 (4), 545–554.
- Singh, G. & Muthukumarappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT - Food Science & Technology*, 41, 1145-1152.
- Tamime, A.Y. & Robinson, R.K. (2000). *Yoghurt: Science and Technology* (2nd ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Walstra, P., Geurts, T, Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M.A. (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. New York: Marcel Dekker Inc.

Capítulo I-3

*Impacto de la interacción entre el CMP y el
CasNa sobre las propiedades interfaciales
y espumantes*

I-3. Introducción

Muchos alimentos que contienen ingredientes lácteos como, por ejemplo, leche, CasNa y suero (que puede contener CMP), deben su textura característica a la existencia de una estructura espumada (panes, tortas, merengues, helados, mousses, etc.), atribuidas justamente a las proteínas presentes en su formulación (Campbell y Mougeot, 1999; Dickinson, 2003).

Tanto el CMP (Kreuß, Krause y Kulozik, 2009 a, 2009 b; Martínez et al., 2009; Martínez et al., 2012) como el CasNa (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Fang y Dalglish, 1993; Marinova et al., 2009; Rodríguez Patino et al., 2007), presentan una gran capacidad de espumado debido a su alta actividad superficial; sin embargo, sus espumas presentan una estabilidad relativamente baja, sobre todo las de CMP.

Conociendo la existencia de interacción entre el CMP y el CasNa demostrada en el Capítulo I-1 de esta Sección, resulta de interés evaluar si la mezcla de ellos modificará sus propiedades espumantes.

I-3.1. Impacto de la interacción entre el CMP y el CasNa en interfases y espumas

I-3.1.1. Comportamiento interfacial

Se evaluaron inicialmente las propiedades interfaciales aire/agua en un tensiómetro de gota pendiente. Las muestras de CMP y CasNa se estudiaron a una concentración del 1 % p/p. Se trabajó con la muestra de CasNa de la firma MPBiomedicals y la relación CasNa/CMP en los sistemas mixtos estudiados fue: 1/1 y 3/1, a una concentración proteica total del 1 % p/p.

Las **Figura 39** A y B muestran la evolución de la presión superficial (π) en función del tiempo de adsorción de las soluciones de CMP, CasNa y sus mezclas a pH 5,5 y 6,8, respectivamente. El incremento de la presión superficial con el tiempo está relacionado con la adsorción de proteínas en la interfase aire/agua (Graham y Phillips, 1979).

Tanto para el CMP, como para el CasNa y las mezclas CasNa/CMP se observó un incremento de π durante la etapa inicial de adsorción que se puede asociar con un aumento de la concentración de proteína en la interfase.

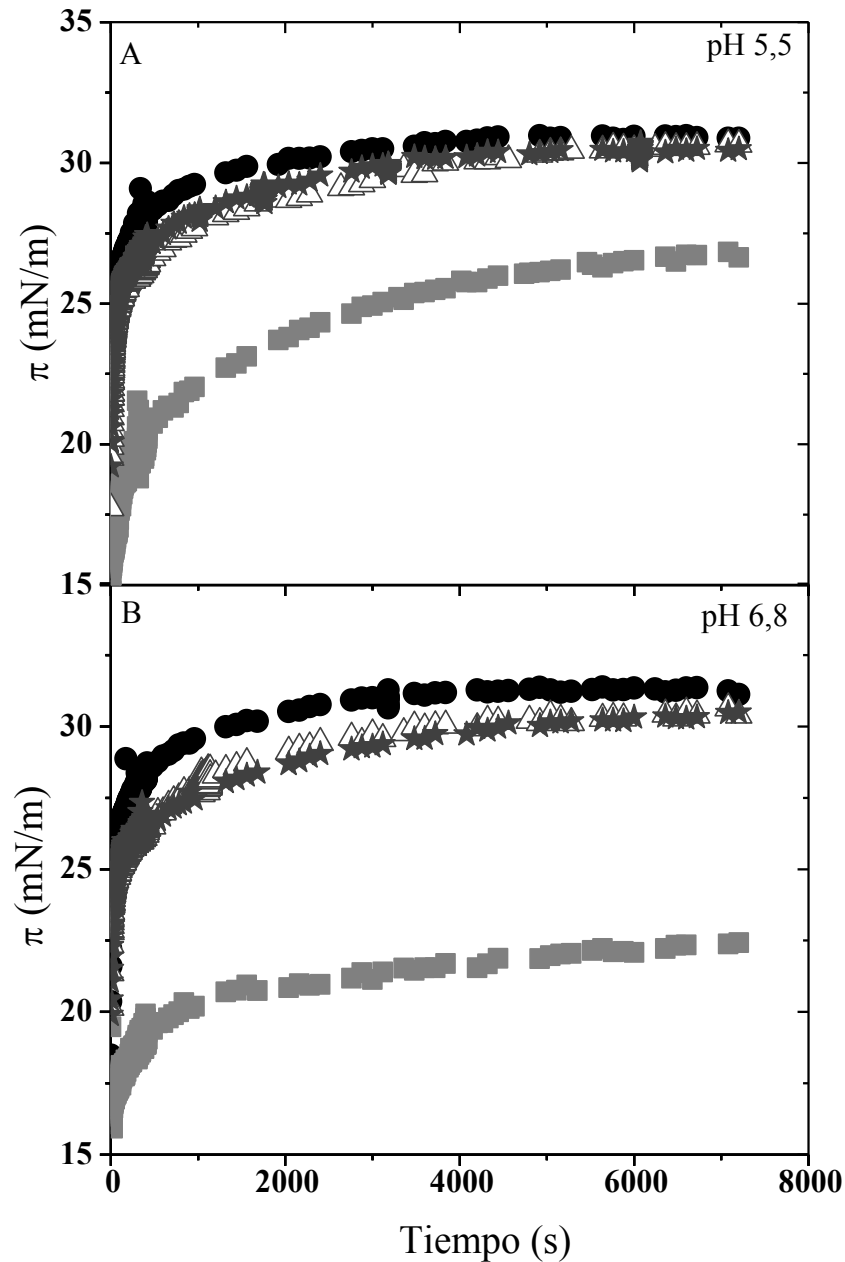


Figura 39. Evolución de la presión interfacial (π) en función del tiempo a pH 5,5 (A) y a pH 6,8 (B) de soluciones de CMP (■), CasNa (●), CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△).

Concentración total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

A ambos pH, el CasNa exhibió mayor actividad interfacial que el CMP, mientras que las soluciones mixtas CasNa/CMP mostraron un comportamiento más cercano al CasNa, indicando que este último dominó la actividad superficial de las mezclas. Durante la adsorción competitiva, inicialmente la presión superficial es controlada por el componente que se adsorbe más rápidamente (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011), en este

caso el CasNa. Por otra parte, la adsorción competitiva de sistemas mixtos de biopolímeros, puede verse afectada por las interacciones en la fase continua o incluso por interacciones específicas en la interfase que puedan afectar la reología de la película interfacial (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

En lo que respecta a las propiedades dilatacionales interfaciales, la **Figura 40** muestra la variación del módulo dilatacional (E) en función del tiempo de adsorción de las películas superficiales de las mismas soluciones a pH 5,5 (**Figura 40 A**) y a pH 6,8 (**Figura 40 B**). Estos datos se obtuvieron al aplicar deformaciones sinusoidales a la gota pendiente.

El CMP exhibió el módulo de elasticidad más alto a pH 5,5 (~ 25 mN/m) aproximadamente el doble del que presenta el CasNa y las mezclas. Sin embargo, al igual que la presión superficial a pH 5,5 (**Figura 39 A**) la elasticidad de las películas mixtas (**Figura 40 A**) estuvo dominada por el CasNa.

A pH 6,8, la película de CMP mostró un módulo de elasticidad mucho menor que a pH 5,5 y más similar al observado para la muestra de CasNa. Las películas mixtas exhibieron un módulo dilatacional ligeramente inferior a las películas de CMP y CasNa solas a pH 6,8 (**Figura 40 B**), lo que indicaría un comportamiento antagónico entre CasNa y CMP en la interfase aire/agua a este pH.

Como se describió previamente, a pH 5,5 el CMP se autoensambla para formar dímeros (Farías et al., 2010) que podrían formar una película más elástica que la formada por el monómero de CMP presente a pH 6,8. Kreuß et al. (2009 a) determinaron las propiedades interfaciales y espumantes de ambas fracciones de CMP (la glicosilada (gCMP) y la no glicosilada (aCMP)) y observaron una mayor adsorción de ambas en la interfase aire/agua a pH 5,5 que a pH 6,8, lo que se atribuyó a la pérdida de repulsión por cargas al disminuir el pH.

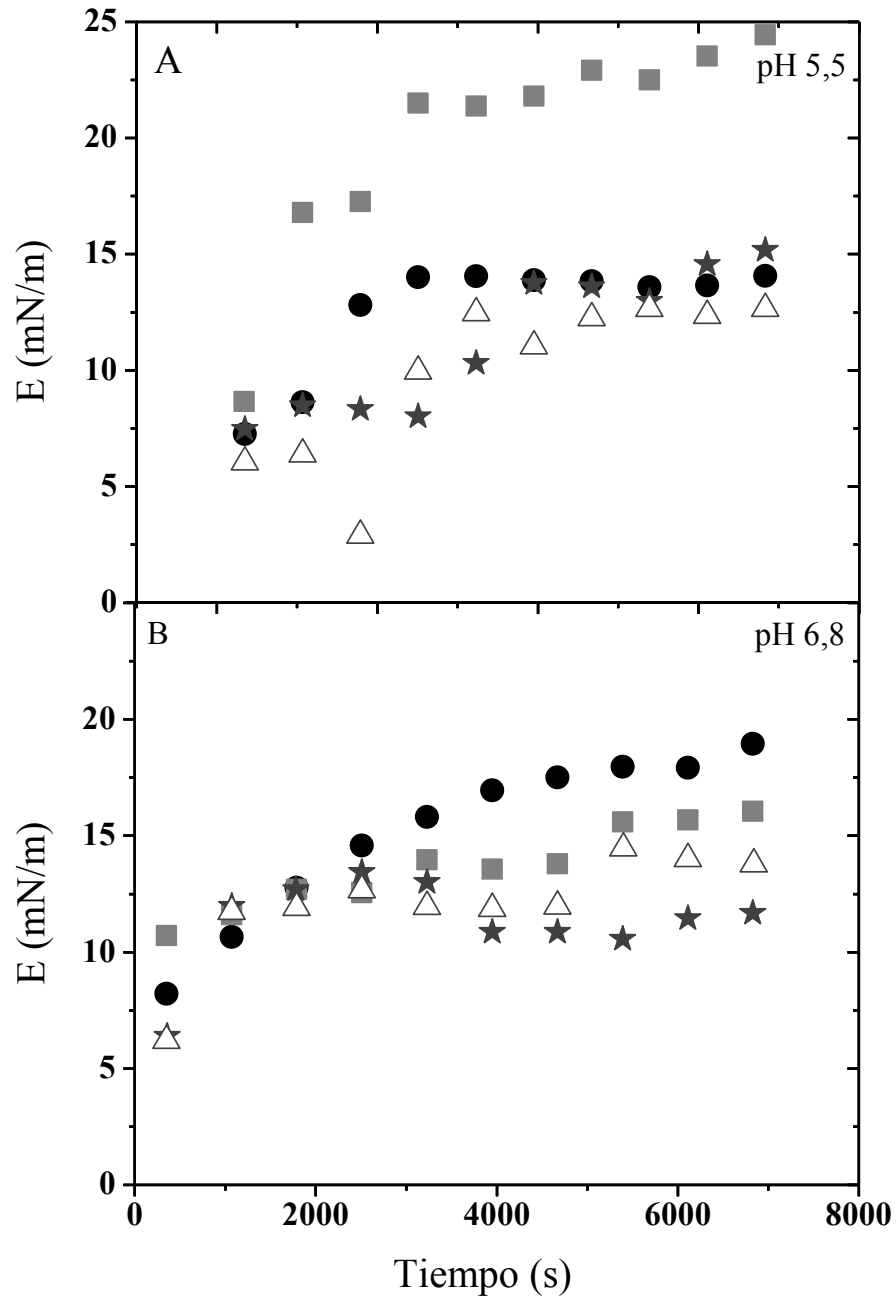


Figura 40. Variación del módulo dilatacional (E) en función del tiempo, a pH 5,5 (A) y a pH 6,8 (B) de soluciones de CMP (■), CasNa (●), CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△).

Concentración total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

I-3.1.2. Capacidad de espumado

La **Figura 41** muestra la capacidad de espumado (CE) de soluciones de CMP, CasNa y mezclas CasNa/CMP a pH 6,8 y pH 5,5.

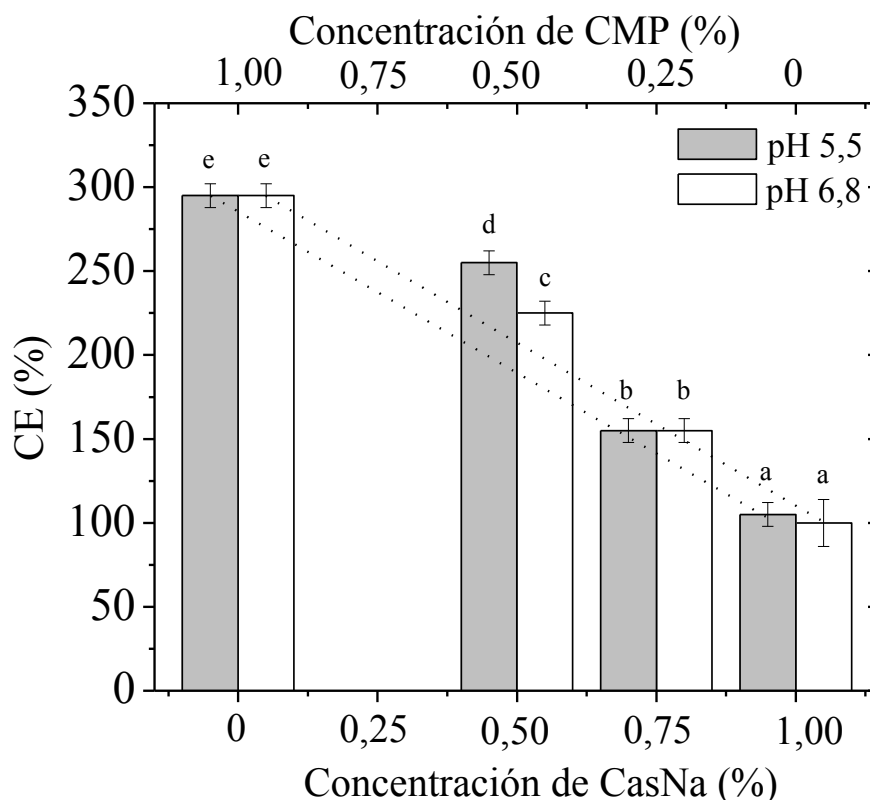


Figura 41. Capacidad de espumado (CE) de soluciones de CMP, CasNa, CasNa/CMP 1/1 y CasNa/CMP 3/1 a pH 5,5 (barras grises) y pH 6,8 (barras blancas). Las líneas punteadas indican el comportamiento esperado por la relación CasNa/CMP en las espumas mixtas a cada pH.

Concentración proteica total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

A ambos pH, las espumas de CMP individuales mostraron la mayor CE y las espumas de CasNa la menor. Este comportamiento no guarda relación con la evolución de la presión interfacial (**Figura 39**), lo cual puede explicarse por el hecho de que esta última no describe los eventos que ocurren durante la formación de la espuma (30-60 segundos iniciales). La mayor CE del CMP puede atribuirse a su menor tamaño que le permite difundir rápidamente a la interfase naciente y formar una película elástica. De hecho, el coeficiente de difusión obtenido por DLS, para CMP en solución fue aproximadamente 30 veces mayor que el de CasNa (**Tabla 7**). En trabajos previos se ha reportado la alta capacidad de formación de espuma del CMP en comparación con otras proteínas, por ejemplo β -lg (Martinez et al., 2012) y gelatina (Martinez et. al., 2013).

Por otro lado, se observó que la CE fue similar a ambos valores de pH, indicando que la variación del pH, al menos en este rango, no influye en el proceso general de formación

de espuma, excepto en la relación CasNa/CMP 1/1 en la que la CE a pH 5,5 fue significativamente mayor que a pH 6,8. Zhang et al. (2004) reportaron una influencia importante del pH sobre la capacidad de formación de espuma de proteínas de suero y leche descremada, encontrando una CE menor para las proteínas de leche descremada (donde las caseínas son los componentes principales) a medida que disminuye el pH desde 7 hasta 4,5 y lo atribuyeron a la precipitación de las caseínas cerca de su punto isoeléctrico. Sin embargo, en el presente estudio, el menor pH estudiado fue 5,5 que se encuentra por encima del punto isoeléctrico del caseinato.

También se observó que la CE aumentó con el aumento del contenido de CMP en las mezclas (**Figura 41**). Además, la mezcla CasNa/CMP 1/1, mostró una CE mayor que la esperada según su composición (línea punteada en la **Figura 41**), señalando un comportamiento sinérgico de esta mezcla durante la formación de espuma a ambos valores de pH.

Tabla 7. Coeficiente de difusión translacional de soluciones de CMP, CasNa y mezclas CasNa/CMP a pH 6,8 y 5,5.

Concentración (%)		Coeficiente de difusión ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	
CasNa	CMP	pH 6,8	pH 5,5
1	0	$2,70 \pm 0,03^a$	$2,57 \pm 0,02^a$
0,75	0,25	$2,97 \pm 0,01^a$	$4,00 \pm 0,04^a$
0,50	0,50	$3,33 \pm 0,03^a$	$4,01 \pm 0,03^a$
0	1	$88,17 \pm 2,89^b$	$66,73 \pm 0,75^c$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

I-3.1.3. Estabilidad de las espumas al drenado

La **Figura 42** muestra el volumen de espuma colapsada y el volumen de líquido drenado en función del tiempo de las espumas de CMP (A) y CasNa (B) a pH 6,8 y 5,5.

Aunque el CMP exhibe una capacidad de espumado excelente (**Figura 41**), las espumas son muy inestables a ambos valores de pH, como se muestra en la (**Figura 42 A**). El líquido contenido en las espumas drena rápidamente, alcanzando el máximo volumen de drenado (20 ml) en 6,5 o 9,5 minutos para espumas a pH 5,5 y 6,8, respectivamente.

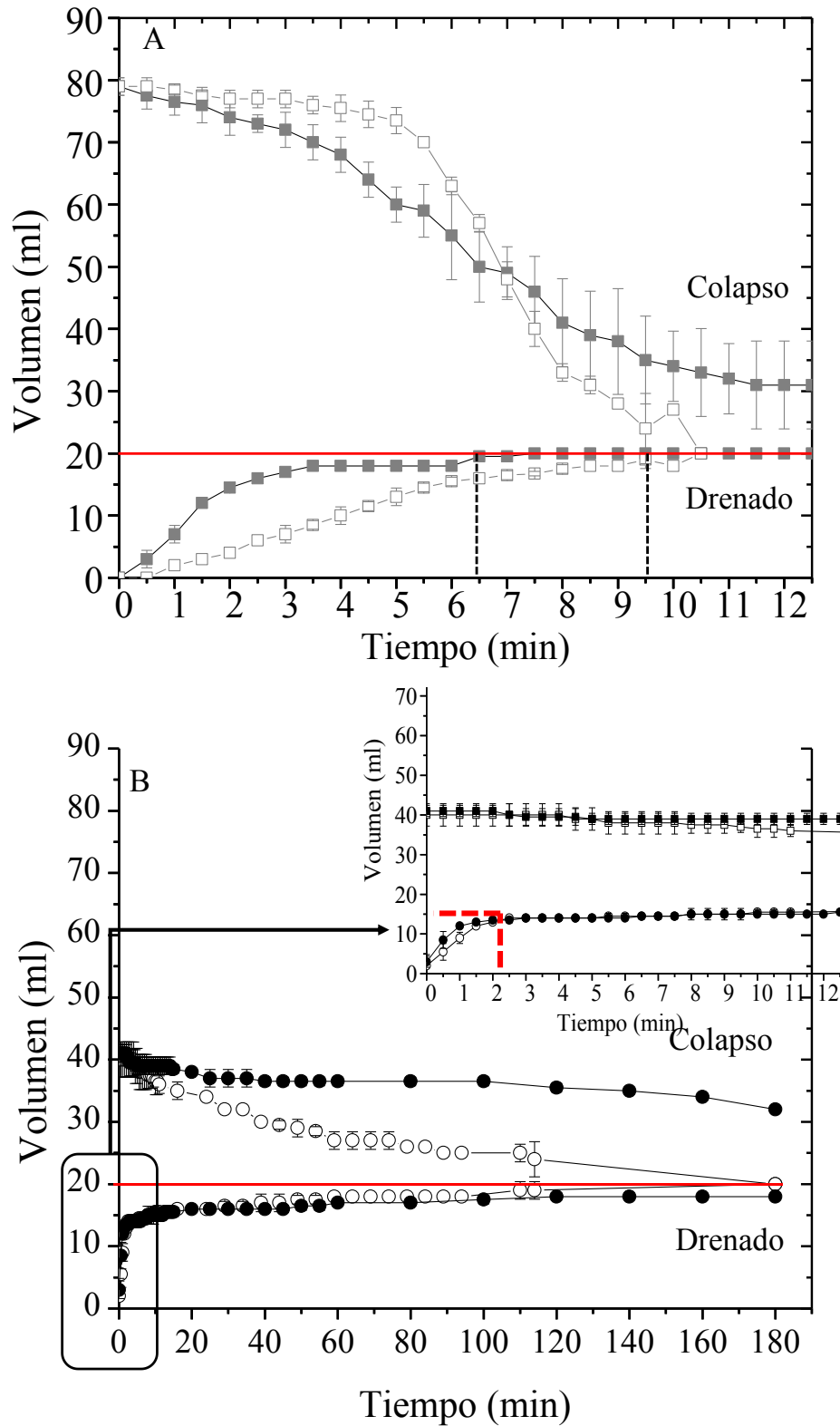


Figura 42. Volumen de espuma colapsado y volumen de líquido drenado en función del tiempo para espumas de CMP (A) y CasNa (B) a pH 6,8 (símbolo abierto) y pH 5,5 (símbolo sólido).

Gráfico inserto en B: zoom de los primeros minutos del drenado de CasNa.

Concentración: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

Durante los primeros minutos el volumen de la espuma disminuyó lentamente, pero cuando casi todo el líquido drenó (4-6 min), el volumen de la espuma disminuyó bruscamente (principalmente a pH 6,8). Finalmente, las espumas de CMP colapsaron por completo después de 10 minutos. En general, las espumas de CMP, inicialmente, fueron ligeramente más estables a pH 6,8 que a pH 5,5.

Por el contrario, el CasNa, que presentó menor CE que el CMP (**Figura 41**), formó una espuma mucho más estable (**Figura 42 B**). Inicialmente, las espumas de CasNa drenaron rápidamente (dentro de los primeros dos minutos), aproximadamente 14 ml de líquido, lo que podría revelar que no todo el líquido se incorporó a la espuma. A continuación, el drenado avanzó lentamente hasta alcanzar el volumen máximo (20 ml) después de 180 minutos. Con respecto al colapso de las espumas de CasNa, el volumen de espuma a pH 5,5 se mantuvo con muy poca variación aún después de 180 minutos, pero a pH 6,8 disminuyó continuamente hasta la desaparición de la espuma a los 180 minutos. En general, las espumas de CasNa fueron más estables al colapso a pH 5,5 que a pH 6,8, mientras que el drenado no fue afectado por el pH.

En la **Figura 43** y **Figura 44** se compara el drenado del líquido de las espumas mixtas con el drenado del líquido de las espumas de CMP y CasNa a pH 6,8 y pH 5,5, respectivamente. A ambos valores de pH, el perfil del drenado de las espumas mixtas fue dominado por el CasNa, mostrando así un drenado más lento, en relación a las espumas de CMP.

A pH 6,8 (**Figura 43 A**) se alcanzó el volumen máximo drenado (20 ml) en 60 minutos para la relación CasNa/CMP 1/1 y 3/1. Al analizar el drenaje inicial a pH 6,8, hasta 12 minutos, se puede observar que la espuma de CasNa drena rápidamente durante los primeros 2 minutos, como se mencionó anteriormente, y luego se mantiene constante (**Figura 43 B**).

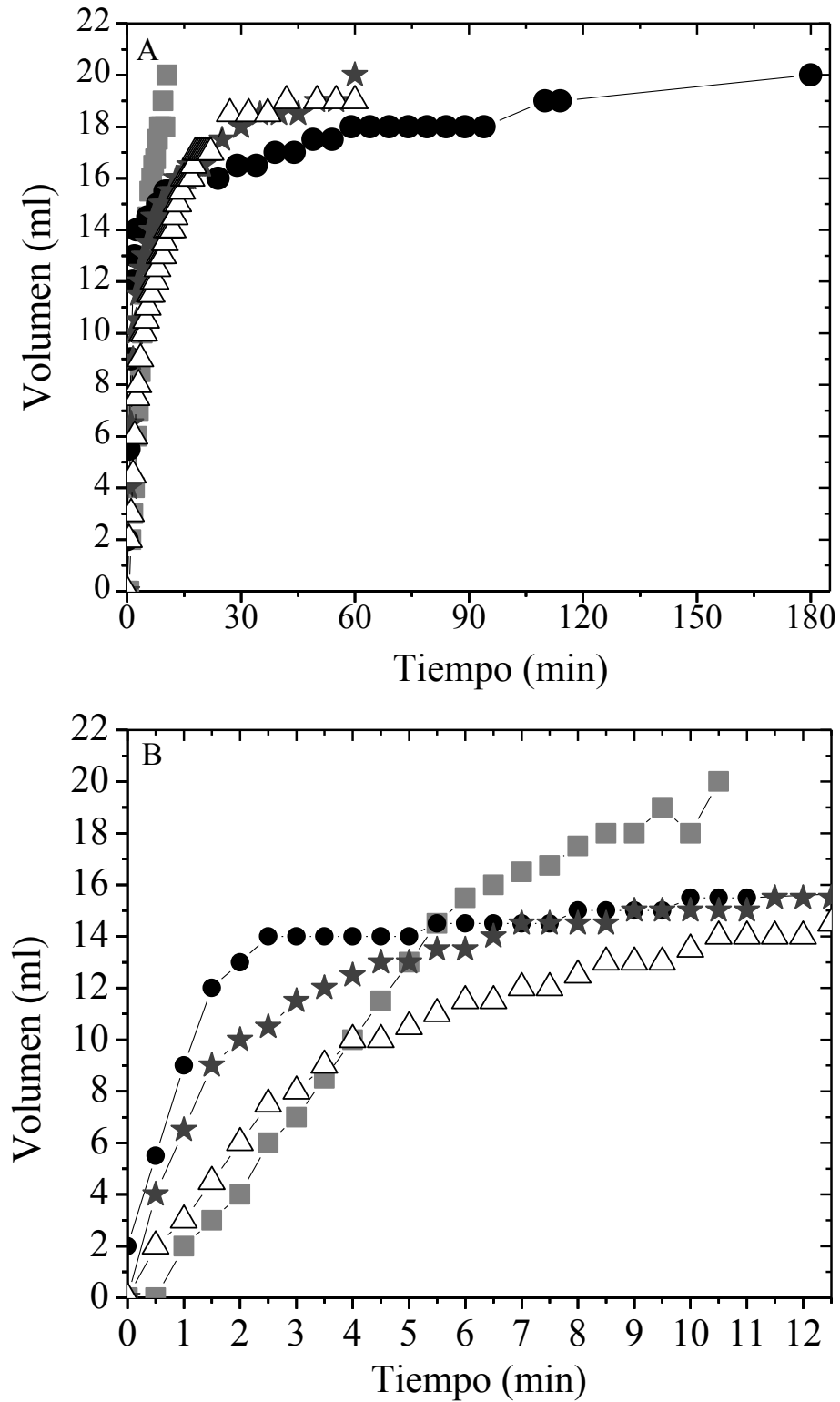


Figura 43. Volumen de líquido drenado versus tiempo de espumas de CMP (■), CasNa (●), CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△) a pH 6,8, escala extendida (A) y escala reducida (B). Concentración proteica total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

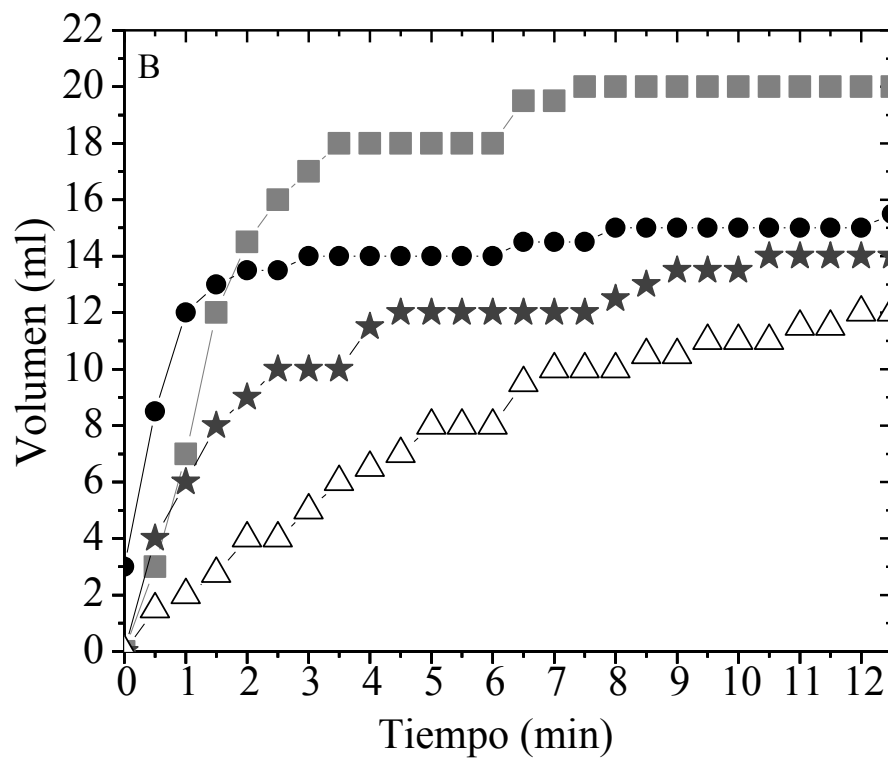
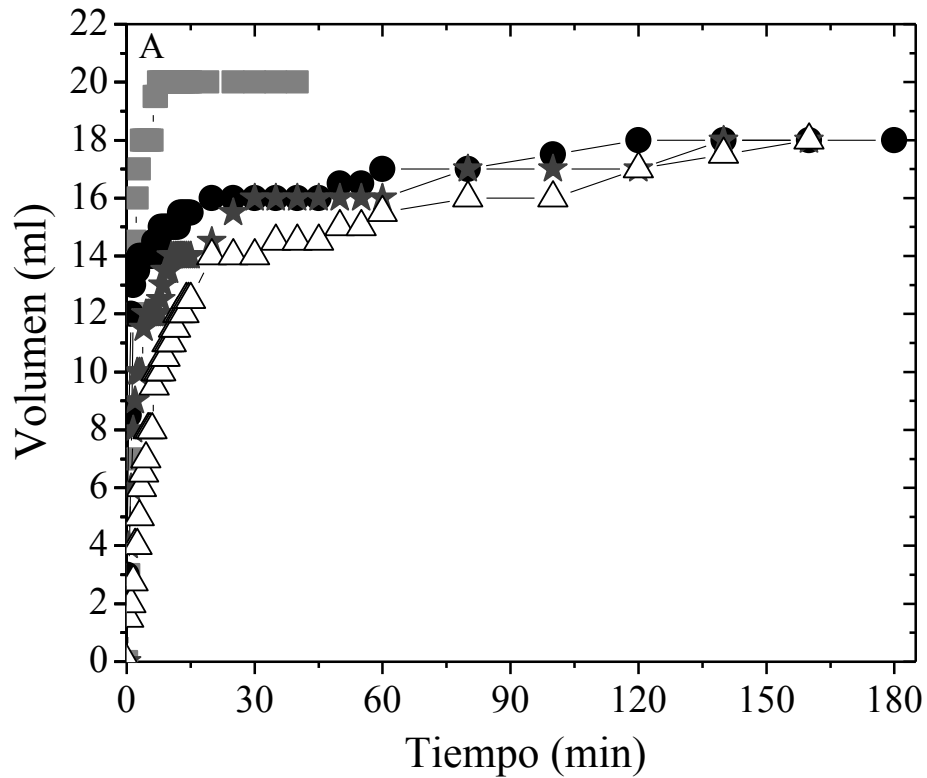


Figura 44. Volumen de líquido drenado versus tiempo de espumas de CMP (■), CasNa (●), CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△) a pH 5,5, escala extendida (A) y escala reducida (B). Concentración proteica total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

Al aumentar el contenido de CMP en la mezcla, la velocidad de drenado inicial fue más lenta asemejándose al comportamiento de la espuma de CMP solo, indicando que la presencia de CMP en las espumas mixtas aumenta el volumen de líquido retenido en la espuma.

Por otro lado, a pH 5,5, las espumas mixtas fueron aún más estables que a pH 6,8, ya que después de 180 minutos todavía retenían parte del líquido (**Figura 44 A**). Además, a pH 5,5, las espumas mixtas drenaron más lentamente que la espuma de CasNa y CMP solas, exhibiendo un comportamiento sinérgico (**Figura 44 B**). Se observó que el aumento del contenido de CMP en la mezcla a pH 5,5, retardó en gran medida el drenado del líquido inicial (**Figura 44 B**), ya que la menor velocidad de drenado fue observada para la espuma con relación CasNa/CMP 1/1.

I-3.1.4. Estabilidad de las espumas al colapso

Para evaluar la estabilidad de las espumas al colapso, se graficó la fracción del volumen de gas presente en la espuma a cada tiempo, a pH 6,8 y pH 5,5 como puede observarse en la **Figura 45 A** y **B**, respectivamente. Dicha fracción varía entre 1 (al momento inicial) y 0 (si el volumen de la espuma desaparece totalmente).

En primer lugar, se observó que las espumas mixtas fueron más estables al colapso a pH 5,5 que a pH 6,8. Como se mostró anteriormente al evaluar el volumen de espuma (**Figura 42 A**), las espumas de CMP sufrieron un rápido colapso a ambos valores de pH, ya que después de 10 minutos de formadas, se observó un colapso casi completo. Por el contrario, las espumas de CasNa fueron mucho más estables, incluso más a pH 5,5, ya que el 80 % del volumen inicial de espuma se mantuvo aún luego de 100 minutos de su formación (**Figura 42 B**).

El perfil de colapso de las espumas mixtas a pH 6,8 (**Figura 45 A**) fue más parecido al de la espuma de CMP; el tiempo para colapsar el 80 % del volumen inicial de espuma fue de 10, 20-25 y 90 minutos para CMP, las mezclas y CasNa, respectivamente. Por lo tanto, el efecto positivo observado en las mezclas CasNa/CMP sobre la velocidad de drenado a pH 6,8 (**Figura 43**) no se observó en el comportamiento de las espumas frente al colapso. La presencia de CMP en las espumas mixtas a pH 6,8, fue perjudicial para el colapso de las mismas, lo que guarda relación con los resultados observados en la elasticidad de las películas mixtas, donde la presencia de CMP también fue perjudicial (**Figura 40 B**).

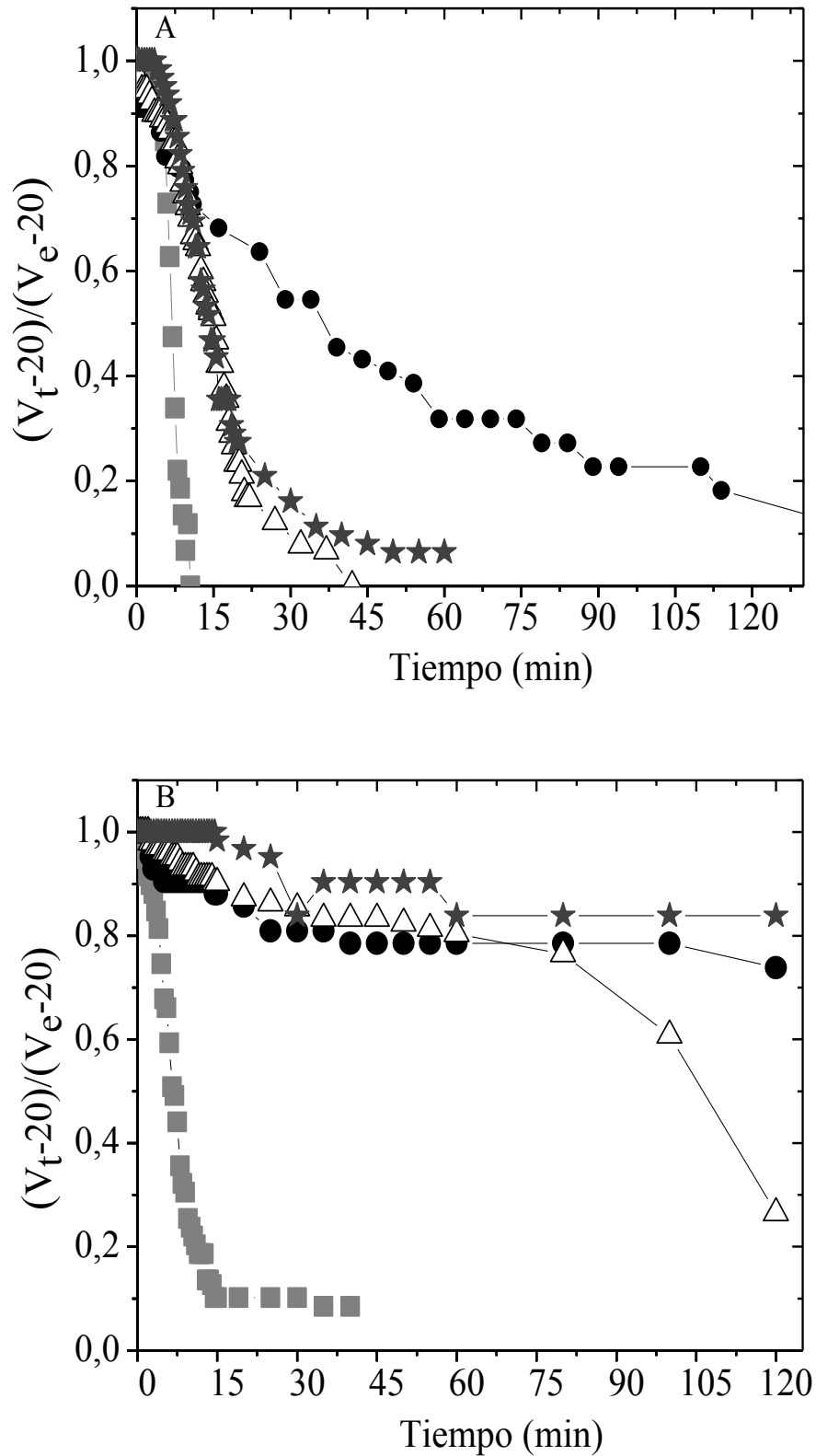


Figura 45. Fracción del volumen de gas presente en la espuma a cada tiempo $(V_t-20)/(V_e-20)$ de espumas de CMP (■), CasNa (●), CasNa/CMP 3/1 (★), CasNa/CMP 1/1 (△) a pH 6,8 (A) y pH 5,5 (B). Concentración proteica total: 1 % p/p. Temperatura: 25 °C.

Sin embargo, a pH 5,5 el comportamiento frente al colapso de las espumas mixtas fue inicialmente muy similar al de las espumas de CasNa (**Figura 45 B**), lo que se correlaciona con los resultados de elasticidad de la película de estos sistemas (**Figura 40 A**). En particular, la espuma de CasNa/CMP 3/1 fue aún más estable que la espuma de CasNa luego de 120 minutos, colapsando solo el 20 % del volumen inicial de la espuma. Mientras que, la espuma CasNa/CMP 1/1 colapsó bruscamente después de 80 minutos, mostrando a partir de dicho tiempo, un perfil similar a la espuma de CMP. Los resultados obtenidos a pH 5,5 muestran un fuerte sinergismo en las espumas mixtas frente al colapso (principalmente para la espuma CasNa/CMP 3/1), al igual que también se observó sinergismo, a este pH, en las espumas mixtas frente al drenado (**Figura 44**).

De manera análoga a lo observado en las espumas CasNa/CMP, se ha reportado un comportamiento sinérgico sobre la estabilidad de espumas mixtas de CMP con β -lg (Martinez et al., 2012) y gelatina (Martinez et al., 2013), las cuales, en condiciones ácidas fueron mucho más estables que las espumas de las proteínas individuales. Este comportamiento se atribuyó a la existencia de interacciones entre estos biopolímeros en la interfase aire/agua y también en solución acuosa.

En general, es ampliamente aceptado que la estabilidad de las espumas está controlada por las propiedades reológicas de las películas interfaciales (principalmente, la elasticidad), ya que películas fuertes podrían evitar el colapso de las burbujas. Aunque varios artículos han reportado una fuerte relación entre la estabilidad de las espumas y las propiedades interfaciales (Álvarez Gómez y Rodríguez Patino, 2007; Clarkson et al., 1999; Kitabatake y Estsushiri, 1982; Murray, 2007; Rodríguez Patino et al., 2007; Rodríguez Patino et al., 2008; Wilde, 2000), otros autores indicaron que la correlación puede ser más compleja y que las propiedades reológicas interfaciales en algunos casos no influyen en la estabilidad de las espumas. De hecho, el CMP que mostró un módulo de elasticidad dilatacional más alto que el CasNa, produjo espumas muy inestables. Una gran cantidad de trabajos demuestran que la presencia de agregados proteicos podría ser responsable de la mejora de las propiedades espumantes (Chen et al., 2016; Dickinson, 2016). De hecho, en un trabajo reciente (Dombrowski et al., 2016) se reportó una correlación muy interesante entre las características de las partículas (tamaño de partícula, hidrofobicidad superficial, potencial zeta) y las propiedades interfaciales y espumantes de agregados de β -lg.

La mayor estabilidad de las espumas de CasNa observada en este trabajo, podría atribuirse a la existencia de submicelas, es decir partículas o agregados proteicos que retrasarían el drenado y el colapso de las burbujas. Parece haber dos formas principales por medio de las cuales las partículas pueden funcionar como agentes estabilizantes en espumas (Dickinson, 2016): i) cuando están presentes a una concentración suficientemente alta en la fase continua, las partículas pueden generar una barrera estructural en forma de una red de partículas dentro de los espacios entre las burbujas de gas; ii) las partículas pueden unirse directamente a la interfase aire-agua, generando una capa superficial de partículas la cual podría proteger a las burbujas individuales frente a eventos de inestabilidad tales como desproporción o colapso. A diferencia de la estabilización obtenida por partículas sólidas que protegen las gotitas de una emulsión o las burbujas de las espumas contra la desestabilización por acción interfacial (efecto “pickering”) (Pickering, 1907), el sistema proteico del presente trabajo es un sistema complejo donde las partículas de caseinato surgen a partir de la asociación-disociación reversible que da lugar a la formación de diferentes estructuras autoensambladas, con cantidades variables de ellas, reflejando la existencia de un equilibrio que depende de la concentración, pH, fuerza iónica, etc. (Horne, 2002; Vinceković et al., 2014). El papel del CasNa en la interfase aire/agua ha sido ampliamente descrito en la literatura como el de moléculas adsorbidas (β -caseína, α_{S1} , α_{S2} , etc.) (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Marinova et al., 2009). En contraste, hay muy pocas referencias sobre su rol como partícula que genere un efecto pickering. Koczó et al. (1996) investigaron los mecanismos de drenaje y estabilidad de películas en espumas de CasNa, mediante el uso de la técnica de microinterferometría de luz reflejada para observar la estratificación (es decir, la cinética de estructuración en la formación de microcapas) en películas formadas por una solución de CasNa al 2 %. Midieron la altura de esas capas obteniendo un valor que se encuentra en el mismo rango que el de las submicelas caseínicas (~ 20 nm). Estas partículas (submicelas) están presentes en la solución de CasNa utilizada en el presente trabajo (**Figura 23** y **Figura 26**) y podrían explicar la estabilidad de las espumas de CasNa. En la solución de CMP no existen tales partículas, por lo que la interfase no podría ser estabilizada por este mecanismo y, por lo tanto, sería más propensa a la desestabilización.

En base a los resultados presentados hasta aquí, se propone un modelo para explicar la mejora de las propiedades de las espumas mixtas de CasNa y CMP (**Figura 46**).

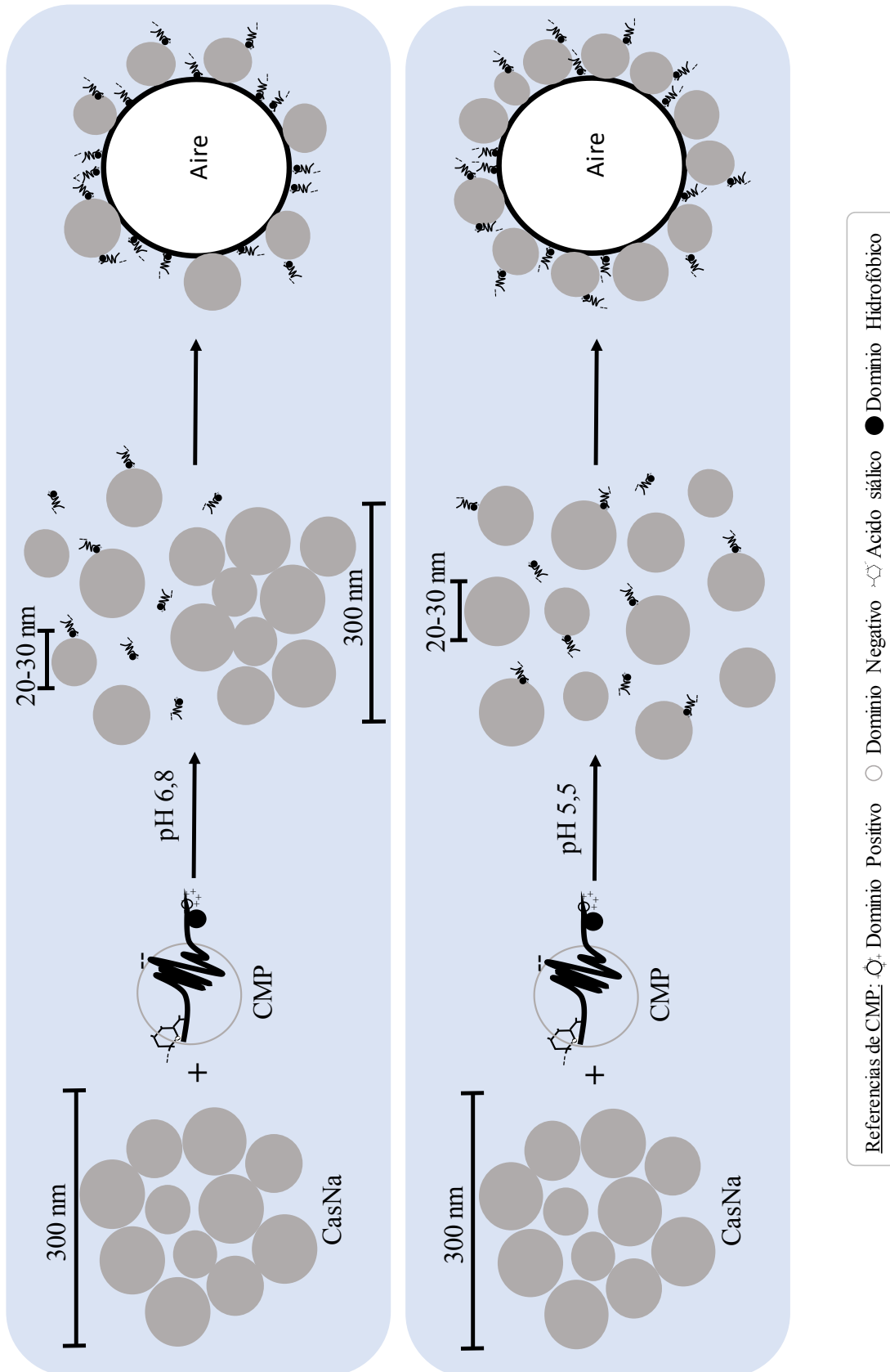


Figura 46. Esquema del modelo propuesto para explicar la mejora de las propiedades de espumado de las mezclas CasNa/CMP.

Como se describió en el esquema presentado en el capítulo 1 (**Figura 31**), la interacción en fase acuosa entre CasNa y CMP, determinada por DLS (**Figura 24**, **Figura 25** y **Figura 27**), redujo el tamaño de partícula de los agregados de CasNa de ~ 300 nm a aproximadamente 20-30 nm, aumentando así la población de partículas de dicho tamaño, lo que podría explicar la disminución del drenado y el colapso de las espumas mixtas, principalmente a pH 5,5 donde todo el CasNa se disoció a submicelas. Según lo informado por Koczó et al., (1996), el número de capas y el espesor aumenta con el aumento de la concentración de CasNa. A una concentración del 4 % de CasNa se pudieron observar cuatro capas de submicelas. Este modelo de películas que contienen submicelas caseínicas ordenadas en capas coincide con el perfil de colapso observado para CasNa/CMP 1/1 a pH 5,5 (**Figura 45 B**), donde, inicialmente esta mezcla colapsó en forma similar a CasNa, por lo cual se podría decir que las capas de submicelas en la película hacen posible el retraso del colapso de la espuma. Sin embargo, luego de 80 minutos, parece que el colapso no se inhibe más (posiblemente debido a la separación total de submicelas), quedando así solo el CMP adsorbido que es propenso a colapsar rápidamente.

Adicionalmente, el aumento de la viscosidad de las soluciones mixtas a pH 5,5 (**Figura 28**) puede contribuir a la estabilidad de la espuma a este pH, ya que una viscosidad más alta retardará el proceso de drenado.

En un trabajo reciente (Chen et al., 2016) se estudió el rol de las propiedades interfaciales y del tamaño de los agregados de micelas de caseína sobre la estabilidad de sistemas espumados y no se pudo observar ninguna correlación entre la estabilidad de las espumas y las propiedades reológicas interfaciales. Dichos autores llegaron a la conclusión de que la estabilidad de sistemas espumados está fuertemente influenciada por el tamaño de las partículas de la muestra de caseína y observaron que los agregados no se adsorben en la interfase, sino que se unen a ella como una subcapa o permanecen en la fase continua. Ambas opciones pueden conducir a una disminución del drenaje del líquido del sistema. Sin embargo, ellos reportaron una mayor estabilidad de las espumas en dispersiones de micelas con un tamaño de 500 nm comparado a micelas de 200 nm, opuesto a lo mostrado en este trabajo, donde soluciones con agregados más pequeños (20-30 nm) formaron espumas más estables que soluciones con agregados más grandes (de aproximadamente 300 nm).

Pero también existen varios estudios que han demostrado que el tamaño de los agregados proteicos afecta la estabilidad de las espumas al drenado de manera similar a lo expuesto en este trabajo. Schmidt et al. (2010) informaron del efecto del tamaño de los complejos entre pectina y una proteína globular sobre la estabilidad de la espuma. Ellos reportaron que los agregados más pequeños formaban espumas más estables que las proteínas no agregadas, mientras que los agregados más grandes provocaban un rápido drenado. De manera similar, Rullier et al. (2008) estudiaron el efecto de los agregados proteicos sobre las propiedades espumantes de β -lg, reportando que los agregados más grandes de β -lg (200-400 nm) tenían una influencia negativa en las propiedades espumantes actuando como agente anti-espuma, mientras que los agregados más pequeños (70-140 nm) mejoraron la estabilidad de las espumas debido a efectos estéricos. Ellos concluyeron que el principal factor que influía en la estabilidad de las espumas era la cantidad y el tamaño de los agregados en las muestras que impedían la desestabilización de la espuma al reducir la velocidad de drenado.

De manera similar, Kim et al. (2005), reportaron una mejora en la estabilidad de espumas de β -lg sometida a tratamiento térmico a diferentes valores de pH e indicaron que dicha mejora no puede ser atribuida a las propiedades reológicas interfaciales, sino a diferencias en las interacciones.

En un interesante trabajo Wierenga y Gruppen (2010) desarrollaron una extensa discusión sobre los procesos y mecanismos involucrados en las propiedades espumantes. Ellos estudiaron proteínas modificadas por la reacción de Maillard y observaron cambios significativos en las propiedades de espumado para ciertas soluciones proteicas, mientras que las propiedades interfaciales permanecieron sin cambios, y sugirieron que la presencia de agregados de proteínas podría ser la responsable de la mejora de las propiedades de espumado. Finalmente, estos autores plantearon que los investigadores deberían reconsiderar la relación entre estabilidad de espumas y propiedades interfaciales, especialmente para sistemas con agregados proteína-proteína o proteína-tensioactivo.

I-3.2. Conclusiones

Las interacciones sinérgicas que tienen lugar entre el CMP y el CasNa influyen en la formación de espumas a pH 5,5, mejorando la capacidad de espumado y la estabilidad de las mismas. El sinergismo puede atribuirse principalmente a las interacciones en la fase acuosa que inducen la disminución del tamaño de los agregados de CasNa de ~ 300 nm a

20-30 nm. Estos pequeños agregados serían capaces de formar capas de adsorción en la superficie de las burbujas que retardan el drenado y el colapso de la espuma. Sin embargo, la mejora en la estabilidad puede ser también debida a que las partículas quedan atrapadas en la lamela de la espuma lo cual provoca un drenado del líquido y colapso de la espuma más lentos.

Por lo tanto, la incorporación de CMP en soluciones de CasNa no sólo tiene un beneficio relacionado con las propiedades bioactivas proporcionadas por el CMP, sino que también mejora la CE y la estabilidad de las espumas, lo que podría contribuir a extender el uso de CasNa como agente espumante, principalmente en productos lácteos.

I-3.3. Referencias

- Álvarez Gómez, J.M. & Rodríguez Patino, J.M. (2007). Viscoelastic properties of diglycerol ester and protein adsorbed films at the air-water interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46, 2693–2701.
- Campbell, G.M. & Mougeot, E. (1999). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (9), 283–296.
- Carrera Sánchez, C. & Rodríguez Patino, J.M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19 (3), 407–416.
- Chen, M., Bleeker, R., Sala, G., Meinders, M.B.J., van Valenberg, H.J.F., van Hooijdonk, A.C.M. & van der Linden, E. (2016). Particle size determines foam stability of casein micelle dispersions. *International Dairy Journal*, 56, 151–158.
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F. & Darton, R.C. (1999). Protein Denaturation in Foam. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215 (2), 333–338.
- Dickinson, E. (2003). Advanced dairy chemistry. En: *Proteins, Parts A and B*. Fox P.F & McSweeney, P. (Eds.), pp. 1229–1260. The Netherlands: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219–231.
- Dombrowski, J., Johler, F., Warncke, M. & Kulozik, U. (2016). Correlation between bulk characteristics of aggregated β -lactoglobulin and its surface and foaming properties. *Food Hydrocolloids*, 61, 318–328.
- Fang, Y. & Dalgleish, D.G. (1993). Dimensions of the adsorbed layers in oil-in-water emulsions stabilized by caseins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 156 (2), 329–334.
- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79–88.
- Graham, D.E. & Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70 (3), 415–426.
- Horne, D.S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7 (5–6), 456–461.
- Kim, D.A., Cornec, M. & Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285 (1), 100–109.

- Kitabatake, N., & Estsushiri, D. (1982). Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*, 47, 1218–1221.
- Koczo, K., Nikolov, A.D., Wasan, D.T., Borwankar, R.P. & Gonsalves, A. (1996). Layering of Sodium Caseinate Submicelles in Thin Liquid Films— A New Stability Mechanism for Food Dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178 (2), 694–702.
- Kreuß, M., Krause, I. & Kulozik, U. (2009a). Influence of glycosylation on foaming properties of bovine caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 19 (12), 715–720.
- Kreuß, M., Strixner, T. & Kulozik, U. (2009b). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1818–1826.
- Marinova, K.G., Basheva, E. S., Nenova, B., Temelska, M., Mirarefi, A.Y., Campbell, B. & Ivanov, I.B. (2009). Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: Sodium caseinate and whey protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1864–1876.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009). Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71 (2), 230–237.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012). Interactions between β -lactoglobulin and casein glycomacropeptide on foaming. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89 (1), 234–241.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2013). Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide - gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 48–57.
- Murray, B.S. (2007). Stabilization of bubbles and foams. *Current Opinion Colloid Interface Science*, 12, 232–241.
- Pickering, S. (1907). Emulsions. *Journal of the Chemical Society*, 91, 2001–2021.
- Rodríguez Patino, J.M, Cejudo Fernández, M., Carrera Sánchez, C. & Rodríguez Niño, M.R. (2007). Structural and shear characteristics of adsorbed sodium caseinate and monoglyceride mixed monolayers at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313 (1), 141–151.
- Rodríguez Patino, J.M., Carrera Sánchez, C. & Rodríguez Niño, M.R. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140 (2), 95–113.

- Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1925–1937.
- Rullier, B., Novales, B. & Axelos, M.A.V. (2008). Effect of protein aggregates on foaming properties of β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 330 (2–3), 96–102.
- Schmidt, I., Novales, B., Boué, F. & Axelos, M.A.V. (2010). Foaming properties of protein/pectin electrostatic complexes and foam structure at nanoscale. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345 (2), 316–324.
- Vinceković, M., Ćurlin, M. & Jurašin, . (2014). Impact of cationic surfactant on the self-assembly of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (34), 8543–8554.
- Wierenga, P.A. & Gruppen, H. (2010). New views on foams from protein solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (5), 365–373.
- Wilde, P.J. (2000). Interfaces: Their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5 (3–4), 176–181.
- Zhang, Z., Dalgleish, D.G. & Goff, H.D. (2004). Effect of pH and ionic strength on competitive protein adsorption to air/water interfaces in aqueous foams made with mixed milk proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34 (2), 113–121.

Sección II

*Propiedades emulsionantes e interfaciales
del CMP y el impacto de otros
emulsionantes*

Capítulo II-1

*Propiedades emulsionantes e interfaciales
del CMP*

II-1. Introducción

Las emulsiones constituyen sistemas coloidales presentes en una amplia variedad de alimentos, y pueden ser utilizadas además para la liberación controlada de drogas, cosméticos y productos alimenticios (Livney, 2010; Tavares et al., 2014). Por esta razón, las propiedades emulsionantes de numerosos sistemas proteicos han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, existen pocos trabajos referidos a la evaluación de las propiedades emulsionantes del CMP (Kreuß et al., 2009; Martin-Diana et al., 2005; Moreno, López-Fandiño y Olano, 2002; Wong, Nakamura y Kitts, 2006), lo que genera un campo atractivo de estudio.

Las emulsiones son sistemas generalmente inestables con respecto a la separación de las dos fases fluidas que las forman (Adamson, 1990; Dickinson, 2015). Uno de los requerimientos más importantes para que una emulsión sea estable en el tiempo es que no haya cambios en la distribución del tamaño de las gotas (Karlberg, Thuresson, y Lindman, 2005). Existen varias estrategias para la mejora de estas propiedades, entre las que se encuentran: el aumento de la viscosidad de la fase continua (Karlberg et al., 2005; McClements, 2015), la adsorción de partículas sólidas a la interfase (Dickinson, 2017; Liu, 2012; Ye, 2013) y la gelificación de las emulsiones (Dickinson, 2012).

La gelificación de las emulsiones presenta tres ventajas principales: 1) la estabilización del sistema debido a su alta viscosidad; 2) la posible mejora en su uso como *carrier* de ciertas moléculas, ya que se ha reportado que los geles constituyen una excelente matriz para el transporte de minerales promoviendo su absorción (Remondetto, Beyssac, y Subirade, 2004), mejorando también la estabilidad oxidativa de lípidos y promoviendo una liberación controlada de compuestos activos (Ruffin et al., 2014); y 3) la obtención de productos alimenticios con diferentes propiedades de textura (Dickinson y Chen, 1999; Dickinson, 2013).

El CMP presenta la particularidad de gelificar a temperatura ambiente por disminución del pH (Farías et al., 2010), lo que abre la posibilidad de utilizarlo para formar emulsiones gelificadas que actúen como *carrier* de aceites bioactivos o compuestos solubles en aceite (Boon et al., 2010; Dickinson, 2012; Mantovani et al., 2016).

II-1.1. Caracterización de las emulsiones de CMP

Las propiedades emulsionantes del CMP se estudiaron a una concentración del 8 % p/p en la fase acuosa y las emulsiones se formularon con una relación de aceite/agua 10:90

utilizando como fase oleosa aceite de girasol. Esta alta concentración de CMP fue elegida con el fin de evaluar posteriormente la posible gelificación de la emulsión, para lo cual resulta necesario una concentración suficiente para que la gelificación ocurra en un tiempo menor a 24 h (Farías et al., 2010). Las emulsiones fueron caracterizadas inicialmente y durante el tiempo de almacenamiento a una temperatura de 25 °C mediante la determinación del tamaño de gota por dispersión estática de luz (SLS).

En la **Figura 47** se observan las distribuciones de tamaño de gota de la emulsión inicial de CMP 8 % p/p a pH 6,5 y de la misma luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C).

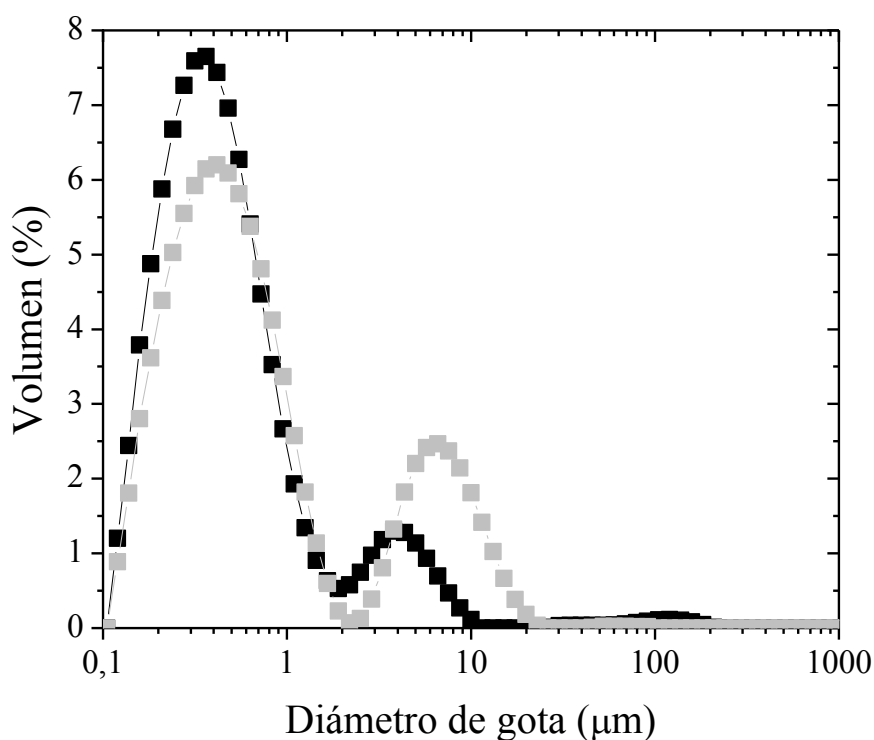


Figura 47. Distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP 8 % p/p inicial (■) y después de 7 días (■). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Se observó que la emulsión presentó inicialmente una distribución bimodal con un diámetro medio de gota (D_{32}) de 0,340 μm (**Tabla 8**). Una de las poblaciones corresponde a pequeñas gotas de $\sim 0,35 \mu\text{m}$ y la otra a mayores tamaños ($\sim 4 \mu\text{m}$). El parámetro D_{43} , que está relacionado con los fenómenos de desestabilización, por ser más sensible a la variación de volumen y la polidispersidad, presentó un valor más alto (0,716 μm) que el D_{32} , indicando un cierto grado de floculación inicial.

Cuando se evaluó el tamaño de gota luego de 7 días, se observó que la distribución se mantuvo bimodal, aunque con un aumento de la población de mayor tamaño. El aumento en el parámetro D_{32} con el tiempo de almacenamiento está relacionado con la presencia de gotas de mayor tamaño, las cuales serían más propensas a los fenómenos de desestabilización (McClements, 2015). El parámetro D_{43} aumentó significativamente en el período de almacenamiento, desde $0,716 \mu\text{m}$ a $1,947 \mu\text{m}$ (**Tabla 8**), evidenciando la baja estabilidad de esta emulsión.

Tabla 8. Diámetros promedio (D_{32} y D_{43}) obtenidos para las emulsiones de CMP 8 % p/p a pH 6,5 inicial y luego del almacenamiento durante 7 días a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tiempo (días)		$D_{32} (\mu\text{m})$	$D_{43} (\mu\text{m})$
Emulsión de CMP	0	$0,338 \pm 0,003^a$	$0,716 \pm 0,066^a$
	7	$0,413 \pm 0,000^b$	$1,947 \pm 0,035^b$

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

($P < 0,05$, $n = 2$).

La estabilidad de las emulsiones está influenciada por la presencia de gotas de mayor tamaño, aún cuando estén presentes en un pequeño porcentaje con respecto al número total de gotas. Cuanto mayor sea el tamaño de las gotas, éstas serán más propensas a la coalescencia, ya que las fuerzas de impacto que se generan y la magnitud de las mismas durante una colisión, se hacen mayores con el aumento del tamaño de las gotas (McClements, 2015).

Chobert et al. (1989) estudiaron las propiedades emulsionantes del CMP en comparación con las de κ -caseína (proteína de la cual proviene). En dicho trabajo, el CMP fue aislado de la κ -caseína mediante acción enzimática con quimosina, seguida por una etapa de acidificación y una posterior purificación por medio de técnicas cromatográficas. Luego se prepararon emulsiones de CMP 0,1 % en un amplio rango de pH (1-10) en un homogeneizador a 20,000 rpm durante 30 s. Estos autores reportaron que el CMP mostró una actividad emulsionante similar a la de la κ -caseína, pero una menor estabilidad, particularmente en el intervalo de pH neutro y alcalino. Por otro lado, cuando se estudiaron las propiedades emulsionantes de un CMP obtenido por acción enzimática, posterior tratamiento térmico y purificación por polimerización y ultrafiltración, en comparación con concentrados de suero lácteo (WPC) (Martin-Diana et al., 2005), se

reportó una menor actividad emulsificante del CMP con respecto al WPC; sin embargo, la actividad del CMP no fue tan afectada por el pH como la del WPC.

Se han hecho algunos intentos para modificar las propiedades emulsionantes del CMP conjugándolo con otras moléculas. Mediante la reacción de Maillard, se conjugó lactosa con CMP ovino y se determinó el índice de actividad emulsionante (EAI) a una concentración de 1 mg/ml en un rango de pH entre 3 y 7 (Moreno et al., 2002). Los autores reportaron que los valores de EAI obtenidos para el CMP ovino fueron comparables a los valores informados para CMP bovino y para κ -caseína y superiores a los descriptos para β -caseína, mostrando así un buen carácter emulsionante. También indicaron que esta buena actividad emulsionante se observó a valores de pH > 6, mientras que a pH 4 y 5 no se pudieron formar emulsiones, los autores atribuyen este comportamiento a que, a estos valores de pH, cerca de su pI, un cambio en los grupos ionizables puede afectar la estructura de la CMP y, por lo tanto, su capacidad emulsionante. Por último, reportaron que su conjugación con lactosa aumentó la actividad emulsionante sin reducir significativamente la solubilidad del macropéptido.

En otro trabajo, se conjugó una muestra de CMP (obtenida por acción enzimática y posterior purificación por diálisis) con ácidos grasos de cadena larga mediante una reacción de lipofilización que involucra ésteres grasos de N-hidroxisuccinimida y se logró una mejora de la funcionalidad del CMP no sólo como emulsionante sino también como antibacteriano (Wong et al., 2006). Los autores reportaron que la naturaleza hidrofílica del CMP fue un factor limitante para su actividad como agente emulsionante, y que la lipofilización del CMP introdujo un grupo anfipático que mejoró su capacidad emulsionante y la estabilidad de la emulsión.

Kreuß et al., (2009) estudiaron las propiedades emulsionantes de las dos fracciones de CMP (aCMP y gCMP), por homogeneización a altas presiones, a concentraciones entre 0,25-5 % p/p y pH 6 y reportaron una mayor capacidad emulsionante y estabilidad para la emulsión formada por la fracción aCMP en comparación con la formada por la fracción gCMP. Esto fue atribuido a una posible mayor adsorción del aCMP en la interfase. El mayor tamaño de gota observado para la emulsión de gCMP se relacionó con la presencia de cadenas laterales de glicano cargadas negativamente en las moléculas de esta fracción, las cuales provocan repulsiones eléctricas y estéricas que producen una menor adsorción de las moléculas de gCMP.

Todos estos estudios demuestran que las propiedades emulsionantes del CMP son dependientes del método de obtención del CMP, del pH, y de las fracciones que contenga,

aunque en general se caracteriza por presentar una buena capacidad emulsionante; sin embargo, sus emulsiones no son tan estables.

El CMP utilizado en el presente trabajo fue obtenido de manera selectiva por la técnica de intercambio iónico, (técnica que garantiza la uniformidad de las propiedades estudiadas); sin embargo, aún a altas concentraciones (8 % p/p) la emulsión presentó floculación y una baja estabilidad al almacenamiento.

II-1.2. Caracterización interfacial aceite/agua de CMP

Las propiedades emulsionantes están vinculadas a las propiedades interfaciales de las proteínas ya que durante el proceso de formación de una emulsión la proteína debe migrar y adsorberse a la interfase y estabilizarla (McClements, 2015). Hasta el momento no se ha reportado el comportamiento del CMP en la interfase aceite/agua (O/W), si bien se ha estudiado su comportamiento en la interfase aire/agua (Martinez et al., 2009). Por lo tanto, se determinó el comportamiento del CMP en la interfase O/W mediante un tensiómetro de gota pendiente. Esta técnica permite determinar la evolución de la presión interfacial ($\pi - \pi_0$) con el tiempo de adsorción y al mismo tiempo caracterizar la reología de la película interfacial. Se trabajó con una concentración de CMP del 2 % p/p, cuatro veces inferior a la utilizada para la obtención de las emulsiones, debido a limitaciones del equipo.

En la **Figura 48** se muestra la cinética de adsorción (variación de π en el tiempo) del CMP a pH 6,5. Se observó un rápido incremento de la presión (π) durante la etapa inicial de adsorción que se puede asociar con su rápida migración y adsorción interfacial, alcanzándose un valor de π máximo (~ 13 mN/m) en pocos minutos.

La solubilidad de la proteína es un requisito previo importante para la formación de la película interfacial porque la migración rápida y la adsorción en la interfase son críticas para la formación de la emulsión. Los péptidos tienen estructuras más simples comparados con las proteínas. Se considera que los péptidos de bajo peso molecular tienen menos estructura terciaria y una conformación menos rígida, por lo cual la contribución de la estructura primaria a la propiedad de emulsionar podría ser más pronunciada (Chobert et al., 1989). Es posible sugerir que la alta solubilidad que presenta el CMP (Kreuz et al., 2009), su pequeño tamaño molecular (El-Salam et al., 1996; Thomä-Worringer et al., 2006) y estructura simple y aleatoria, sin estructura secundaria y terciaria definidas (Kreuz et al., 2009), podrían favorecer la capacidad del CMP para

cubrir la interfase rápidamente (Martinez et al., 2009; Thomä Worringer et al., 2007), lo cual contribuiría a su actividad interfacial.

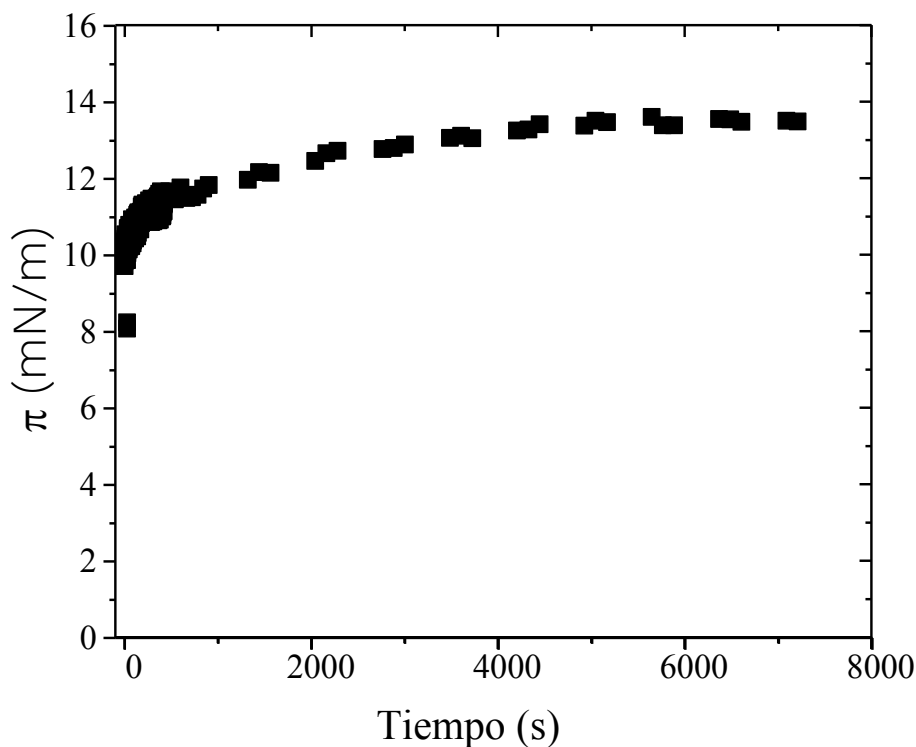


Figura 48. Evolución de la presión interfacial (π) con el tiempo de adsorción de una solución de CMP 2 % p/p (■). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Con respecto a las propiedades dilatacionales interfaciales, la **Figura 49** muestra la variación del módulo dilatacional (E) en función del tiempo de adsorción. Se observó un aumento progresivo de E a medida que transcurre el tiempo. El incremento de E refleja la cantidad de proteína adsorbida en la interfase y/o el grado de interacción entre las moléculas. En este caso, se alcanzó un valor de E constante (~ 15 mN/m) luego de 4000 s, manteniendo dicho valor hasta finalizar el tiempo de medición. Este valor final de E , indica que la película formada por CMP se caracteriza por presentar un comportamiento elástico, característico de la mayoría de las macromoléculas interfacialmente activas (Bos y Van Vliet, 2001). Sin embargo, el desarrollo de la elasticidad de la película interfacial de CMP es relativamente lenta en comparación con otras proteínas que aumentan muy rápidamente su valor de E durante los primeros minutos de adsorción (Martin et al., 2002; Rodríguez Patino et al., 2003). Por ejemplo, en las mismas condiciones de medición que el presente trabajo la β -lg formó películas muy elásticas ($E > 30$ mN/m) a cortos tiempos

de adsorción ($t < 2000$ s), incluso a concentraciones más bajas que las estudiadas en este trabajo (1 y 0,5 % p/p) (Camino et al., 2012).

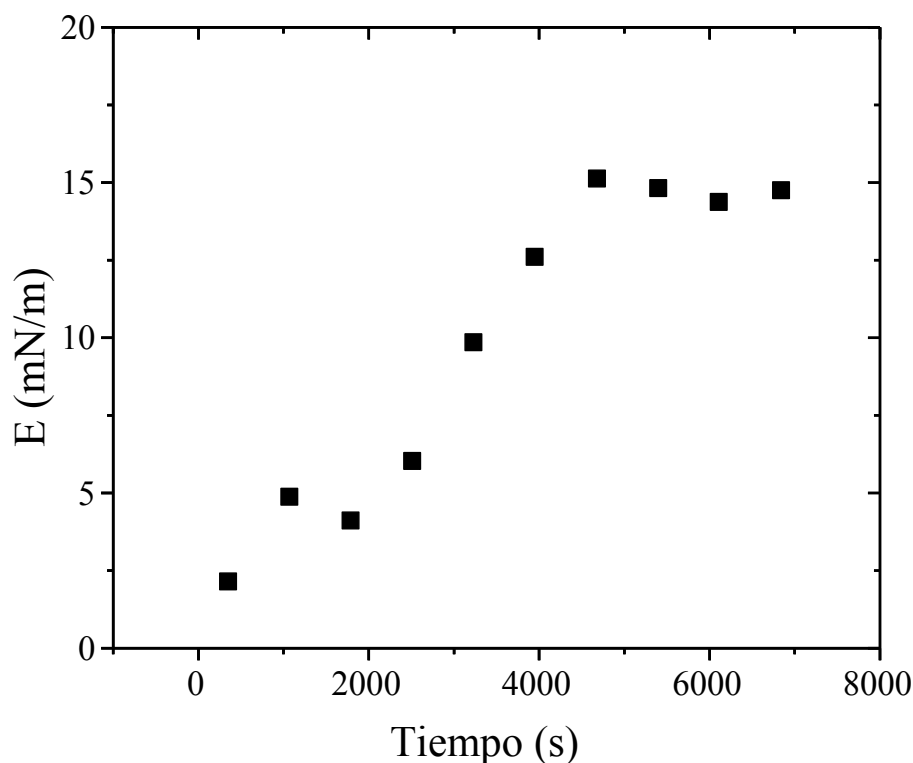


Figura 49. Evolución del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo de adsorción de una solución de CMP 2 % (■). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

A pesar de que no se han reportado estudios interfaciales O/W de soluciones de CMP, sí ha sido descrito y caracterizado su comportamiento en interfases A/W a diferentes concentraciones de CMP y condiciones de pH (Martinez et al., 2009). En dicho trabajo, se reportó que el CMP (a altas concentraciones y a pH 7) migra rápidamente a la interfase A/W, lo que fue asociado al pequeño tamaño de partícula que presenta el CMP a pH 7 (forma monómerica). Sin embargo, esta rápida ocupación restringiría el despliegue en la interfase y su reordenamiento, dando como resultados valores de E inferiores a los obtenidos a concentraciones menores, lo que fue atribuido a la existencia de una restricción estérica debido a la alta carga del CMP en la interfase.

El comportamiento del CMP en la interfase O/W, observado en este trabajo, permite sugerir que la rápida adsorción del CMP en la interfase (alcanzando su máximo valor a $t < 2000$ s) (**Figura 48**) favorecería la formación de la emulsión; sin embargo, la lenta formación de interacciones en dicha interfase (alcanzando un valor de viscoelasticidad

máximo a $t > 4000$ s, **Figura 49**) podría explicar la baja estabilidad de las emulsiones de CMP (**Figura 47** y **Tabla 8**).

II-1.3. Gelificación de emulsiones de CMP por pH

La forma más común de gelificar una emulsión es por medio del tratamiento térmico de proteínas (cuando estas se usan como emulsionante), como por ejemplo proteínas del suero (WPI) (Chen y Dickinson, 1998, Dickinson y Chen, 1999). Sin embargo, la gelificación en frío resultaría más adecuada para sistemas que contienen ingredientes sensibles al calor, como los aceites.

Algunos autores han obtenido emulsiones de WPI gelificadas en frío pero con una etapa inicial de precalentamiento para promover el despliegue de la proteína y la exposición de grupos reactivos, y una segunda etapa de formación de una estructura de gel a través de diferentes estrategias: a) la adición de un acidificante con el fin de disminuir el pH al pI de la proteína (por ejemplo, glucono- δ -lactona) (Mao et al., 2014; Rosa et al., 2006; Sala et al., 2009 a, 2009 b), b) la adición de sales divalentes (por ejemplo, cloruro de calcio), o c) la adición de enzimas (por ejemplo, transglutaminasa) (Dickinson y Yamamoto, 1996). En este tipo de gelificación, el precalentamiento que promueve el despliegue de la proteína podría llevarse a cabo antes o después del proceso de emulsificación (Rosa et al., 2006; Sala et al., 2009 a, 2009 b; Ye et al., 2009); sin embargo, ambas posibilidades podrían conducir a efectos adversos como la reducción de las propiedades emulsionantes de la proteína o el daño de las propiedades del aceite. Una alternativa interesante a este método de obtención de emulsiones gelificadas, fue reportada recientemente por Mantovani et al. (2016) quienes obtuvieron emulsiones de WPI gelificadas en frío por disminución del pH y sin ningún tratamiento térmico de la proteína. La obtención de estas emulsiones gelificadas se realizó en dos etapas: 1) estabilización de las gotas de la emulsión con proteína no tratada térmicamente, y 2) gelificación por medio de la adición de proteína tratada térmicamente a la fase continua.

Por todo lo expuesto, el desarrollo de emulsiones gelificadas en frío presenta un desafío para la obtención de sistemas que no impliquen un deterioro inicial tanto del aceite, como de la proteína y de los posibles bioactivos incorporados a tales sistemas, por lo que las emulsiones de CMP serían una excelente alternativa.

En un trabajo previo (Fariás et al., 2010) se estudió la capacidad de soluciones de CMP de gelificar a temperatura ambiente en un amplio rango de concentraciones (3-10 % p/p)

y condiciones de pH (3-8) y se reportó que el CMP es capaz de gelificar a $\text{pH} < 4,5$ a todas las concentraciones evaluadas. No obstante, el tiempo de gelificación aumenta al disminuir la concentración de CMP.

Con el objetivo de estudiar si una emulsión de CMP también es capaz de gelificar por disminución de pH en forma similar a lo que ocurre en solución, se disminuyó el pH de la emulsión de CMP (8 % p/p, formada a pH 6,5) hasta pH 2 y pH 3 con el agregado de HCl 1 N. Las emulsiones ajustadas a pH 2 y pH 3 se matuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y se procedió a determinar mediante el test de inclinación el tiempo de gelificación (t_{gel}). Las condiciones de concentración de CMP y pH para el estudio de la gelificación de las emulsiones del presente trabajo fueron seleccionadas a partir del estudio previo de Farías et al. (2010), donde se reportó que a concentraciones mayores a 7 % p/p y $\text{pH} < 4,5$ se logró promover la gelificación de soluciones de CMP en tiempos menores a 24 h. En la **Tabla 9** se muestran los t_{gel} obtenidos. Se observó que tanto a pH 2 como a pH 3 las emulsiones gelificaron, siendo más rápida la gelificación a pH 2, lo que guarda relación con los resultados obtenidos en solución acuosa donde se indicó que a medida que el pH disminuye por debajo de 4 la gelificación ocurre en menores tiempos (Farías et al., 2010).

Tabla 9. Tiempo de gelificación (t_{gel}) de emulsiones de CMP al 8 % p/p a pH 2 y pH 3.

Temperatura: 25 °C.

	t_{gel} (h)	
	<i>pH 2</i>	<i>pH 3</i>
Emulsión de CMP	3,5	4,5

Si se compara el t_{gel} de la emulsión de CMP 8 % p/p a pH 3 (4,5 h) con el t_{gel} de la solución de CMP 8 % p/p (7,65 h) (Farías et al., 2010), se observa que los tiempos son mucho menores para la gelificación del CMP emulsionado, por lo que podría sugerirse que probablemente el proceso de emulsificación promueva la asociación del CMP más rápidamente que en solución.

II-1.4. Reversión de la gelificación de emulsiones de CMP por pH

Debido a que la gelificación es pH-dependiente, se evaluó la capacidad de reversión de las emulsiones gelificadas por aumento de pH a su valor original (6,5). Para ello, luego de 24 horas de gelificadas las emulsiones, se diluyeron en buffer a pH 6,5 (dilución 1:4) y se completó el ajuste hasta dicho pH con NaOH 0,1 N. Todas las emulsiones revirtieron su estado gelificado.

Posteriormente, se determinó el tamaño de gota de las emulsiones luego de la reversión de la gelificación, para evaluar si éste fue afectado por el proceso de gelificación/reversión. La **Figura 50** muestra la distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP (pH 6,5) inicial y luego de revertir la gelificación. Se puede observar que las emulsiones de CMP luego de la reversión presentan tamaños de gota mayores a los iniciales. Dicho aumento se evidencia también en un aumento significativo de los valores de D_{32} y D_{43} (**Tabla 10**) en comparación con los de la emulsión original a pH 6,5, sugiriendo que el sistema se desestabiliza durante el proceso de gelificación y que no logra volver a su estado original luego del ajuste de pH a la condición inicial.

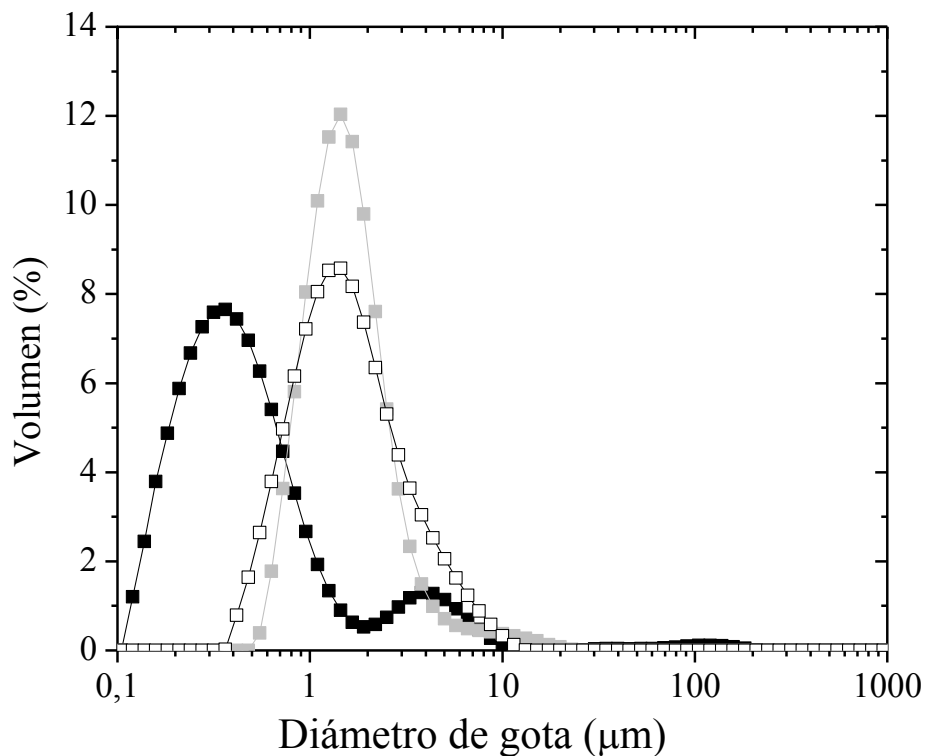


Figura 50. Distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP 8 % p/p inicial (■), y luego de revertir la gelificación desde pH 3 (□) y pH 2 (◼). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Tabla 10. Diámetros promedio (D_{32} y D_{43}) obtenidos para las emulsiones de CMP 8 % p/p a pH 6,5 inicial y luego de la reversión de la gelificación desde pH 2 y 3. Temperatura: 25 °C.

Emulsión de CMP	D_{32} (μm)	D_{43} (μm)
Inicial	$0,338 \pm 0,003^a$	$0,716 \pm 0,066^a$
Revertida desde pH 2	$1,309 \pm 0,003^c$	$1,779 \pm 0,006^b$
Revertida desde pH 3	$1,211 \pm 0,001^b$	$1,854 \pm 0,004^b$

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

($P < 0,05$, $n = 2$).

Se ha reportado que el CMP es afectado por el cambio de pH ya que contiene dos residuos Asp, siete u ocho Glu (dependiendo de la variante genética), un fosfo-Ser y tres residuos de Lys (Chobert et al., 1989). Inicialmente, a pH neutro, la mayoría de los dominios hidrófobos del CMP están enmascarados por la fuerte densidad de carga negativa de los residuos Glu y Asp de manera que estos dominios no pueden interactuar con otras moléculas. Este efecto es más pronunciado para gCMP debido a la carga negativa de los residuos de ácido siálico terminal (Kreuz et al., 2009).

Es así que, las emulsiones obtenidas a valores de pH mayores al pI (por ejemplo, pH 6,5) presentarían una mejor estabilidad debida a la fuerte repulsión electrostática entre las gotas de aceite cargadas negativamente. Al disminuir el pH por debajo de 6,5, hay una creciente protonación de los aminoácidos ácidos de las cadenas laterales. Por lo tanto, la carga negativa empieza a disminuir, permitiendo que el dominio hidrofóbico N-terminal (que ya no estaría cubierto por la carga negativa), pueda comenzar a interactuar con otras moléculas (Farías et al., 2010; Martínez et al., 2011). Al disminuir el pH por debajo de 4, el aCMP (pI 4,15) tiene una carga positiva originada a partir de los tres residuos Lys, del N-terminal cargado positivamente y de la protonación de los residuos Glu y Asp. Las isoformas del gCMP menos ácidas alcanzan su estado isoeléctrico a esta condición de pH y al seguir disminuyendo el pH hasta pH 3,15 todo el gCMP se encuentra en su estado isoeléctrico (Kreuz et al., 2009).

Por lo tanto, durante la acidificación realizada (hasta pH 2 o 3) para promover la gelificación, las dos fracciones de CMP atraviesan su pI. Debido a la falta de fuerzas repulsivas alrededor de las gotas de aceite (barrera de energía necesaria para evitar que las gotas se unan) las mismas tenderían a desestabilizarse (Dickinson, 2001; Kreuz et al., 2009; Sharma, 2013). El gran aumento del D_{32} y su similitud con el D_{43} también sugeriría

que ocurrió un grado significativo de coalescencia por lo cual se podría sugerir que la desestabilización que se produce cerca del pI sería irreversible.

A fin de corroborar cuál es el fenómeno de desestabilización que ocurre durante la disminución de pH de las emulsiones de CMP, se realizó el análisis de tamaño de gota de las emulsiones previamente gelificadas a pH 2 y pH 3 y luego revertidas a pH 6,5, en presencia y ausencia de SDS. La adición de SDS rompe los flóculos y previene una posterior floculación, ya que el SDS adsorbido le da a las gotas una carga neta negativa, lo cual previene su agregación debido a la repulsión electrostática (Palazolo et al., 2005). La comparación entre las distribuciones determinadas en ausencia y presencia de SDS permite evaluar la existencia de flóculos.

La **Figura 51** muestra la distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP inicial y luego de revertida la gelificación (tanto a pH 2 como a pH 3) en agua (sin SDS) y con SDS. En la **Tabla 11** se presentan además los valores obtenidos para los parámetros: índice de coalescencia (IC) y grado de floculación (GF).

Puede observarse que, inicialmente la emulsión de CMP presentó un alto grado de floculación (~ 45 %) (**Tabla 11**). Luego de gelificar las emulsiones a pH 2 y 3 y de revertir dicha gelificación por aumento del pH a 6,5 se obtuvo un alto grado de coalescencia, con valores de IC entre 200-360 %, indicando que existe un aumento significativo del tamaño de gota durante el proceso de gelificación-reversión, es decir, las gotas que inicialmente se encuentran floculadas tienden a seguir el proceso de desestabilización fusionándose y dando lugar a gotas de mayor tamaño. Si bien existe floculación en estas emulsiones, el índice es bajo (IF ~ 25 %), sugiriendo que la desestabilización de la emulsión de CMP gelificada y revertida ocurre principalmente mediante el fenómeno de coalescencia.

La coalescencia es el proceso irreversible mediante el cual dos o más gotas de líquido se fusionan para formar una gota más grande. Es el mecanismo principal por el cual una emulsión se mueve hacia su estado termodinámicamente estable porque implica una disminución en el área de contacto entre las fases aceite y agua. La coalescencia hace que las gotas de la emulsión crezcan o sedimenten más rápidamente debido al aumento en su tamaño. Este proceso sólo puede ocurrir cuando las gotas están muy próximas y la película interfacial se hace lo suficientemente delgada como para que se rompa. En la práctica, se considera que la ruptura de la película interfacial se da principalmente en aquellos sistemas en donde las tensiones interfaciales son extremadamente bajas o donde no hay interacciones repulsivas entre las gotas (McClements, 2015). La resistencia de una

película interfacial a la coalescencia depende del tipo y concentración de las moléculas de emulsionantes presentes, así como de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de la interfase, por ejemplo, el espesor, la carga eléctrica, el empaque y las interacciones (McClements, 2015).

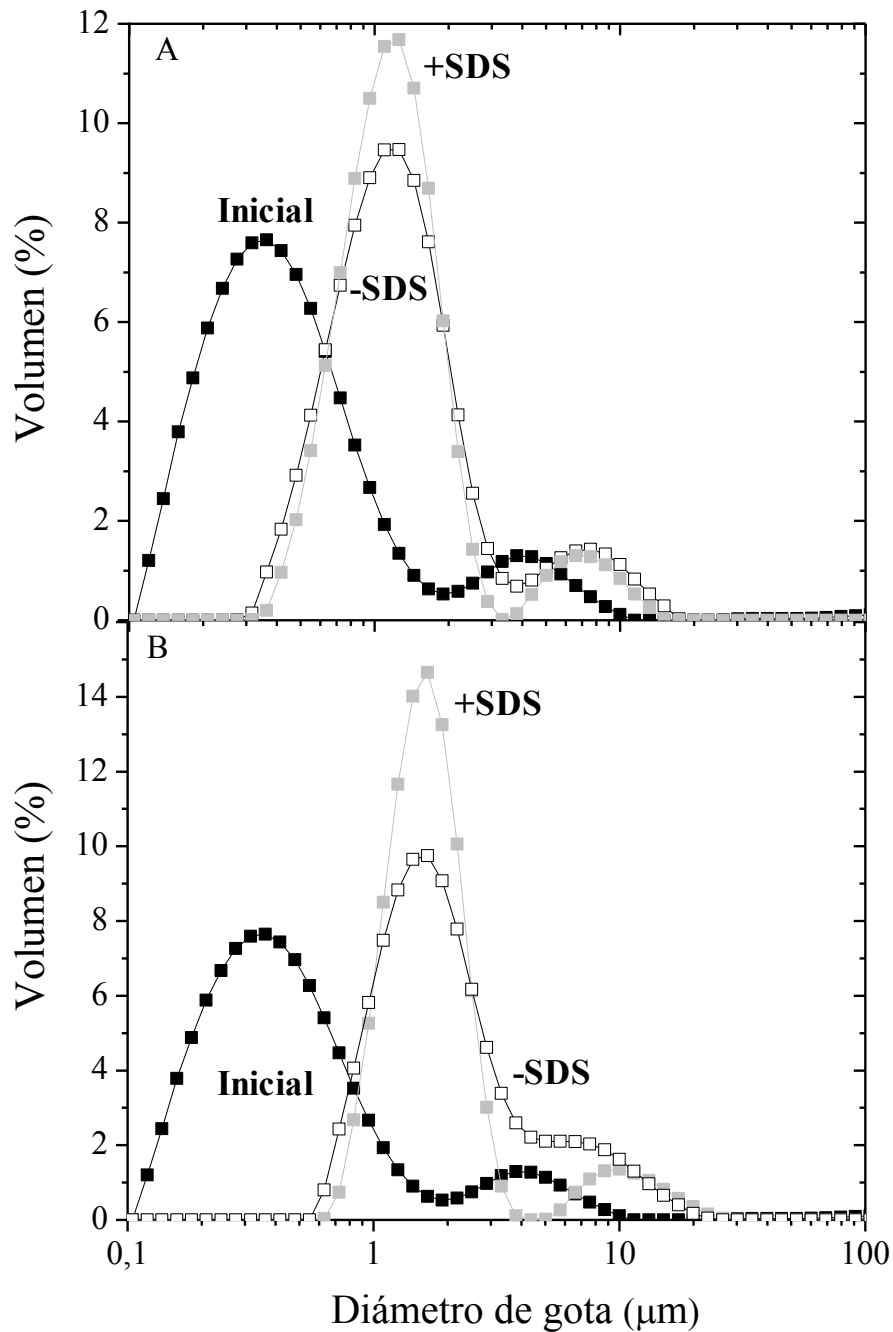


Figura 51. Distribución de tamaño de la gota de la emulsión de CMP 8 % p/p inicial (■), luego de revertir la gelificación desde pH 2 (A) y pH 3 (B), con SDS (■) y sin SDS (□).

Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Tabla 11. Índice de coalescencia (IC %) y grado de floculación (GF %) de emulsiones de CMP a pH 6,5 inicial y luego de la reversión de la gelificación desde pH 2 y 3. Temperatura: 25 °C.

Emulsión CMP	IC (%)	GF (%)
Incial	-	44,7
Revertida desde pH 2	212	24,2
Revertida desde pH 3	360	24,7

Como se mencionó en el apartado anterior, el CMP alcanza su pI durante la acidificación realizada para promover la gelificación, lo que induce la unión de las gotas debido al predominio de interacciones electrostáticas. El hecho de que la desestabilización sea principalmente mediada por el fenómeno de coalescencia explica que dicha desestabilización se mantenga aún después de la reversión de la gelificación por aumento de pH.

Además del tamaño de las gotas, existen otros factores que afectan la tendencia de las gotas a unirse durante (o poco después) de la formación de la emulsión, como lo es la efectividad del recubrimiento interfacial para resistir la coalescencia frente a un encuentro gota-gota.

En base a estos resultados, en la **Figura 52** se propone un esquema que representa la gelificación de las emulsiones de CMP y su posterior reversión. A pH 6,5 las moléculas de CMP, cargadas negativamente, se adsorben en la interfase y las gotas de aceite individuales son estabilizadas por medio de la repulsión electrostática que existe entre las mismas. A valores de pH < 4,5, la carga de los residuos fuertemente negativos comienza a disminuir, y las moléculas comienzan a asociarse tanto en la interfase como en la fase continua. A valores de pH cercanos al pI, debido a la falta de fuerzas repulsivas, no es posible estabilizar las gotas de aceite y, en consecuencia, la emulsión coalesce rápidamente. Cuando se reestable el pH a su valor inicial (6,5), las gotas que coalescieron durante la acidificación se mantienen de esta forma, mientras que las moléculas asociadas en la fase continua revierten a su forma dimérica. Esto da como resultado un aumento en el tamaño de gotas luego de la reversión.

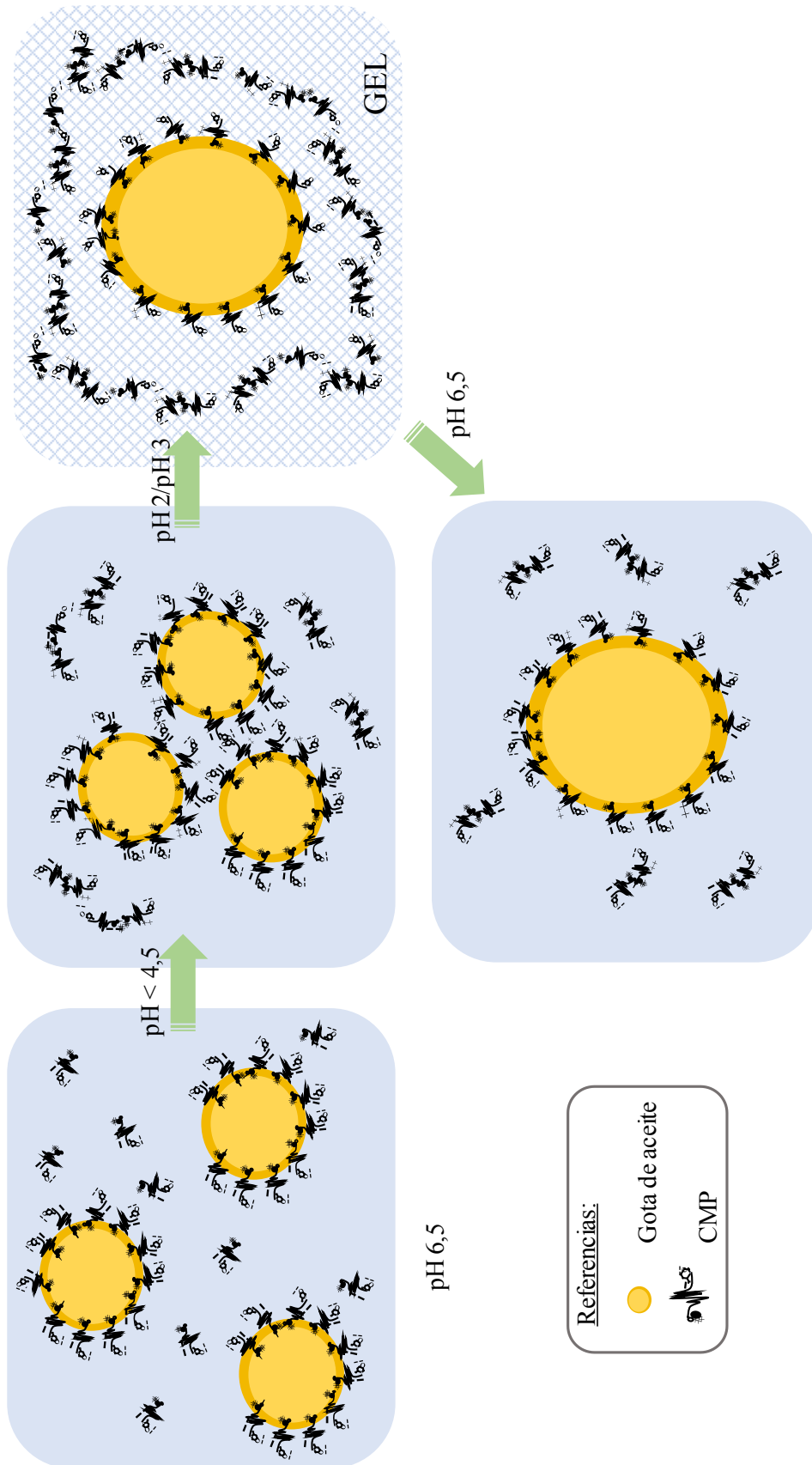


Figura 52. Representación esquemática del proceso de gelificación y reversión de la gelificación de una emulsión de CMP por medio de cambios de pH.

II-1.5. Conclusiones

Se concluye que no es posible formar una emulsión de CMP estable en el tiempo a pH 6,5 aún a concentraciones elevadas como 8 % p/p.

Al disminuir el pH se logró la gelificación de la emulsión de CMP; sin embargo, se observó que durante la acidificación necesaria para promover la gelificación de la emulsión ésta se desestabiliza produciéndose la coalescencia de las gotas de aceite. Este fenómeno puede ser explicado en términos de las diferentes cargas de las fracciones de CMP (glicosilada y no glicosilada) que disminuyen al acercarse al pI reduciendo la repulsión electrostática entre gotas, lo que promueve finalmente la unión entre ellas (coalescencia).

Por todo esto, se concluye que sería necesaria la presencia de otros emulsionantes a fin de asegurar una mayor estabilidad de las emulsiones de CMP.

II-1.6. Referencias

- Adamson, A.W. (1990). *Physical Chemistry of Surfaces*. New York, Wiley.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J. & Decker, E. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (6), 515–532.
- Bos, M.A. & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91 (3), 437–471.
- Camino, N.A., Carrera Sanchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2012) Hydroxypropylmethylcellulose - β -lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27, 464-474.
- Chen, J.S. & Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. *Journal Texture Studies*, 29 (3), 285-304.
- Chobert, J.M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalarondo, M. & Nicolas, M.G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ -casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457–473.
- Dickinson, E. & Yamamoto, Y. (1996). Rheology of milk protein gels and protein- stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1371-1377.
- Dickinson, E. & Chen, J. (1999). Heat-set whey protein emulsion gels: role of active and inactive filler particles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20 (1-2), 197-213.
- 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. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28 (1), 224–241.
- Dickinson, E. (2013). Stabilizing emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93,710-721.
- Dickinson, E. (2015). Structuring of colloidal particles at interfaces and the relationship to food emulsion and foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 449, 38-45.
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231.

- El-Salam, M.H.A., El-Shibiny, S. & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6 (4), 327–341.
- Fariás, M.E., Martínez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79–88.
- Karlberg, M., Thuresson, K. & Lindman, B. (2005). Hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 262, 158–167.
- Kreuß, M., Strixner, T. & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1818–1826.
- Li, C., Sun, P. & Yang, C. (2012). Emulsion stabilized by starch nanocrystals. *Starch Starke*, 64, 497-502.
- Livney, Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (1-2), 73-83.
- Mao, L., Roos, Y.H. & Miao, S. (2014). Study on the rheological properties and volatile release of cold-set emulsion-filled protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11420-11428.
- Mantovani, R. A., Cavallieri, A.L.F. & Cunha, R. L. (2016). Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. *Journal of Food Engineering*, 175, 108–116.
- Martin-Diana, A.B, Frias, J. & Fontecha, J. (2005). Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. *Milchwissenschaft*, 60, 363–366.
- Martin, A.H., Grolle, K., Bos, M.A., Cohen Stuart, M.A. & Van Vliet, T. (2002). Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254 (1), 175–183.
- Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2009). Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 230-237.
- Martinez, M.J., Fariás, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 860–867.
- McClements, D.J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. (CRC Press, Ed.) (3rd ed.).
- Moreno, F.J., López-Fandiño, R. & Olano, A. (2002). Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (18), 5179–5184.

- Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. & Wagner, J.R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19, 595–604.
- Remondetto, G.E., Beyssac, E. & Subirade, M. (2004). Iron availability from whey protein hydrogels: an *in vitro* study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8137–43.
- Rodríguez Patino, J.M., Molina Ortiz, S.E., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Niño, M.R. & Añón, M.C. (2003). Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 268 (1), 50–57.
- Rosa, P., Sala, G., van Vliet, T. & van de Velde, F. (2006). Cold gelation of whey protein emulsions. *Journal of Texture Studies*, 37 (5), 516-537.
- Ruffin, E., Schmit, T., Lafitte, G., Dollat, J.M. & Chambin, O. (2014). The impact of whey protein preheating on the properties of emulsion gel bead. *Food Chemistry*, 151, 324–332.
- Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., van Aken, G.A. & van de Velde, F. (2009a). Deformation and fracture of emulsion-filled gels: effect of oil content and deformation speed. *Food Hydrocolloids*. 23 (5), 1381-1393.
- Sala, G., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., van Aken, G.A. & van de Velde, F. (2009b). Deformation and fracture of emulsion-filled gels: effect of gelling agent concentration and oil droplet size. *Food Hydrocolloids*. 23 (7), 1853-1863.
- Sharma, R. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science. & Technology*, 93, 21–43.
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F. & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 37 (1), 5-20.
- Thomä-Worringer, C., Sörensen, J. & López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16 (11), 1324-1333.
- Thomä-Worringer, C., Siegert, N. & Kulozik, U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. *Milchwissenschaft*, 62, 249–252.
- Wong, P.Y.Y., Nakamura, S. & Kitts, D.D. (2006). Functional and biological activities of casein glycomacropeptide as influenced by lipophilization with medium and long chain fatty acid. *Food Chemistry*, 97 (2), 310–317.

- Ye, A. & Taylor, S. (2009). Characterization of cold-set gels produced from heated emulsions stabilized by whey protein. *International Dairy Journal*, 19 (12), 721-727.
- Ye, A., Zhu, X. & Singh, H. (2013). Oil-in-water emulsion system stabilized by protein-coated nanoemulsion droplets. *Langmuir*, 29, 14403-14410.

Capítulo II-2

*Impacto del agregado de co-emulsionantes
sobre las emulsiones de CMP*

II-2. Introducción

Entre los distintos tensioactivos o emulsionantes que pueden encontrarse en las emulsiones alimentarias, además de las proteínas, los emulsionantes de bajo peso molecular y algunos polisacáridos son los más estudiados (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992). Los emulsionantes de bajo peso molecular son capaces de estabilizar pequeñas gotitas de aceite debido a que pueden migrar muy rápidamente a la interfase aceite-agua. Por ejemplo, se ha reportado el uso de emulsionantes de bajo peso molecular como los polisorbatos en emulsiones lácteas como helados (Euston, 1997). Por su parte, los polisacáridos se añaden tradicionalmente para aumentar la viscosidad de la fase continua y se ha estudiado mucho el uso de polisacáridos en combinación con proteínas con el fin de mejorar las estabilidad de las emulsiones (Klein et al., 2010).

En el capítulo anterior se mostró que las emulsiones de CMP a pH 6,5 fueron poco estables; por tal razón, en el presente capítulo se pretende evaluar el efecto de la combinación de CMP con otros emulsionantes (otras proteínas, surfactantes de bajo peso molecular, fosfolípidos e hidrocoloides) sobre la estabilidad de las emulsiones.

La capacidad de formación y la estabilidad de una emulsión está dada, entre otros factores, por la actividad interfacial de sus componentes, y la interacción entre ellos (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Dickinson, 2009), de manera que la incorporación de otros emulsionantes podría brindar características mejoradas a la emulsión de CMP.

Por otra parte, se observó que las propiedades emulsionantes del CMP fueron muy afectadas por la acidificación y, debido al interés de utilizar la estrategia de gelificación por disminución de pH, resulta necesario lograr una emulsión por medio de la combinación de CMP con otro emulsionante que no sea tan afectada por los cambios de pH. Se seleccionaron como co-emulsionantes de bajo peso molecular a un polisorbato (Tween 80, Tw) y lecitina (LEC). Como co-emulsionantes proteicos al CasNa (ya estudiado anteriormente) y a la gelatina (GEL). Finalmente, se seleccionó a la goma arábica (GA) como co-emulsionante polisacárido por su amplio uso en la industria.

II-2.1. Caracterización de las emulsiones de CMP en presencia de co-emulsionantes

Se prepararon emulsiones de CMP a una concentración del 8 % p/p adicionadas con diferentes co-emulsionantes, con aceite de girasol comercial en una relación 10:90. Se utilizaron concentraciones del 2 % p/p para el Tw (Tw₂), CasNa (CasNa₂), LEC y GA,

además se estudiaron concentraciones del 4 % p/p para el Tw 80 (Tw₄) y CasNa (CasNa₄), y para el caso de la GEL se estudió una concentración menor (0,5 % p/p) ya que a concentraciones superiores se promueve su gelificación.

En primer lugar, se analizó en forma comparativa la distribución de tamaño de gota inicial para el CMP y las emulsiones mixtas a pH 6,5 y temperatura ambiente (25 °C) (**Figura 53**). Las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones muestran la capacidad de cada uno de los emulsionantes empleados para producir pequeñas gotas de aceite durante el proceso de emulsificación.

Las emulsiones estabilizadas por CMP/GA (**Figura 53 A**) y CMP/GEL (**Figura 53 B**), dieron lugar a distribuciones de tamaño de gota bimodales, similar a lo obtenido en la emulsión de CMP. Sin embargo, en el caso de la emulsión con GA el segundo pico se encuentra a tamaños menores que el observado en la emulsión de CMP, mientras que en la emulsión con GEL el segundo pico se encuentra a tamaños levemente mayores. Analizando los diámetros promedios de estas distribuciones (**Tabla 12**) se observó que tanto el D₃₂ como el D₄₃ de la emulsión CMP/GA fueron significativamente inferiores a los obtenidos para el CMP. Esto puede atribuirse a las propiedades emulsionantes de la GA, que es ampliamente utilizada en la industria para estabilizar emulsiones, principalmente de uso en bebidas. La emulsión CMP/GEL, en cambio, presentó valores de D₃₂ similares al CMP, pero el D₄₃ fue significativamente superior, sugiriendo que la adición de este co-emulsionante no logra otorgarle una mayor estabilidad a la emulsión de CMP, ya que un mayor valor de D₄₃ inicial sugiere un mayor grado de floculación inicial.

Por otro lado, las distribuciones de tamaño de gota de CMP/LEC (**Figura 53 C**), CMP/CasNa (**Figura 53 D**) y CMP/Tw (**Figura 53 E**) se caracterizaron por ser monomodales, presentando un solo pico en tamaños menores a 1 μm. La emulsión de CMP/LEC mostró un diámetro promedio de gota D₃₂ superior al de la emulsión de CMP (**Tabla 12**) pero un menor valor de D₄₃ indicando que esta emulsión a pesar de presentar un tamaño de gota un poco mayor al de la emulsión de CMP, presenta un menor grado de floculación inicial.

Para el caso de las emulsiones CMP/CasNa₂ y CMP/CasNa₄ los valores de D₃₂ fueron similares al observado en la emulsión de CMP, mientras que el D₄₃ fue significativamente menor, demostrando ser un co-emulsionante capaz de mejorar la estabilidad del CMP a la floculación inicial.

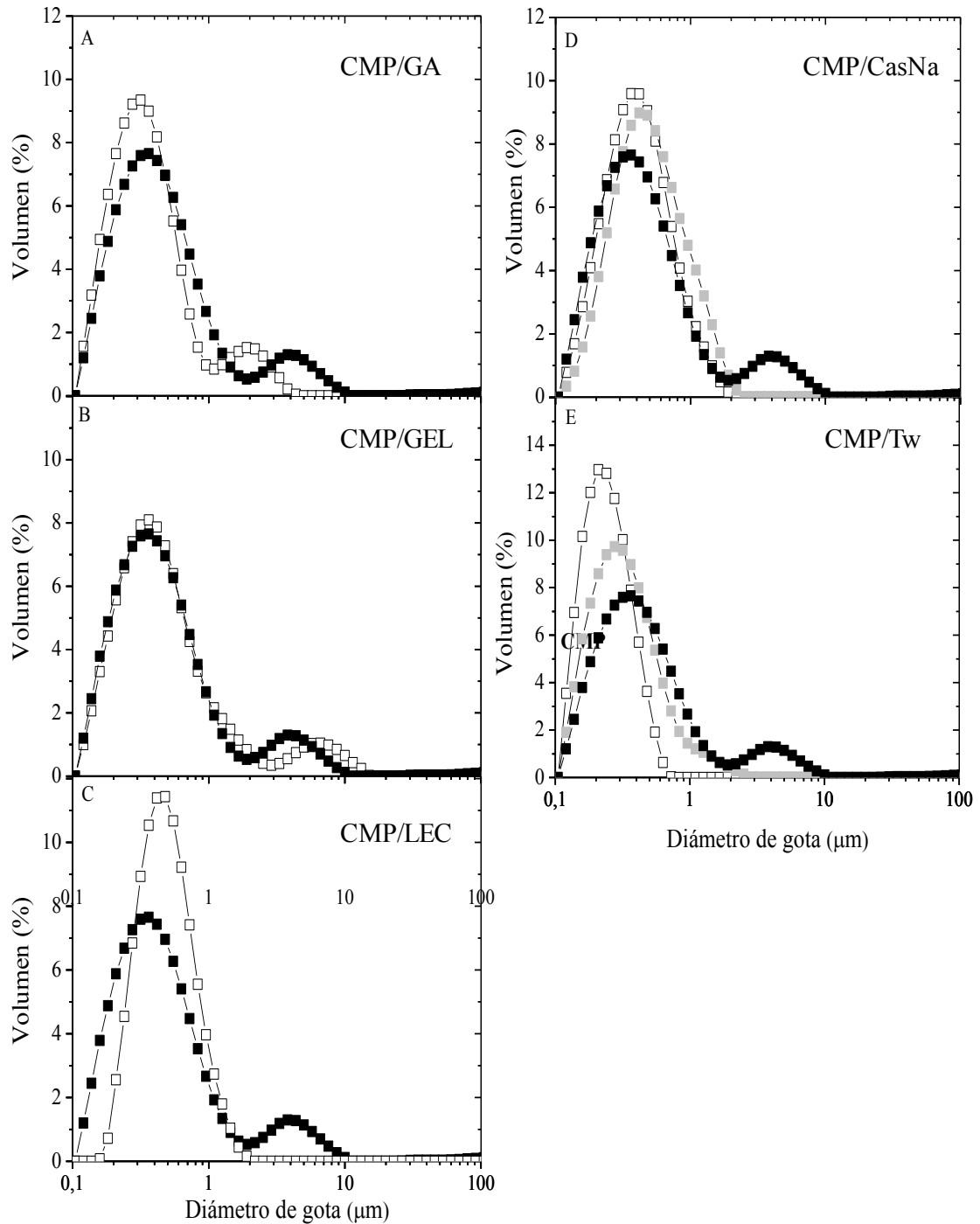


Figura 53. Distribución de tamaño de gota inicial de la emulsión de CMP 8 % p/p (■) y CMP/Co-emulsionante (□). A) CMP 8 %/GA 2 %; B) CMP 8 %/GEL 0,5 %; C) CMP 8 %/LEC 2 %; D) CMP 8 %/CasNa 2 % (■) y 4 % (□); E) CMP 8 %/Tw 2 % (■) y 4 % (□).

Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Por último, al evaluar los diámetros promedio de gota de las emulsiones CMP/Tw₂ y CMP/Tw₄ se observó en ambos casos valores significativamente menores a los obtenidos

por la emulsión de CMP (**Tabla 12**). De hecho, la emulsión CMP/Tw₄ fue la que presentó los menores valores de D₃₂ y D₄₃, siendo dichos valores muy similares entre sí lo que indica la ausencia de floculación inicial, sobre todo con la mayor concentración de Tw evaluada.

Tabla 12. Diámetros promedio (D₃₂ y D₄₃) obtenidos para las emulsiones iniciales a pH 6,5 y temperatura de 25 °C. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

Emulsiones Iniciales	D₃₂ (µm)	D₄₃ (µm)
CMP	0,338 ± 0,003 ^{cd}	0,716 ± 0,066 ^d
CMP/GA (2 %)	0,287 ± 0,001 ^b	0,487 ± 0,002 ^c
CMP/GEL (0,5 %)	0,339 ± 0,008 ^{cd}	0,891 ± 0,075 ^e
CMP/LEC (2 %)	0,420 ± 0,017 ^e	0,518 ± 0,023 ^c
CMP/CasNa₂ (2 %)	0,365 ± 0,028 ^d	0,512 ± 0,036 ^c
CMP/CasNa₄ (4 %)	0,333 ± 0,011 ^c	0,453 ± 0,018 ^{bc}
CMP/Tw₂ (2 %)	0,264 ± 0,003 ^b	0,369 ± 0,003 ^b
CMP/Tw₄ (4 %)	0,210 ± 0,001 ^a	0,238 ± 0,001 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n = 2).

Se ha reportado la obtención de emulsiones con LEC con diámetro de gota pequeño (~ 1 µm) (Ogawa et al., 2003). Estos autores atribuyeron la capacidad de la LEC para producir emulsiones con tamaños de gota pequeños a la rápida adsorción a la interfase debido a su carácter aniónico. De manera similar, Dickinson et al. (2003) y Eliot y Dickinson (2003) estudiaron emulsiones de CasNa y observaron una distribución de tamaño de gota monomodal con diámetros inferiores a 1 µm.

Por otra parte, Rao y McClements (2011) estudiaron emulsiones de aceite de limón utilizando como surfactante Tw en diferentes concentración (7, 13 y 30 % p/p) y reportaron diámetros de gota menores a 0,2 µm a todas las concentraciones estudiadas. Otros autores estudiaron también sistemas emulsionados por diferentes surfactantes de bajo peso molecular, entre ellos Tw, observando un tamaño de gota de ~ 0,32 µm (Henry et al., 2009).

II-2.2. Caracterización de la estabilidad de emulsiones de CMP en presencia de co-emulsionantes

La estabilidad en el tiempo de las diferentes emulsiones se caracterizó mediante la determinación del diámetro de gota luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C). Las distribuciones obtenidas se muestran en la **Figura 54**. Las **Tablas 13 y 14** muestran comparativamente los diámetros promedio D_{32} y D_{43} , respectivamente, obtenidos para las emulsiones iniciales y luego del almacenamiento.

Las emulsiones de CMP/GA (**Figura 54 A**) y CMP/GEL (**Figura 54 B**) presentaron distribuciones bimodales e incluso multimodales para el caso de la emulsión con GEL y un aumento significativo de los diámetros D_{32} y D_{43} . La emulsión de CMP/GA presentó un aumento del D_{32} de más de 4 veces, mientras que el D_{43} aumentó 11 veces, indicando una desestabilización mucho mayor que la emulsión de CMP.

La emulsión de CMP/GEL presentó aún un mayor grado de desestabilización. Si bien el D_{32} aumentó también 4 veces, el D_{43} aumentó 30 veces, indicando un grado de floculación muy grande.

Por otro lado, la emulsión estabilizada por CMP/LEC (**Figura 54 C**) fue más estable al almacenamiento que la de CMP solo ya que el D_{32} no varió en 7 días (**Tabla 13**) y el D_{43} sufrió apenas un pequeño incremento (**Tabla 14**).

Por último, las emulsiones de CMP/CasNa (**Figura 54 D**) y CMP/Tw (**Figura 54 E**) presentaron distribuciones monomodales similares a las iniciales (**Figura 53 D y E**), con valores de D_{32} (**Tabla 13**) y D_{43} (**Tabla 14**) que se mantuvieron sin cambios significativos. Por lo tanto, ambos sistemas presentan una marcada mejora en la estabilidad comparada con la que presentó la emulsión de CMP solo.

Se ha demostrado que la GEL es una proteína con actividad superficial capaz de actuar como un emulsionante en sistemas O/W (Surh et al., 2006); sin embargo, en general los sistemas emulsionados con GEL presentan tamaños de gotas relativamente grandes y poseen baja estabilidad (Dickinson y Lopez, 2001). Por tal razón, algunos autores han estudiado la modificación de GEL por medio de la unión de grupos laterales no polares para aportarle un mayor carácter hidrofóbico logrando así una disminución del tamaño de gota y un aumento de la estabilidad de la emulsión (Toledano y Magdassi, 1998). También se ha reportado que tanto la combinación de GEL con tensioactivos aniónicos, como la hidrólisis de GEL (obteniendo péptidos con tamaños de 50-100 kDa) pueden mejorar su eficacia como agente emulsionante (Olijve et al., 2001).

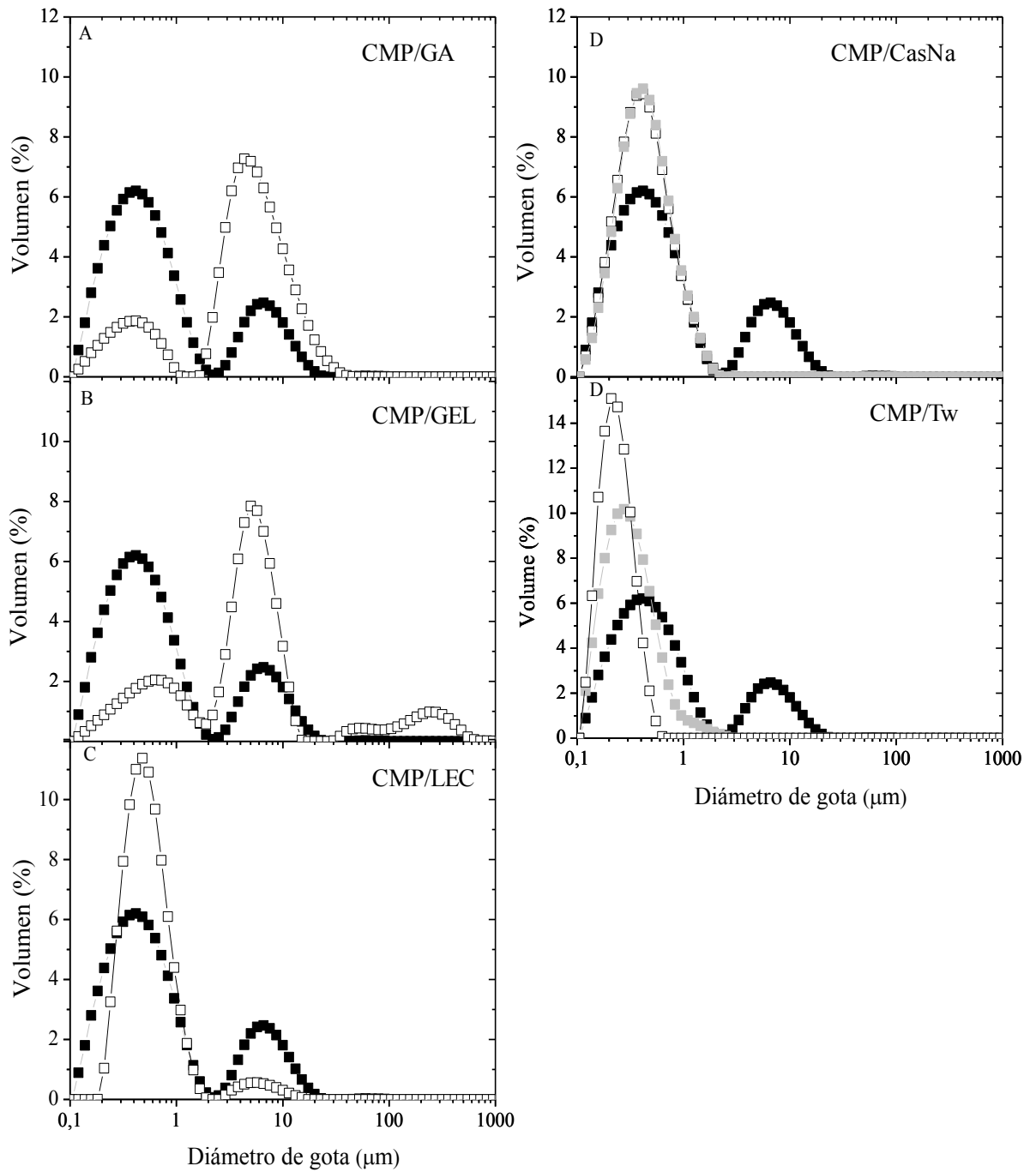


Figura 54. Distribución de tamaño de gota luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C de la emulsión de CMP 8 % p/p (■) y CMP/Co-emulsionante (□). A) CMP 8 %/GA 2 %; B) CMP 8 %/GEL 0,5 %; C) CMP 8 %/LEC 2 %; D) CMP 8 %/CasNa 2 % (■) y 4 % (□); D) CMP 8 %/Tw 2 % (■) y 4% (□). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Por otro lado, la GA es ampliamente utilizada como emulsionante en la industria de bebidas (Piorkowski y McClements, 2013). Tiene una alta solubilidad en agua y una viscosidad baja comparada con otras gomas, lo que facilita su aplicación como emulsionante. Sin embargo, tiene una baja afinidad a interfases O/W en comparación con otros biopolímeros tensioactivos, lo que significa que tiene que usarse a concentraciones relativamente altas para formar emulsiones estables (Tse y Reineccius, 1997).

Las diferencias encontradas entre las emulsiones en cuanto a su estabilidad en el tiempo guardan relación con el tamaño de gota inicial, ya que las emulsiones que presentaron menor tamaño de gota inicial (CMP/Tw, CMP/CasNa y CMP/LEC) son las que mantuvieron en mayor medida su tamaño durante el tiempo de almacenamiento. Un menor tamaño de gota inicial contribuye a una mayor estabilidad de las emulsiones en el tiempo (McClements, 2015).

Tabla 13. Diámetro promedio (D_{32}) de las emulsiones iniciales y luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C, a pH 6,5. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

	D_{32} (μm)	
	Tiempo (días)	
	0	7
CMP	0,338 \pm 0,003 ^{cdA}	0,413 \pm 0,000 ^{eB}
CMP/GA (2 %)	0,287 \pm 0,001 ^{bA}	1,200 \pm 0,003 ^{gB}
CMP/GEL (0,5 %)	0,339 \pm 0,008 ^{cdA}	1,316 \pm 0,011 ^{hB}
CMP/LEC (2 %)	0,420 \pm 0,017 ^{eA}	0,454 \pm 0,000 ^{fA}
CMP/CasNa₂ (2 %)	0,365 \pm 0,028 ^{dA}	0,345 \pm 0,001 ^{dA}
CMP/CasNa₄ (4 %)	0,333 \pm 0,011 ^{cA}	0,333 \pm 0,004 ^{cA}
CMP/Tw₂ (2 %)	0,264 \pm 0,003 ^{bA}	0,254 \pm 0,000 ^{bA}
CMP/Tw₄ (4 %)	0,210 \pm 0,001 ^{aA}	0,206 \pm 0,001 ^{aA}

Letras mayúsculas diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Tabla 14. Diámetro promedio (D_{43}) de las emulsiones iniciales y luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C, a pH 6,5. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

	D_{43} (μm)	
	Tiempo (días)	
	0	7
CMP	0,716 \pm 0,066 ^{dA}	1,947 \pm 0,035 ^{bB}
CMP/GA (2 %)	0,487 \pm 0,002 ^{cA}	5,386 \pm 0,025 ^{cB}
CMP/GEL (0,5 %)	0,891 \pm 0,075 ^{eA}	27,090 \pm 0,905 ^{dB}
CMP/LEC (2 %)	0,518 \pm 0,023 ^{cA}	0,783 \pm 0,001 ^{aB}
CMP/CasNa₂ (2 %)	0,512 \pm 0,036 ^{cA}	0,467 \pm 0,001 ^{aA}
CMP/CasNa₄ (4 %)	0,453 \pm 0,018 ^{bcA}	0,460 \pm 0,000 ^{aA}
CMP/Tw₂ (2 %)	0,369 \pm 0,003 ^{bB}	0,341 \pm 0,000 ^{aA}
CMP/Tw₄ (4 %)	0,238 \pm 0,001 ^{aA}	0,232 \pm 0,001 ^{aA}

Letras mayúsculas diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

En función de los resultados obtenidos, se decidió seleccionar la emulsión de CMP/Tw₄ para continuar el seguimiento de la estabilidad en el tiempo ya que fue la que presentó el menor tamaño de gota tanto inicial como luego de 7 días de almacenamiento. La **Figura 55** y la **Tabla 15** muestran los resultados de tamaño de gota de las emulsiones de CMP inicial, CMP/Tw₄ inicial y en el tiempo de almacenamiento hasta 20 días. Se observó que dicha emulsión se mantiene prácticamente sin cambios aún luego de 20 días de almacenamiento a 25 °C, con valores de D_{32} y D_{43} significativamente inferiores a los obtenidos para la emulsión de CMP.

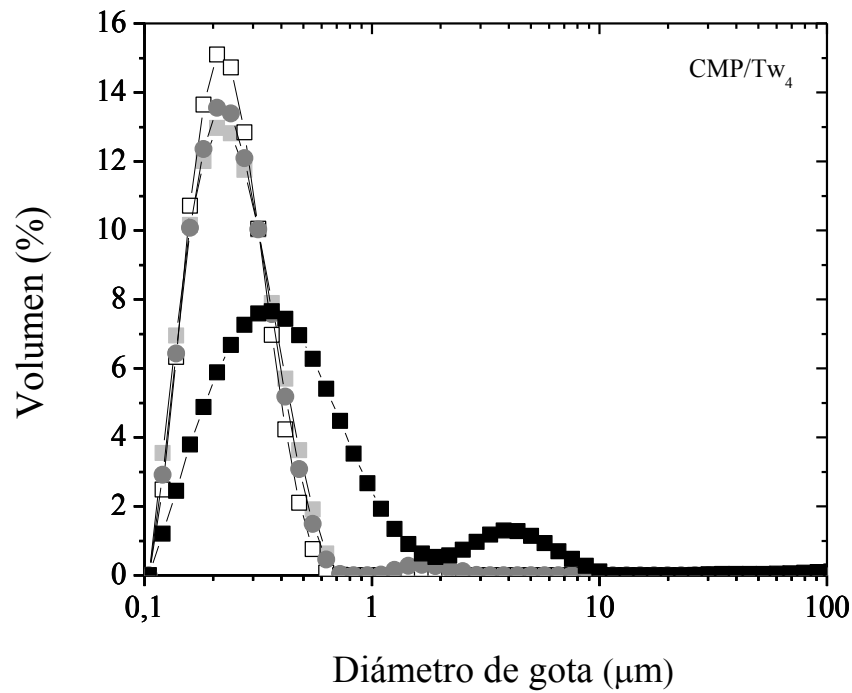


Figura 55. Distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP 8 % p/p inicial (■), CMP/Tw₄ inicial (■), CMP/Tw₄ después de 7 días (□) y 20 días de almacenamiento (●). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Tabla 15. Diámetros promedio (D₃₂ y D₄₃) obtenidos para la emulsión de CMP 8 % p/p y CMP/Tw₄ inicial y durante su almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C), pH 6,5.

Emulsión	Tiempo de almacenamiento (días)	D ₃₂ (μm)	D ₄₃ (μm)
CMP	0	0,338 ± 0,003 ^c	0,716 ± 0,066 ^b
	7	0,413 ± 0,000 ^d	1,947 ± 0,035 ^c
CMP/Tw ₄	0	0,210 ± 0,001 ^b	0,238 ± 0,001 ^a
	7	0,206 ± 0,001 ^a	0,232 ± 0,001 ^a
	20	0,211 ± 0,000 ^b	0,257 ± 0,000 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n = 2).

II-2.3. Gelificación de emulsiones mixtas por pH y reversibilidad

La gelificación de las emulsiones no pudo llevarse a cabo con las emulsiones CMP/CasNa y CMP/LEC, ya que se desestabilizaron durante la disminución del pH.

La acidificación del CasNa hacia su punto isoeléctrico ($pI \sim 4,6$) aumenta las fuerzas de atracción neta entre las moléculas, dando como resultado una auto-asociación de la proteína (Allen et al., 2006) lo que explica la desestabilización observada en dicha emulsión.

La desestabilización de emulsiones de LEC por disminución del pH fue reportada también por otros autores (Comas, Wagner y Tomás, 2006; Lin et al., 2014; Mantovani et al., 2013). Lin et al. (2014) estudiaron emulsiones de lecitina sola sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*, y observaron que en presencia de un medio gástrico con pH 1,8 la emulsión se desestabilizaba completamente, mientras que en un medio gástrico con pH 4 se mantenía estable. Dichos autores atribuyeron esta desestabilización ocurrida a valores de pH más ácidos a la falta de repulsión entre gotas debido a la cercanía con el pK_a de los grupos fosfatos presentes en la lecitina ($\sim 1,5$). Por otro lado, Mantovani et al. (2013) estudiaron emulsiones de lecitina y de su mezcla con WPI, y observaron que a pH 3, la emulsión de lecitina sola se mantenía estable, probablemente debido a que todavía mantiene suficiente carga negativa; sin embargo, en presencia de WPI se desestabilizaba y atribuyeron dicho comportamiento a la posible formación de complejos electrostáticos, ya que el WPI se encuentra cargado positivamente a dicho pH, lo que resulta en una repulsión electrostática insuficiente como para mantener las gotas de aceite separadas. En nuestro caso, tanto a pH 2 como a pH 3, el CMP presenta carga positiva por lo que podría interactuar electrostáticamente con los grupos fosfato de la lecitina, disminuyendo así la repulsión entre gotas y desestabilizando así la emulsión.

Por lo tanto, el estudio de gelificación sólo se pudo realizar sobre las emulsiones CMP/GEL, CMP/GA y CMP/Tw.

La **Tabla 16** muestra los tiempos de gelificación para las emulsiones estudiadas. Se observó que los tiempos de gelificación fueron mucho más cortos a pH 2 que a pH 3, comportamiento similar al encontrado en las emulsiones de CMP solo (**Tabla 9**). Pero en comparación con la emulsión de CMP solo, los tiempos a ambos pH fueron inferiores, lo que puede atribuirse al mayor contenido de sólidos en las emulsiones CMP/Co-emulsionante.

Tabla 16. Tiempo de gelificación (t_{gel}) de emulsiones de CMP/Co-emulsionante a pH 2 y pH 3. Temperatura: 25 °C. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

Emulsión	t_{gel} (h)	
	pH 2	pH 3
CMP/Tw₂ (2 %)	0,40	1,55
CMP/Tw₄ (4 %)	0,50	1,35
CMP/GA (2 %)	1	1,50
CMP/GEL (0,5 %)	0,55	1,50

Luego de 24 h de haber gelificado las emulsiones, se revirtió la gelificación siguiendo el procedimiento realizado para la reversión de la gelificación de las emulsiones de CMP solo (dilución 1:4 en buffer pH 6,5 y ajuste con NaOH 0,1 N). Luego de revertidas se determinó el tamaño de gota de las emulsiones y se comparó con el tamaño inicial (**Figura 56**).

Las emulsiones revertidas desde pH 2 y 3 de CMP/GEL (**Figura 56 A**) y CMP/GA (**Figura 56 B**) presentaron distribuciones con tamaño de gota mucho mayor al inicial (sin gelificar), indicando que dichas emulsiones se desestabilizan durante el proceso de gelificación/reversión mediado por pH, siendo la desestabilización mayor para el sistema CMP/GA. Dicho comportamiento se refleja también en el aumento significativo de los valores de D_{32} (**Tabla 17**) y D_{43} (**Tabla 18**) con respecto a la emulsión inicial.

En el caso de la emulsión con GEL, este resultado puede explicarse en relación a las cargas de ambas moléculas proteicas, ya que a medida que disminuye el pH se modifica la carga neta tanto de CMP (pI 3,15-4,15) como de GEL (pI 6,04). Así, por debajo de pH 6 la gelatina presenta carga positiva mientras que CMP mantiene una fuerte carga negativa permitiendo la interacción electrostática entre ambos. De hecho, se ha reportado la existencia de interacción entre CMP y GEL (con las mismas muestras de CMP y GEL que el presente trabajo), a pH 6,5 y 3,5 y el impacto de dichas interacciones sobre las propiedades gelificantes (Morales, Martínez y Pilosof, 2016) y espumantes (Martínez et al., 2013). A pH 6,5 CMP y GEL podrían interactuar mediante sitios hidrófobos y a pH 3,5 dicha unión se reforzaría mediante interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados negativamente o ácido siálico en CMP y gelatina cargada positivamente (Martínez et al., 2013). En ambos trabajos, se reportó una mejora de las propiedades funcionales a pH 3,5, ya que que la mayor interacción a este pH favoreció tanto la

formación de geles como la estabilidad de las espumas mixtas. Dicha mejora fue atribuida a que el bloqueo de los grupos hidrofóbicos de la gelatina por interacción con grupos hidrofóbicos de CMP podría aumentar la afinidad de la gelatina por el agua, promoviendo una mayor retención de agua en los geles (Morales et al., 2016) y en la lamela de las espumas, inhibiendo así el drenado y el colapso de las mismas (Martinez et al., 2013). En cambio, en el presente trabajo, estas interacciones provocarían la desestabilización de la emulsión debido a la falta de fuerzas de repulsión entre las gotas.

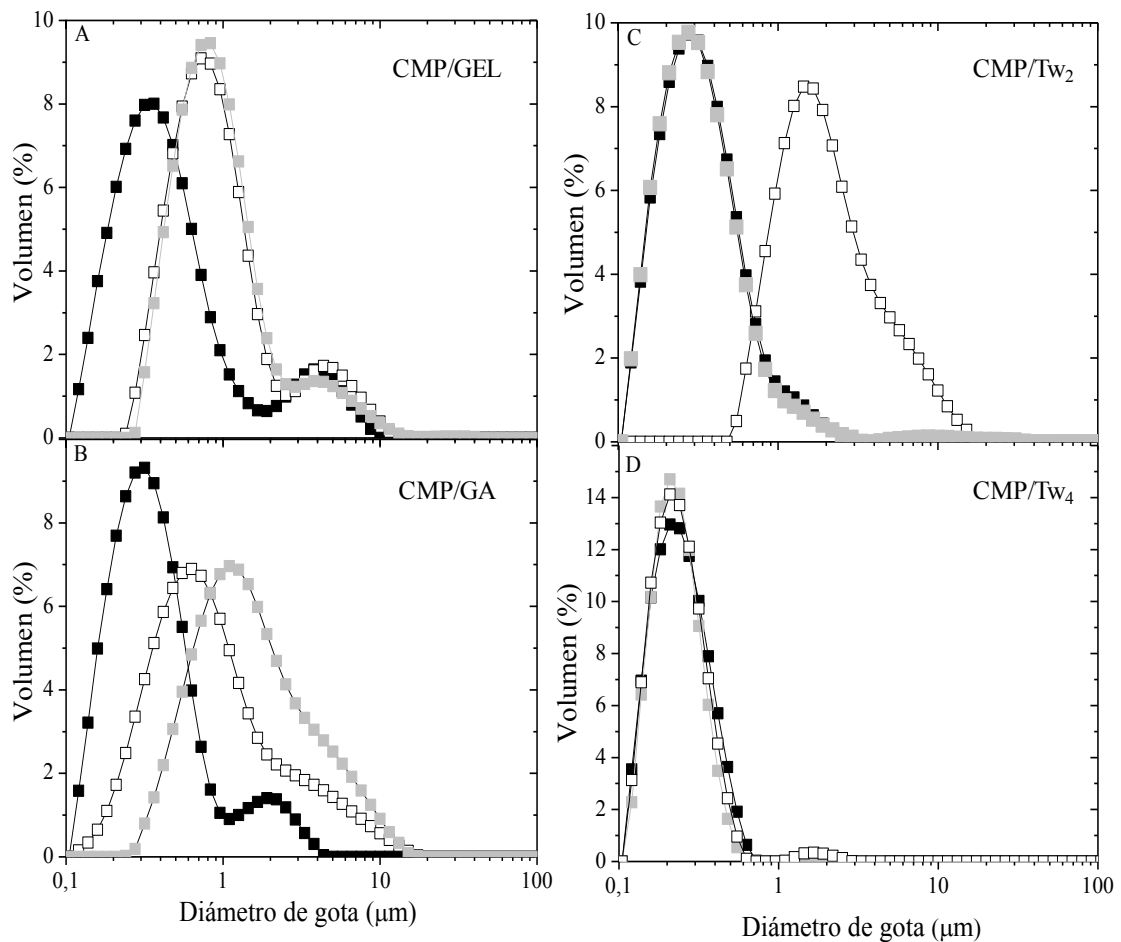


Figura 56. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de CMP/GEL (A), CMP/GA (B), CMP/Tw₂ (C) y CMP/Tw₄ (D), inicial (■), tras revertir desde pH 3 (□) y pH 2 (▒).

Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Para el caso de la emulsión con GA, Chanamai y McClements (2002) y Jayme et al. (1999) estudiaron el potencial ζ de emulsiones de G, encontrando su pI en un valor de 1,8 y demostraron que dichas emulsiones no son afectadas por el pH, en un amplio rango

de valores. Estos autores concluyeron que la estabilidad de las emulsiones de GA está dada principalmente por repulsión estérica y no tanto por repulsión electrostática como en el caso de las proteínas. De manera que, a los pH en los que se promovió la gelificación (2 y 3) la GA mantendría cierta carga negativa, mientras que el CMP, y principalmente la fracción no glicosilada, presentaría carga positiva. Esta falta de repulsión electrostática podría explicar nuevamente la desestabilización de la emulsión.

De todos modos, a pesar de que el mecanismo de interacción podría ser el mismo entre CMP y GEL o GA que el mencionado previamente entre CMP y LEC, evidentemente la interacción en este último caso sería tan rápida o tan fuerte que la emulsión se desestabilizaría antes de lograr la gelificación de la misma.

Las emulsiones de CMP/Tw se comportaron de manera diferente dependiendo de la concentración de Tw. Las emulsiones de CMP/Tw₂ (**Figura 56 C**) gelificadas a pH 2, luego de la reversión mostraron un tamaño de gota igual al original (**Tabla 17**); mientras que cuando la emulsión fue gelificada a pH 3, no se observó el mismo tamaño de gota luego de la reversión por aumento de pH, presentando una distribución desplazada hacia tamaños mayores y también valores de D₃₂ (**Tabla 17**) y D₄₃ (**Tabla 18**) superiores.

En cambio, la emulsión CMP/Tw₄ (**Figura 56 D**) mostró valores similares de D₃₂ y D₄₃ luego de la reversión de la gelificación excepto el D₄₃ de la emulsión revertida desde pH 3 que fue levemente superior (**Tabla 17** y **Tabla 18**), evidenciando una mayor estabilidad de esta emulsión a los cambios de pH.

Tabla 17. Diámetro promedio (D₃₂) obtenido para las emulsiones iniciales y luego de la reversión desde pH 2 y 3 hasta pH 6,5. Temperatura: 25 °C. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

	D ₃₂ (µm)		
	Inicial	Revertida desde pH 2	Revertida desde pH 3
CMP	0,338 ± 0,003 ^a	1,309 ± 0,003 ^c	1,211 ± 0,001 ^b
CMP/GEL (0,5 %)	0,339 ± 0,008 ^a	0,747 ± 0,001 ^c	0,713 ± 0,004 ^b
CMP/GA (2 %)	0,286 ± 0,001 ^a	1,058 ± 0,000 ^c	0,570 ± 0,002 ^b
CMP/Tw₂ (2 %)	0,264 ± 0,003 ^a	0,268 ± 0,000 ^a	1,552 ± 0,003 ^b
CMP/Tw₄ (2 %)	0,210 ± 0,001 ^{ab}	0,213 ± 0,001 ^b	0,207 ± 0,001 ^a

Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas

(P < 0,05, n = 2).

Tabla 18. Diámetro promedio (D_{43}) obtenido para las emulsiones iniciales y luego de la reversión desde pH 2 y 3 hasta pH 6,5. Temperatura: 25 °C. Concentración de CMP: 8 % p/p, la concentración de co-emulsionante se indica en cada caso.

D_{43} (μm)			
	Inicial	Revertida desde pH 2	Revertida desde pH 3
CMP	0,716 \pm 0,066 ^a	1,779 \pm 0,006 ^b	1,854 \pm 0,004 ^b
CMP/GEL (0,5 %)	0,891 \pm 0,075 ^a	1,303 \pm 0,032 ^b	1,316 \pm 0,001 ^b
CMP/GA (2 %)	0,487 \pm 0,002 ^a	2,034 \pm 0,012 ^c	1,377 \pm 0,015 ^b
CMP/Tw₂ (2 %)	0,369 \pm 0,003 ^a	0,436 \pm 0,083 ^a	2,527 \pm 0,010 ^b
CMP/Tw₄ (2 %)	0,241 \pm 0,000 ^a	0,251 \pm 0,000 ^a	0,368 \pm 0,011 ^b

Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas

($P < 0,05$, $n = 2$).

II-2.4. Comportamiento interfacial del CMP y sus mezclas con diferentes co-emulsionantes

Como se ha dicho anteriormente, durante la formación de una emulsión, el emulsionante se adsorbe en la interfase O/W, produciendo la disminución de la tensión interfacial y la formación de una película que estabiliza las gotas de aceite. En el caso de tener una mezcla de emulsionantes (CMP + co-emulsionante) la pregunta que surge es si ambos se adsorben en la interfase o si alguno de ellos predomina sobre el otro.

Si existe suficiente espacio, es decir, a concentraciones inferiores a la saturación de monocapa de cada componente, ambos componentes se adsorberán cooperativamente en la interfase. Si la concentración de ambos componentes permite la saturación de la interfase (esta es la situación en este trabajo por las concentraciones altas de emulsionantes), habrá una competencia por la interfase (adsorción competitiva), y la composición final de la interfase y sus propiedades reológicas dependerán de la actividad superficial, la velocidad de adsorción y la capacidad de formación de la película interfacial de la proteína y del co-emulsionante (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

Por lo tanto, se estudió la adsorción competitiva a la interfase O/W del CMP y cada uno de los co-emulsionantes, con el fin de explicar el comportamiento observado en las emulsiones mixtas.

Los sistemas mixtos evaluados se prepararon de manera que, en la solución, se mantuvieran las relaciones empleadas en los sistemas emulsionados, para relacionarlos

con los resultados discutidos en el apartado anterior, pero a una concentración 4 veces menor a la empleada en el estudio de emulsiones debido a limitaciones del equipo (CMP 2 %, Tw 1 %, CasNa 1 %, GEL 0,125 %, LEC 0,5 % y GA 0,5 % p/p).

II-2.4.1. Adsorción competitiva entre las moléculas de emulsionantes

La evolución de la presión superficial (π) con el tiempo de adsorción fue evaluada tanto para los sistemas mixtos CMP/co-emulsionante como para cada co-emulsionante individualmente. La **Figura 57** muestra los resultados obtenidos para los sistemas CMP/GEL, CMP/GA y CMP/LEC y la **Figura 58** los obtenidos para CMP/CasNa y CMP/Tw, evaluados a pH 6,5 y temperatura ambiente (25 °C). Como fue mencionado anteriormente, el incremento de la presión superficial con el tiempo está relacionado con la adsorción de proteínas/surfactantes en la interfase aceite-agua (Graham y Phillips, 1979).

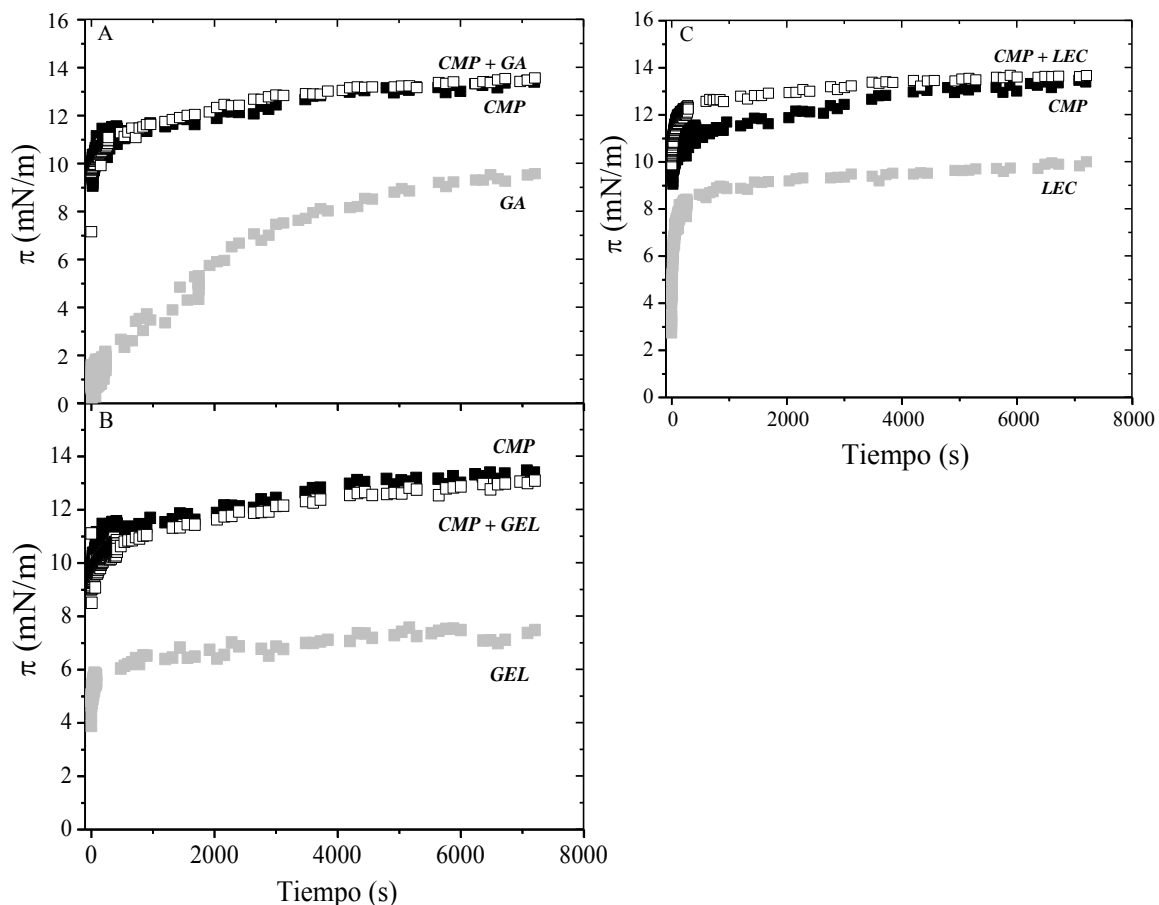


Figura 57. Evolución de la presión interfacial (π) con el tiempo de adsorción a pH 6,5 de soluciones de CMP (■), Co-emulsionante (■) y sistemas mixtos (□). Co-emulsionante: GA (A), GEL (B), LEC (C). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Los sistemas mixtos CMP/GA (**Figura 57 A**), CMP/GEL (**Figura 57 B**) y CMP/LEC (**Figura 57 C**) se comportaron de forma similar al CMP, alcanzando valores de π finales de ~ 13 mN/m, mientras que los co-emulsionantes solos presentaron una cinética de adsorción más lenta que el CMP solo con valores finales de π menores (entre 7 y 10 mN/m), lo que en principio indicaría que la actividad interfacial en estos sistemas mixtos estaría dominada por el CMP.

Por otro lado, los co-emulsionantes Tw (**Figura 58 A**) y CasNa (**Figura 58 B**) presentaron una cinética de adsorción más rápida que el CMP, alcanzando valores de π final superiores al alcanzado por CMP (~ 16 y 20 mN/m para CasNa y Tw, respectivamente).

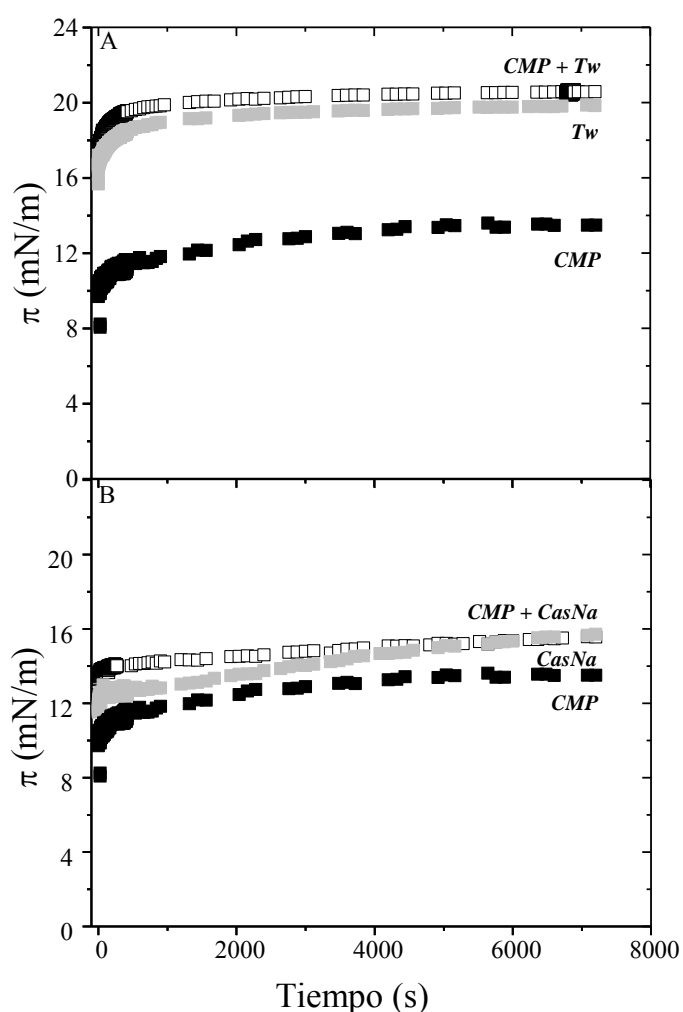


Figura 58. Evolución de la presión interfacial (π) con el tiempo de adsorción a pH 6,5 de soluciones de CMP (■), co-emulsionante (■) y sistemas mixtos (□). Co-emulsionante: Tw (A), CasNa (B). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Los sistemas mixtos CMP/Tw y CMP/CasNa presentaron una cinética de adsorción similar al co-emulsionante solo, indicando que en estos sistemas es el co-emulsionante quien dominaría el comportamiento interfacial de las emulsiones mixtas.

Cuando se evaluó el comportamiento reológico de la película interfacial se pudo observar que el módulo E correspondiente a las películas interfaciales formadas por los sistemas mixtos CMP/GA (**Figura 59 A**), CMP/GEL (**Figura 59 B**) y CMP/LEC (**Figura 59 C**) presentó inicialmente una tendencia similar a la película de CMP solo, aún cuando en algún caso, como la GA, el co-emulsionante solo presentó un módulo E tres veces mayor que el CMP.

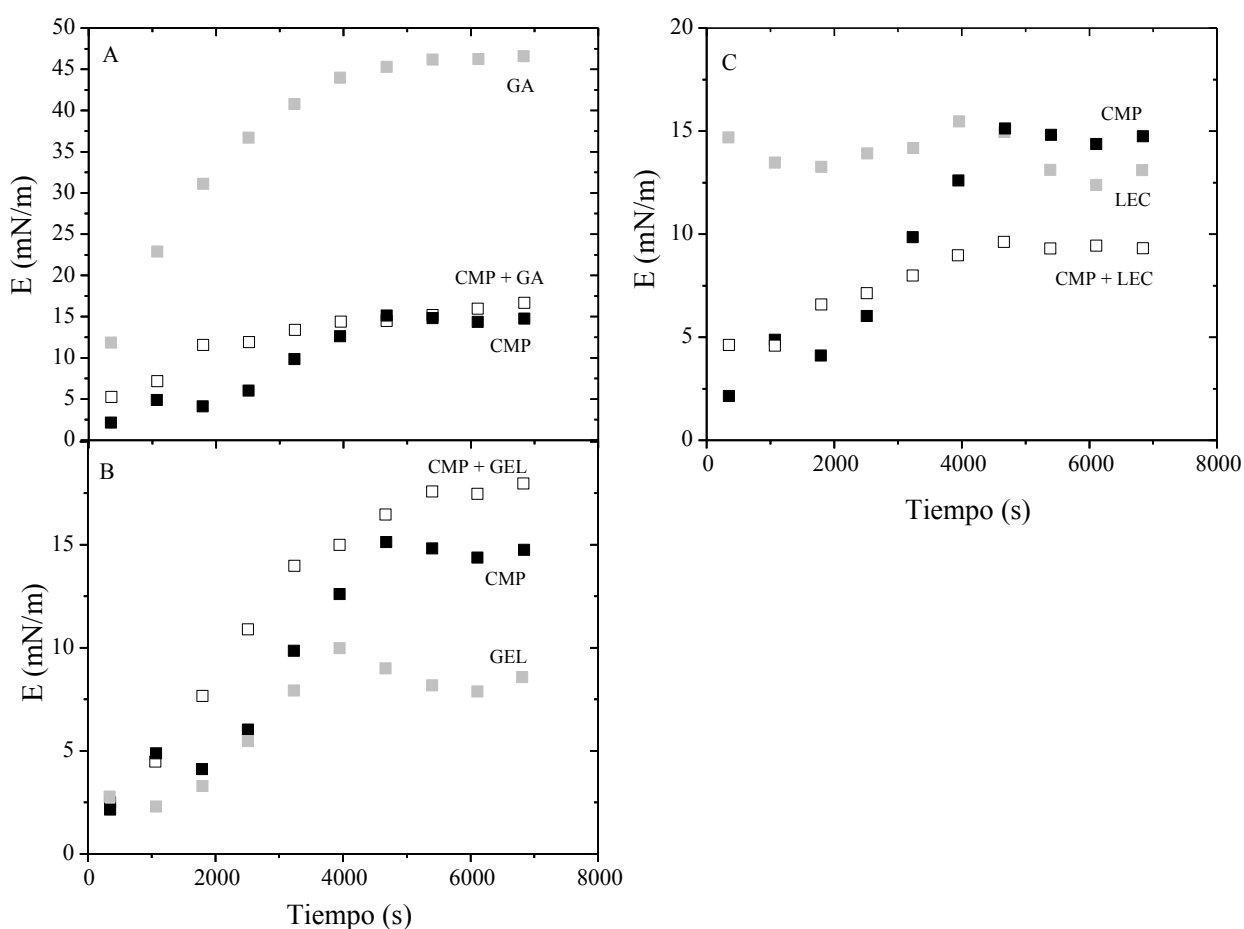


Figura 59. Evolución del módulo dilatacional superficial (E) con el tiempo de adsorción de soluciones de CMP (■), co-emulsionante (■) y sistemas mixtos (□). Co-emulsionante: GA (A), GEL (B) y LEC (C). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

El sistema CMP/LEC (**Figura 59 C**) alcanzó un valor de E final inferior al obtenido para los sistemas individuales (CMP y co-emulsionante) indicando un efecto antagónico,

mientras que el sistema CMP/GEL, aunque siguió una tendencia similar al CMP, mostró un valor de E levemente superior.

En cambio, los sistemas CMP/Tw (**Figura 60 A**) y CMP/CasNa (**Figura 60 B**) mostraron una respuesta del módulo E igual a la de los co-emulsionantes ($E \sim 5-7,5$ mN/m) y menor a la del CMP.

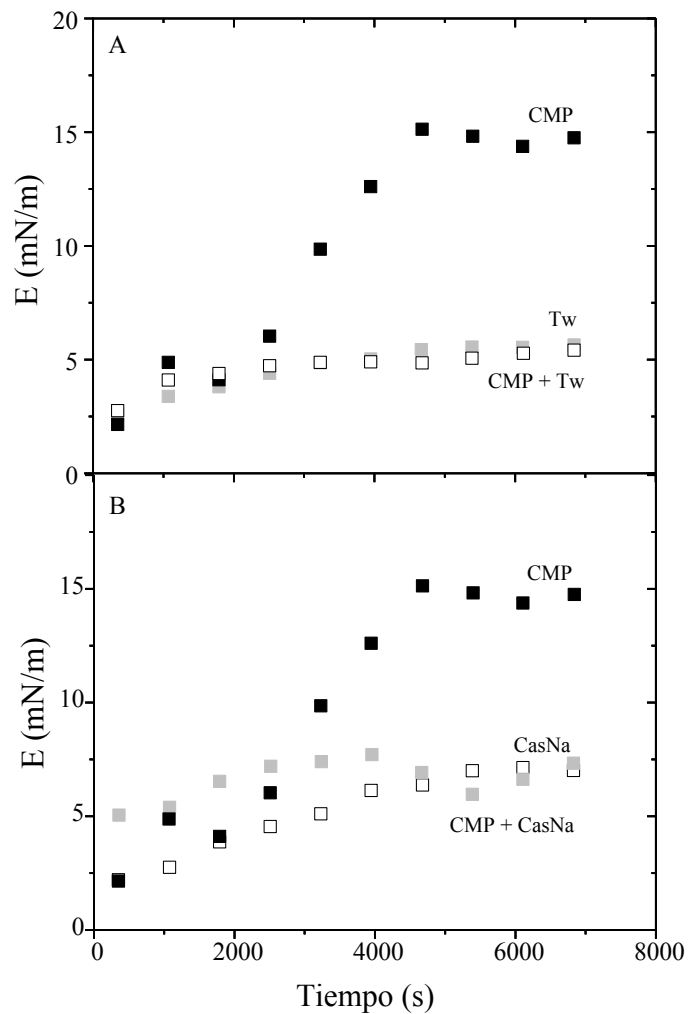


Figura 60. Evolución del módulo dilatacional superficial (E) con el tiempo de adsorción de soluciones de CMP (■), co-emulsionante (■) y sistemas mixtos (□). Co-emulsionante: Tw (A), CasNa (B). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Durante la adsorción competitiva entre el CMP y los co-emulsionantes a altas concentraciones se concluye que la presión interfacial es controlada por el componente que se adsorbe más rápidamente y es más activo interfacialmente. Sin embargo, la elasticidad de las películas muestra un comportamiento más complejo, que revela en

forma clara en algunos casos (GEL y LEC) que el co-emulsionante está presente en la película interfacial, al menos a tiempos de adsorción altos. Es decir, inicialmente predomina el componente que se adsorbe más rápido y controla la presión interfacial (CMP), pero luego se adsorbe el co-emulsionante.

En las mezclas de CMP y Tw o CasNa, si bien la elasticidad de las películas coincide con la del componente con mayor actividad interfacial (Tw o CasNa) no se puede descartar la presencia del CMP en las películas. Se ha visto en otros trabajos, que la gelificación interfacial de las proteínas, la cual origina los altos valores del módulo dilatacional, puede verse impedida por la presencia de otro emulsionante por su interferencia en la asociación proteica (Wilde et al., 2004). Por otra parte, la adsorción competitiva puede verse afectada por interacciones específicas entre los componentes en la interfase que puede afectar la reología de la película (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

Por otro lado, podrían existir interacciones entre el CMP y los co-emulsionantes en la fase acuosa que modifiquen el carácter inicial de las especies que se adsorberán en la interfase. De hecho, en la Sección I se demostró que el CMP y el CasNa interactúan en la fase acuosa de tal manera que el CMP se asociaría al CasNa reduciendo su estado de agregación. También se demostró que el CMP interactúa en la fase acuosa con la gelatina, a pH 6,5 mediante sitios hidrófobos y a pH 3,5 dicha unión se reforzaría mediante interacciones electrostáticas entre aminoácidos cargados negativamente o ácido siálico en CMP y gelatina cargada positivamente (Martinez et al., 2013). Se sabe también que los tensioactivos no iónicos interactúan débilmente con proteínas principalmente mediante sitios de unión hidrofóbicos específicos en los que pueda tener lugar la unión cooperativa de la proteína. Rodríguez Niño y Rodríguez Patino (1998), han reportado la formación de un complejo BSA-Tween formado en la fase acuosa el cual puede adsorberse en una conformación diferente a la proteína pura, dando como resultado un efecto positivo o negativo sobre la adsorción interfacial.

Se evaluó, por lo tanto, si el CMP presentaba una interacción con el Tw en la fase acuosa, especialmente por ser esta mezcla la que presentó la mejor estabilidad de emulsión. La **Figura 61** muestra la distribución de tamaño de partícula por volumen del sistema CMP/Tw con el fin de analizar las poblaciones predominantes en cada una de las muestras. Se observó que el CMP presenta una población predominante con un pico en 2,3 nm, como ha sido mencionado en capítulos anteriores, mientras que el Tw presentó un pico predominante en tamaños de 8,4 nm. El Tw es un tensioactivo que en solución acuosa forma estructuras agregadas de tipo micelar de tamaño bastante pequeño,

Bhattacharjee et al. (2010) estudiaron soluciones de Tween 80 0,1 M por DLS reportando un radio hidrodinámico de 6,1 nm. Por otro lado, Lafitte et al. (2007) mediante técnicas de resonancia magnética nuclear reportaron un radio hidrodinámico de 5,7 nm para una solución de Tween 80 al 5 %. Ambos reportes dan valores de tamaño similares al encontrado en este trabajo.

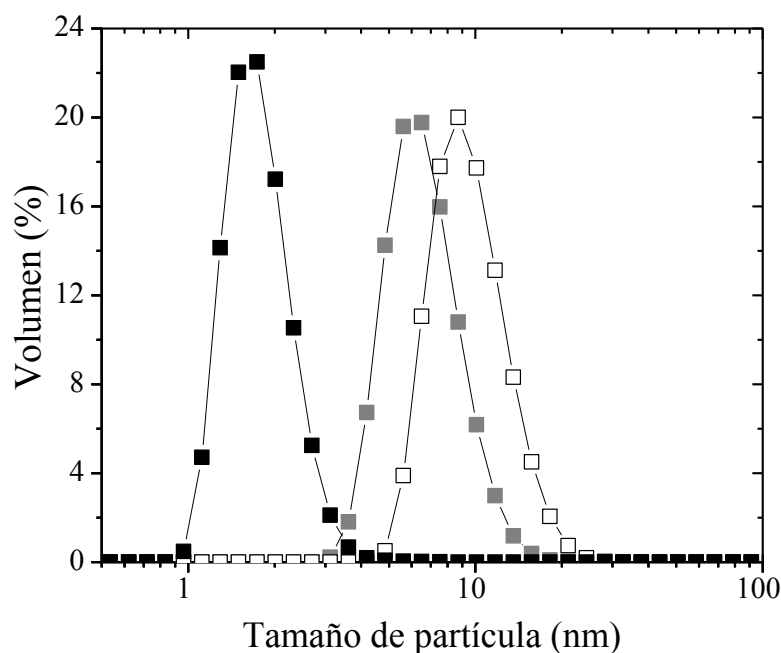


Figura 61. Distribución de tamaño de partícula por volumen de soluciones de CMP 2 % p/p (■), Tw 1 % p/p (■) y CMP 2 %/Tw 1 % p/p (□). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Cuando se analizó el tamaño de partícula de la mezcla CMP/Tw se observó que los picos correspondientes al CMP o Tw desaparecieron, encontrándose sólo una población predominante con un pico a 10 nm, superior a los observados para las muestras individuales. Estos resultados ponen en evidencia la existencia de una interacción entre el CMP y el Tw, la cual da lugar a la formación de partículas de mayor tamaño, que corresponderían a estructuras micelares mixtas de Tw y CMP.

De manera adicional, a fin de verificar si el CMP y el Tw pueden coexistir en la interfase se realizó un ensayo de adsorción secuencial a partir de la adsorción inicial de CMP y la inyección posterior de Tw. Este ensayo permite además evaluar la resistencia que presenta la película de CMP al desplazamiento interfacial por el Tw. Estos resultados se compararon con los obtenidos para los sistemas individuales de CMP y Tw.

La **Figura 62** muestra los resultados obtenidos en este ensayo. En primer lugar se forma la interfase de CMP y a un tiempo de adsorción suficientemente largo como para que la película de CMP alcance un valor de pseudo-equilibrio de $\pi \sim 13$ mN/m (**Figura 48**), indicando la saturación de la interfase, se inyectó en la subfase el Tw.

Tras la inyección de la solución de Tw a los 8000 s, se produjo un leve aumento de π (~ 16 mN/m), lo que podría indicar que las moléculas de Tw penetraron en la película interfacial formada por el CMP. Luego de ese ligero aumento, la presión se mantuvo en valores intermedios a los presentados por los componentes individuales, sugiriendo que las moléculas de CMP no serían desplazadas totalmente de la interfase.

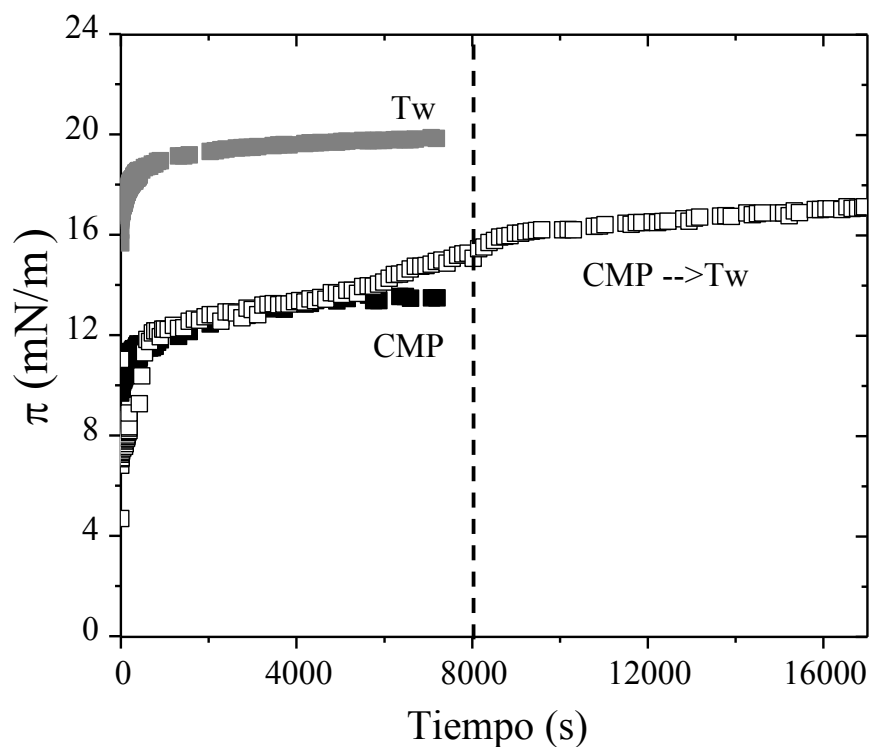


Figura 62. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo durante un ensayo de adición secuencial de una solución de Tween 80 (1 %) (8000-17500 s) sobre una película de CMP (2 %)

Se muestra como referencia el resultado del CMP (2 % p/p) (■) y Tw 80 (1 % p/p) (■).

Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Cuando se analizó el comportamiento reológico de la película formada (**Figura 63**) se observó que luego de la inyección de Tw la elasticidad de la película disminuyó abruptamente, llegando a un valor intermedio entre el CMP y Tw. Esto también indicaría que ambas moléculas se encuentran en la interfase y que el CMP no es desplazado por el Tw, al menos totalmente.

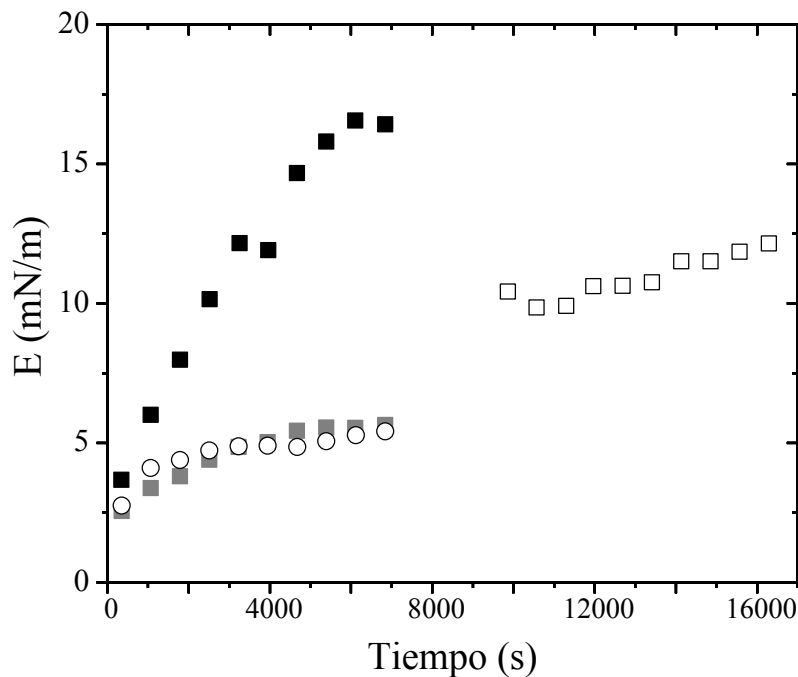


Figura 63. Evolución del módulo dilatacional superficial (E) con el tiempo de adsorción durante un ensayo de adición secuencial de una solución de Tween 80 (1 %) (8000-17500 s) sobre una película de CMP (2 %). Se muestra como referencia el resultado del CMP (2 % p/p) (■), Tw 80 (1 % p/p) (■) y CMP/Tw (○). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5

El mecanismo orogénico fue propuesto originalmente por Mackie et al. (1999) y ha sido utilizado para explicar el impacto que tienen los surfactantes convencionales (como los polisorbatos) sobre películas interfaciales formadas por proteínas (β -lg, β -caseína y α -lactoalbúmina) (Mackie et al., 2001; Woodward et al., 2009). Según este mecanismo, las proteínas podrían ser desplazadas de la interfase por un surfactante de bajo peso molecular (por ejemplo, polisorbato o un fosfolípido) en un proceso complejo que puede resumirse en tres etapas:

Etapa 1: conocida como fase de compresión, en la que el surfactante de bajo peso molecular ocuparía los pequeños huecos existentes en un film interfacial formado por la macromolécula. Este fenómeno da lugar a la cobertura adicional de la región interfacial (que no puede cubrir la proteína) que como consecuencia daría lugar a aumentos de la presión interfacial, como se ha podido observar también en este trabajo (**Figura 62**).

Etapa 2: Los dominios ocupados por los surfactantes de bajo peso molecular continúan aumentando a medida que la proteína es obligada a moverse y comprimirse en la interfase. A esta etapa se la conoce como fase de colapso.

Etapa 3: Cuando la presión interfacial es lo suficientemente alta, el film proteico se podría romper y la proteína podría ser desplazada de la interfase, ya sea en forma total o parcial, formando pequeños agregados en el medio, quedando el sistema dominado por el surfactante de bajo peso molecular.

Nuestros resultados indican que el CMP no es desplazado (o por lo menos no totalmente) de la interfase sino más bien sugieren que el Tw que penetra en la interfase, interfiere en la estructuración de la película de CMP, no permitiéndole que genere un comportamiento elástico.

Como se mencionó a lo largo de los capítulos anteriores, el CMP tiene buenas propiedades interfaciales, pero forma films interfaciales muy débiles, lo que conduce a la formación de sistemas coloidales inestables. Esto podría explicar que, tanto el sistema de CMP solo como aquellos donde el comportamiento interfacial está dominado por el CMP, produzcan emulsiones inestables.

II-2.5. Rol del CMP y el Tw en la estabilidad de las emulsiones mixtas

Teniendo en cuenta que los resultados presentados hasta aquí indican que el comportamiento interfacial del sistema CMP/Tw₄ estaría dominado por el Tw, surge la necesidad de determinar cuál es el rol de cada uno de ellos en la estabilización de la interfase y la emulsión mixta. Para ello se realizaron algunos estudios adicionales. En primer lugar, se estudió si una emulsión de Tw solo era estable a los cambios de pH realizados durante la gelificación de las emulsiones. Se determinó para ello el tamaño de gota de una emulsión de Tw₄ solo a pH 6,5 y se lo comparó con los resultados obtenidos anteriormente para las emulsiones de CMP solo y CMP/Tw₄ (**Figura 64** y **Tabla 19**).

La distribución de tamaño de gota de la emulsión de Tw solo presentó una distribución monomodal similar a la de la emulsión mixta CMP/Tw₄ pero desplazada levemente hacia la derecha. Las tres emulsiones presentaron valores de D₃₂ significativamente diferentes, siendo menor el tamaño de gota de la emulsión CMP/Tw₄. Por otro lado, los valores de D₄₃ de las emulsiones CMP/Tw₄ y Tw₄ solo fueron similares entre sí y significativamente menores al de la emulsión de CMP solo.

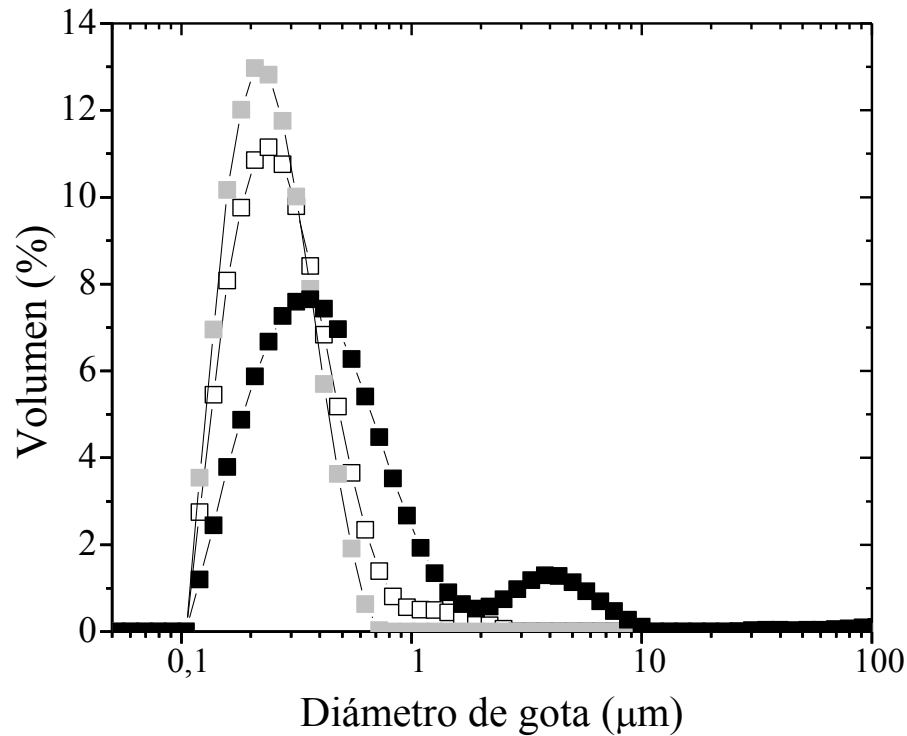


Figura 64. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones iniciales de CMP 8 % p/p (■), Tw 4 % p/p (□) y CMP 8 %/Tw 4 % p/p (◻). Temperatura: 25 °C, pH 6,5.

Tabla 19. Diámetros promedio (D_{32} y D_{43}) obtenidos para las emulsiones iniciales de CMP (8 % p/p), CMP/Tw₄ (8 %/4 % p/p) y Tw₄ (4 % p/p) a pH 6,5. Temperatura: 25 °C.

		D_{32} (µm)	D_{43} (µm)
CMP	Inicial	$0,338 \pm 0,003^c$	$0,716 \pm 0,066^b$
CMP/Tw	Inicial	$0,210 \pm 0,001^a$	$0,238 \pm 0,001^a$
Tw	Inicial	$0,233 \pm 0,000^b$	$0,304 \pm 0,000^a$

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

($P < 0,05$, $n = 2$).

Posteriormente, se determinó el tamaño de gota de las emulsiones de Tw₄ luego de la disminución a pH a 2 y 3 y de retornar el pH a 6,5. A pesar de que la emulsión de Tw₄ solo no gelifica por disminución de pH se siguió este procedimiento para evaluar si dicha emulsión era afectada por los cambios de pH. La **Figura 65** muestra la distribución de tamaño de gota de la emulsión de Tw a pH 6,5 inicial y luego de aumentar el pH desde 2 y 3.

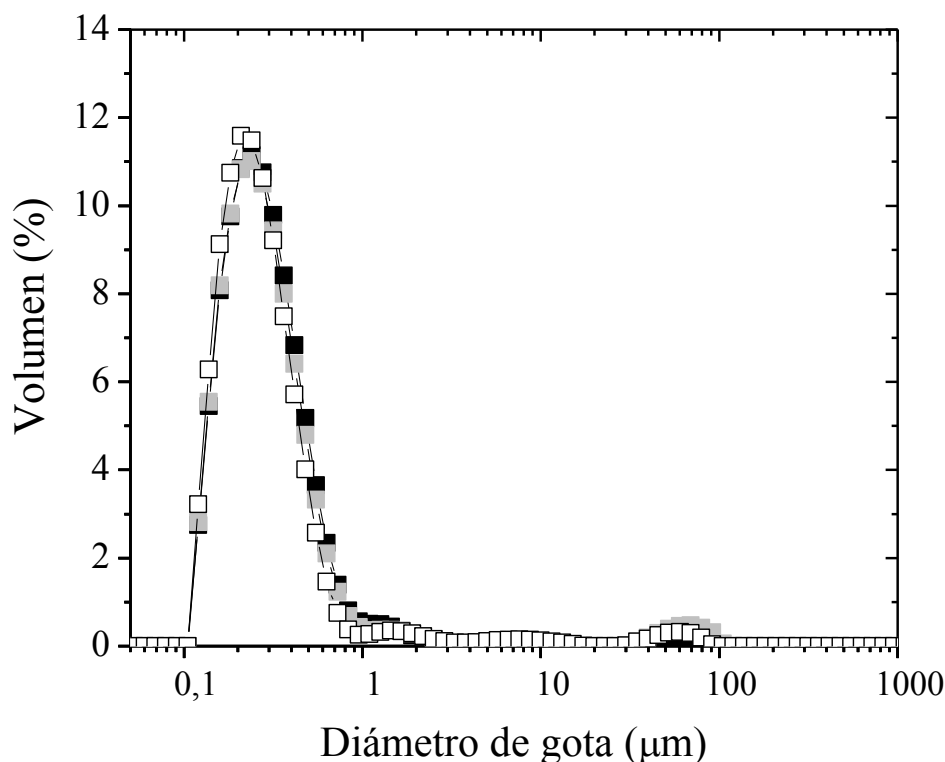


Figura 65. Distribución de tamaño de gota de la emulsión inicial de Tw 4 % (■) y revertida desde pH 2 (■) y desde pH 3 (□). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Las **Tabla 20** y **21** muestran los valores de D_{32} y D_{43} de dichas emulsiones comparadas con los de la emulsión mixta CMP/Tw y CMP. Luego de la modificación del pH, la emulsión de Tw presentó una distribución con un pico principal similar a la emulsión original a pH 6,5 pero además mostró pequeños picos a tamaños más grandes, lo que se ve reflejado en un aumento significativo del valor de D_{43} (**Tabla 21**).

Tabla 20. Diámetros promedio (D_{32}) obtenidos para la emulsión de CMP (8 % p/p), CMP/Tw₄ (8 %/4 % p/p) y Tw₄ (4 % p/p) inicial y luego del aumento de pH desde pH 2 y 3 hasta pH 6,5.

Temperatura: 25 °C.

D_{32} (µm)			
	Inicial	pH 2	pH 3
Tw	0,233 ± 0,000 ^{Bb}	0,235 ± 0,001 ^{Bb}	0,229 ± 0,001 ^{Ab}
CMP/Tw₄	0,210 ± 0,001 ^{ABa}	0,213 ± 0,001 ^{Ba}	0,207 ± 0,001 ^{Aa}
CMP	0,338 ± 0,003 ^{Ac}	1,309 ± 0,003 ^{Cc}	1,211 ± 0,001 ^{Bc}

Letras mayúsculas diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Tabla 21. Diámetro promedio (D_{43}) obtenidos para la emulsión de CMP (8 % p/p), CMP/Tw₄ (8 %/4 % p/p) y Tw₄ (4 % p/p) inicial y luego del aumento de pH desde pH 2 y 3 hasta pH 6,5.

Temperatura: 25°C.

	D_{43} (μm)		
	Inicial	pH 2	pH 3
Tw	0,304 \pm 0,000 ^{Aa}	1,880 \pm 0,093 ^{Bb}	1,485 \pm 0,287 ^{Bb}
CMP/Tw₄	0,241 \pm 0,000 ^{Aa}	0,251 \pm 0,000 ^{Aa}	0,368 \pm 0,011 ^{Ba}
CMP	0,716 \pm 0,066 ^{Ab}	1,779 \pm 0,006 ^{Bb}	1,854 \pm 0,004 ^{Bb}

Letras mayúsculas diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Esto evidencia una marcada tendencia a la floculación (aumento del valor de D_{43}) a diferencia de la emulsión mixta CMP/Tw₄. Se esperaría que la emulsión con Tw solo no se vea afectado por el pH ya que es un compuesto no iónico, pero existe evidencia que las soluciones de Tw presentan impurezas que podrían impartir carga a esta molécula. Algunos autores han reportado que las emulsiones estabilizadas por surfactantes no iónicos, como el Tw u otros, tienen una carga negativa a pH neutro, debido a la adsorción de OH⁻ del agua o impurezas catiónicas del aceite (como por ejemplo ácidos grasos libres) a la interfase O/W (Hsu y Nacu, 2003; Mun, Decker y McClements, 2007).

Además, los valores de D_{32} y D_{43} tanto de la emulsión inicial de Tw como de las revertidas desde pH 2 y 3 fueron significativamente mayores que los de la emulsión CMP/Tw₄.

Estos resultados sugieren que, a pesar de que durante la adsorción competitiva el sistema mixto CMP/Tw parece estar dominado por el Tw (**Figura 58 A** y **Figura 60 A**), el CMP cumple cierto rol en la estabilización de las emulsiones mixtas CMP/Tw, impidiendo su floculación.

También se evaluó el comportamiento de una emulsión obtenida de manera secuencial (asemejando el ensayo de adsorción interfacial secuencial) a fin de estudiar su comportamiento frente a cambios de pH.

Para ello, se preparon emulsiones de forma secuencial de manera de simular condiciones similares a las del estudio interfacial. Inicialmente se procedió a emulsionar una solución de CMP 8 % p/p con aceite de girasol comercial en una relación 10:90 por Ultraturax y USAI en las condiciones descriptas en la sección de materiales y métodos durante un tiempo de 5 minutos. Luego de ese tiempo se agregó a la emulsión la cantidad necesaria

de Tween 80 para obtener una concentración en el sistema de 4 % p/p, se homogeneizó por 1 minuto en vórtex, y se procedió a ultrasonicar por 5 minutos más.

La emulsión obtenida fue caracterizada mediante la determinación del tamaño de gota y comparada con la emulsión de CMP/Tw obtenida mediante el procedimiento habitual (**Figura 66**).

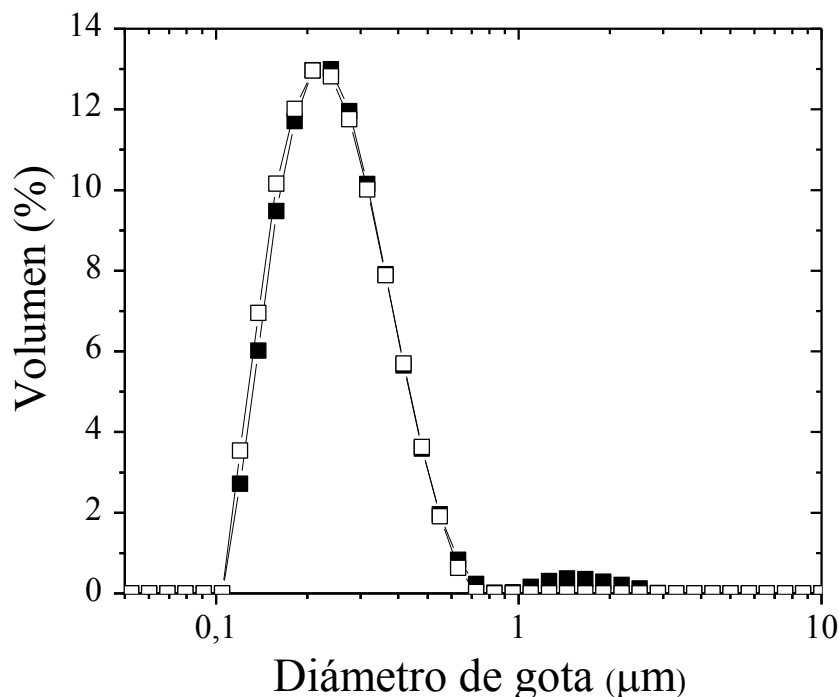


Figura 66. Distribución de tamaño de gota de la emulsión inicial de CMP/Tw₄ obtenida de forma no secuencial (□) y de forma secuencial (■). Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

Los diámetros promedio D_{32} y D_{43} de las emulsiones de la **Figura 66** se muestran en la **Tabla 22**. En la emulsión secuencial inicial se observó la aparición de pequeños picos en tamaños más grandes, comparadas con las obtenidas mediante el procedimiento no secuencial, lo que se refleja en valores de D_{32} y D_{43} mayores.

Tabla 22. Diámetros promedios (D_{32} y D_{43}) para las emulsiones iniciales de CMP/Tw₄ obtenidas de forma secuencial y no secuencial. Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

	D_{32} (µm)	D_{43} (µm)
Secuencial	$0,218 \pm 0,001^b$	$0,275 \pm 0,005^b$
No secuencial	$0,210 \pm 0,001^a$	$0,241 \pm 0,000^a$

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$, $n = 2$).

Posteriormente, se sometió a la emulsión secuencial al proceso de gelificación por acidificación hasta pH 3 y luego de 24 h se revirtió la gelificación de la misma manera que en el apartado II-2.3. En la **Figura 67** se muestran las distribuciones de tamaño de gota luego de la reversión de la gelificación de la emulsión secuencial y también a modo comparativo de la de la emulsión obtenida mediante el procedimiento habitual.

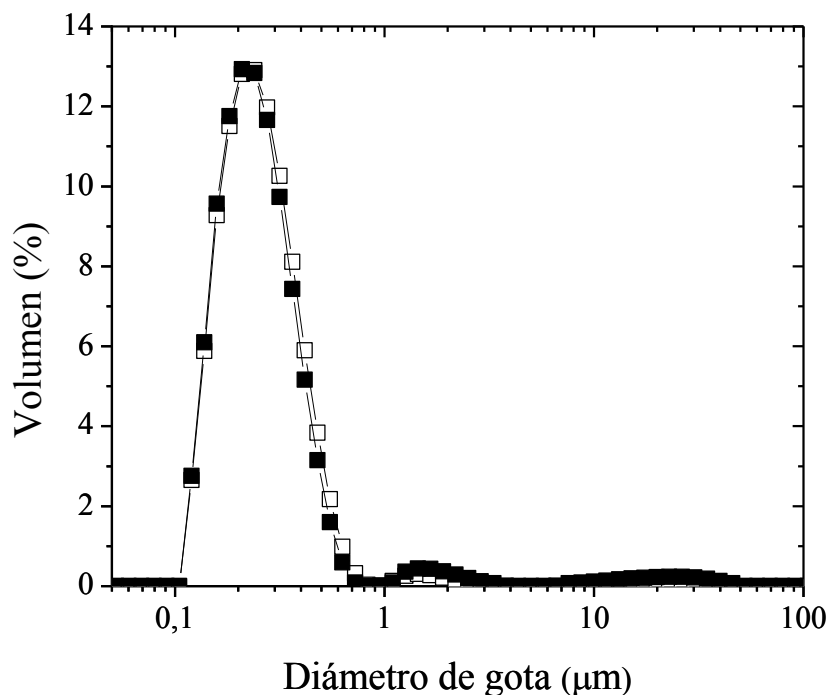


Figura 67. Distribución de tamaño de gota de la emulsión de CMP/Tw₄ obtenida de forma no secuencial (□) y de forma secuencial (■), luego de revertir la gelificación desde pH 3.

Temperatura: 25 °C, pH: 6,5.

La emulsión obtenida de manera secuencial presentó poblaciones con tamaño de partícula mayor que los observados luego de la reversión de la emulsión no secuencial. Este hecho se refleja en los altos valores de D₃₂ y D₄₃ (**Tabla 23**), lo que indica una menor estabilidad de la emulsión secuencial a la reversión por pH, en comparación con la emulsión preparada mediante el procedimiento habitual.

Tabla 23. Diámetros promedio (D₃₂ y D₄₃) obtenido para las emulsiones de CMP/Tw₄ obtenidas de forma secuencial y no secuencial, revertidas desde pH 3. Temperatura: de 25 °C, pH: 6,5.

	D ₃₂ (µm)	D ₄₃ (µm)
Secuencial	0,219 ± 0,001 ^b	0,741 ± 0,001 ^b
No secuencial	0,207 ± 0,001 ^a	0,368 ± 0,011 ^a

Letras minúsculas diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05, n = 2).

Esto indicaría que la co-adsorción de ambos emulsionantes sería mas efectiva a la hora de formar películas/emulsiones estables a los cambios de pH (gelificación) que una adsorción secuencial donde posiblemente no se establecerían las mismas interacciones entre los emulsionantes.

Los resultados presentados en este capítulo, muestran que la presencia de Tw en los sistemas emulsionados de CMP mejora notablemente tanto su estabilidad en el tiempo como su estabilidad frente a diferentes condiciones de pH. Este comportamiento debería atribuirse a la interacción entre el CMP y el Tw tanto en solución como en la interfase. Los surfactantes adsorbidos, así como las partículas sólidas, estabilizan las emulsiones a través de dos mecanismos principales: 1) estabilización estérica y 2) estabilización electrostática. El Tw por ser no iónico provee una estabilización estérica basada en los grupos polares que se orientan a la fase acuosa. Por otro lado, el CMP provee una estabilización esencialmente electrostática. El complejo formado entre estas dos moléculas mediante la interacción de sus regiones hidrofóbicas una vez adsorbido en la interfase brindaría tanto una estabilización estérica como electrostática a pH 6,5.

Esto mismo explicaría por qué las emulsiones mixtas se mantienen estables al bajar el pH ya que, aún conservando la posibilidad de gelificación debido a las cargas eléctricas que asume el CMP interfacial (y también el remanente en solución) durante la acidificación, las gotas de aceite no podrían coalescer debido a un impedimento estérico brindado por el Tw.

Nikiforidis y Kiosseoglou (2007), estudiaron el efecto de la incorporación de Tween 80 en emulsiones de yema de huevo sometidas a calentamiento, mediante el análisis de tamaño de gota por SLS y estudios interfaciales de adsorción secuencial. De acuerdo al tamaño de gota encontrado inicialmente y posterior al tratamiento, reportaron un aumento de la estabilidad frente al tratamiento térmico de la emulsión en presencia de Tween. Los estudios interfaciales mostraron que la incorporación de Tw a la película formada por proteínas de yema de huevo, dio como resultado el desplazamiento parcial de estas proteínas, quedando la película conformada por ambas moléculas. Estos autores sugieren que la adición de Tween inhibe los fenómenos de floculación y coalescencia de las gotas protegiendo los grupos reactivos de las moléculas de proteína de yema de huevo. La protección ofrecida por las moléculas de tensioactivo fue atribuida a la prevención de la formación de enlaces hidrófobos, tanto entre las moléculas de proteína adsorbidas en las superficies de las gotas, como así también entre las no adsorbidas.

En base a los resultados observados en este trabajo, es posible desarrollar un esquema (**Figura 68**) para explicar el mecanismo de estabilización de las gotas en la emulsión mixta CMP/Tw. Cuando la emulsión es formada sólo por CMP, éste se acomoda en la interfase manteniéndose en parte también en la fase continua. En presencia de ambos compuestos en la solución mixta, ocurre la formación de un complejo entre el CMP y el Tw interaccionando por sus grupos hidrofóbicos; este complejo es quien se adsorbería en interfase al igual que moléculas de Tw quien en principio parecen dominar el comportamiento interfacial. El CMP, además de estar formando parte del complejo adsorbido, se encontraría en la fase continua.

La formación de este complejo y su adsorción en la interfase impediría la interacción entre las moléculas de CMP en la película interfacial, de acuerdo con los resultados encontrados en el estudio interfacial donde se observó que la película mixta (CMP/Tw) presentó una menor elasticidad que la del CMP solo.

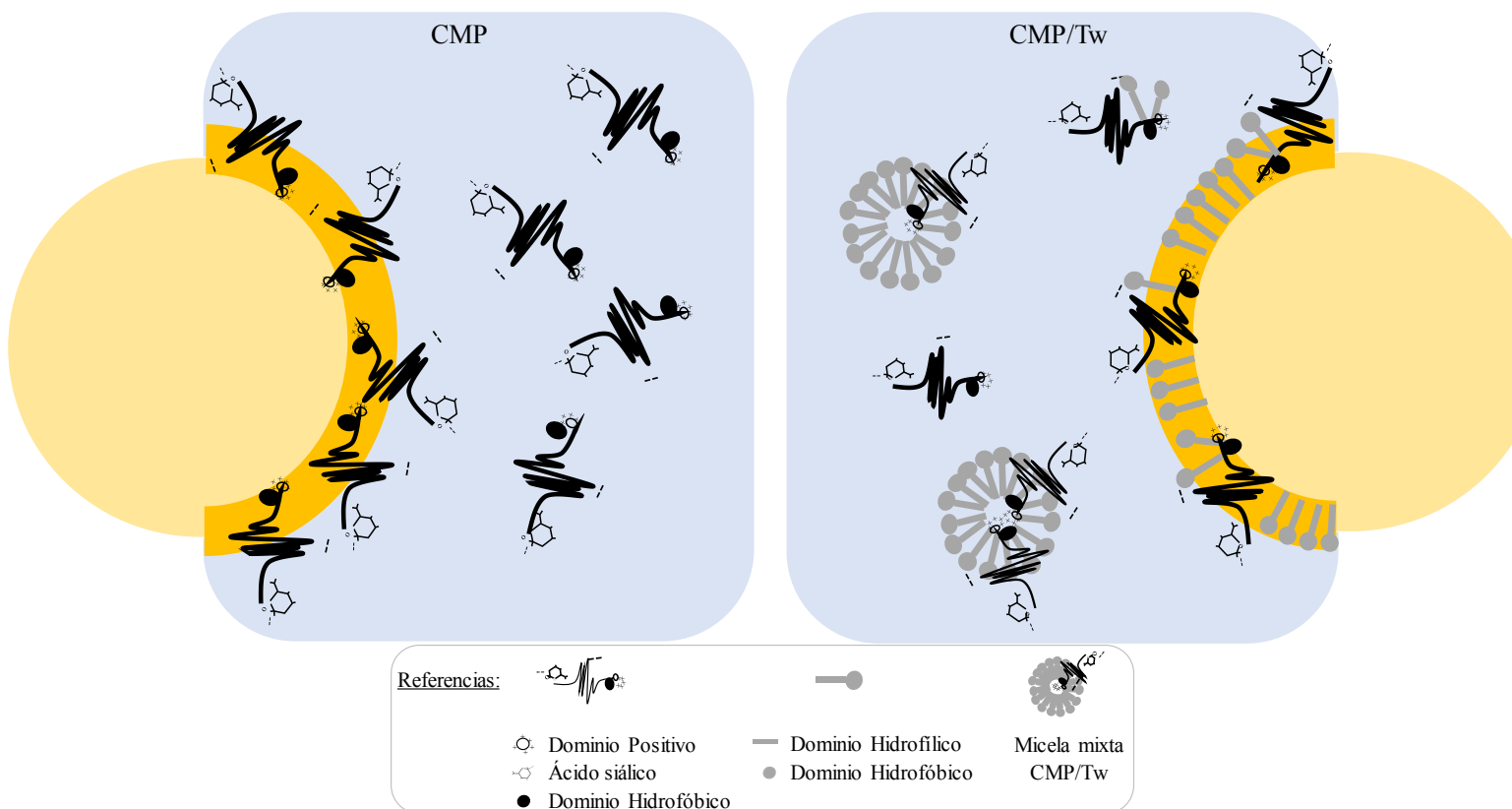


Figura 68. Esquema propuesto para explicar la mejora de las propiedades emulsionantes de la mezcla CMP/Tw a pH 6,5.

Así mismo, es posible pensar un mecanismo de gelificación de las emulsiones mixtas CMP/Tw al igual que el propuesto para la emulsión de CMP. La **Figura 69 69** muestra la representación del proceso de gelificación de la emulsión de CMP/Tw y su reversión.

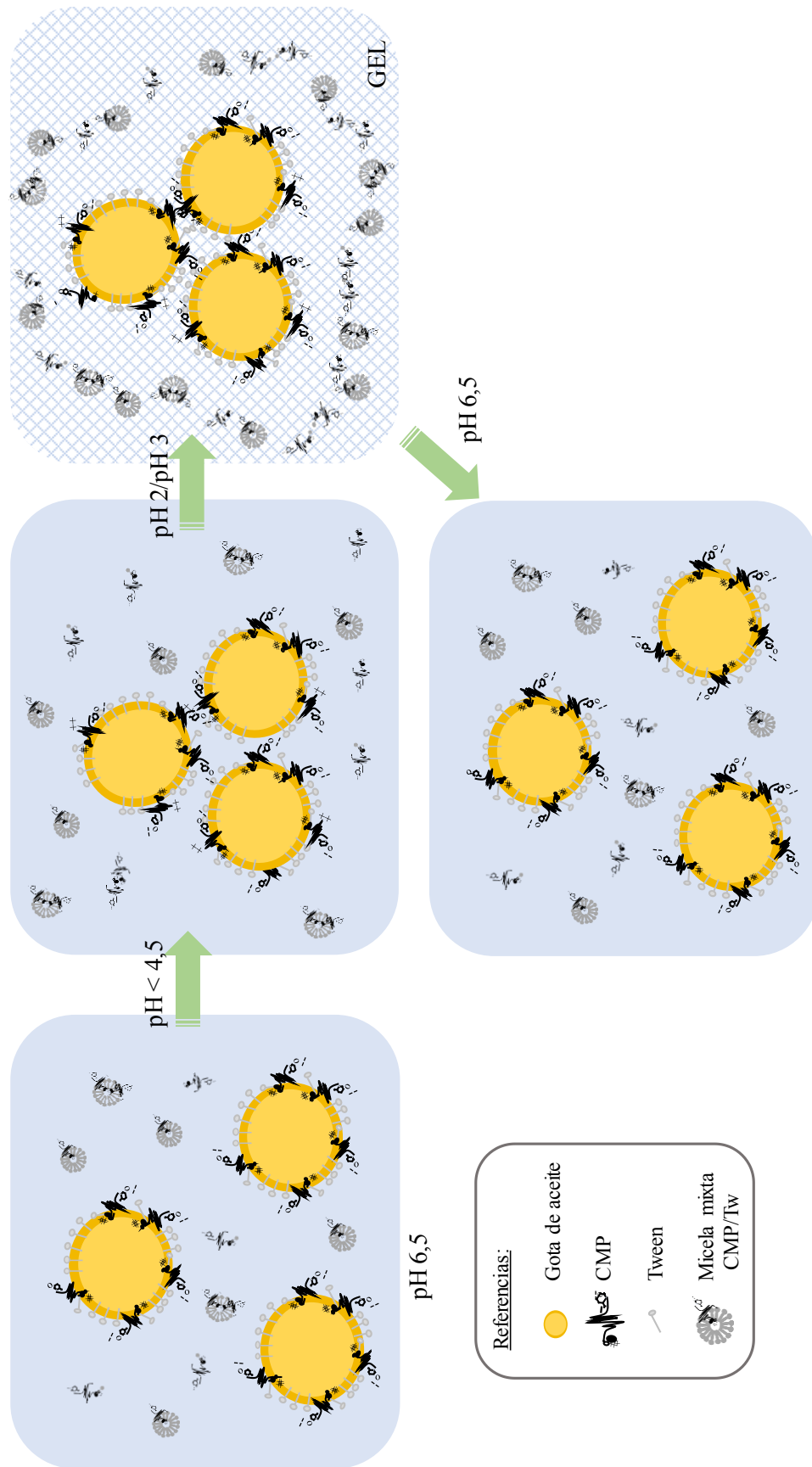


Figura 69. Esquema propuesto para explicar la gelificación y posterior reversión de las emulsiones de CMP/Tw.

Como fue explicado anteriormente, inicialmente a pH 6,5 la interfase de las gotas de aceite estaría conformada por moléculas de Tw y complejos de CMP/Tw. A este pH la estabilización de la emulsión estaría dada por impedimento eléctrico, debido a la carga negativa de las moléculas de CMP y por impedimento estérico debido a la presencia de moléculas de Tw.

Al producirse la gelificación (acidificación) mediada por el CMP, las gotas de aceite podrían interactuar electrostáticamente, pero las películas interfaciales serían resistentes a la coalescencia debido al impedimento estérico del Tw. De esta manera, cuando se revierte al pH inicial (6,5), las gotas presentan el mismo tamaño inicial ya que no hubo fusión de gotas durante la gelificación, lo que resulta en la reversión efectiva de la emulsión.

II-2.6. Conclusiones

De todos los co-emulsionantes estudiados, el Tw resultó ser el co-emulsionante adecuado para la formación de las emulsiones de CMP estables al proceso de gelificación mediado por pH. Una interacción sinérgica entre ambos emulsionantes aparece como la base de esta mejora en la cual el Tw contribuiría a la estabilización estérica.

Además de utilizar CMP que per se es un compuesto bioactivo, esta emulsión gelificada sería útil para transportar aceites bioactivos o compuestos solubles en aceite. Estos sistemas tienen un uso potencial como *carrier* de ingredientes funcionales, una estrategia que se utiliza ampliamente en otros campos y que podría encontrar una amplia gama de aplicaciones en el desarrollo de alimentos funcionales innovadores.

II-2.7. Referencias

- Allen, K.E., Dickinson, E. & Murray, B. (2006). Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 225-234.
- Bhattacharjee, J., Verma, Aswal, V.K., Date, A.A., Nagarsenker, M.S. & Hassan, P.A. (2010). Tween 80-sodium deoxycholate mixed micelles: structural characterization and application in doxorubicin delivery. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 16414–16421.
- Carrera Sánchez, C. & Rodríguez Patino, J.M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19 (3), 407-416.
- Chanamai, R. & McClements, D.J. (2002). Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and temperature. *Journal of Food Science*, 67 (1), 120-125.
- Comas, D.I., Wagner, J.R. & Tomás, M.C. (2006). Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein-lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*, 20 (7), 990-996.
- Dickinson, E. & Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers.
- Dickinson, E. (1992). *An Introduction to Food Colloids*. Oxford, UK: University Press.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1473-1482.
- Dickinson, E. & Lopez, G. (2001). Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial milk proteins. *Journal of Food Science*, 66 (1), 118-123.
- Dickinson, E., Radford, S. J. & Golding, M. (2003). Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: Combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, 17 (2), 211-220.
- Eliot, C. & Dickinson, E. (2003). Thermoreversible gelation of caseinate-stabilized emulsions at around body temperature. *International Dairy Journal*, 13 (8), 679-684.
- Euston, S.R. (1997). Emulsifiers in dairy products and dairy substitutes. En: *Food emulsifiers and their applications*. Hasenhuettl, G.L & Hartel, R.W (Eds), pp. 173-201. Springer Science-Business Media.

- Henry, J.V.L., Fryer, P.J., Frith, W.J. & Norton, I.T. (2009). Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338 (1), 201-206.
- Hsu, J.P. & Nacu, A. (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259 (2), 374-381.
- Jayme, M., Dunstan, D. & Gee, M. (1999). Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 13 (6), 459-465.
- Klein, M., Abraham, A., Svitov, I. & Garti, N. (2010). Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum arabic and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77 (1), 75-81.
- Lafitte, G., Thuresson, K., Jarwoll, P. & Nyden, M. (2007). Transport properties and aggregation phenomena of polyoxyethylene sorbitane monooleate (polysorbate 80) in pig gastrointestinal mucin and mucus. *Langmuir*, 23, 10933-10939.
- Lin, X., Wang, Q., Li, W. & Wright, A. (2014). Emulsification of algal oil with soy lecithin improved DHA bioaccessibility but did not change overall *in vitro* digestibility. *Food and Function*, 5 (11), 2913-2921.
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Wilde, P.J. & Morris, V.J. (1999). Orogenic displacement of protein from the air/water interface by competitive adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 210 (1), 157-166.
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Ridout, M.J., Wilde, P.J. & Rodriguez Patino, J. (2001). In situ measurement of the displacement of protein films from the air/water interface by Surfactant. *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.
- Mantovani, R.A., Cavallieri, Â.L.F., Netto, F.M. & Cunha, R.L. (2013). Stability and *in vitro* digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins. *Food & function*, 4 (9), 1322-1331.
- Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2013). Foaming and surface properties of casein glycomacropeptide - gelatin mixtures as affected by their interactions in the aqueous phase. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 48-57.
- McClements, D.J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. (CRC Press, Ed.) (3.a ed.).

- Morales, R., Martinez, M.J. & Pilosof, A.M.R. (2016). Dynamics of gelation, textural and microstructural properties of gelatin gels in the presence of casein glycomacropeptide. *Food Research International*, 84, 102-107.
- Mun, S., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2007). Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40, 770–781.
- Nikiforidis, C.V. & Kiosseoglou, V. (2007). The role of Tween in inhibiting heat-induced destabilization of yolk-based emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21 (8), 1310–1318.
- Ogawa, S., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2003). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin - Chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9), 2806-2812.
- Olijve, J., Mori, F. & Toda, Y. (2001). Influence of the molecular-weight distribution of gelatin on emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 243, 476-482.
- Piorkowski, D.T. & McClements, D.J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Rao, J. & McClements, D.J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25 (6), 1413-1423.
- Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1925–1937.
- Rodríguez Niño, M. R. & Rodríguez Patino, J. (1998). Surface tension of bovine serum albumin and tween 20 at the air-aqueous interface. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (10), 1241-1248.
- Surh, J., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2006). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 596-606.
- Toledano, O. & Magdassi, S. (1998). Emulsification and Foaming Properties of Hydrophobically Modified Gelatin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 200 (2), 235-240.
- Tse, K.Y. & Reineccius, G.A. (1997). Methods to predict the physical stability of flavor — cloud emulsion. *Flavor Technology*, 13, 172-182.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advance Colloid Interface Science*, 63-71, 108-109.

Woodward, N.C., Gunning, A.P., Mackie, A.R., Wilde, P.J. & Morris, V.J. (2009). Comparison of the orogenic displacement of sodium caseinate with the caseins from the air-water interface by nonionic surfactants. *Langmuir*, 25 (12), 6739-6744.

Capítulo II-3

*Estudio de la lipólisis de emulsiones de
CMP y CMP/co-emulsionante*

II-3. Introducción

Las emulsiones experimentan una serie de cambios a lo largo del aparato digestivo que alteran su susceptibilidad al proceso digestivo y, en consecuencia, la disponibilidad de los productos de la digestión para su absorción. El proceso inicia en la boca, donde se lleva a cabo la formación del bolo alimenticio; el alimento ingerido es humedecido con la saliva mientras es amasado y fragmentado por medio de la acción llevada a cabo por la lengua y los dientes (masticación), respectivamente. Los procesos que tienen lugar en este órgano originan cambios en la estructura y propiedades de los lípidos emulsionados, entre ellos, interacción con componentes de la saliva (por ejemplo mucina), interacción con enzimas (por ejemplo amilasa salival) o bien cambios estructurales originados por los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica (Sarkar, Goh y Singh, 2009; Vingerhoeds et al., 2005). Una vez que el bolo alimenticio abandona la boca, es transportado por el esófago hacia el estómago. Este último puede ser considerado como una estructura con forma de saco situado en la parte superior del abdomen, donde el bolo es procesado y almacenado previo a pasar al intestino delgado por medio del píloro (Barrett, 2006). Durante la digestión gástrica se continúa con el proceso de degradación del bolo alimenticio por la acción de los jugos gástricos que contienen una mezcla compleja de enzimas, sales y sustancias con actividad interfacial, entre otros componentes biológicos. Por medio de los movimientos peristálticos, el bolo alimenticio es sometido a una agitación mecánica y obligado a tomar un contacto íntimo con los componentes gástricos. En el intestino delgado, la mayoría de los macronutrientes alimentarios se descomponen física y químicamente con la ayuda de una serie de enzimas, como la tripsina, la quimotripsina, la lipasa pancreática, la colipasa y la α -amilasa, lo que facilita su absorción (Ganong y Barrett, 2005). Tanto los aceites emulsionados preexistentes como las emulsiones formadas in situ en el duodeno o el estómago deben estar expuestos al medio intestinal para su hidrólisis (Armand et al., 1996; Reis et al., 2009; Singh y Ye, 2013). Juntos, la película interfacial y la matriz alimentaria que rodea las gotas de aceite dispersas, así como la composición del aceite modularán su digestión intestinal. Las sales biliares (SB) y los fosfolípidos producidos en el hígado, que llegan al intestino vía vesícula biliar, presentan actividad interfacial, por lo que se adsorben en la superficie de las gotas de lípidos para facilitar su digestión (Tso, 2000). Las sustancias con actividad interfacial, ya sean endógenas (secretadas por el cuerpo) o exógenas (ingeridas), compiten por su adsorción en la interfase, desplazando, en forma total o parcial, al emulsionante

original adsorbido en la gota de lípido, por lo que se produce una alteración de la composición interfacial y sus propiedades (Bauer et al., 2005; Favé, Coste y Armand, 2004). La digestión de los lípidos se completa por medio de las lipasas que llegan al intestino desde el páncreas (lipasas pancreáticas), para dar lugar a la liberación de ácidos grasos (AG) y monoglicéridos (MG) a partir de moléculas de triglicéridos (TG). Los productos generados en la digestión, son transportados luego en micelas de SB y fosfolípidos para su posterior absorción por las células del epitelio (McClements et al., 2010). Para catalizar la reacción de lipólisis, la lipasa debe adsorberse en la interfase O/W para establecer contacto con el sustrato. Para lograr su óptima actividad, la lipasa debe unirse a la co-lipasa, un cofactor enzimático secretado por los jugos pancreáticos que, por medio de la formación de un complejo, permite la llegada de la lipasa a la interfase.

Por todo lo antes expuesto, la optimización de las características de una emulsión como sistema de suministro de componentes bioactivos presenta un gran desafío, ya que dicho sistema debe proteger a los compuestos de interés durante el almacenamiento del producto y durante la digestión, proporcionando una liberación óptima en el tracto intestinal. Todos los cambios mencionados anteriormente que ocurren en la emulsión durante el paso por el tracto gastrointestinal modifican por un lado, la estructura inicial de las emulsiones, ya que al llegar la emulsión al duodeno podrían tener lugar cambios sustanciales en el área interfacial (debido a fenómenos de floculación y/o coalescencia) y, por otro lado y relacionado con ello, podrían ocurrir modificaciones en la película interfacial que alteren su susceptibilidad a los componentes presentes en el fluido duodenal (sales biliares, enzimas, etc.) (Singh y Ye, 2013). Las características de la película interfacial dependen principalmente del tipo y concentración de emulsionante utilizado (Mackie y Macierzanka, 2010; Singh y Horne, 2009). Por ello, la utilización de diferentes emulsionantes y la combinación de ellos podrían dar lugar a la formación de películas interfaciales que presenten diferente susceptibilidad a los componentes presentes en el fluido duodenal, de manera de modificar el proceso de lipólisis.

Desde el punto de vista del diseño de productos alimentarios, la digestión de lípidos, puede modularse controlando el acceso de las lipasas a la interfase O/W mediante la alteración de la matriz alimentaria que los contiene (Guo et al., 2017). Además, la formación de una matriz gelificada podría modificar la acción de los componentes presentes durante la digestión, afectando la biodisponibilidad de lípidos y la liberación de componentes liposolubles a sitios específicos dentro del tracto digestivo (Aguilera, 2006; Chen et al., 2006). De hecho, se ha reportado que cuando las gotas de aceite se dispersan

en una matriz alimenticia de tipo sólido (por ejemplo, queso o yogur), la estructura de dicha matriz puede convertirse en el factor dominante que controla la digestión (Dickinson, 2012), ya que la estructura gelficada puede obstruir la difusión de enzimas hacia la superficie de gotas de aceite dispersas. Por tal razón, el conocimiento y el seguimiento del proceso gastrointestinal es crucial para optimizar la biodisponibilidad de los componentes bioactivos o bien para modular la resistencia a la acción digestiva de las lipasas.

En este capítulo se evaluará la influencia de la composición y la estructura de las emulsiones sobre la hidrólisis de los lípidos emulsionados. Se analizarán en forma comparativa las emulsiones formadas por CMP y CMP/Tw₄ a pH 6,5 (líquidas) y a pH 3 (gelificadas), durante la digestión gastroduodenal *in vitro* a fin de determinar la velocidad y extensión del proceso de lipólisis a partir de la liberación de ácidos grasos. Adicionalmente, a fin de estudiar el efecto de emulsificantes de otra naturaleza, se estudiará el mismo proceso sobre emulsiones de CMP/GA.

II-3.1. Lipólisis de emulsiones de CMP: efecto de la gelificación

Este estudio se realizó sobre emulsiones obtenidas a partir de soluciones de CMP a una concentración del 8 % p/p con aceite de girasol comercial en una relación 10:90. Se estudiaron tanto las emulsiones obtenidas a pH 6,5 (líquidas) como las gelificadas por pH (pH 3). Las mismas se sometieron al proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, consistente en una etapa gástrica (1 h, pH 2,5), seguida de una etapa duodenal (2 h, pH 7,0), en presencia de enzimas y biomoléculas en concentraciones fisiológicas.

La digestibilidad de las gotas de aceite de la emulsión fue determinada por medio de la determinación de los ácidos grasos liberados a partir de la acción de la lipasa pancreática durante la fase duodenal del proceso de digestión *in vitro* (Abrahamse et al., 2012; Li y McClements, 2010). Para estimar el % de ácidos grasos liberados (AGL) se utilizó la Ecuación (15), definida en la sección de Materiales y Métodos, que tiene en cuenta el hecho de que una molécula de TG es capaz de dar origen a dos moléculas de AG (titulables) y una molécula MG, durante el proceso de lipólisis. Es decir, que por cada equivalente de TG (que dará lugar a dos equivalentes de AG), se requieren dos equivalentes de NaOH para su titulación (Li y McClements, 2010; McClements y Li, 2010).

En la **Figura 70** se muestra la cinética de liberación de ácidos grasos durante la etapa duodenal (2 h), para las emulsiones de CMP 8 % p/p a pH 6,5 (líquida) y a pH 3 (gelificada). Para ambos casos se observó un rápido incremento durante los primeros minutos en el porcentaje de ácidos grasos liberados (% AGL), previo a alcanzar un valor de pseudoequilibrio, a tiempos mayores, que resultó levemente mayor para la emulsión de CMP a pH 6,5.

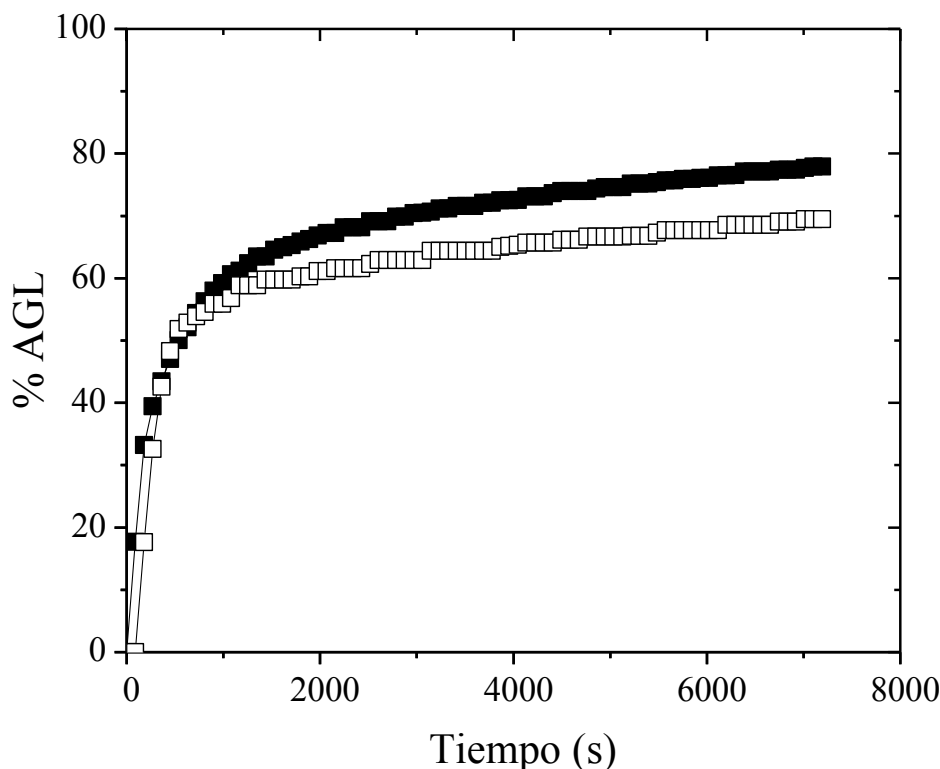


Figura 70. Liberación de los ácidos grasos (% AGL) durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones estabilizadas por CMP 8 % p/p a pH 6,5 (■) y pH 3 (□).

Ha sido reportado que, al trabajar con suficiente concentración de lipasa pancreática, su adsorción a la interfase O/W es casi inmediata a su incorporación al medio de reacción (McClements y Li, 2010). A raíz de esto, el proceso de lipólisis (que da lugar a la liberación de AG) comienza de manera inmediata una vez que se ha incorporado la lipasa pancreática, sin evidenciarse la existencia de un período de inducción (McClements y Li, 2010). La hidrólisis de lípidos se logra debido a que las SB presentes en el fluido duodenal desplazan algunas de las moléculas presentes en las superficies de las gotas, lo que permite que la lipasa se adsorba. Debido a su alta actividad superficial, las sales biliares son muy eficientes para desplazar proteínas adsorbidas en interfases de emulsiones (Singh

y Ye, 2013). Por lo tanto, cualquier proteína o péptido que permanece en la superficie de la gota después de la acción de la pepsina, la tripsina y la quimotripsina en las fases gástrica y duodenal es probablemente desplazado por las sales biliares. Maldonado-Valderrama et al., (2008) reportó un desplazamiento parcial o completo de β -lg desde la superficie de la gota después de la introducción de SB en el fluido intestinal simulado mediante estudios *in vitro*.

La razón de que la cantidad de ácidos grasos liberados de las emulsiones se mantenga constante después de un cierto tiempo, aunque no se hayan digerido todos los lípidos, puede deberse a la inhibición de la actividad de la lipasa por los ácidos grasos liberados (Pafumi et al., 2002). La acumulación de los productos de reacción (AG y monoglicéridos) en la superficie de las gotas de aceite, provoca la inhibición de la lipasa, reduciendo su actividad (Gallier et al., 2013; Troncoso, Aguilera y McClements, 2012). Debido a que estos productos presentan actividad interfacial, en condiciones *in vitro* podrían acumularse en la interfase dificultando el acceso de la lipasa, hecho que durante la digestión *in vivo* sería resuelto por la presencia de las SB, quienes en forma de micelas, realizan la continua remoción de los AG de la interfase garantizando el acceso de la lipasa pancreática y su óptima actividad (Reis et al., 2009; Troncoso et al., 2012).

Las curvas experimentales que describen la lipólisis (**Figura 70**) fueron ajustadas de acuerdo con el siguiente modelo empírico (Pilosof, Boquet y Bartholomai, 1985):

$$\% \text{AGL} (t) = [(\% \text{AGL})_{\text{máx}} * t] / (B + t) \quad (16)$$

donde % AGL (t) y $(\% \text{AGL})_{\text{máx}}$ se refiere al % AGL liberados al tiempo t y al % AGL donde se alcanza el pseudoequilibrio, respectivamente y B es el tiempo (min) necesario para alcanzar la mitad del $(\% \text{AGL})_{\text{máx}}$, es decir $(\% \text{AGL})_{\text{máx}}/2$.

De acuerdo con Pilosof et al., (1985), es posible estimar la velocidad inicial (K_0^{AGL}) y la velocidad global (K^{AGL}) del proceso de lipólisis a partir de los valores de $(\% \text{AGL})_{\text{máx}}$ y B por medio de las ecuaciones 17 y 18:

$$K_0^{\text{AGL}} = (\% \text{AGL})_{\text{máx}} / B \quad (17)$$

$$K^{\text{AGL}} = ((\% \text{AGL})_{\text{máx}} * B)^{-1} \quad (18)$$

En la **Tabla 24** se resumen los valores obtenidos a partir del ajuste con las ecuaciones 16, 17 y 18. Se puede observar que el valor máximo de liberación de ácidos grasos (% AGL_{máx}) obtenido para las emulsiones estabilizadas por CMP a pH 6,5 y pH 3 no fueron significativamente diferentes.

No existen en la literatura reportes previos sobre estudios de lipólisis de emulsiones de CMP. Bellesi et al. (2016) estudiaron la liberación de ácidos grasos de emulsiones preparadas con β -lg y proteína de soja, a una concentración del 2 % p/p y una relación O/W 10:90, sometidos al mismo proceso de digestión *in vitro* utilizado en este trabajo, y reportaron valores de %AGL_{máx} de 65 % para β -lg y 43 % para la proteína de soja. Dichos autores indicaron que la proteína de soja fue la que dio lugar a la emulsión más resistente a la digestión, mostrando un grado de liberación de ácidos grasos similar a la hidroxipropilmetilcelulosa, que es un emulsionante no digerible, y atribuyeron el menor grado de digestión lipídica de la emulsión de proteína de soja al comportamiento interfacial de esta proteína, la cual podría resistir el desplazamiento llevado a cabo por las SB (Bellesi et al., 2014; Favé, Coste y Armand, 2004), disminuyendo la adsorción de la lipasa y dificultando la desorción de los productos de la lipólisis que también está mediada por las SB. En comparación con las proteínas de origen animal, las películas interfaciales formadas por proteínas de origen vegetal pueden proporcionar una protección mejorada contra la lipólisis durante la digestión (Guo et al., 2017).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ni en la velocidad inicial (K_0^{AGL}), ni en la velocidad global (K^{AGL}) del proceso de lipólisis (**Tabla 24**) entre ambas emulsiones de CMP, sugiriendo en principio que la matriz gelificada no modificaría su susceptibilidad frente a la acción de la lipasa.

Tabla 24. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión de la **Figura 70**, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof et al. (1985).

Emulsión	R ²	% AGL _{máx}	B (min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} ·10 ³ (1/min)
CMP pH 6,5	0,99	73,3 ± 2,8 ^a	2,71 ± 0,33 ^b	27,20 ± 2,32 ^a	13,65 ± 0,52 ^a
CMP pH 3	0,98	64,0 ± 13,6 ^a	1,70 ± 0,05 ^a	38,32 ± 9,21 ^a	15,80 ± 3,40 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n = 2).

Como se mencionó, la digestión de alimentos incluye tres etapas: procesamiento oral, digestión gástrica y digestión intestinal. En la boca, los humanos presentan diferentes patrones de procesamiento oral de alimentos (por ejemplo, número de ciclos de masticación y duración de la masticación) en función de las propiedades de los alimentos (Chen, 2009; Foster et al., 2006). La masticación descompone un alimento sólido en partículas pequeñas y lo mezcla con saliva para formar el bolo alimenticio, listo para tragar, mientras que los alimentos líquidos permanecen en la boca por unos segundos y se ingieren directamente (Chen, 2009). Aunque la masticación, la mezcla con saliva y la fricción entre las superficies orales dividirán los alimentos en partículas pequeñas, su microestructura permanecerá prácticamente intacta, ya sea que hablemos de alimentos sólidos como nueces, pastas, geles de proteínas o emulsiones líquidas como aderezos para ensaladas (Guo et al., 2013). En el estómago, las proteínas se hidrolizan significativamente por la pepsina, mientras que los lípidos se digieren sólo parcialmente y los carbohidratos se degradan poco (Ganong y Barrett, 2005). Las partículas de alimentos más grandes remanentes del procesamiento oral se descomponen en partículas más pequeñas ($< 1-2$ mm) mediante trituración antral (Kong y Singh, 2008), que, junto con los jugos gástricos, dan como resultado una interrupción significativa de la microestructura de los alimentos. La desestabilización de las emulsiones O/W ocurre durante la digestión gástrica, cuyo grado depende de la naturaleza de la película interfacial que cubre las gotas de aceite dispersas y la matriz alimenticia que rodea dichas gotas (Guo et al., 2014; Singh y Ye, 2013). Por lo cual, en sistemas donde las gotas de lípidos se encuentran inmersas en matrices sólidas, la velocidad y la extensión de la digestión de los lípidos en el estómago y el intestino delgado pueden depender de cuán rápido se desintegren los componentes de la matriz que los rodean, ya que los lípidos deben exponerse antes de que puedan ser digeridos por las lipasas (Chen, Remondetto y Subirade, 2006). En un estudio reciente (Guo et al., 2016), se formaron geles con diferentes microestructuras calentando emulsiones de proteína de suero de leche en presencia de diferentes concentraciones de sal. Con concentraciones bajas de NaCl (< 50 mM) se obtuvieron geles más blandos y con concentraciones más altas de NaCl (> 100 mM) se obtuvieron geles más duros. Los autores reportaron que esta diferencia en la microestructura del gel fue un factor clave en la digestión del aceite disperso, ya que, durante la digestión intestinal, el gel blando presentó un comportamiento de digestión similar a la emulsión de proteína de suero líquido (sin agregado de NaCl) mientras que el gel más duro mantuvo en parte su estructura, lo que condujo a un menor grado de lipólisis.

Liang et al. (2010) estudiaron la influencia de la microestructura de emulsiones de β -lg (6,6 % p/p) gelificadas en frío por adición de calcio, sobre la liberación controlada de α -tocoferol bajo condiciones gastrointestinales (GI) simuladas (una etapa gástrica de 0,5 h, con SGF a pH 1,2 y pepsina, seguida de una etapa duodenal de 6 h, con SIF a pH 7,5 y pancreatina). Los autores demostraron que las emulsiones gelificadas protegen al α -tocoferol bajo estas condiciones GI y que la liberación de α -tocoferol fue controlada principalmente por la degradación de la matriz proteica. Además, la degradación de estas emulsiones gelificadas durante la etapa gástrica fue sólo del 20 %, lo que indica que las matrices son gastrorresistentes.

A diferencia de β -lg, la cual es muy resistente a la acción de la pepsina gástrica (Martinez et al., 2016; Mandalari et al., 2009; Mouécoucou et al., 2004), el CMP es muy susceptible a la proteólisis en condiciones gástricas. La digestión gastrointestinal *in vitro* de soluciones acuosas del mismo CMP utilizado en este trabajo fue estudiada por Martinez et al. (2016), tomando muestras en diferentes tiempos durante la digestión y caracterizándolas por cromatografía de fase reversa (RF-HPLC). Los resultados indicaron que el CMP es rápidamente hidrolizado por la pepsina durante la digestión gástrica, ya que el pico característico encontrado en el perfil cromatográfico del CMP desapareció completamente luego de 10 min de la etapa gástrica. En concordancia a estos resultados, Chatterton et al. (2004) estudió la digestión gástrica de CMP en presencia de pepsina porcina durante 1 h a 37 °C y pH 2, y también reportó una rápida hidrólisis de este péptido. Esta rápida hidrólisis condujo a la formación de varias fracciones más pequeñas que fueron evidenciadas por RF-HPLC, en donde se observó también que a los 10 min de digestión gástrica el CMP fue completamente hidrolizado.

Esta alta susceptibilidad a la hidrólisis gástrica podría favorecer la degradación de la matriz gelificada rápidamente de manera que, al llegar a la fase duodenal, en donde ocurre la lipólisis, la emulsión tanto gelificada como líquida tendrían un grado de exposición de lípidos similar para la acción de la lipasa. Además, es importante mencionar que la emulsión gelificada de CMP obtenida a pH 3 presenta una estructura más bien blanda y cremosa, semejante a la de un queso untable, con lo cual se podría inferir que dicha estructura no presentaría gran resistencia a la disgregación y a la difusión de las enzimas hacia la superficie de gotas de aceite dispersas.

II-3.2. Lipólisis de emulsiones mixtas de CMP/co-emulsionante: efecto de la gelificación

Como fue mencionado anteriormente, la utilización de diferentes emulsionantes y/o la combinación de ellos podrían dar lugar a la formación de películas interfaciales que presenten diferente susceptibilidad a los componentes presentes en el fluido duodenal, de manera de modificar el proceso de lipólisis. Por tal razón, se estudió la liberación de ácidos grasos de una emulsión combinada CMP/Tw₄. Dicha emulsión fue elegida ya que fue la que presentó la mejor estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente y también durante el proceso de gelificación-reversión modulado por pH.

En la **Figura 71** se muestra la liberación de ácidos grasos para dicha emulsión y para las emulsiones de CMP 8 % p/p, Tw 4 % p/p a pH 6,5 (A) y pH 3 (B) a fin de entender el efecto que tiene la combinación de emulsionantes sobre la lipólisis. A pH 6,5 (**Figura 71 A**) la emulsión de CMP/Tw₄ presentó un comportamiento similar a la emulsión de CMP. Sin embargo, la liberación inicial de ácidos grasos fue mayor que el correspondiente a las emulsiones de los componentes individuales. La **Tabla 25** muestra los parámetros obtenidos a partir del ajuste del modelo empírico (Ecuación (16)), los cuales indican que efectivamente el % AGL_{máx} obtenido para la emulsión mixta es similar al obtenido para la emulsión de CMP y significativamente mayor al observado para la emulsión de Tw₄ (51,4 %). Un número de posibles mecanismos fisicoquímicos pueden explicar el impacto de los diversos tensioactivos en la digestión y en particular el bajo grado de lipólisis de la emulsión de Tw: (i) prevención de la adsorción de la lipasa a la interfase aceite-agua; (ii) formación de complejos interfaciales; (iii) interacción directa con la lipasa; (iv) interacción con otros componentes en el medio de digestión, como sales biliares o fosfolípidos (Li y McClements, 2011).

Los mecanismos i)-iii) no parecerían predominar en el caso de la emulsión de Tw, ya que la velocidad inicial de lipólisis fue alta (K_0^{AGL} en la **Tabla 25**). La notable disminución en el % AGL_{máx} en presencia de Tw podría deberse principalmente al mecanismo (iv) en cuanto que la interacción del Tw ya sea a nivel interfacial o en solución con las sales biliares, podría reducir la disponibilidad de las mismas para adsorberse y permitir que se adsorba el complejo lipasa/colipasa así como la posibilidad de las sales biliares de remover de la interfase los productos de la lipólisis. Recientemente, Sarkar, Ye y Singh (2016) demostraron cuantitativamente el papel que desempeñan las sales biliares en la desorción de los productos lipolíticos inhibidores bajo condiciones intestinales simuladas.

Mostraron que la presencia de sales biliares no adsorbidas mejoró notablemente la tasa y la extensión de la digestión de los lípidos. Esto podría atribuirse a la eliminación considerable de los productos de la lipólisis (AGL, mono y / o di-acilgliceroles) en micelas mixtas, que se sabe que inhiben la digestión de los lípidos, por las sales biliares no adsorbidas.

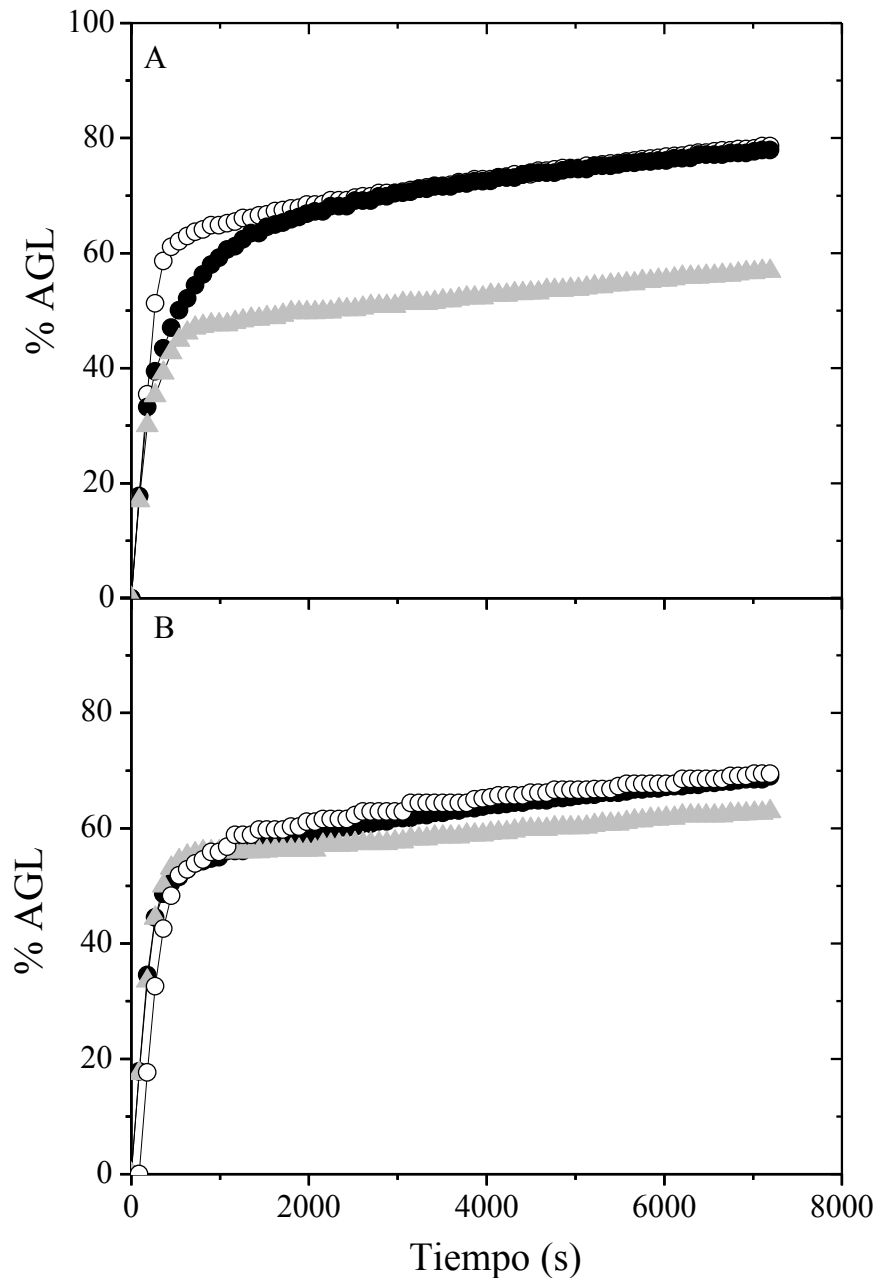


Figura 71. Liberación de los ácidos grasos (% AGL) durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de emulsiones estabilizadas por: CMP (8 % p/p) (●), CMP/Tw₄ (8 %/4 % p/p) (○) y Tw₄ (4 % p/p) (▲). A pH 6,5 (A) y pH 3 (B).

Posá y Círin, (2012) demostraron que el Tw interacciona con las sales biliares formando micelas mixtas en solución. Las sales biliares interaccionarían con el centro hidrofóbico de la micela de Tw mediante su cara hidrofóbica mientras que la interacción se vería reforzada a través de puentes de hidrógeno entre la cabeza polar del Tw y la parte aniónica de la sal biliar.

El efecto de los tensioactivos de bajo peso molecular sobre la digestibilidad de los lípidos en emulsiones de aceite de maíz estabilizado con proteínas fue estudiado por Li, y McClements (2011) utilizando un modelo de digestión *in vitro*. Dichos autores evaluaron el impacto de los tensioactivos no iónicos (Tween 20, Tween 80, Brij35), aniónicos (SDS) y catiónicos (DTAB) sobre la velocidad y el grado de digestión de los lípidos, y encontraron que todos los surfactantes inhiben la digestión de los lípidos a concentraciones suficientemente altas. Por el contrario, en nuestro trabajo no se observó que el Tw disminuya la lipólisis en presencia de CMP. Esto podría atribuirse a que el Tw al interaccionar con el CMP (**Figura 61**) tendría comprometidos los sitios de unión potencial a las sales biliares, de tal manera que éstas estarían disponibles para ejercer su rol en la lipólisis.

Tabla 25. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión de la **Figura 71 A**, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof et al. (1985).

Emulsión pH 6,5	R ²	% AGL _{máx}	B (min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} ·10 ³ (1/min)
CMP	0,99	73,30 ± 2,80 ^b	2,71 ± 0,33 ^b	27,20 ± 2,32 ^a	13,65 ± 0,52 ^a
Tw4	0,97	51,40 ± 5,50 ^a	1,44 ± 0,33 ^a	31,41 ± 4,25 ^a	15,90 ± 2,10 ^b
CMP/Tw4	0,96	71,42 ± 1,03 ^b	1,52 ± 0,16 ^a	47,20 ± 4,15 ^b	14,00 ± 0,20 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n = 2).

Cuando se evaluó la liberación de AG en los sistemas gelificados (**Figura 71 B**), se observó que las emulsiones de CMP y Tw solos presentaron una cinética de liberación similar, por lo cual también la emulsión CMP/Tw arrojó valores similares. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de dichas curvas no mostraron diferencias significativas (**Tabla 26**), indicando que los sistemas son igualmente susceptibles a la acción de la lipasa.

Tabla 26. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión de la **Figura 71 B**, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof et al. (1985).

Emulsión pH 3	R ²	% AGL _{máx}	B (min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} ·10 ³ (1/min)
CMP	0,98	64,02 ± 13,63 ^a	1,68 ± 0,05 ^b	38,32 ± 9,21 ^a	16,00 ± 3,40 ^a
Tw₄	0,95	57,23 ± 4,10 ^a	1,15 ± 0,07 ^a	49,60 ± 0,52 ^a	17,50 ± 1,30 ^a
CMP/Tw₄	0,96	62,45 ± 2,10 ^a	1,64 ± 0,09 ^b	38,10 ± 3,40 ^a	16,00 ± 0,53 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n=2).

El hecho de que la emulsión CMP-Tw₄ se comporte de manera similar a la emulsión de CMP apoya los resultados encontrados en el capítulo anterior, los cuales indicaron que no sólo el Tw, sino que también el CMP se encuentra formando parte de la película interfacial de las emulsiones mixtas CMP/Tw (**Figura 68**).

El efecto de la gelificación de la emulsión de CMP/Tw₄ en la lipólisis se puede analizar comparando los parámetros cinéticos correspondientes a esta mezcla en las **Tablas 25 y 26**. Realizando un ANOVA entre dichos parámetros (P < 0,05, n = 2), se observó que el % AGL_{máx} es ligeramente mayor en la emulsión CMP/Tw₄ sin gelificar.

Adicionalmente se evaluó la hidrólisis de los lípidos emulsionados en otro sistema mixto, la emulsión CMP/GA, que había mostrado una baja estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente y también a los cambios de pH.

La **Figura 72** muestra los resultados obtenidos en la liberación de AG durante la etapa duodenal, de las emulsiones CMP/GA y CMP, a modo comparativo, a pH 6,5 (A) y a pH 3 (B). Se observó que a pH 6,5 las dos emulsiones presentaron una cinética de liberación de AG similar. Hecho que se corrobora con los parámetros cinéticos (**Tabla 27**), lo cuales no mostraron diferencias significativas.

Cuando se evaluó la liberación a pH 3 (**Figura 72 B**) se observó que la emulsión CMP/GA presentó inicialmente un aumento más rápido de liberación que la emulsión del CMP. De hecho, la **Tabla 28** muestra que la velocidad inicial de liberación para esta emulsión fue significativamente superior. Finalmente, se observó que los valores de % AGL_{máx} de las dos emulsiones gelificadas fueron similares (**Tabla 28**) con valores entre 62-64 %.

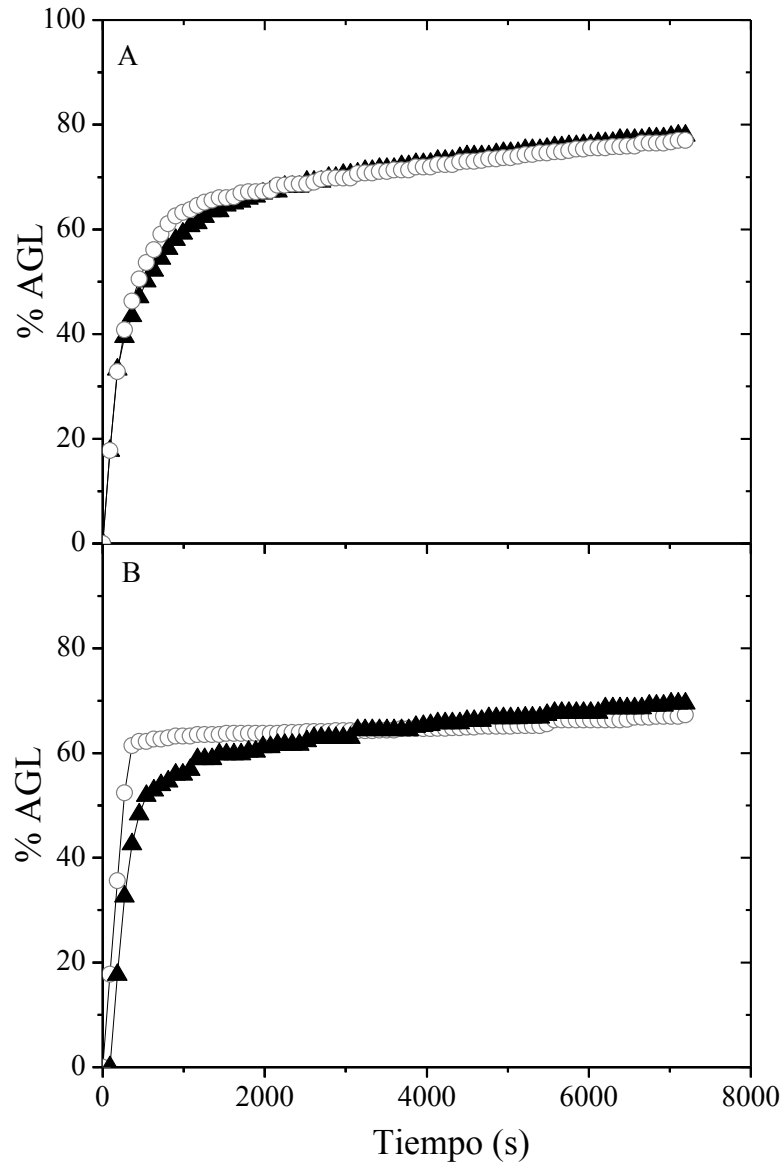


Figura 72. Liberación de ácidos grasos (% AGL) durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de emulsiones estabilizadas por: CMP (8 % p/p) (▲) y CMP G (8 %/2 % p/p) (○). A pH 6,5 (A) y pH 3 (B).

Tabla 27. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión la **Figura 72 A**, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof et al. (1985).

Emulsión pH 6,5	R ²	% AGL _{máx}	B (min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} ·10 ³ (1/min)
CMP	0,99	73,3 ± 2,8 ^a	2,71 ± 0,33 ^a	27,20 ± 2,32 ^a	13,65 ± 0,52 ^a
CMP/GA	0,99	71,75 ± 0,32 ^a	2,13 ± 0,50 ^a	34,55 ± 7,40 ^a	14,00 ± 0,06 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n=2).

Tabla 28. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión de la **Figura 72 B**, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof et al. (1985).

Emulsión pH 3	R ²	% AGL _{máx}	B(min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} ·10 ³ (1/min)
CMP	0,98	64,02 ± 13,63 ^a	1,68 ± 0,05 ^b	38,32 ± 9,21 ^a	16,00 ± 3,40 ^a
CMP/GA	0,92	62,40 ± 3,45 ^a	0,90 ± 0,10 ^a	73,00 ± 4,40 ^b	16,10 ± 0,90 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

(P < 0,05, n=2).

De igual modo que con las emulsiones de CMP/Tw, no se observaron diferencias significativas en el grado de lipólisis de la emulsión CMP/GA en relación a su gelificación, sugiriendo que en estas emulsiones el proceso de acificación y gelificación no afectó la posterior acción de las enzimas digestivas.

II-3.3. Conclusiones

Los resultados de este capítulo muestran que la emulsión de CMP/Tw₄ presenta no sólo la ventaja de ser estable al almacenamiento a temperatura ambiente, y a los cambios de pH que permiten su gelificación y posterior reversión, sino que también su digestión da lugar a un alto porcentaje de liberación de AG, similar al obtenido para la emulsión de CMP solo, lo que sería favorable para el transporte de lípidos bioactivos o compuestos bioactivos solubles en la fase oleosa donde el objetivo es la máxima liberación posible. Por el contrario, la gelificación de la emulsión de CMP/Tw₄ dio lugar a una leve disminución en el grado de lipólisis, lo que podría ser perjudicial. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta pequeña diferencia podría no existir en el proceso de digestión *in vivo*, en el cual la masticación y la disgregación de la matriz gelificada en el estómago es mucho más eficiente. Cabe destacar, que estos sistemas gelificados presentan adicionalmente la posible ventaja de ser sistemas capaces de mantener la estabilidad de ciertos compuestos liposolubles, actuando como posibles *carrier* de estos compuestos de interés.

II-3.4. Referencias

- Abrahamse, E., Minekus, M., van Aken, G. A., van de Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., Oozeer, R., van der Beek, E. M. & Ludwig, T. (2012). Development of the digestive system-experimental challenges and approaches of infant lipid digestion. *Journal Food Digestion*, 3 (1-3), 63-77.
- Aguilera, J.M. (2006). Food product engineering: building the right structures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1147–1155.
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, P., Dubois, C., Senft, M. Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J. & Lairon, D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271 (1), 172-183.
- Barrett, K.E. (2006). *Gastrointestinal physiology: Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies*.
- Bauer, E., Jakob, S. & Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Journal of Animal Science*, 18, 282-295.
- Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. (2014). Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids*, 36, 115-122.
- Bellesi, F.A., Martinez, M.J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V.M. & Pilosof, A.M.R. (2016). Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under *in vitro* gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 52, 47-56.
- Chatterton, D.E.W., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Sørensen E.S. & Petersen, T.E. (2004). *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in Infant formulas: research on biological functions. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 373–383.
- Chen, Li., Remondetto, G.G. & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17 (5), 272–83.
- Chen, J. (2009). Food oral processing-A review. *Food Hydrocolloids*, 23 (1), 1-25.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets, *Food Hydrocolloids*, 28, 224-241.
- Favé, G., Coste, T.C. & Armand, M. (2004). Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cellular and Molecular Biology*, 50 (7), 815-831.
- Foster, K.D., Woda, A. & Peyron, M.A. (2006). Effect of texture of plastic and elastic model foods on the parameters of mastication. *Journal Neurophysiology*, 95 (6), 3469-3479.

- Gallier, S., Tate, H. & Singh, H. (2013). *In vitro* gastric and intestinal digestion of a walnut oil body dispersion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2), 410-417.
- Ganong, W.F. & Barrett, K.E. (2005). *Review of medical physiology*, McGraw-Hill Medical, New York.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D. & Singh, H. (2013). The breakdown properties of heat-set whey protein emulsion gels in the human mouth. *Food Hydrocolloids*, 33 (2), 215-224.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D. & Singh, H. (2014). Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels. *Soft Matter*, 10 (8), 1214-1223.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D. & Singh, H. (2016). Impact of colloidal structure of gastric digesta on *in-vitro* intestinal digestion of whey protein emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 54, 255-265.
- Guo, Q., Ye, A., Bellissimo, N., Singh, H. & Rousseau, D. (2017). Modulating fat digestion through food structure design. *Progress in Lipid Research*, 68, 109-118.
- Kong, F. & Singh, R.P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal Food Science*, 73(5), 67-80.
- Li, Y. & McClements, D.J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-Stat digestion profiles: impact of lipid droplet characteristics on *in vitro* digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8085-8092.
- Li, Y. & McClements, D.J. (2011). Inhibition of lipase-catalyzed hydrolysis of emulsified triglyceride oils by low-molecular weight surfactants under simulated gastrointestinal conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, 423-431.
- Liang, L., Sok Line, V.L., Remondetto, G.E. & Subirade, M. (2010). *In vitro* release of α -tocopherol from emulsion loaded β -Lactoglobulin gels. *International Dairy Journal* 20 (3), 176–81.
- Mackie, A. & Macierzanka, A. (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 102–8.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L. & Bublin, M. (2009). *In vitro* digestibility of β -casein and β -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55 (3), 372–381.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N.C., Gunning, A.P., Ridout, M.J., Husband, F.A. & Mackie, A.R. (2008). Interfacial characterization of beta-lactoglobulin networks: displacement by bile salts. *Langmuir*, 24, 6759–6767.

- Martinez, M.J., Martos, G., Molina, E. & Pilosof, A.M.R. (2016). Reduced β -lactoglobulin IgE binding upon *in vitro* digestion as a result of the interaction of the protein with casein glycomacropeptide. *Food Chemistry*, 192, 943–949.
- McClements, D.J. & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159 (2), 213-228.
- Mouécoucou, J., Villaume, C., Sanchez, C., & Méjean, L. (2004). β -Lactoglobulin/polysaccharide interactions during *in vitro* gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1670 (2), 105–112.
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J. & Hamosh, M. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 28070–28079.
- Pilosof, A.M.R., Boquet, R. & Bartholomai, G.B. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *Journal of Food Science*, 50 (1), 278-279.
- Poša, M. & Čirin, D. (2012). Mixed micelles of sodium salts of bile acids and Tween 40: effect of the steroid skeleton on the coefficient of interaction in mixed micelles. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 14722–14728.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 237-250.
- Sarkar, A., Goh, K.K.T., Singh, R.P. & Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an *in vitro* gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1563-1569.
- Sarkar, A., Ye, A. & Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.
- Singh H, Ye A. & Horne D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48, 92–100.
- Singh, H. & Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 360-370.
- Troncoso, E., Aguilera, J.M. & McClements, D.J. (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27 (2), 355-363.
- Tso, P. (2000). Overview of digestion and absorption. En: *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. Crissinger, K.D. & Stipanuk, M.H. (Eds.), pp. 75–90. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company.

Vingerhoeds, M.H., Blijdenstein, T.B.J., Zoet, F.D. & van Aken, G.A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19 (5), 915-922.

Conclusiones generales

El CMP es un péptido singular que además de presentar un alto valor como péptido bioactivo, es muy atractivo desde un punto de vista fisicoquímico y tecnológico. Dos de las características que lo hacen singular son su capacidad de autoensamblaje en forma espontánea mediado por el pH y su tendencia a unirse a diferentes moléculas que forman parte de la matriz alimentaria.

En este trabajo se demostró que el CMP es capaz de interactuar ya sea con el CasNa, como con moléculas de bajo peso molecular como el polisorbato (Tween). Dichas interacciones, en general, dieron lugar a un comportamiento sinérgico.

La interacción del CMP con el CasNa potenció las propiedades gelificantes y espumantes, mientras que su interacción con Tween potenció las propiedades emulsionantes de las mezclas, sin afectar la bioaccesibilidad de los lípidos.

En este trabajo se demostró que la singular capacidad del CMP de autoensamblarse en forma espontánea mediado por el pH, observado previamente en solución, se extiende también a emulsiones donde el CMP se encuentra formando parte de la película interfacial. Cuando interacciona con un co-emulsionante como el Tween 80, se logran emulsiones estables “inteligentes” que pasan del estado líquido al gelificado y viceversa por cambios de pH. Las emulsiones gelificadas pueden ser una alternativa para mejorar la protección de lípidos bioactivos o compuestos bioactivos solubles en la fase oleosa durante el almacenamiento y durante el tránsito por el aparato digestivo, asegurando una buena biodisponibilidad.

Sin dudas esto conlleva la necesidad de realizar futuros estudios en relación a la aplicabilidad de estos principios a emulsiones específicas.