



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencia Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica
Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN-UBA-CONICET)

Funcionalidad del quitosano argentino como matriz para ácido fólico en su relación con el agua, sistemas dispersos y aplicaciones

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Lic. Regina De Matteo

Director de Tesis: Dr. Oscar E. Pérez

Consejera de estudios: Dra. Sandra Ruzal

Lugar de trabajo: Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nanoherramientas, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, diciembre 2023

Resumen

“Funcionalidad del quitosano argentino como matriz para ácido fólico en su relación con el agua, sistemas dispersos y aplicaciones”

La industria pesquera de langostinos en el Mar Argentino genera residuos contaminantes para el medio ambiente. Un potencial uso de estos residuos es la obtención de quitosano argentino, generando alternativas que conduzcan a la reducción de la contaminación ambiental y aporten valor agregado. El objetivo de este trabajo de Tesis fue evaluar la funcionalidad y las propiedades de un quitosano argentino con particularidades moleculares específicas en sistemas acuosos, de baja humedad, en interfases aceite/agua y su *performance* como vehículo para una vitamina de interés público como la vitamina B9 o ácido fólico.

En primera instancia se estudió la interacción entre el quitosano y el ácido fólico: a) experimentalmente, mediante espectroscopías UV-visible, FTIR y difracción de rayos X; b) por estudios *in silico*, donde se determinó que las interacciones más fuertes a pH=5 fueron la interacción simultánea de uno de los carboxilatos del ácido fólico con a) un grupo amonio (C-2) del quitosano por interacción electrostática y, b) un grupo -OH adyacente al amonio (ya sea con un hidroxilo en C-3 adyacentes al mencionado amonio o con un hidroxilo en C-6 del azúcar vecino) por interacción tipo enlace de hidrógeno. La caracterización ultraestructural de los sistemas mixtos quitosano-ácido fólico en sistemas de baja humedad realizada mediante diferentes técnicas microscópicas de alta *performance* (AFM, SEM), demostraron microrregiones amorfas dadas principalmente por la matriz de quitosano generada en la que se embebe la vitamina, que presentó un patrón cristalino. Los sistemas mixtos quitosano-ácido fólico mostraron la habilidad de generar emulsiones estables en el tiempo a pesar de observarse una leve reducción de la tensión superficial en la interfase aceite/agua (O/W), formando *films* superficiales con carácter mayormente elástico. Al aplicarse los sistemas a modo de recubrimiento comestible en muestras de quesos de pasta blanda, se demostró que no tienen un impacto en sus características composicionales, fisicoquímicas, microbiológicas ni texturales. Además, la bioaccesibilidad del ácido

fólico se vio incrementada cuando se encontró en la matriz de quitosano y se pudo establecer una alternativa para fortificar este tipo de quesos con el AF, pudiendo constituir un verdadero alimento funcional.

Los resultados de esta Tesis doctoral permiten concluir acerca de la factibilidad de utilizar el quitosano argentino como vehículo para el ácido fólico, lo cual ofrece una alternativa para el aprovechamiento de los residuos de la pesca de crustáceos, y a su vez sentando las bases para el diseño de nuevas plataformas para el entrapamiento y la protección de compuestos bioactivos sensibles con aplicación en la industria alimentaria.

Palabras clave: quitosano argentino, ácido fólico, *docking*, dinámicas moleculares, sistemas dispersos, propiedades interfaciales, emulsiones, recubrimiento comestible, queso de pasta blanda, bioaccesibilidad.

Abstract

"Argentinian chitosan functionality of as a matrix for folic acid vehiculization focused on its relationship with water, in dispersed systems and some applications"

The shrimp fishing industry in the Argentine Sea generates polluting waste for the environment. A potential use of these wastes is to obtain Argentinian chitosan, generating alternatives that lead to the reduction of environmental pollution and provide added value. The objective of this Thesis work was to evaluate the functionality and properties of an Argentinian chitosan with specific molecular characteristics in aqueous systems, with low humidity, at oil/water interfaces (O/W) and its performance as a vehicle for a vitamin of public interest such as vitamin B9 or folic acid.

In the first instance, the interaction between chitosan and folic acid was studied: a) experimentally, using UV-visible, FTIR and X-ray diffraction spectroscopy; b) by *in silico* studies, where it was questioned that the strongest interactions at pH=5 were the simultaneous interaction of one of the carboxylates of folic acid with a) an ammonium group (C-2) of chitosan by electrostatic interaction and b) an -OH group adjacent to the ammonium (either with a hydroxyl at C-3 adjacent to the aforementioned ammonium or with a hydroxyl at C-6 of the neighboring sugar) by hydrogen bond type interaction. The ultrastructural characterization of the mixed chitosan-folic acid systems in low humidity systems using different high-performance microscopic techniques (AFM, SEM), demonstrated amorphous microregions given mainly by the chitosan matrix generated in which the vitamin is embedded, which presented a crystalline pattern. The mixed chitosan-folic acid systems showed the ability to generate stable emulsions over time despite observing a slight reduction in surface tension at the oil/water (O/W) interface, forming surface films with a mostly elastic character. By applying the systems as an edible coating on soft cheeses, it is shown that they do not have an impact on their compositional, physicochemical, microbiological, or textural characteristics. Furthermore, the bioaccessibility of folic acid was increased when it

was found in the chitosan matrix and an alternative could be established to fortify this type of cheese with FA, being able to constitute a true functional food.

The results of this doctoral Thesis allow us to conclude about the feasibility of using Argentinian chitosan as a vehicle for folic acid, which offers an alternative for the use of waste from crustacean fishing, and in turn laying the foundations for the design of new platforms for the trapping and protection of sensitive bioactive compounds with application in the food industry.

Key words: chitosan, Argentinian chitosan, folic acid, *docking*, molecular dynamics, dispersed systems, interfacial properties (O/W interface), emulsions, edible coating, soft paste cheese, bioaccessibility.

Agradecimientos

Al Dr. Oscar E. Pérez, por darme la posibilidad de realizar el doctorado, por sumarme a su grupo y por fomentar la visión interdisciplinaria en la investigación científica. Por transferirme muchísimos conocimientos y herramientas para la investigación. Por sus consejos, por guiarme y acompañarme en este largo proceso de aprendizaje y crecimiento.

A los Dres. Víctor Pizones Ruiz-Henestrosa y Cecilio Carrera Sánchez, por recibirme en su laboratorio en la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla. Gracias por su gran paciencia, por darme ánimos a cada rato y por respirar conmigo cuando los ensayos no salían los lunes. Por permitirme tener una experiencia enriquecedora científica, cultural y personalmente. A Estefa, Pau, Carlos, Manolo, Gaby y Clau por recibirme y hacer que la estancia sea amena.

A la Mg. Mariana Ugarte y al Lic. Daniel Scollo, por permitirme trabajar durante el distanciamiento social en el laboratorio Oscar Varsavsky, en mi querida Universidad Nacional de Lanús. Fue imprescindible para poder volver al trabajo experimental. A Juli V., Juli B., Gaby y Dani K. por todo el acompañamiento en cada uno de los ensayos de los quesos. Gracias por recibirme nuevamente con los brazos abiertos en mi primer laboratorio.

A la Dra. Carolina Schebor por compartir sus conocimientos, insumos e instalaciones para la realización de ensayos.

A las instituciones que hicieron posible la realización de esta Tesis. A CONICET por el otorgamiento de la beca doctoral, al instituto IQUIBICEN y a los Departamentos de Química Biológica y de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por contribuir con sus instalaciones para la ejecución de las tareas de investigación. A la AUIP por la beca de movilidad a España.

Al Dr. Patricio Santagapita, a la Dra. Florencia Di Salvo, al Lic. Juan Manuel Rey y la Dra. Victoria Gómez Andrade por su conocimiento, tiempo e insumos invertidos para la caracterización de los sistemas. Hicieron un aporte fundamental para esta Tesis.

A la Dra. Victoria Richmond y el Dr. Pau Arroyo Mañez por transmitirme toda su experiencia en el mundo bioinformática desde la distancia. Permitieron hacer avances muy importantes cuando no se podían hacer experimentos en físico. A Vicky por ser tan empática y cálida, por responder a cada una de mis preguntas.

A la Dra. Sandra Ruzal, por ser mi consejera de estudios y por la donación de la cepa *L. casei* BL23. A la Dra. Mariana Allievi por el asesoramiento en el ensayo con esta cepa.

A la Dra. Fernanda Gliemmo, por la gran ayuda con los ensayos de textura de quesos, por explicarme claramente y con paciencia.

A Lácteos Luz Azul por la donación de los quesos y por permitirme recorrer la planta de producción. Gracias sobre todo a la Lic. Lichu por su generosidad y por ser una gran guía turística.

A mis compas de docencia de OPE I: Santi, Vir y Edward, por apoyarme en la última etapa de escritura.

A mis compas del labo. A Pau por estar a mi lado en el proceso de aprendizaje en cultivo celular y por incentivar mi lado atlético. A Agus coincidir en la importancia de darle tu visión estética al contenido científico. A Caro por ayudarme con los ensayos de MTT y tener siempre lindas palabras. A Ro por su inmensa ayuda en los ensayos de antioxidantes, digestiones *in vitro* y bioaccesibilidad, gracias por tu tiempo y tu conocimiento. A Flor y Sofi por estar en la primera etapa y acompañar las tardes con un tecitos y risas. A Lean por aportar mucha paz y tranquilidad al labo, por responderme todas las preguntas con paciencia y ser un gran compañero de cursos. A Martín y Dani por la buena onda en esta comunidad transversal.

A lxs pi del ETI 1, por estar en esta última etapa. A Lau por llegar a descontracturar nuestras vidas, por ser mi compa de banco y hacerme sentir en el colegio de nuevo. A Sebas por ser un dulce, por escucharme y decirme siempre bellas palabras. A Dante por sus chistes que aseguraban las risas en el almuerzo. A Guille por ser un gran compañero de mates y papitas. A Maru por sus abrazitos y su cariño. A Chechu por compartir muchísimos momentos juntas dentro y fuera del labo, por los chocolatitos, tecitos, abrazitos, musiquita, playita y birritas compartidos. A Ale por bajarme a Tierra con su visión resolutiva, por bancarme siempre y ayudarme a que sea más simple llegar a la meta.

A Mai y Belu por estar presentes mandándome mensajitos preguntando cómo estaba y alentándome a seguir. A Ailu y Memi por alegrarme y despejarme con sus locuras, por estar del otro lado siempre. A Elsi y Cami por acompañarme y bancarme en todas, por ser oídos y estar siempre listas pal chismecito.

Al ex wacho por escucharme y ayudarme con mis primeras presentaciones y acompañarme. Por elegir y cuidar a los titos con mucho cariño.

A Tomy por ayudarme a encontrar mi hogar y a Vale por aportar con tu toque de diseño. A ambxs por acompañar a mis hermanxs.

A Tito y Piraña por ser mis motorcitos, por darme energía y alegría. Por el amor y compañía incondicional.

A mi familia, por ser facilitadora.

A Ren por los cafecitos para levantarme en pandemia, por ayudarme a resolver cuestiones financieras, por hacer posible que fuera a España. A Rena por las noches de hermanas en Rocamora y los almuerzos asegurados, por apoyarme y escucharme. A ambxs por ser mis hermanxs prefes.

A mamá y papá, por darme la vida. Por acompañar cada una de mis etapas y procesos, por incentivarme a crecer en todos los aspectos. Por estar siempre atentxs a lo que necesitamos los tres. Por el amor y el cariño dado en todas sus formas posibles.

**A mi familia,
mi factoría**

Publicaciones realizadas en el marco de esta Tesis

2023

- De Matteo R., Rey J.M, Corfield R., Gómez Andrade V.A., Santagapita P.R., Di Salvo F., Pérez, O. E. "Chitosan - folic acid mixed matrices. Structural characterization and vitamin bioaccessibility" Food Biophysics (2023). En revisión.

2020

- Di Santo M. C., Alaimo A., Domínguez Rubio A. P., De Matteo R., Pérez O. E. Biocompatibility analysis of high molecular weight chitosan obtained from *Pleoticus muelleri* shrimps. Evaluation in prokaryotic and eukaryotic cells. Biochemistry and Biophysics Reports, 24. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100842>

Participación en eventos científicos-tecnológicos nacionales e internacionales

2023

- **V Jornadas de Investigadores e Investigadoras en Formación Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología.** Universidad Nacional de Quilmes. Quilmes, Argentina. (Septiembre, 2023)
"Quitosano Argentino: performance en sistemas dispersos aire/agua y aceite/agua." **R. De Matteo**, V.M. Pizones Hernestrosa, C. Carrera Sánchez, O. E. Pérez.
Presentación de póster.

2021

- **IX Congreso de Alimentos Siglo XXI. I Jornada Patagónica de la Asociación de Nutricionistas de Chubut. XLIII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.** Comodoro Rivadavia, Argentina. (Octubre, 2021)
"Efecto ejercido por un coating comestible diseñado con quitosano argentino y ácido fólico en quesos de pasta blanda" **De Matteo R**, Visentini JV, Bregante J, Bustos LF, Ugarte MG, Pérez OE.
Presentación de resumen.
- **IX Congreso de Alimentos Siglo XXI. I Jornada Patagónica de la Asociación de Nutricionistas de Chubut. XLIII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.** Comodoro Rivadavia, Argentina. (Octubre, 2021)
"Complejos de proteínas de lactosuero bubalino nativas y desnaturalizadas con vitamina E" Bustos L, **De Matteo R**, Judis M, Vasile F, Pérez O
Presentación de resumen.

- **III jornadas de jóvenes bionanocientíficos.** JoBioN. CABA, Argentina. (Septiembre, 2021)
"Nanogeles de quitosano como sistemas de administración de ácido fólico para el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada con la Edad." Sebastián Bruno Previgliano, **Regina De Matteo**, Florencia Solana Buosi, Agustina Alaimo, Oscar Edgardo Pérez.
ISSN 2684-0618
 Presentación de póster.

- **IV Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencia y Tecnología – UNQ. (Modalidad online).** Universidad Nacional de Quilmes. (Marzo, 2021)
"Aplicación de coatings comestibles basados en quitosano y ácido fólico sobre quesos tipo cuartirolo" **R. De Matteo**, L. N. Rossi, M. G. Ugarte y O. E. Pérez.
 Presentación de video.

2020

- **1st zooming in to preclinical nanomedicines in the era of Covid19. (Modalidad online).** Nanomed-Ar. (Diciembre, 2020)
"High molecular weight chitosan based particles for folic acid encapsulation obtained via nanospray technology" **R. De Matteo**, C. C. Schebor, O. E. Pérez.
 Presentación de video.
- **Congreso de Química en Twitter. Internacional. (Modalidad online).** LatinXChem. (Septiembre, 2020)
"High Molecular Weight Chitosan as a functional biomaterial. Properties and cytotoxic evaluation" M.C. Di Santo, A. Alaimo, A. P. Domínguez Rubio, **R. De Matteo**, O. E. Pérez.
 Presentación de póster.
- **Congreso de Química en Twitter. Internacional. (Modalidad online)** LatinXChem. (Septiembre, 2020)
"Modelling approach of high molecular weight chitosan-folic acid interactions" **R. De Matteo**, V. Richmond, P. Arroyo Máñez, O. E. Pérez.
 Presentación de póster.
- **2ª Jornadas de Jóvenes Bionanocientíficos. (Modalidad online)** Universidad Nacional de San Martín. San Martín, Argentina. (Junio, 2020)
"Metodologías de formación de matrices basadas en quitosano para ácido fólico y su caracterización topográfica-nanoscópica" **R. De Matteo**, V. A. Gómez Andrade, O. E. Pérez.
 Presentación de resumen y asistente.

2019

- **XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.** Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. CABA, Argentina. *(Noviembre, 2019)*
“Caracterización de matrices basadas en quitosano para el confinamiento de ácido fólico.” **R. De Matteo**, V.A. Gómez Andrade, J.M. Rey, F. Di Salvo, C.C. Schebor, O.E. Pérez.
Presentación de póster y de trabajo completo.
- **XIII Simposio Argentino de Polímeros – SAP 2019.** CABA, Argentina. *(Octubre, 2019)*
“Quitosano Argentino Para Vehiculizar Bioactivos De Implicancia Nutricional Y Biomédica (ID 339)” **R. De Matteo**, M.C. Di Santo, P. Santagapita, R. Pozner, A. Alaimo, S.B. Pantano y O.E. Pérez.
Presentación oral.
- **Exploring the Frontiers of Chemistry: Challenges for the 21st Century.** Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina. *(Septiembre, 2019)*
“Folic acid embedded in argentinian chitosan: antioxidant capacity and cytotoxic effect in Caco-2” **R. De Matteo**, R. Corfield, C. C. Schebor, O. E. Pérez.
Presentación de póster.
- **III Congreso de Bromatología y Nutrición.** Universidad Nacional de Entre Ríos. Entre Ríos, Argentina. *(Septiembre, 2019)*
“Evaluación de la citotoxicidad y la topografía de matrices de quitosano para el confinamiento de ácido fólico.” **R. De Matteo**, V. A. Gómez Andrade, O. E. Pérez.
Presentación oral.
- **III Congreso de Bromatología y Nutrición.** Universidad Nacional de Entre Ríos. Entre Ríos, Argentina. *(Septiembre, 2019)*
“Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de un ingrediente funcional formulado con ácido fólico y proteínas lácteas.” **R. Corfield**, M. Allievi, A.P. Domínguez Rubio, **R. De Matteo**, C.C. Schebor, O. E. Pérez.
Presentación de póster.
- **IX Jornadas de Jóvenes Investigadores.** Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina. *(Junio, 2019)*
“Encapsulating folic acid: characterization of chitosan nano-vehicles as a food additive”. **R. De Matteo**, P. R. Santagapita, V. A. Gómez Andrade, C. C. Schebor, O. E. Pérez.
Presentación de póster.

2018

- **VIII Encuentro de Física y Química de Superficies.** Universidad Nacional de San Luis. San Luis, Argentina. *(Octubre, 2018)*

“Interacciones Ácido Fólico-Quitano. Estudio para el diseño de nanovehículos para la vitamina.” **R. De Matteo**, V. A. Gómez Andrade, M. A. Castañeda Cataña, C. C. Schebor, O. E. Pérez.

Presentación de póster.

- **3ra Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología.** Universidad Nacional de Quilmes. Quilmes, Argentina. (Agosto, 2018)

“Interacciones Ácido Fólico-Quitano. Estudio para el diseño de nanovehículos para la vitamina.” **R. De Matteo**, C. C. Schebor, M. A. Castañeda, O. E. Pérez.

Presentación de póster.

Índice

Resumen.....	2
Abstract	4
Agradecimientos	6
Índice	14
Nomenclatura y abreviaturas.....	19
Capítulo I: Introducción general.....	20
I.1. Quitosano	21
I.1.1. Obtención de Q a partir de desechos de crustáceos	22
I.1.2. Estructura química del quitosano	24
I.1.3. Solubilidad, grado de desacetilación (DD) y peso molecular (PM) del Q.....	25
I.1.4. Crecimiento global en el uso del Q	26
I.1.5. Q en la industria alimentaria.....	27
I.2. Ácido fólico (AF)	28
I.2.1. Estructura química del AF	28
I.2.2. Solubilidad del AF.....	29
I.2.3. Actividad biológica e impacto en la salud	30
I.2.4. Folatos en los alimentos.....	31
I.2.4.1. Fuentes naturales de folatos	31
I.2.4.2. Alimentos fortificados con AF	31
I.2.4.3. Estabilidad del AF y limitaciones de la fortificación directa de los alimentos.....	33
I.2.4.4. Estrategias para el enriquecimiento de alimentos	33
Hipótesis.....	35
Objetivo general de la Tesis	35
Capítulo II: Estudio de las propiedades e interacciones Q - AF en su relación con el agua y propiedades biológicas.....	36
II.1. Introducción	37
Objetivos particulares	39
II.2. Materiales y métodos	40
II.2.1. Materiales	40
II.2.2. Preparación de soluciones mixtas de Q-AF.....	40
II.2.3. Influencia del pH en la solubilidad del AF	41
II.2.4. Determinación de interacciones moleculares por espectroscopía UV	41
II.2.5. Estudio <i>in silico</i> de las interacciones moleculares Q-AF.....	41

II.2.5.1. Acoplamiento molecular o <i>docking</i>	45
II.2.5.2. Estudios de dinámica molecular.....	46
II.2.6. Actividad antioxidante de las soluciones mixtas Q-AF.....	46
II.2.6.1. Ensayo ABTS	48
II.2.6.2. Ensayo FRAP	48
II.2.7. Cultivo y propagación de líneas celulares	48
II.2.7.1. Ensayo de viabilidad celular	49
II.2.8. Preparación de sistemas mixtos en polvo Q - AF	51
II.2.9. Determinación del contenido de agua por método gravimétrico	51
II.2.10. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	51
II.2.11. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	52
II.2.12. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	53
II.2.13. Estructura cristalina	53
II.2.14. Bioaccesibilidad del AF. Digestión <i>in vitro</i> de sistemas liofilizados.....	53
II.2.15. Cuantificación de AF en sistemas liofilizados. Método microbiológico	56
II.2.16. Análisis estadísticos.....	59
II.3. Resultados	60
II.3.1. Describiendo el comportamiento del AF en agua	60
II.3.2. Simulaciones de dinámica molecular	64
II.3.3. Actividad antioxidante	68
II.3.4. Citotoxicidad. Viabilidad celular en línea celular Caco- 2	71
II.3.5. Contenido de humedad en muestras liofilizadas.....	75
II.3.6. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	76
II.3.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	81
II.3.8. Estructura cristalina.....	86
II.3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	91
II.3.10. Bioaccesibilidad de AF en sistemas liofilizados	94
II.4. Conclusiones parciales	97
Capítulo III: Sistema mixto Q – AF. Propiedades interfaciales (O/W) y desempeño en sistemas dispersos	99
III.1. Introducción	100
III.1.1. Formación de la película interfacial y adsorción a las interfases.....	100
III.1.2. Conformación espacial de las moléculas de los polímeros tensioactivos en la interfase	103
III.1.3. Sistemas dispersos: emulsiones	104
III.1.4. Sistemas dispersos: nanoemulsiones (NE)	105

III.1.5. Q como emulsionante	107
Objetivos particulares	108
III.2. Materiales y métodos	109
III. 2.1. Materiales.....	109
III. 2.1.1. Purificación del aceite de girasol	109
III.2.2. Determinación de la distribución de tamaños de partícula de la fase acuosa	109
III.2.3. Potencial- ζ	110
III.2.4. Propiedades de la interfase.....	112
III.2.4.1. Tensiómetro tipo Wilhelmy	112
III.2.4.2. Tensiómetro de gota.....	116
III.2.5. Sistemas emulsionados	119
III.2.6. Estabilidad de sistemas emulsionados.....	121
III.2.6.1. Determinación de la carga superficial de las gotas	121
III.2.6.2. Cambios en el tamaño de gota en la nano y microescala	122
III.2.6.3. Viscosidad de los sistemas emulsionados	123
III.3. Resultados	124
III.3.1. Isotermas de adsorción superficial de la interfase A/W en equilibrio.....	124
III.3.2. Tamaño de partículas y potencial- ζ de soluciones.....	128
III.3.2.1. Soluciones de Q.....	128
III.3.2.2. Soluciones mixtas Q-AF	132
III.3.3. Isotermas de adsorción en la interfase O/W	133
III.3.4. Adsorción de Q a la interfase O/W. Enfoque dinámico	135
III.3.5. Cinética de adsorción interfacial de soluciones mixtas Q-AF.....	142
III.3.6. Características dilatacionales interfaciales de Q.....	144
III.3.7. Características dilatacionales interfaciales de soluciones mixtas Q - AF	148
III.3.8. Estabilidad de las emulsiones O/W	151
III.3.8.1. Distribución del tamaño de gota	152
III.3.8.2. Potencial- ζ de emulsiones	160
III.3.8.3. Viscosidad de emulsiones	161
III.4. Conclusiones parciales	163
Capítulo IV: Sistema mixto quitosano – ácido fólico como <i>coating</i> aplicado en un queso de pasta blanda	165
IV.1. Introducción.....	166
IV.1.1. Industria quesera en la Argentina.....	166
IV.1.1.1. Exportación.....	166
IV.1.1.2. Mercado interno.....	166

IV.1.2. Definiciones según el CAA.....	167
IV.1.2.2. Valor nutricional	168
IV.1.2.2 Fortificación de quesos.....	169
IV.1.3. Textura de los quesos	171
IV.1.4. Quitosano como <i>film</i> y recubrimiento comestible	171
Motivación de este estudio.....	175
Objetivos particulares	175
IV.2. Materiales y métodos	176
IV.2.1. Materiales	176
IV.2.1.1. Quesos de pasta blanda	176
IV.2.2. Preparación de recubrimiento comestible (RC).....	178
IV.2.3. Procedimiento de aplicación de recubrimiento comestible sobre muestras de quesos de pasta blanda.....	178
IV.2.4. Caracterización fisicoquímica y composicional de muestras de quesos de pasta blanda.....	179
IV.2.4.1. Determinación de pH	179
IV.2.4.2. Determinación de actividad de agua (aw).....	180
IV.2.4.3. Determinación de contenido de sodio	180
IV.2.4.4. Determinación de contenido de humedad	181
IV.2.4.5. Determinación de contenido de proteínas.....	181
IV.2.4.6. Determinación de contenido de grasas.....	183
IV.2.4.7. Determinación de color superficial	183
IV.2.5. Caracterización de BAL en los quesos de pasta blanda	185
IV.2.6. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de muestras de queso	186
IV.2.7. Bioaccesibilidad del AF. Digestión in vitro de muestras de quesos	189
IV.2.8. Evaluación de la biodisponibilidad del AF.....	190
IV.2.9. Actividad antioxidante de los sobrenadantes de digeridos de queso	191
IV.2.10. Evaluación de viabilidad de células Caco-2 con sobrenadantes de digeridos de queso.....	191
IV.3. Resultados.....	192
IV.3.1. Caracterización fisicoquímica y composicional de los quesos de pasta blanda	192
IV.3.2. Caracterización del color y aspecto de los quesos de pasta blanda	197
IV.3.3. Cuantificación de BAL en las muestras de quesos de pasta blanda	204
IV.3.4. Estudio de la textura en las muestras de los quesos de pasta blanda.....	206
IV.3.5. Estudio de la bioaccesibilidad del AF	209
IV.3.6. Evaluación de la actividad antioxidante de los digeridos de quesos	210
IV.3.7. Evaluación de citotoxicidad de digeridos en Caco-2.....	212

IV.4. Conclusiones parciales	217
Conclusiones generales	218
Bibliografía	223

Nomenclatura y abreviaturas

Abreviatura	Significado
Q	Quitosano
QA	Quitosano argentino
QS	Quitosano comercial (marca Sigma Aldrich)
DD	Grado de desacetilación
PM	Peso molecular
AF	Ácido fólico
ABTS•+	Radical catión [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico)] Intensidad
QA-AF	Sistema mixto formado por quitosano argentino y ácido fólico
QS-AF	Sistema mixto formado por quitosano comercial (marca Sigma Aldrich) y ácido fólico
A/W	Interfase aire/agua
O/W	Interfase aceite/agua
NE	Nanoemulsión
RC	Recubrimiento comestible
qControl	Queso control, sin tratamiento
qQA	Queso tratado con recubrimiento comestible de quitosano argentino
qAF	Queso tratado con recubrimiento comestible de ácido fólico
qQA-AF	Queso tratado con recubrimiento comestible de quitosano argentino y ácido fólico
Control*	Digerido de agua, sobrenadante obtenido de la digestión simulada <i>in vitro</i>
qControl*	Digerido de queso control, sobrenadante obtenido de la digestión simulada <i>in vitro</i>
qQA*	Digerido de queso con recubrimiento comestible de quitosano argentino, sobrenadante obtenido de la digestión simulada <i>in vitro</i>
qAF*	Digerido de queso con recubrimiento comestible de ácido fólico, sobrenadante obtenido de la digestión simulada <i>in vitro</i>
qQA-AF*	Digerido de queso con recubrimiento comestible de quitosano argentino y ácido fólico, sobrenadante obtenido de la digestión simulada <i>in vitro</i>

Capítulo I: Introducción general

I.1. Quitosano

La investigación sobre el quitosano (Q) ha experimentado un crecimiento exponencial, en las últimas décadas y ha despertado interés por su amplia gama de aplicaciones posibles (Buosi y col., 2020). Se sabe que el Q y sus derivados encuentran aplicación en medicina, productos farmacéuticos, alimentos, cosméticos, agricultura, en las industrias textil y papelera. El Q es un candidato prometedor para aplicaciones industriales debido a su estructura molecular y sus propiedades biológicas y funcionales únicas, incluidas la solubilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y atoxicidad (Thambiliyagodage y col., 2023). Además presenta propiedades antimicrobianas y la capacidad de formar películas (Kenawy y col., 2019).

El Q es un polisacárido lineal obtenido a partir de la desacetilación de la quitina mediante un tratamiento alcalino fuerte. La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza luego de la celulosa, es un aminopolisacárido que se compone de monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos mediante enlaces glicosídicos β (1-4) (Knidri y col., 2018). La quitina está presente en las paredes celulares de los hongos, y en los exoesqueletos de insectos y arácnidos y caparazones de crustáceos como camarones, langostinos, cangrejos y langostas (Román-Doval y col., 2023).

Debido a la gran cantidad de desechos producidos por la industria pesquera, los exoesqueletos de crustáceos son la principal fuente de producción a granel de quitina y Q (Huq y col., 2022). Dichos desechos ocasionan problemas para el medio ambiente porque contribuyen a la eutrofización de aguas y a la propagación de patógenos, ya que aportan cantidades excesivas de nutrientes al mar y son fácilmente colonizados. La obtención de Q surge como una solución, al menos parcial, a esta problemática dando una revalorización a los residuos y promoviendo un modelo de economía circular en la industria alimentaria (Mou y col., 2020).

Los desechos de los crustáceos son el exoesqueleto y cefalotórax; representan alrededor del 50-70% del peso de la pesca y están conformados principalmente por proteínas (30-40%), carbonato de calcio (CaCO_3) (30-50%) y quitina (20-30%), además

contienen pigmentos de naturaleza lipídica como los carotenoides (astaxantina, astatina, cantaxantina, luteína y caroteno) (Duan y col., 2019; Huq y col., 2022).

I.1.1. Obtención de Q a partir de desechos de crustáceos

Los métodos de obtención de Q a partir de desechos de crustáceos comprenden tres etapas principales: (1) desmineralización, (2) desproteínización y (3) desacetilación de la quitina. El hecho de que las proteínas estén vinculadas a la quitina limita sus aplicaciones, ya que las proteínas desencadenan la respuesta inmune en el usuario, lo que genera restricciones en el uso de la quitina para aplicaciones biológicas. Por tanto, la eliminación de proteínas es de gran importancia (Younes y Rinaudo, 2015). Como paso previo, los residuos marinos deben ser lavados, secados y molidos de forma tal que se obtenga una mayor superficie de contacto, favoreciendo las reacciones químicas (Kou, Peters y Mucalo, 2021). Algunos estudios señalan la decoloración como paso intermedio, pero es considerado una etapa trivial (Thambiliyagodage y col., 2023). Estos métodos pueden clasificarse en método químico y métodos biológicos, cuyos pasos están simplificados en la **Figura I.1**.

El método químico consiste en etapas de incubación de los residuos de crustáceos con ácidos y bases concentrados para la separación de los minerales y las proteínas; tiene una eficiencia alta, es rápido y es económico, aunque los efluentes pueden ser muy contaminantes si no se disponen correctamente (Kou, Peters y Mucalo, 2021). Por otra parte, los métodos biológicos pueden ser enzimáticos o por fermentación con bacterias. En el método enzimático la etapa de desmineralización se realiza con ácido concentrado, como en el método químico (Muñoz Ruiz y Zuluaga Corrales, 2017); para la desproteínización y desacetilación se utilizan enzimas purificadas obtenidas de microorganismos o de los intestinos de peces (Younes y Rinaudo, 2015). Si bien por este método las condiciones son mucho más suaves, la principal limitación de este método es el alto costo operativo, además presenta una menor eficiencia (Kou, Peters y Mucalo, 2021). Para resolver el problema económico de las enzimas, se han desarrollado métodos de fermentación. Los microorganismos, bajo condiciones de reacción optimizadas, se multiplican mientras liberan enzimas en reactores. La etapa de desmineralización se realiza mediante el uso de bacterias lácticas o bacterias

productoras de otros ácidos orgánicos (Arbia y col., 2013). En las siguientes etapas se utilizan bacterias productoras de enzimas proteolíticas, desacetilasas o quitosanasas. La principal desventaja que presenta este método es el tiempo de producción, ya que tienen una duración aproximada de 7 días (Arbia y col., 2013; Kou, Peters y Mucalo, 2021).

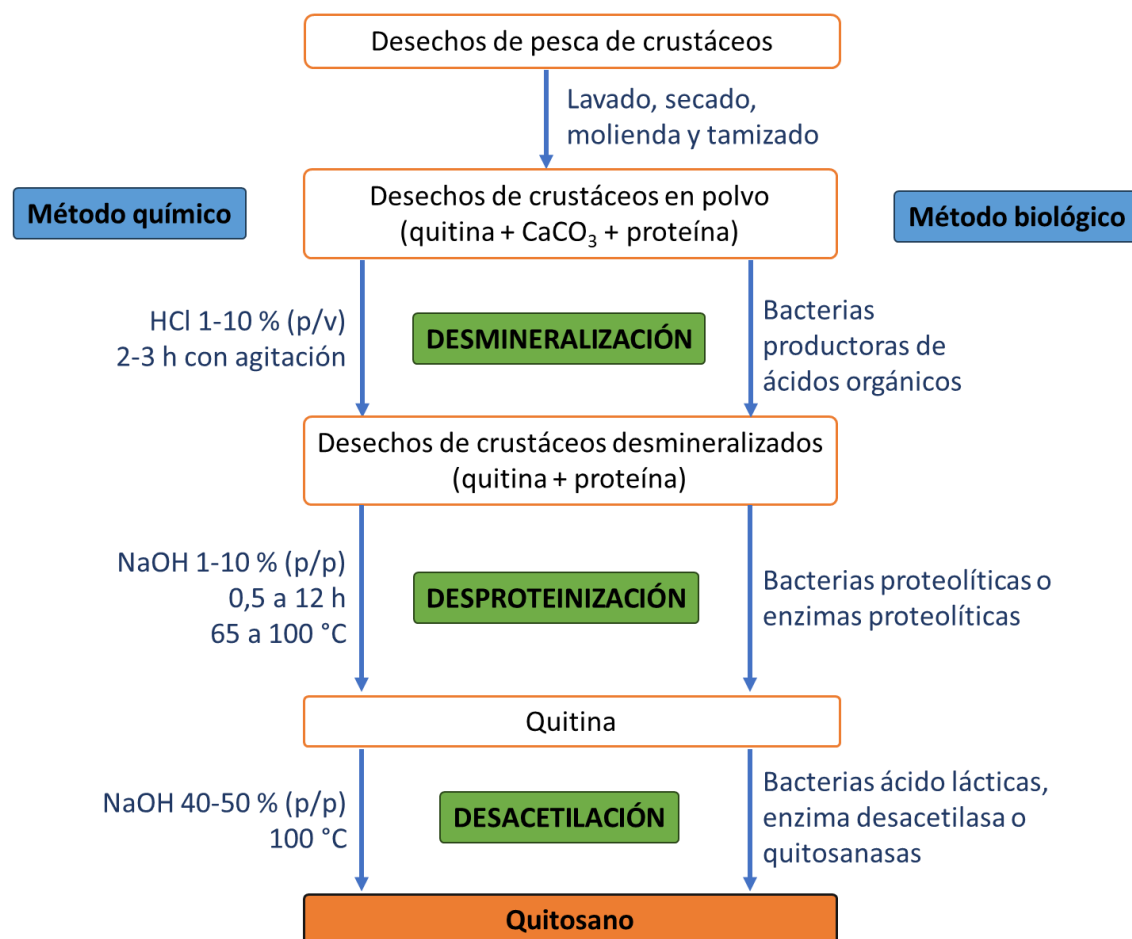


Figura I.1. Métodos de obtención de Q, químico y biológico a partir de residuos de crustáceos. Tomado de Kou y col. (2021) y Kim y col. (2011) con modificaciones.

En estudios recientes se han informado métodos novedosos más ecológicos para el procesamiento de desechos de crustáceos para la obtención de Q. Estos nuevos procesos incluyen el tratamiento con agua caliente (Margoutidis y col., 2018; Yang y col., 2019), el tratamiento mecánico-químico en estado sólido (Li y col., 2017; Chen y col., 2017) y el tratamiento con glicerol (Devi y Dhamodharan, 2018). Estos métodos pueden reducir en gran medida las cantidades de consumo de productos químicos y la generación de aguas residuales.

I.1.2. Estructura química del quitosano

En el proceso de desacetilación de la quitina una fracción de los monómeros de N-acetil-D-glucosamina pierde el grupo acetilo y otra fracción lo mantiene, obteniéndose como producto el Q. El Q es un aminopolisacárido lineal compuesto por una sucesión aleatoria de unidades de 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa (D-glucosamina desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glicosídicos β (1-4) (Buosi y col., 2020) (**Figura I.2**).

La fracción porcentual de las unidades repetidas N-acetiladas se define como el grado de acetilación (DA), mientras que el porcentaje de las unidades de 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa en el Q se define como el grado de desacetilación (DD) (Duan y col., 2019). Aunque las publicaciones actuales no tienen consenso con respecto al límite de los valores de DD entre quitina y Q, generalmente está entre 40 y 75%, y la mayoría de los Q comerciales presentan valores de DD entre 70-90% (Kou, Peters y Mucalo, 2021). El grado de polimerización (GP) se define como el número de unidades monoméricas en el polímero. Se calcula como la relación entre el peso molecular de un polímero y el peso molecular de la unidad repetida (Shrivastava, 2018).

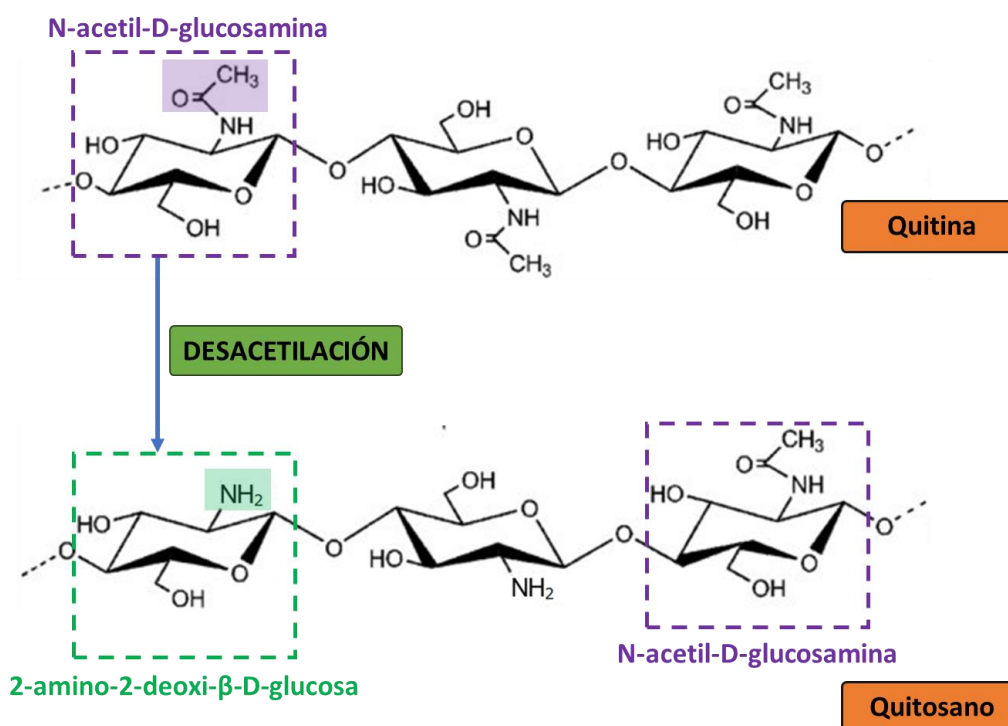


Figura I.2. Estructura de la quitina y el quitosano. Tomado de Nilsen-Nygaard y col. (2015) con modificaciones.

I.1.3. Solubilidad, grado de desacetilación (DD) y peso molecular (PM) del Q

Si bien la quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, el Q es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6,0. Esto se debe a que el Q puede considerarse como una base fuerte, ya que posee grupos amino primarios con un valor de pK_a de 6,3 (Duan y col., 2019). La presencia de los grupos amino indica que el pH altera sustancialmente el estado de carga y las propiedades del Q (Elsabee y Abdou, 2013). A un pH menor al pK_a , las aminos se protonan y se cargan positivamente, lo que convierte al Q en un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por otro lado, a medida que el pH aumenta por encima del pK_a , las aminos del Q se desprotonan y el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble (**Figura 1.3**). La transición soluble-insoluble ocurre en su valor de pK_a alrededor de un pH entre 6,0 y 6,5 (Duan y col., 2019). La solubilidad del Q está influenciada por el DD, la concentración de Q, el PM y la temperatura de disolución (Qiao y col., 2021), mientras que el grado de ionización depende del pH y del pK_a del ácido que provoca la protonación del Q (Duan y col., 2019). Las propiedades de la solución de Q dependen no solo de su DD, sino también de la distribución de los grupos acetilo en la cadena principal (Younes y Rinaudo, 2015).

Generalmente, el Q es soluble en soluciones ácidas como el ácido clorhídrico y varios ácidos orgánicos, incluidos los ácidos acético, butírico, fórmico, málico, cítrico, láctico, oxálico, propiónico y succínico (Zhong, Song y Li, 2011; Qiao y col., 2021). La flexibilidad de la cadena del Q es sensible al tipo de contraiones ácido (Chen y col., 2009) por lo cual el tipo de disolvente tiene una influencia importante en las propiedades reológicas de las soluciones e hidrogeles de Q (Lakehal y col., 2019; Soares y col., 2019). El disolvente más comúnmente reportado es el ácido acético al 1% a un pH 4,0 aproximadamente, sin embargo, las soluciones concentradas de ácido acético a altas temperaturas pueden provocar la despolimerización del Q (Pillai, Paul y Sharma, 2009). Además del DD, el PM también es un parámetro importante que controla significativamente la solubilidad y las propiedades del Q (Chang y col., 2015).

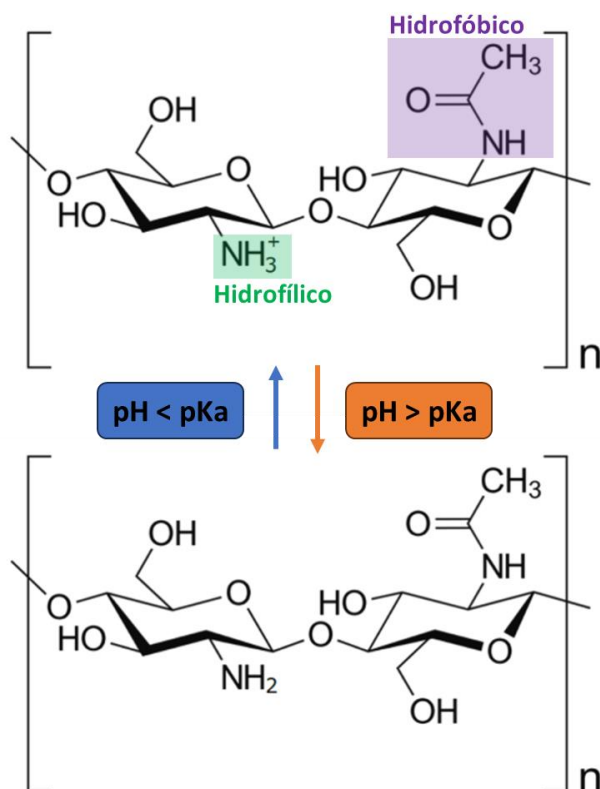


Figura I.3. Forma protonada y desprotonada del Q en función del pH del medio. Tomada de Sharkawy y col. (2020) con modificaciones.

La mayoría de los Q comerciales tienen pesos moleculares que oscilan entre 50 y 2000 kDa. Según su PM, los Q pueden agruparse en Q de bajo PM (<150 kDa), Q de PM medio (150-700 kDa) y Q de alto PM (>700 kDa) (Román-Doval y col., 2023). El alto PM y el alto DP del Q dan como resultado una baja solubilidad a pH neutro. Los Q con DP <20 y un PM inferior a 3,9 kDa se denominan quitooligosacáridos (COS), son solubles en agua, tienen diversas aplicaciones, como antimicrobianos, antioxidantes y antitumorales (Gonçalves, Ferreira y Lourenço, 2013).

I.1.4. Crecimiento global en el uso del Q

Los principales países o regiones productoras de Q son EE. UU., Canadá, Japón, Europa y Asia- Pacífico (Issahaku, Tetteh y Tetteh, 2022). El mercado global de Q creció de \$601 mil millones en 2022, a \$6,84 mil millones en 2023 a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 13,8 %. Se espera que el mercado de Q crezca a \$ 14,67 mil millones en 2027 a una tasa compuesta anual de 21,0 %. El impulsor del

crecimiento del mercado de Q es la amplia posibilidad de aplicación del biopolímero en el tratamiento de aguas y varias industrias de alto valor como la farmacéutica, biomédica, cosmética y alimentaria. Algunas de las áreas de interés identificadas incluyen la modificación del biopolímero para ampliar su aplicabilidad, el conocimiento de los mecanismos implicados en la actividad biológica del Q, derivados del Q y COS y el estudio en profundidad de las enzimas con actividad lítica en Q y quitina presentes en diferentes microorganismos (Aranaz y col., 2021). En los últimos 20 años ha habido un incremento en el número de publicaciones y patentes referidas al Q (Thambiliyagodage y col., 2023).

I.1.5. Q en la industria alimentaria

Las aplicaciones del Q en la industria alimentaria están condicionadas por aspectos regulatorios y actualmente su aplicación en esta área es limitada. El Q ha sido aprobado como aditivo alimentario en algunos países de Asia, como Japón (1983), Corea (1995) y China (2007). En Europa, el Q todavía no está permitido como material en contacto con alimentos; aunque la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) decidió que el Q está suficientemente bien caracterizado para mantener concentraciones normales de colesterol de lipoproteínas de baja densidad en sangre (Butnaru y col., 2019). La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) detalla un listado de ingredientes y aditivos bajo el estado de generalmente reconocidos como seguros (GRAS). El Q de origen fúngico (*Aspergillus niger*) se considera GRAS para su uso como coadyuvante alimentario en la producción de bebidas alcohólicas en niveles entre 10 y 500 g por 100 L (Klinkesorn, 2013). El Q derivado de crustáceos marinos ha recibido el estatus GRAS para aplicación en alimentos y bebidas en 2002, 2005 y 2013, pero los avisos fueron retirados posteriormente (Ahire y col., 2013; FDA, 2023). El Código Alimentario Argentino (CAA) no contempla actualmente la inclusión del Q como ingrediente o coadyuvante en alimentos.

Los principales problemas regulatorios incluyen la heterogeneidad estructural de los Q, grandes variaciones en los lotes, posibles impurezas en las muestras y la procedencia de materias primas potencialmente alergénicas, como lo son los exoesqueletos de crustáceos (Nilsen-Nygaard y col., 2015). Actualmente, no existen productos

farmacéuticos, biofarmacéuticos o productos alimenticios que contengan Q aprobados por la FDA. Sin embargo, la FDA ha aprobado varios dispositivos médicos y productos combinados a base de Q como apósitos tópicos para heridas y apósitos para heridas que contienen antimicrobianos. En la Unión Europea (UE), el Q está aprobado para uso biomédico como excipiente en la administración nasal de medicamentos y vacunas (Nilsen-Nygaard y col., 2015; Aranaz y col., 2021).

Las aplicaciones alimentarias más importantes del Q que se están estudiando actualmente son la inmovilización de enzimas, encapsulación de compuestos bioactivos y diseño de nutracéuticos, clarificación y desacidificación de jugos de frutas y bebidas alcohólicas, fibra dietética, industria de *films* y recubrimientos comestibles, agentes estabilizadores de color, agentes antimicrobianos y agentes espesantes, gelificantes y emulsionantes (Padmaja y Bhatt, 2020).

El Q empleado en este trabajo fue obtenido en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Tecnología Industrial (INTI), filial Mar del Plata a través de un proyecto conjunto entre dicho laboratorio y el Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nano-Herramientas. El objetivo del proyecto fue escalar la producción de Q por método químico hasta un nivel de planta piloto y al mismo tiempo emplear el biopolímero como material encapsulante de bioactivos de valor para la industria alimentaria y farmacéutica. Dicho convenio quedó consolidado en el marco de un subsidio de tipo PICT Start Up (Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica Start Up) en 2016, cuyo título fue “Quitosano argentino para el desarrollo de nanocápsulas de tipo core-shell destinadas a la protección y liberación controlada de bioactivos”.

I.2. Ácido fólico (AF)

I.2.1. Estructura química del AF

El AF puede clasificarse dentro del grupo “folato” o “vitamina B9”, que se utiliza como descriptor genérico para un grupo de compuestos o vitámeros que exhiben actividad vitamínica similar en humanos (NIH, 2023). Los folatos consisten en una estructura básica compuesta por un anillo de pteridina unido a través de un puente metileno a

una molécula de ácido p-aminobenzoico conjugada con una molécula de ácido glutámico. A partir de ésta, unidades adicionales de ácido glutámico se pueden añadir mediante enlaces γ -peptídicos para dar formas poliglutámicas (Ebara, 2016). En la mayoría de los folatos naturales, el número de unidades de ácido glutámico en la cadena lateral varía de 5 a 8. El AF es la forma monoglutámica oxidada de la vitamina (Figura I.5), es un compuesto obtenido por síntesis química ya que se encuentra escasamente en la naturaleza. Es la forma más empleada comercialmente en suplementos y alimentos fortificados pues es más estable y de fácil absorción (Ruiz-Rico y col., 2017).

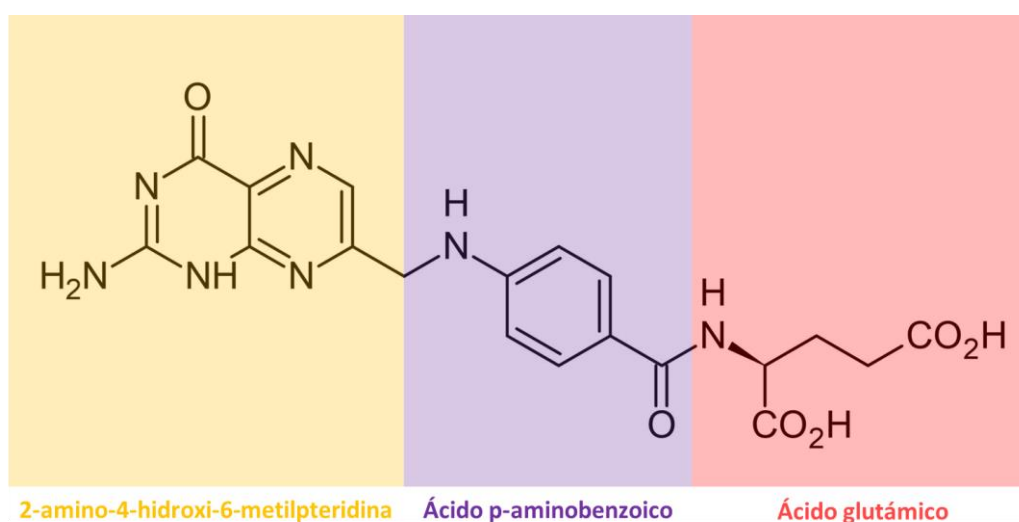


Figura I.5. Estructura del ácido fólico.

I.2.2. Solubilidad del AF

El AF es un polvo de color amarillo-anaranjado, inoloro e insípido. Presenta limitada solubilidad en agua aunque es hidrofílico y soluble en soluciones acuosas ácidas y alcalinas, es insoluble en solventes orgánicos (Tuszyńska, 2012). Según investigaciones, a pesar de ser hidrofílico, el AF puede auto-ensamblarse a concentraciones bajas (0,1% p/p) mediante interacciones de *autostacking* y puentes de hidrógeno (Figura I.6) (Gottarelli y col., 1994; Motkar y col., 2012).

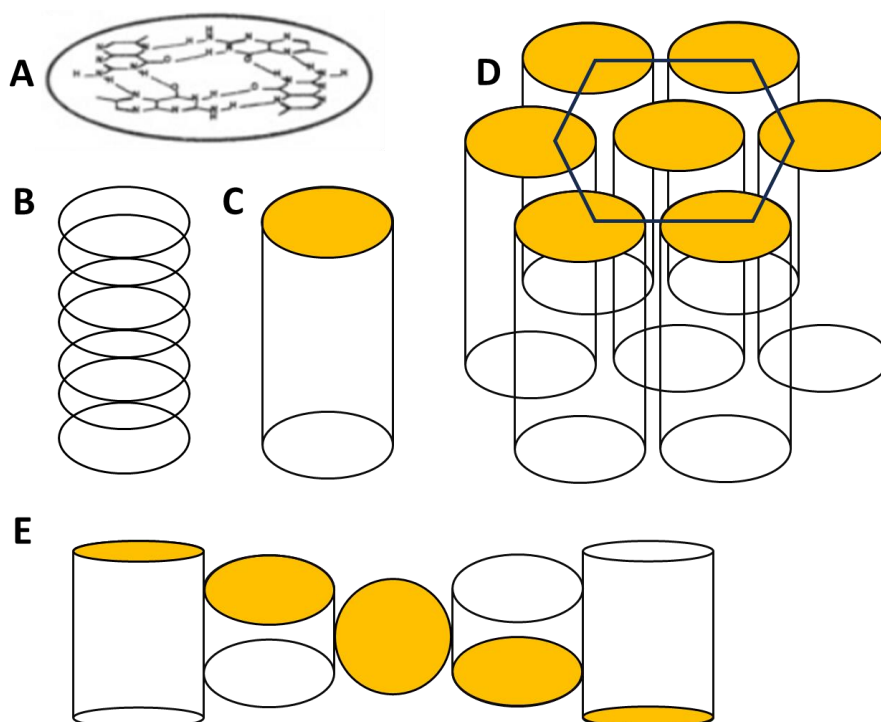


Figura I.6. Modelo de formación de las mesofases columnares a partir de folato. Los tetrameros de los residuos de folato (A) se acumulan (B) para formar columnas (C). Las columnas pueden autocorrelacionarse para generar una mesofase de orden hexagonal (D) o colestérico (E). Tomado de Gottarelli y col. (1994) con modificaciones.

I.2.3. Actividad biológica e impacto en la salud

Los folatos en los sistemas vivos actúan como cosustrato o coenzima en reacciones de transferencia de carbono en la síntesis de ácidos nucleicos (ADN, ARN) y en el metabolismo de aminoácidos (Ross y col., 2012). Además, participan en el catabolismo de Hys y Gly, la conversión de homocisteína en metionina, la conversión de Gly-Ser y la síntesis de proteínas al participar en la reacción de formilación de metionina. Otro proceso que se ve influenciado por la presencia de folato es la metilación del desoxiuridilato para formar timidilato en la síntesis de ADN, particularmente en células de alta tasa de proliferación, como son los glóbulos rojos y las células epiteliales gastrointestinales (Olivares y col., 2004).

Se han publicado numerosos trabajos que estudian el impacto de los bajos niveles de AF y han demostrado que la administración periconcepcional de AF ayuda a prevenir la aparición y recurrencia de muchas anomalías congénitas, incluidos defectos del tubo neural, especialmente la anencefalia y la espina bífida, el bajo peso al nacer, el paladar

hendido, la anemia megaloblástica, enfermedad vascular oclusiva y otras patologías (Luo y col., 2017). La falta de folatos también puede provocar deterioro cognitivo a medida que las personas envejecen, está relacionado con la disfunción cognitiva como resultado del envejecimiento. Esto puede ser debido a una ingesta y/o una absorción inadecuadas de la vitamina o destrucción de la misma en el tracto gastrointestinal (Sijlmasi, 2019). Los humanos y los animales no pueden sintetizar folato *de novo* y deben obtener esta vitamina de su dieta (Fitzpatrick y col., 2012).

I.2.4. Folatos en los alimentos

I.2.4.1. Fuentes naturales de folatos

Los folatos pueden encontrarse en muchos alimentos naturales, como legumbres, levadura, frutas, cítricos y verduras de hojas verdes (Muhamad Nor y col., 2010). También está presente en alimentos de origen animal, como la leche, el hígado y los riñones (Bourassa, Hasni y Tajmir-Riahi, 2011). Sin embargo, parte del folato de los alimentos naturales puede destruirse durante el proceso de cocción, especialmente con altas temperaturas y/o tiempos de tratamiento térmico prolongados (Sijlmasi, 2019).

I.2.4.2. Alimentos fortificados con AF

Según el Código Alimentario Argentino los alimentos fortificados son un tipo de alimento dietético y se encuentran dentro de la categoría “Alimentos para satisfacer necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas”. Los alimentos fortificados están definidos en el Art. 1363 de la *Resolución Conjunta SPyRS N° 118/2008* y *SAGPyA N° 474/2008* como “aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente”. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre 20 y 100 % de los Requerimientos Diarios Recomendados para vitaminas hidrosolubles. Los nutrientes incorporados deberán:

- Ser estables en el alimento en las condiciones habituales de almacenamiento, distribución, expendio y consumo y presentar una adecuada biodisponibilidad.

- No presentar incompatibilidad con ninguno de los componentes del alimento ni con otro nutriente agregado.
- Estar presente en niveles tales que no ocasionen una ingesta excesiva por efecto acumulativo a partir de otras fuentes de la dieta.

Las recomendaciones de ingesta diaria de AF varían según el grupo etario y se detallan en la **Tabla I.2.**

Tabla I.2. Ingesta diaria recomendada para AF por grupo etario.

Grupo etario		Ingesta diaria recomendada* (µg FDE**)
Lactantes	0-6 meses	65
	7-12 meses	80
Niños/as	1-3 años	150
	4-8 años	200
	9-13 años	300
Adolescentes	14-18 años	400
Adultos/as		400
Gestación		600
Lactancia		500

* Human Vitamin and Mineral Requirement, FAO/WHO, 2002.

** Donde FDE significa “Folato Diario Equivalente” y refleja las diferentes biodisponibilidades de los folatos dependiendo de su origen. En este sentido, 1 µg FDE = 1 µg de folato alimentario = 0,6 µg AF (en alimentos fortificados o suplementos consumidos con alimentos) = 0,5 µg AF (en suplementos dietéticos tomados con el estómago vacío).

La base científica que respalda el uso del AF como una estrategia de prevención para las enfermedades del tubo neural ha dado lugar al desarrollo de enfoques a gran escala en salud pública con el objetivo de aumentar la ingesta de la vitamina. Estos enfoques de prevención abarcan la suplementación farmacológica, la fortificación de alimentos básicos, como los cereales, ya sea de manera voluntaria u obligatoria, y campañas diseñadas para fomentar el consumo de alimentos naturalmente ricos en folatos (Samaniego-Vaesken y col., 2010). La obligación de fortificar alimentos con AF

se extiende a nivel global en un total de 40 países (Samaniego-Vaesken y col., 2010), incluyendo países como Estados Unidos, Canadá, China, Australia, Irlanda y el Reino Unido (Martin y col., 2010). En Argentina, a partir del año 2002 y conforme a la Ley 25.630, la harina destinada al consumo que se encuentra disponible en el mercado debe ser enriquecida con una concentración de 2,2 mg/kg de ácido fólico, además debe estar suplementada con hierro, tiamina, riboflavina y niacina (ANMAT, 2002).

I.2.4.3. Estabilidad del AF y limitaciones de la fortificación directa de los alimentos

El grado y la velocidad de destrucción de los folatos en los alimentos están influenciados por el pH del medio, el tipo de *buffer*, la matriz alimentaria, la temperatura, los ambientes reductores u oxidativos y la incidencia de la luz ultravioleta y visible (Gazzali y col., 2016). Estos factores plantean un desafío para la suplementación de alimentos con AF. Además, debido al carácter más inestable del AF en medios ácidos que en medios alcalinos, es previsible su degradación prematura en el pH gástrico antes de llegar a su sitio de absorción. De hecho, la tendencia del AF a degradarse rápidamente en condiciones de pH bajo junto con su baja solubilidad en agua afectan negativamente su biodisponibilidad después de la administración oral (Jafari y McClements, 2017). En este sentido, el enriquecimiento directo de los alimentos es limitado. Para superar esta problemática, la administración protegida, controlada y dirigida de AF sería una estrategia beneficiosa para mejorar su estabilidad, solubilidad, vida útil y absorción en su sitio específico (Pamunuwa y col., 2020; Fathima y col., 2022).

I.2.4.4. Estrategias para el enriquecimiento de alimentos

Investigaciones científicas han demostrado que la interacción de compuestos bioactivos con polímeros, tales como polisacáridos o proteínas, puede emplearse como un enfoque eficaz para potenciar la estabilidad, eficacia en la administración y biodisponibilidad de dichos compuestos. Desde este punto de vista, los trabajos se centran en el diseño de matrices comestibles como las nano o microcápsulas como vehículo para agentes bioactivos (Jafari y McClements, 2017; Ochnio y col., 2018; Martínez y col., 2019; Bustos y col., 2022), micro o nanoemulsiones (Salvia-Trujillo y

col., 2017) y *films* y recubrimientos comestibles (Mohamed, El-Sakhawy y El-Sakhawy, 2020), que facilitan la liberación lenta y/o controlada en un sitio específico (Boostani y Jafari, 2020).

Hipótesis

Es posible generar una matriz-recubrimiento a base de quitosano argentino capaz de entrapar, vehiculizar y proteger al ácido fólico de condiciones ambientales y fisiológicas adversas para la vitamina, sin alterar su bioaccesibilidad.

Objetivo general de la Tesis

El objetivo de este trabajo de Tesis fue evaluar la funcionalidad y las propiedades de un quitosano argentino con particularidades moleculares específicas en sistemas acuosos, de baja humedad, en interfases aceite/agua y su *performance* como vehículo para una vitamina de interés público como el ácido fólico.

Capítulo II: Estudio de las propiedades e interacciones Q - AF en su relación con el agua y propiedades biológicas

II.1. Introducción

Las interacciones entre los polisacáridos y las vitaminas desempeñan un papel de gran importancia en la estructura y la estabilidad de numerosos productos farmacéuticos y alimentarios (Misra y col., 2022). El control y la modulación de estas interacciones macromoleculares representan un factor crucial en el diseño de nuevas matrices medicinales e ingredientes alimentarios, tanto en su etapa de desarrollo como en su formulación (Jones y col., 2010; Liping y col., 2020). Las moléculas de agua también juegan un papel importante en el empaquetamiento, la conformación y las propiedades mecánicas de los materiales a base de polisacáridos. Específicamente, en formas hidratadas de Q, la estructura de empaquetamiento se puede estabilizar mediante varios enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua sin interacciones directas entre las láminas (Franca y col., 2008).

El análisis de las interacciones entre polisacáridos y compuestos bioactivos implica la obtención de diversos parámetros termodinámicos y cinéticos, como la afinidad de unión, los mecanismos de enlace, las constantes estequiométricas, la naturaleza y las fuerzas de unión, así como las distancias de equilibrio, entre otros. En este marco, las técnicas espectroscópicas desempeñan un papel fundamental, ya que permiten estudiar minuciosamente estas interacciones a nivel molecular (Ramos y col., 2019). Muchos autores sugieren la aplicación de un enfoque multi-instrumental, es decir, la combinación de diversas técnicas analíticas instrumentales y complementarias para obtener una visión integral de las interacciones entre el *carrier* y el ligando. Además, resulta de gran interés comprender la disposición espacial de las moléculas involucradas. Desde esta perspectiva, las herramientas computacionales, como el *docking* y la dinámica molecular, contribuyen a predecir la ubicación y la manera en que el compuesto bioactivo interactúa con el polisacárido (Tang, 2020). Para evaluar la factibilidad de aplicación en alimentos o fármacos, la caracterización de las matrices debe ser acompañada con el estudio de la citotoxicidad utilizando un modelo celular acorde, así como con la evaluación de la bioaccesibilidad del compuesto bioactivo.

El término bioaccesibilidad se refiere a la parte de compuestos liberados de los alimentos en el tracto gastrointestinal, que luego de procesos digestivos pueden ser

absorbidos por el epitelio intestinal (Carbonell-Capella y col., 2014; Shahidi y Peng, 2018). Generalmente, la eficacia de este proceso se indica como un porcentaje de los compuestos liberados en el tracto intestinal en relación con el total presente (Shahidi y Peng, 2018). Mientras tanto, la biodisponibilidad se centra en la acción biológica de un compuesto específico en el cuerpo (Carbonell-Capella y col., 2014; Gutiérrez-Grijalva y col., 2016; Shahidi y Peng, 2018). Esto implica su proceso de digestión, absorción, metabolismo, distribución en los tejidos y su efecto biológico (Carbonell-Capella y col., 2014).

Para investigar la bioaccesibilidad de un compuesto, se suelen emplear métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión. Estos métodos son más rápidos, económicos y menos laboriosos que los estudios *in vivo*, además de no tener restricciones éticas asociadas (Minekus y col., 2014). Existe un esfuerzo por parte de la comunidad científica para estandarizar los protocolos de digestión *in vitro*, de modo que se puedan establecer comparaciones entre laboratorios, así como también desarrollar modelos anatómicos dinámicos precisos (Madalena y col., 2022). El método de digestión *in vitro* de alimentos más popular actualmente es el denominado método INFOGEST (Brodkorb y col., 2019; Minekus y col., 2014). Su amplia adopción se debe principalmente a su capacidad para simular con precisión aceptable el tracto gastrointestinal humano y a su relativa sencillez de aplicación. Además, su reproducibilidad se ha confirmado mediante exhaustivas comparaciones entre diferentes laboratorios. Este enfoque puede ser utilizado para seguir la cinética de la digestión de proteínas, almidones y lípidos en las diversas porciones del tracto gastrointestinal, así como para evaluar la estabilidad, liberación y accesibilidad de compuestos bioactivos en condiciones gastrointestinales (Brodkorb y col., 2019).

Objetivos particulares

- Determinar las propiedades fisicoquímicas relevantes del sistema mixto quitosano argentino-ácido fólico en agua. Estas propiedades incluyen constantes de asociación experimentales e *in silico*.
- Determinar las interacciones moleculares a nivel de grupos funcionales del quitosano y el ácido fólico a partir de *docking* y dinámicas moleculares.
- Estudiar el impacto del QA, QS y AF en la viabilidad celular de células del epitelio intestinal (Caco-2).
- Caracterizar los sistemas de baja humedad Q-AF mediante herramientas experimentales clásicas con vistas al diseño de una matriz alimentaria deshidratada.
- Evaluar la bioaccesibilidad del AF en los sistemas mixtos Q-AF deshidratados por liofilización.

II.2. Materiales y métodos

II.2.1. Materiales

El quitosano argentino de peso medio molecular (QA), con un peso molecular promedio de 264 kDa y un grado de desacetilación (DD) del 72% fue producido por el Laboratorio de Microbiología de INTI Mar del Plata (Mar del Plata, Argentina) en el marco del PICT Start Up 2017 – 3866, del cual el Dr. Oscar E. Pérez fue el Investigador Responsable. El QA fue sometido a un proceso de purificación antes de su uso. Brevemente, el polvo se disolvió en ácido acético 1% p/p, se lo precipitó mediante el agregado de NaOH 4N hasta alcanzar un pH de 7 y se lo lavó con agua bidestilada, sobre un papel de filtro (Mukhopadhyay y col., 2013). Para su secado se agregó etanol y se depositó sobre un vidrio de reloj en una estufa a 40°C, hasta su completa deshidratación.

A fines comparativos se usó quitosano comercial (QS) de bajo peso molecular, 90-150 kDa y DD del 75-85% de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El ácido fólico (AF) con una pureza del 99,2% fue amablemente donado por Laboratorios Bagó S.A, Argentina.

Todos los demás reactivos fueron de calidad analítica y se utilizó agua MilliQ en todos los experimentos.

II.2.2. Preparación de soluciones mixtas de Q-AF

Ambos quitosanos, QA y QS, se disolvieron como soluciones madre al 1 y 0,2 % (p/p) en HCl 0,1 N agitando suavemente, *overnight*, a temperatura ambiente, para asegurar la completa disolución del polisacárido. La solución madre de AF se preparó disolviendo y solubilizando 0,2, 0,4 y 2 % (p/p) de polvo en agua MilliQ, quedando a pH natural. Volúmenes iguales de ambas soluciones al doble de concentración se mezclaron para obtener soluciones mixtas a las concentraciones finales requeridas de Q:AF en proporciones 1:1, 1:2 y 1:10, correspondientes a concentraciones de 0,1:0,1, 0,1:0,2 y 0,1:1,0 % (p/p), respectivamente. Se almacenaron 24 horas a 4°C. De acuerdo con las condiciones exigidas por las diferentes técnicas aplicadas, las concentraciones finales de las soluciones mixtas fueron variables.

II.2.3. Influencia del pH en la solubilidad del AF

Para conocer la influencia del pH en la solubilidad del AF se prepararon soluciones al 0,1% p/p en agua MilliQ. Posteriormente se ajustaron a diferentes pHs, desde 3 hasta 11, utilizando NaOH y HCl.

II.2.4. Determinación de interacciones moleculares por espectroscopía UV

Se aplicó el método propuesto por Chanphai y col. (2017). Los espectros de absorbancia de las soluciones AF y las soluciones mixtas Q-AF se obtuvieron en un espectrofotómetro JASCO V650 (JASCO Inc., Tokio, Japón). El barrido de longitudes de onda se realizó entre 220 a 400 nm. Se utilizó una cubeta de medio paso con paredes oscuras. En el caso de las soluciones mixtas, la concentración de AF se mantuvo constante a 10 µg/ml y la concentración de Q varió en el rango 50 a 2500 µg/ml.

II.2.5. Estudio *in silico* de las interacciones moleculares Q-AF

En este estudio se analizó la interacción a nivel molecular del AF con el Q, dada la posibilidad de ejercer la entrega controlada o *delivery* de la vitamina usando como matriz al Q. En primera instancia se analizó la interacción Q-AF. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se obtuvo que la carga superficial para el Q se encuentra entre 6 mV a pH <6 y -20 mV a pH >7. El potencial electrocinético correspondiente a cero se situó alrededor de pH 6,5 (Prudkin Silva y col., 2018). Por otro lado el AF presentó cargas negativas en el rango de pH estudiado (Pérez y col., 2014) . La máxima separación de las curvas de titulación de cargas para ambas especies permitió establecer el pH óptimo (pH 5) y así maximizar la ocurrencia de interacciones electroestáticas entre grupos de Q y AF. Por ello, se estudió la interacción entre Q-AF en solución acuosa a pH 5, previo a la formación de las soluciones mixtas. Se trabajó con el Q en una conformación extendida.

Preparación del AF

Se calculó la curva de especiación del AF en función del pH (**Figura II.2.1**), utilizando el programa Chemicalize (ChemAxon), lo cual permitió conocer así la especie predominante a pH 5. Los resultados indicaron que la especie que predominó fue la que presentó una carga total de -2, debida a la desprotonación de los dos grupos carboxilo presentes en la molécula (**Figura II.2.2**).

Por otro lado, se estudió la stereoquímica de la amida presente en el ligando, analizando la estabilidad de las amidas *E* y *Z* (**Figura II.2.3**): la minimización de ambas estructuras (método *ab initio* HF 6-31G(d,p), programa Gaussian09) indicó que la amida *E* resultó 4,70 Kcal/mol más estable que la amida *Z*. De acuerdo con este resultado, se procedió a trabajar con la amida *E* en todas las simulaciones.

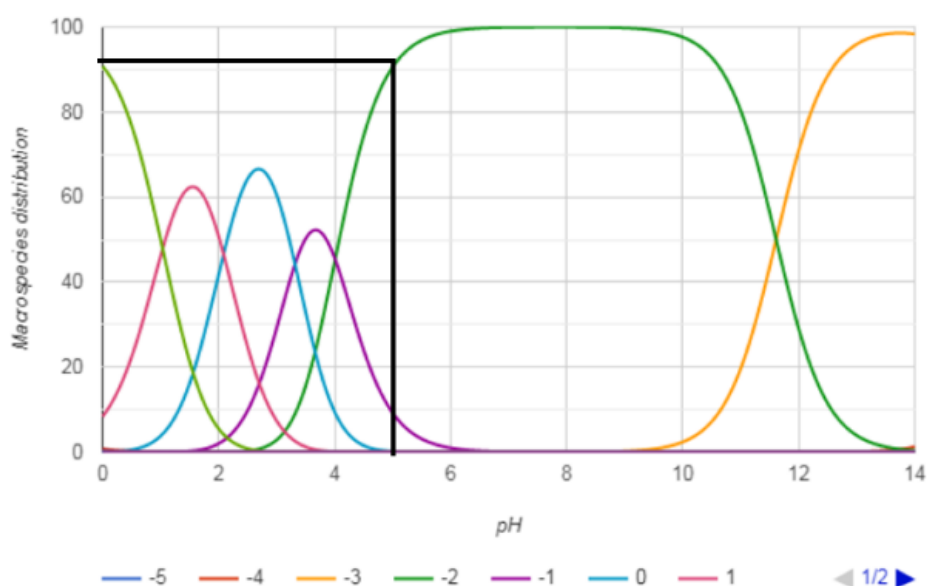


Figura II.2.1. Curva de especiación del ácido fólico en función del pH.

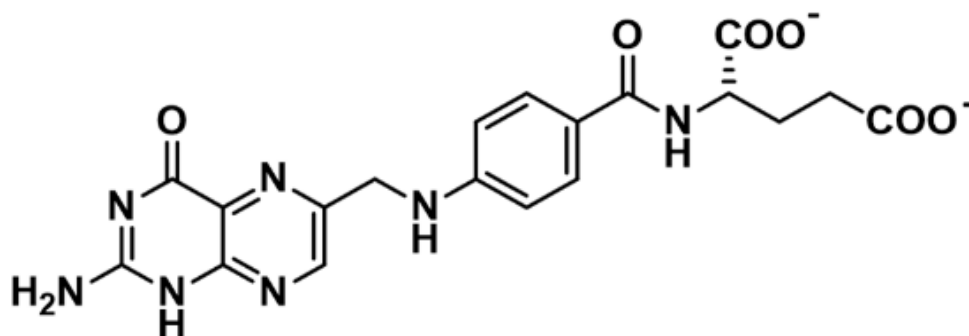


Figura II.2.2. Estructura molecular del ácido fólico con carga total -2.

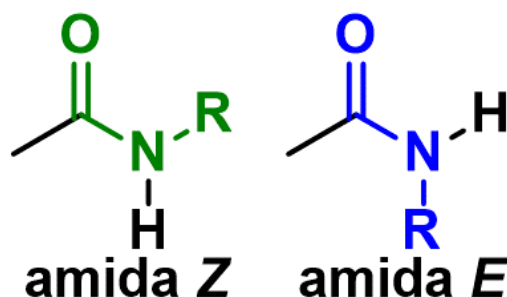


Figura II.2.3. Isómeros E y Z de la amida del ácido fólico.

Preparación del QS

Se trabajó con una estructura de RX del polisacárido obtenida de la base de datos PolySac3DB (Mazeau y col., 1994). Se modificó el archivo de extensión *.pdb* de manera que hubo 2 unidades acetiladas cada 10, ya que el Q presenta en promedio 80% de desacetilación. Además, se estudiaron diferentes patrones de sustitución, ubicando los grupos N-acetilos en posiciones relativas 1,2; 1,3; 1,4 y 1,5, tal como se observa en la **Figura II.2.4**. Cabe destacar que el Q con el que se trabajó está representado por 2 unidades adicionales a las 10 mencionadas, una en cada extremo, para evitar efectos asociados a los extremos de la cadena (**Figura II.2.5**). Se optimizaron estas estructuras poliméricas mediante una rutina de minimización, seguida de un proceso para equilibrar y se produjo dinámica molecular (DM) con el sistema sumergido en una caja de aguas, que emula el medio acuoso. En el siguiente paso se optimizaron estas estructuras poliméricas mediante una rutina de minimización, seguida del proceso de equilibrio y producción de la DM del sistema. Las dinámicas moleculares se realizaron restringiendo la distancia entre los extremos para que el Q conservara su conformación extendida.

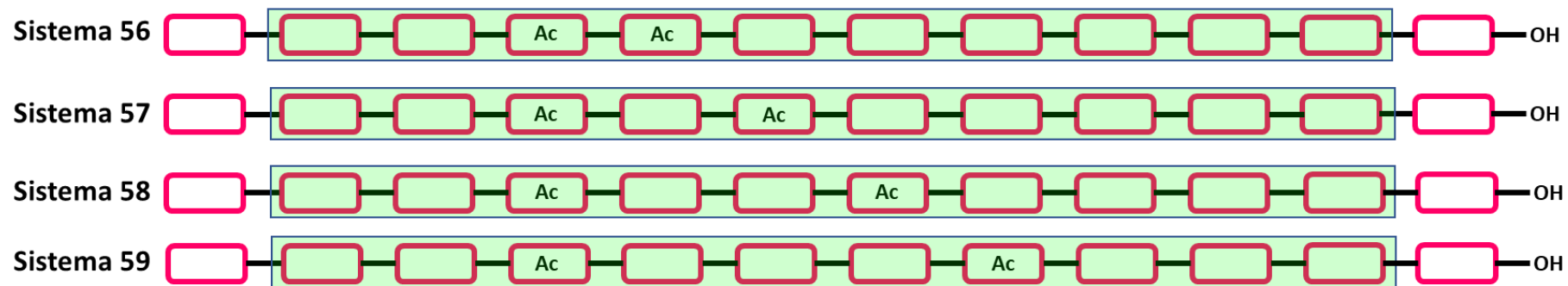


Figura II.2.4. Esquema de representación de isómeros de posición de quitosano. Ac: grupos acetilo.

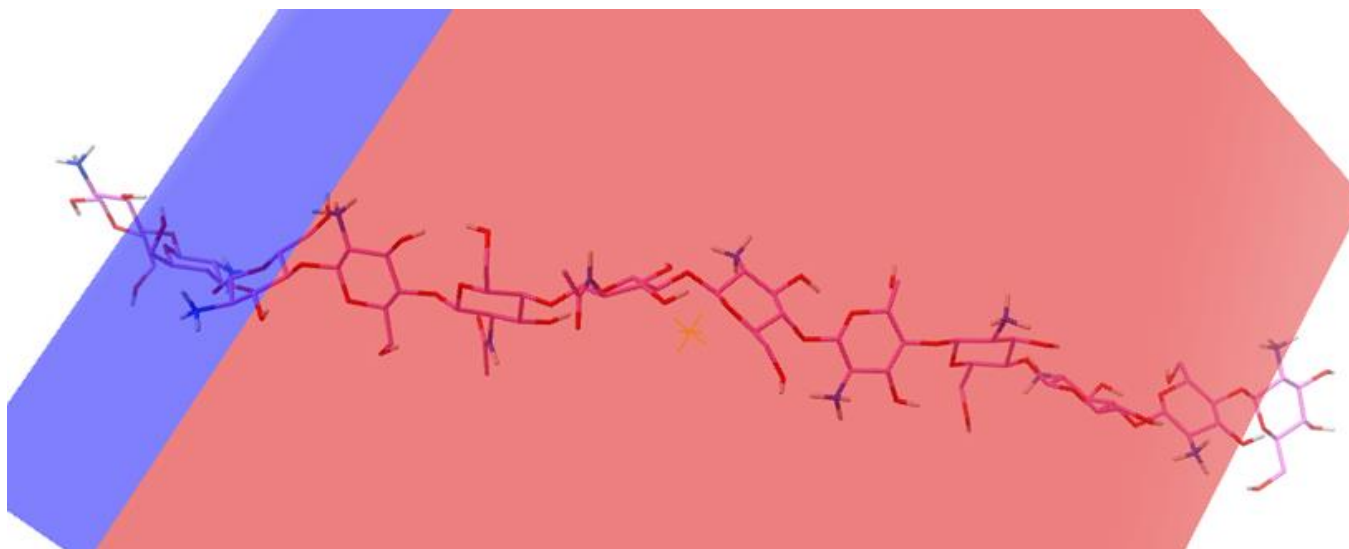


Figura II.2.5. Espacio de simulación de quitosano.

II.2.5.1. Acoplamiento molecular o *docking*

Fue necesario definir el espacio de simulación, determinado por una caja de dimensiones 30,75 Å x 42,75 Å x 39,00 Å que incluyó los 10 monómeros. La energía dentro del espacio de simulación fue calculada en puntos equidistantes espaciados por 0,375 Å.

Se realizaron estudios de *docking* para cada uno de los cuatro (4) isómeros de posición del polisacárido (grupos N-acetilos en posición relativa 1,2; 1,3; 1,4 y 1,5). Para ello, se tomaron cuatro (4) fotos al azar a partir de las simulaciones de dinámica molecular descritas en el punto anterior, como estructura tridimensional del Q. Es decir, se llevaron a cabo 16 estudios de *docking*, asignando cargas y tipos atómicos para las 2 moléculas. Durante el estudio de *docking* se permitió rotar libremente aquellos enlaces que no presentaron restricciones rotacionales en el AF (10 ángulos de torsión con libre rotación). En la **Figura II.2.6** se encuentran en color fucsia aquellos enlaces a los cuales se les permitió rotar libremente.

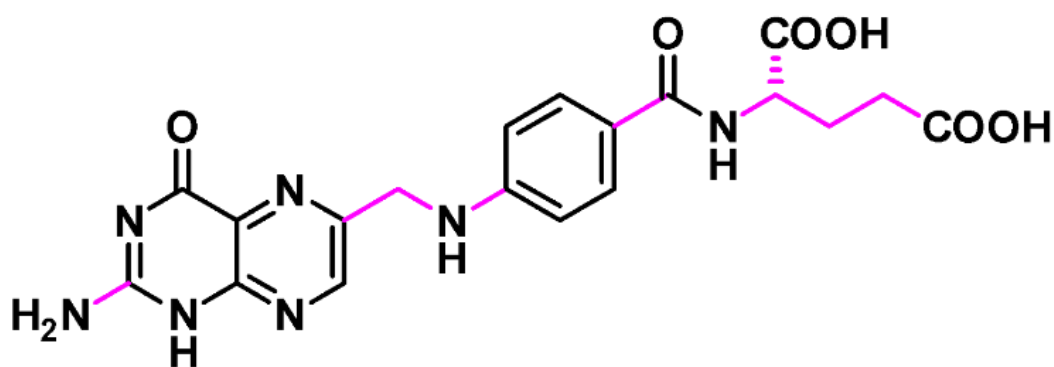


Figura II.2.6. Estructura molecular del ácido fólico.

Para realizar el estudio de *docking* se trabajó con el programa Autodock 4.2 (The Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, MB-5, La Jolla, CA, 2007). Se realizaron 256 evaluaciones de *docking* de AF frente al Q, las cuales generaron 256 conformeros utilizando un algoritmo genético de búsqueda. Este es un algoritmo híbrido ya que la búsqueda es realizada a nivel global y es más adecuada para la interacción Q-AF. Posteriormente, de un modo más preciso, se realizó una búsqueda del mínimo de energía para aquellas conformaciones halladas a nivel local (Morris y col., 1998). Cada conformación encontrada posee coordenadas diferentes en cuanto a

la translación y rotación del AF -relativas al Q- como así también, diferentes ángulos diedros de los enlaces que pueden rotar libremente. Los 256 confórmeros se agruparon en *clusters* de acuerdo a similitud conformacional utilizando la desviación de la raíz cuadrática media de las coordenadas atómicas de cada monómero como criterio. A su vez, los *clusters* se ordenaron dando lugar a un ranking. Este orden quedó determinado por la estabilidad de los complejos Q-AF dentro de cada *cluster*.

II.2.5.2. Estudios de dinámica molecular

Las estructuras de partida se introdujeron en una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P pre-equilibrada (Jorgensen y col., 1983). Todas las simulaciones se realizaron a presión y temperatura constante (1 atm y 300 K, respectivamente) que se ajustaron haciendo uso del barostato y termostato de Berendsen implementado en Amber, y utilizando condiciones periódicas de contorno. Se empleó un radio de corte de 9 Å para la etapa de optimización y de 12 Å para las etapas de equilibración y simulación, a temperatura constante.

Se utilizó el campo de fuerza Glycam para el Q y el AF, junto con el algoritmo SHAKE (Ryckaert y col., 1977) para mantener las distancias de los enlaces que involucran átomos de hidrógeno a las longitudes de equilibrio. El intervalo de tiempo utilizado para la integración de las ecuaciones de Newton fue de 2 fs.

Todas las simulaciones se llevaron a cabo con el módulo PMEMD perteneciente al programa AMBER9 (Wang y col., 2006). Los protocolos para equilibrar los sistemas consistieron en una primera optimización de la estructura inicial seguido de un calentamiento lento hasta la temperatura deseada de 300 K y, posteriormente, se realizaron una serie de simulaciones de 50 ns en presencia del ligando.

II.2.6. Actividad antioxidante de las soluciones mixtas Q-AF

Existen una gran variedad de métodos que permiten evaluar la actividad reductora o capacidad antioxidante. Los ensayos *in vitro* más utilizados se basan en la examinación de los dos principales mecanismos (Apak y col., 2016; Gulcin, 2020):

a. Métodos basados en la transferencia de electrones (SET): evalúan la capacidad de transferencia de electrones y la reducción de un compuesto a otro. Comúnmente se utilizan métodos colorimétricos, como se describen en el estudio de Apak y col. (2016), que incluyen la medición del poder reductor del ion férrico (FRAP) y del ion cúprico (CUPRAC). En el caso del método FRAP, se fundamenta en la reducción de un complejo férrico a un ion ferroso en un entorno de pH bajo, lo que promueve la formación de un complejo tripiridiltiazina ferroso coloreado cuya absorbancia se puede cuantificar a una longitud de onda de 593 nm, como se detalla en el trabajo de Griffiths y col. (2016).

b. Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógenos (HAT): cuantifican la habilidad de transferir átomos de hidrógeno a radicales libres, dando lugar a la formación de radicales más estables. Entre estos métodos se encuentran la determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la medición del poder de captación de radicales totales (TRAP), la evaluación del blanqueo de la solución de β -caroteno, así como la realización de ensayos de quimioluminiscencia.

Además, existen **métodos que evalúan ambos mecanismos en forma simultánea**, dentro de esta clase se puede mencionar la realización de ensayos que evalúan la capacidad de captación del radical catión 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico) (ABTS $\bullet^+$) y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $\bullet$). En particular, la oxidación del ABTS mediante persulfato de potasio resulta en la formación del producto coloreado ABTS $\bullet^+$, cuya absorbancia puede ser determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 734 nm. La medición de la diferencia en la absorbancia estable del ABTS $\bullet^+$ antes y después de la incorporación del antioxidante permite cuantificar el potencial reductor de la molécula en estudio. Posteriormente, el porcentaje de actividad antirradical (% AAR) se relaciona de manera proporcional con la concentración y la actividad del antioxidante (Griffiths y col., 2016). En todos los casos, se recomienda la combinación de múltiples medidas que aborden distintos mecanismos con el fin de obtener conclusiones de mayor fiabilidad, siguiendo las pautas establecidas por Alam y col. (2013).

II.2.6.1. Ensayo ABTS

La capacidad antioxidante de las soluciones de AF, Q y sistemas mixtos (1:10) se evaluó mediante el ensayo ABTS (Re y col., 1999). El ABTS (Merck Millipore, EE. UU.) se disolvió en agua hasta una concentración final de 7 mM, luego se hizo reaccionar la solución madre de ABTS con una concentración final de persulfato de potasio de 2,45 mM para producir el catión radical $ABTS^{\bullet+}$. La mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso. Pasado este tiempo, se diluyó con metanol hasta una absorbancia de 0,80-0,90 leída a 734 nm. Se realizó una curva de calibración empleando estándares de ácido gálico (AG) (0-0,018 mg/ml) en metanol, colocando 100 μ l de solución de AG más 1,9 ml de la solución de ABTS. Se midió la absorbancia a 734nm y se calculó la disminución de la absorbancia frente al blanco de metanol. Luego se midieron las soluciones de AF, los QS y QA y las soluciones mixtas y se calcularon los valores de mg de AG/ml de solución utilizando la curva de calibración pertinente.

II.2.6.2. Ensayo FRAP

El ensayo FRAP se realizó de acuerdo con el método de (Benzie y Strain, 1996) con modificaciones. El reactivo FRAP se preparó justo antes de usarse y conteniendo 2,5 ml de solución de 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.), 10 mM en HCl 40 mM, 2,5 ml de solución de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM y 25 ml de *buffer* acetato 250 mM (pH 3,6). Se vertieron alícuotas de 60 μ l de agua destilada, luego 40 μ l de las soluciones de AF, de QA, QS o de las soluciones mixtas (1:10) o la solución estándar de AG (0-0,03 mg/ml) en un tubo de ensayo más 600 μ l de solución de reactivo FRAP. La mezcla se mantuvo en la oscuridad a 25 °C durante 30 min. Se midió absorbancia a 593 nm de las soluciones bajo análisis y las diferentes concentraciones de las soluciones estándar de AG. Finalmente, el valor de mg de AG/ml de solución se calculó utilizando la curva de calibración pertinente.

II.2.7. Cultivo y propagación de líneas celulares

Se empleó la línea celular Caco-2 (ATCC HTB-37™), una línea continua de células de adenocarcinoma colorectal epitelial humano. Esta línea celular es la usada en forma

oficial para estudiar los procesos de permeabilidad y de bioaccesibilidad en modelos gastrointestinales *in vitro* (Minekus y col., 2014).

Estas células fueron crecidas en placas de Petri estériles con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y penicilina/estreptomicina (50 U/ml; 50 mg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La incubación se realizó en una estufa a 37 °C y en atmósfera con 5 % CO₂.

II.2.7.1. Ensayo de viabilidad celular

Se realizaron pruebas de viabilidad celular empleando el ensayo de reducción de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) para determinar la actividad metabólica de las células Caco-2 frente a distintos tratamientos con QA, QS, AF y los sistemas mixtos QA-AF y QS-AF. El ensayo MTT es un método colorimétrico en el que se determina la conversión de MTT a formazán por deshidrogenasas mitocondriales y se lo utiliza como índice de viabilidad celular. El ensayo se realizó en tres etapas: pre-incubación, tratamiento y ensayo MTT. La **Figura II.2.7** ofrece un esquema del procedimiento seguido en este punto.

En la preincubación se sembraron células Caco-2, a una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/*well*, en placas de cultivo celular de 96 *well* y se incubaron durante 24 h (Kowapradit y col., 2010). Se colocaron las placas en una estufa a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5 %. Posteriormente las células se trataron con QA y QS (50-1000 µg/ml), AF (0,05-1,5 µg/ml) y soluciones mixtas de ambos Q (250 µg/ml) con relación variable de AF (0,05-1,5 µg/ml) en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2 %. Se incubaron las placas durante 48 h en las mismas condiciones de estufa.

Las células se trataron con el reactivo MTT diluido en medio DMEM con 0 % SFB y se incubaron durante 2 h en una estufa a 37 °C y atmósfera con 5 % de CO₂. Pasado el tiempo, se descartó el medio de cultivo y se solubilizaron los cristales de formazán en DMSO. La absorbancia del formazán se midió a 570 nm con sustracción de fondo a 690 nm en un lector de placas de microtitulación POLARstar Omega (BMG LABTECH, Alemania). Los controles se consideraron 1 o 100 % y se normalizaron las absorbancias de cada uno de los tratamientos.

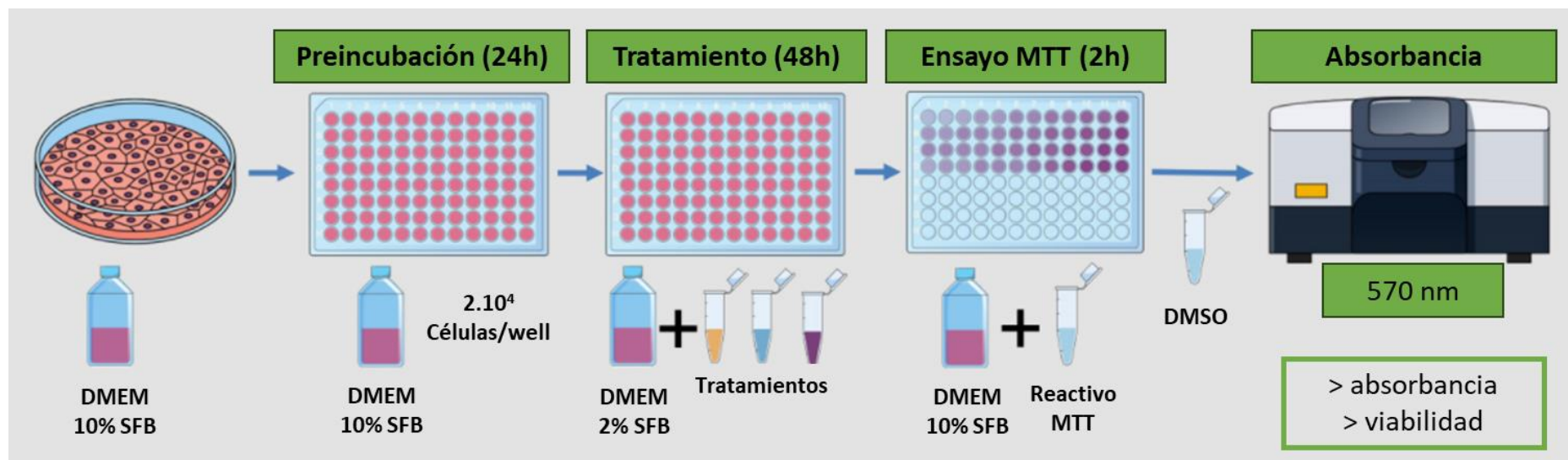


Figura II.2.7. Esquema de las etapas del ensayo de viabilidad celular MTT.

II.2.8. Preparación de sistemas mixtos en polvo Q - AF

Se congelaron 4 ml de las soluciones Q-AF (preparadas según la **Sección II.2.1**) durante 24 h a -20 °C en viales de vidrio. Luego se liofilizaron durante 48 h en un liofilizador Alpha 1-4 LD / 2-4 LD-2 (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Alemania) operado a una presión de 4 Pa y a una temperatura de -54 °C de la placa de condensación.

II.2.9. Determinación del contenido de agua por método gravimétrico

Las muestras en polvo también fueron evaluadas en términos de humedad por el método gravimétrico por secado del polvo en estufa a 105 °C con vacío (Wenyao y col., 2016). Brevemente, se prepararon cápsulas de papel aluminio y se registró su peso. Se pesaron 10 mg de muestra por duplicado. Se secaron en estufa de vacío a 105 °C durante 48 h. Se colocaron las cápsulas en un desecador hasta enfriamiento. Posteriormente se pesaron y se realizaron los cálculos presentados a continuación para obtener el contenido de humedad en porcentaje.

$$M_S = \text{Cáp. } M_S - \text{Cáp.}$$

Ecuación II.2.1

$$\% \text{Humedad} = \frac{M_H - M_S}{M_H} \times 100$$

Ecuación II.2.2

Donde:

- **M_S**: masa de polvo seco
- **Cáp. M_S**: cápsula + masa de polvo seco
- **Cáp.**: masa de cápsula
- **M_H**: masa de polvo pesada al inicio.

II.2.10. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los perfiles topográficos se obtuvieron empleando AFM en modo *tapping*. Se utilizó el dispositivo SPM – Veeco Multimode NanoScope IV-A (Nueva York, EE. UU.) para la adquisición de micrografías de las películas obtenidas por rotación o *spin-coating*

(Taketa y Beppu, 2014). Se analizaron los sistemas individuales AF, QA, QS y QA:AF y QS:AF mixtos (1:1). Los sustratos de silicio (100) fueron previamente lavados con solución de piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}_2\text{:5:1}$) y posteriormente las superficies fueron funcionalizadas con plasma de oxígeno durante 10 segundos. Se depositaron soluciones simples y mixtas mediante una técnica simple de recubrimiento por rotación (4000 rpm, 40 s) sobre los sustratos de silicio (Nosal y col., 2005). Para la deposición capa por capa o *layer by layer* (LbL) (**Figura II.2.8**), primero se depositó la solución de Q mediante recubrimiento por rotación a una velocidad dinámica (4000 rpm, 30 s) sobre la superficie de silicio, luego se depositó la solución de AF en las mismas condiciones sobre la superficie de la película de Q. El tamaño del escaneo fue de $10 \times 10 \mu\text{m}$. Las imágenes se procesaron utilizando el software WSxM 5.0 desarrollo 9.4 por aplicación de los filtros aplanamiento y ecualizar con el objetivo de eliminar la pendiente del fondo y para mejorar el contraste de la imagen, respectivamente. También se analizó la rugosidad y altura de picos y valles. El tamaño de las partículas se midió utilizando el software NanoScope (Subramani y Devarajan, 2019).

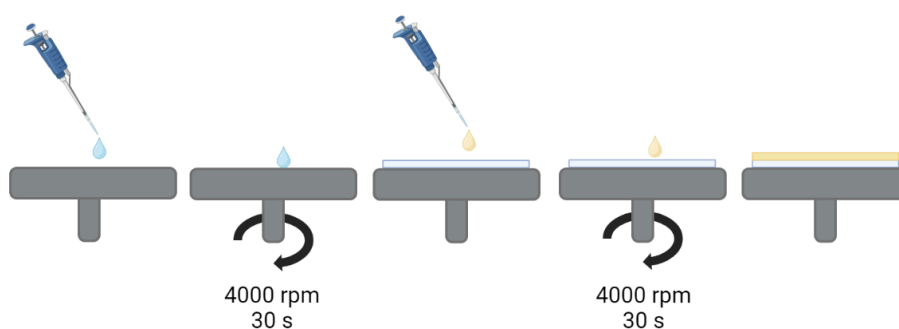


Figura II.2.8. Esquema de aplicación de soluciones por la metodología LbL.

II.2.11. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se obtuvieron en un espectrómetro FTIR modelo 400 (PerkinElmer, Inc., Shelton CT, EE. UU.). Utilizando la técnica de espectroscopía de transformada de Fourier infrarroja de reflectancia difusa (DRIFT). Para el estudio de la estructura, al principio las muestras liofilizadas se mezclaron con polvo de KBr y se comprimieron en

un disco antes de la adquisición de cada espectro. Se escaneó en modo de reflectancia en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} . Se corrigió la línea de base y se normalizaron los espectros (entre 0 y 1) para la presentación de las figuras.

II.2.12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de SEM correspondientes a los sistemas deshidratados se obtuvieron utilizando un equipo Carl Zeiss NTS - SUPRA 40 (Zeiss, Alemania) con un voltaje acelerado de 3 kV. Las muestras liofilizadas se colocaron sobre una cinta adhesiva de dos caras sobre el taco de medición. Se observaron las características morfológicas de las partículas en micrografías adquiridas a 2000 y 10000 X.

II.2.13. Estructura cristalina

La estructura cristalina de las muestras de polvo se examinó mediante difracción de rayos X (XRD), que se llevó a cabo en un difractómetro de polvos Panalytical Empyrean (Malvern Panalytical, Reino Unido) operado con una fuente de radiación Cu K α (K α 1 = 1.54056 Å y K α 2 = 1.54443 Å). Los rayos X se generaron a 40 kV y 45 mA. Las exploraciones XRD se registraron a 2 θ de 4 a 50 ° a una velocidad de exploración de 0,026 ° / 96,4 s. Los espectros de RMN se registraron utilizando un equipo Bruker AM500 (Bruker, Alemania) equipado con una sonda de banda ancha. Se informan cambios químicos de ^1H y ^{13}C en relación con DMSO- d_6 (δ) 2,50 ppm y 39,5 ppm, respectivamente.

II.2.14. Bioaccesibilidad del AF. Digestión *in vitro* de sistemas liofilizados

Se evaluó la bioaccesibilidad del AF en los sistemas mixtos luego de la liofilización. Para estudiar la bioaccesibilidad de un compuesto generalmente se utilizan métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión, ya que son más rápidos, más económicos, menos laboriosos y no tiene restricciones éticas como sucede con los estudios *in vivo* (Minekus y col., 2014). Estos métodos imitan las condiciones fisiológicas teniendo en

cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sal, entre otros factores (Minekus y col., 2014; Shahidi y Peng, 2018).

El protocolo utilizado fue el INFOGEST (Minekus y col., 2014), ya que es un protocolo estandarizado desarrollado bajo un consenso científico internacional, obtenido de la armonización de diversas metodologías existentes y validado con modelos de digestión *in vivo*. El ensayo se desarrolla en tres fases o etapas: oral, gástrica e intestinal (**Figura II.2.9**).

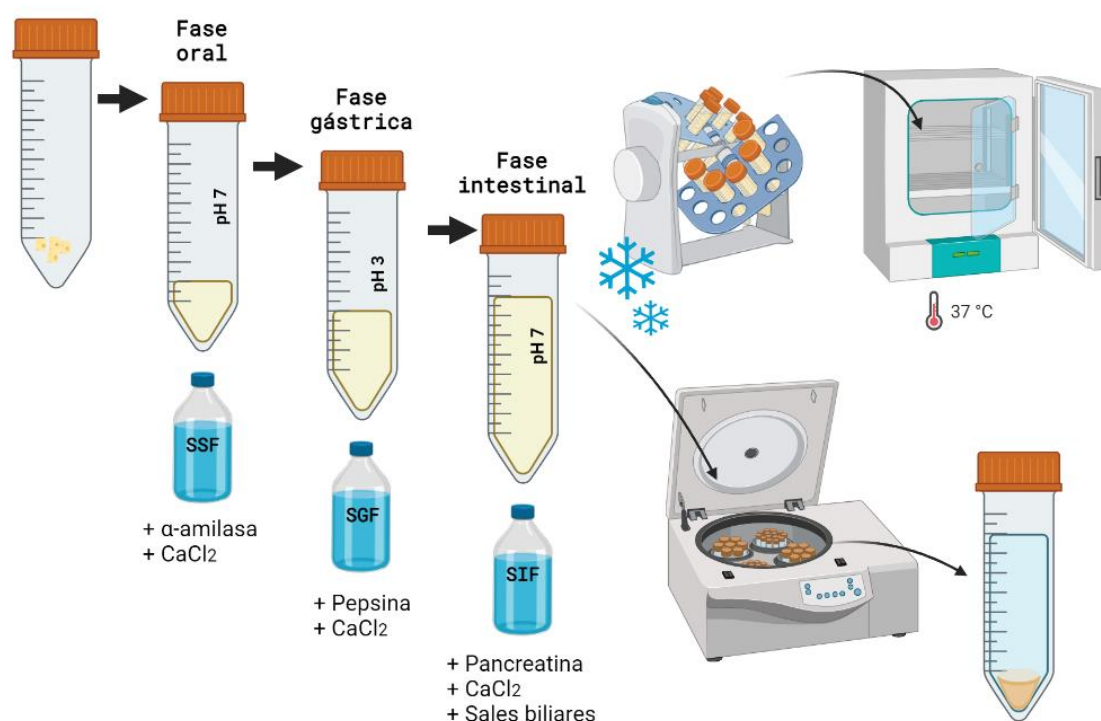


Figura II.2.9. Esquema de protocolo INFOGEST de digestión *in vitro*.

Se resuspendieron los sistemas liofilizados QA:AF y QS:AF en la proporción 1:10 y sus controles correspondientes, utilizando agua MilliQ hasta el volumen inicial. Se tomaron 5 g de los sistemas resuspendidos y se realizó el ensayo de digestión *in vitro* por duplicado. Se agregaron 5 ml de fluido salival (SFS) compuesta por diferentes sales en concentraciones apropiadas para imitar los fluidos salivales. En esta primera etapa la relación entre el resuspendido y las soluciones a agregar (SFS y enzima α-amilasa) es 1:1, el pH se ajustó a 7 y el tiempo de incubación fue de 2 min a 37 °C.

El tratamiento continuó con la fase gástrica, agregando un fluido simulado gástrico (FSG), el cual imita las soluciones estomacales. Se agregaron dos enzimas, la pepsina que actúa sobre las proteínas y la lipasa gástrica que actúa sobre los lípidos. Las soluciones se agregaron en una proporción 1:1 respecto al contenido procedente de la fase oral y la muestra se ajustó a pH 3. El tiempo de incubación fue de 2 h a 37 °C.

La última etapa es la fase intestinal. En esta etapa se añadió una solución simulada intestinal (SSI), que consiste en una solución que imita los fluidos fisiológicos intestinales, y además se agregaron sales biliares y pancreatina. Estas soluciones se añadieron en una proporción 1:1 respecto al contenido anterior, además se ajustó el pH a 7 y se incubó durante 2 h a 37 °C. Al finalizar (**Figura II.2.10**), se realizó un enfriamiento en hielo para lograr la inhibición de las enzimas y posteriormente se centrifugó para separar el extracto digerido del precipitado. A partir del extracto se realizó la evaluación de la bioaccesibilidad del AF, el compuesto de interés.

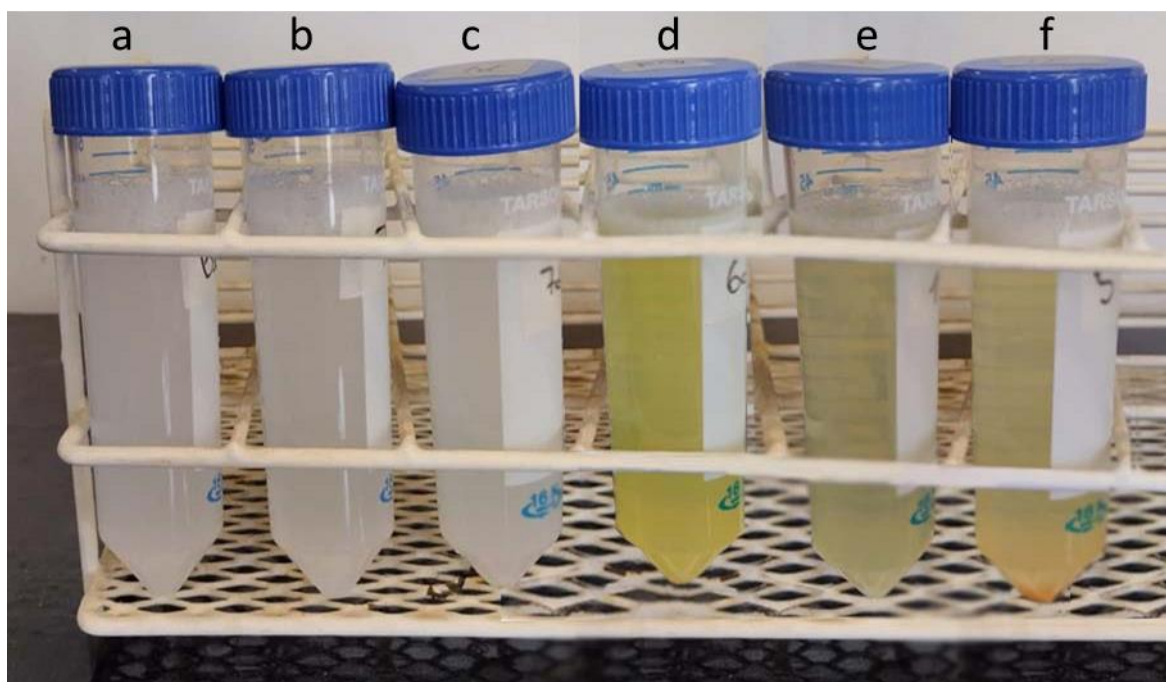


Figura II.2.10. Aspecto de las muestras liofilizadas resuspendidas luego de las tres etapas de digestión **(a)** Blanco, **(b)** QA, **(c)** QS, **(d)** AF, **(e)** QA-AF, **(f)** QS-AF.

II.2.15. Cuantificación de AF en sistemas liofilizados. Método microbiológico

Los sobrenadantes de los sistemas liofilizados obtenidos en la digestión *in vitro* fueron analizados para cuantificar el AF bioaccesible. La cuantificación del AF se realizó mediante el método microbiológico estandarizado oficial de la AOAC (método 992.05, 2000). Este método se basa en la promoción de crecimiento de ciertos microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-lácticas, con auxotrofia para folato (Hau Fung Cheung y col., 2008). Como microorganismo auxótrofo para AF se empleó *Lactocaseibacillus casei* BL23 (*L. casei* BL23). Para llevar a cabo el ensayo, se utilizó el protocolo puesto a punto en nuestro grupo por Ochnio y col. (2018) y empleado por (Corfield y col., 2020, 2023) en el cual se realiza una curva de calibración de AF paralelamente a la medición de las muestras. El procedimiento consta de tres etapas (**Figura II.2.11**) las cuales se realizan en un total de 7 días.

A continuación, se describe cada etapa llevada a cabo:

Etapas 1 - Activación de las bacterias: la cepa *L. casei* BL23, conservada a -80°C en glicerol, se inoculó una ansada en medio MRS (medio Man, Rogosa y Sharpe, Biokar, Beauvais, Francia) y se incubó a 37°C durante 24 h. El cultivo se cosechó por centrifugación y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio MRS.

Etapas 2 - Agotamiento del AF en las células: con el objetivo de asegurar que el crecimiento de *L. casei* BL23 durante la determinación corresponda al AF presente en la muestra y no al remanente del intracelular bacteriano (*pool* intracelular), las bacterias se inocularon en medio FACM (*Folic Acid Casei Medium*, Difco, Sparks, Maryland, EE. UU.), el cual carece de AF en su composición. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente el cultivo obtenido se cosechó nuevamente por centrifugación y se lavó dos veces con agua destilada estéril.

Etapas 3 - Curva de calibración y medición de las muestras:

- **Curva de calibración:** para realizar la curva de calibración, la suspensión bacteriana de *L. casei* BL23 se inoculó en diferentes tubos con medio FACM y concentraciones crecientes de AF. Estos cultivos se incubaron durante 48 h. Posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm como medida de la biomasa producida, la que fue proporcional al crecimiento bacteriano. De este modo se generó una curva de crecimiento microbiana en función de la concentración de AF nominal (**Figura II.2.12**). La curva de concentración se realizó cada vez que se repitió el ensayo. Cabe aclarar que la curva de calibración es un factor limitante de la metodología, dado que, si no se logró obtener una curva de calibración que aproxime a una función lineal, las mediciones de las muestras deben ser desechadas y el procedimiento debe repetirse. En este contexto, las dificultades que surgen experimentalmente para obtener la curva de calibración están relacionadas al agotamiento de AF en las células, ya que, aunque este procedimiento esté estandarizado, no siempre se alcanza el agotamiento de AF esperado. El resultado en las ocasiones en las que falla el agotamiento es una lectura alta de la DO, independientemente de la concentración de AF.
- **Determinación de ácido fólico en las muestras:** las muestras de digeridos se midieron paralelamente a la curva de calibración, por lo que los cultivos utilizados de *L. casei* BL23 fueron sometidos a los mismos procedimientos. Estas bacterias fueron inoculadas en medio FACM conteniendo la muestra a analizar. Las muestras se incubaron 48 h, y posteriormente se determinó la DO a 600 nm.

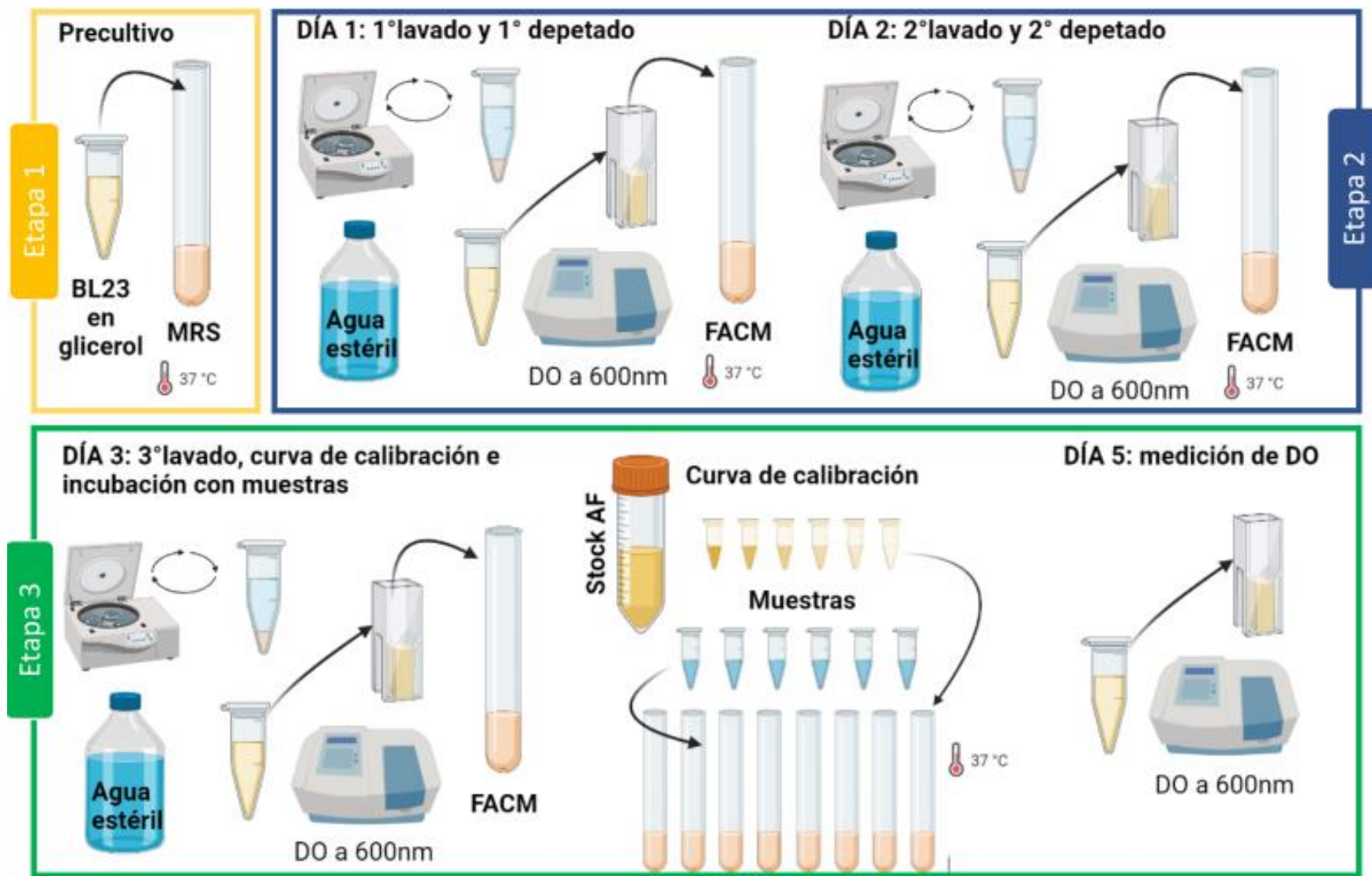


Figura II.2.11. Etapas del protocolo de cuantificación de ácido fólico.

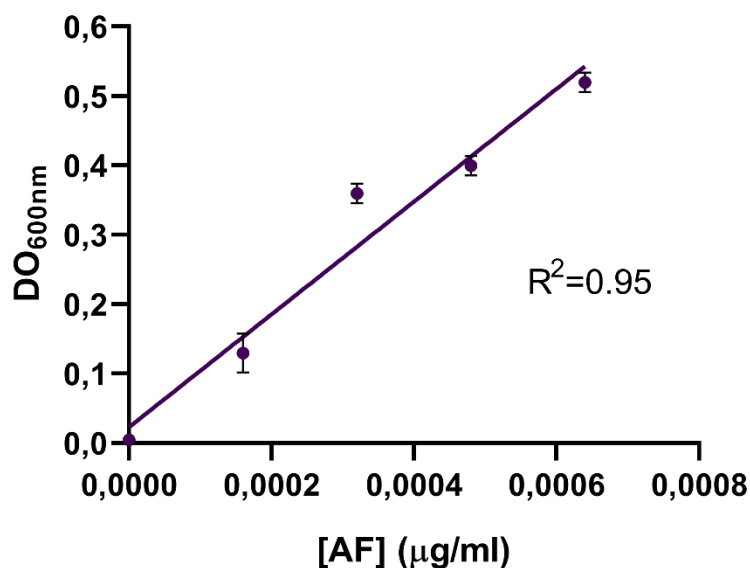


Figura II.2.12. Curva de calibración obtenida a partir del crecimiento de *L. casei* BL23 en función de la concentración de AF. Los valores de DO son el promedio $\pm$ desvío estándar, $n=2$.

II.2.16. Análisis estadísticos

La comparación de medias entre grupos se realizó por ANOVA de una vía y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para la comparación múltiple. En ambos casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$ (intervalo de confianza del 95 %). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v9.02 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA), mientras que el ajuste de datos experimentales se utilizó tanto con este como con el programa Origin (Origin Pro 2018, Origin Lab Corp, Northampton, MA, USA).

II.3. Resultados

II.3.1. Describiendo el comportamiento del AF en agua

La química y bioquímica del AF fue estudiada por diversos autores. Dependiendo del pH de las, el AF existe en diferentes estados iónicos. El pH es un factor fundamental en la solubilidad del AF en soluciones acuosas, dado que es una molécula anfótera. Las fórmulas estructurales de AF en forma neutra, aniónica, catiónica y bi-catiónica se muestran en la **Figura II.3.1**. El cambio de forma neutra a forma aniónica ocurre con una constante de disociación de $pK_{n,a} = 8,38$ (grupo amida), el cambio de forma neutra a forma catiónica tiene una constante de disociación de $pK_{n,c} = 2,35$ (N^1), y el valor de pK para la transformación de la forma catiónica a la bi-catiónica fue $pK_{c,bc} = 0,20$ (N^{10}) (Tyagi and Penzkofer, 2010) Así como también presenta pKa valores de pKa de 3,5 y 4,8 correspondientes a (α -COOH) y (β -COOH) respectivamente (Patring, Lanina y Jastrebova, 2006).

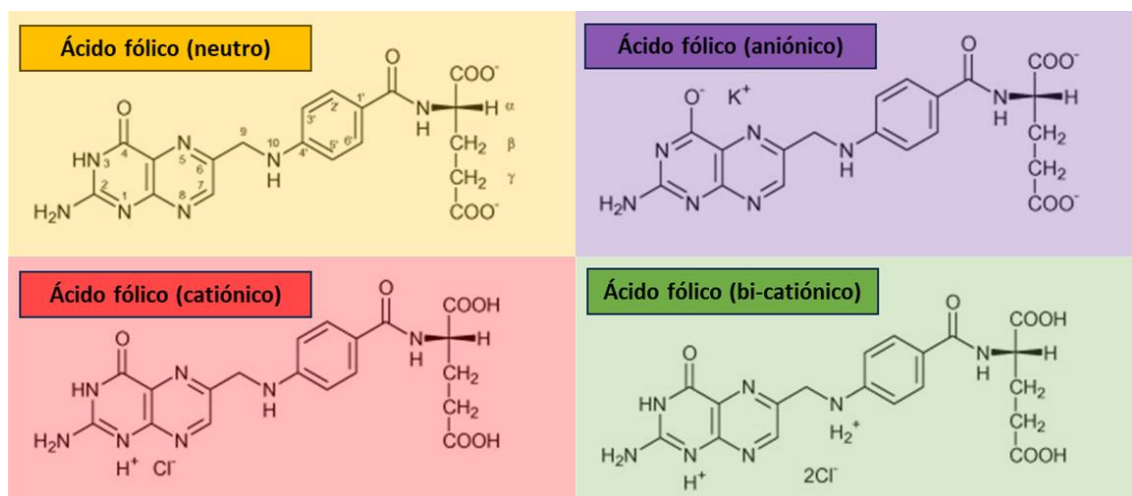


Figura II.3.1. Fórmulas estructurales del AF en forma neutra (fórmula suma: $C_{19}H_{19}N_7O_6$, masa molar $M_m = 441,4 \text{ g mol}^{-1}$), aniónica, catiónica y bi-catiónica. Tomado y modificado de Tyagi y Penzkofer (2010).

En la **Figura II.3.2** se observa el aspecto macroscópico de las soluciones de AF a distintos pHs. A pHs mayores a 7 las soluciones de AF fueron traslúcidas, indicando la solubilización macroscópica de la vitamina y a pHs menores a 7 las soluciones

presentaron coloración amarilla y partículas en suspensión. Estos resultados son coincidentes con los informados previamente (Pérez y col., 2014).

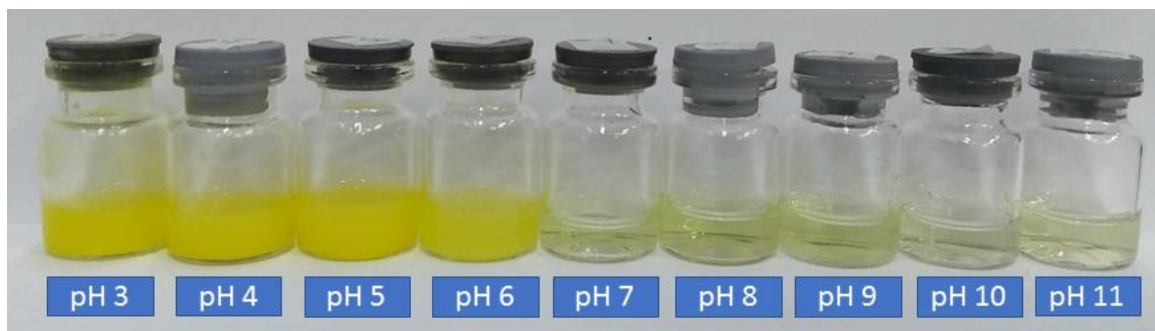


Figura II.3.2. Aspecto macroscópico de soluciones de AF al 0,1 % m/m disueltas en agua a pH de 3 a 11.

Se sabe que el AF absorbe la luz UV (Song y Hwang, 2007) y que el espectro UV de las soluciones de AF se ve afectado por los cambios de pH (Yakubu y Muazu, 2010). A los fines de investigar metodologías sencillas de cuantificación de AF alternativas a la oficial (Método microbiológico), se procedió en primer lugar a obtener espectros mediante espectroscopia UV-Vis a una concentración determinada de AF y a distintos pHs. De esta forma también se abordó el estudio de las interacciones moleculares utilizando este método de cuantificación. Se diluyeron las soluciones manteniendo el correspondiente pH hasta obtener una concentración de 0,001 % m/m y se obtuvieron espectros de absorbancia en la región UV. La **Figura II.3.3** muestra los espectros de absorbancia de AF. Estos espectros presentan una, dos o tres bandas de absorción máxima en las longitudes de onda: 256 nm, 283 nm y 365 nm dependiendo del pH de la solución. Gazzali y col. (2016) estudiaron el AF en solución de NaOH 1 M y reportaron las principales bandas de absorción de AF a 256 nm, 283 nm y 356 nm. Las longitudes de onda de los picos también están de acuerdo con The Merck Index, 11^a edición Merck y Co., Inc. (1989) y Matias y col. (2014) (λ_{max} : 368, 283, 256 nm en NaOH 0,1 M). Las bandas de absorción en los rangos espectrales 200–300 y 300–400 nm, fueron asignadas a las transiciones electrónicas π - π^* y n - π^* de las fracciones de pterina (Pt) y ácido p-aminobenzoico (PABA) del AF, respectivamente (Baibarac y col., 2019). Se seleccionó la absorbancia a 280 nm para la cuantificación de AF porque es la que presenta un coeficiente de extinción mayor (Gazzali y col., 2016) y, por tanto, la

sensibilidad es mayor (Lopera y col., 2009). Asimismo, en la **Figura II.3.3** se puede identificar que la banda a 280 nm tiene una buena definición a pH mayores que 6, por lo tanto, resulta claro que este método sencillo de detección de AF se puede utilizar bajo las condiciones de pH mencionadas.

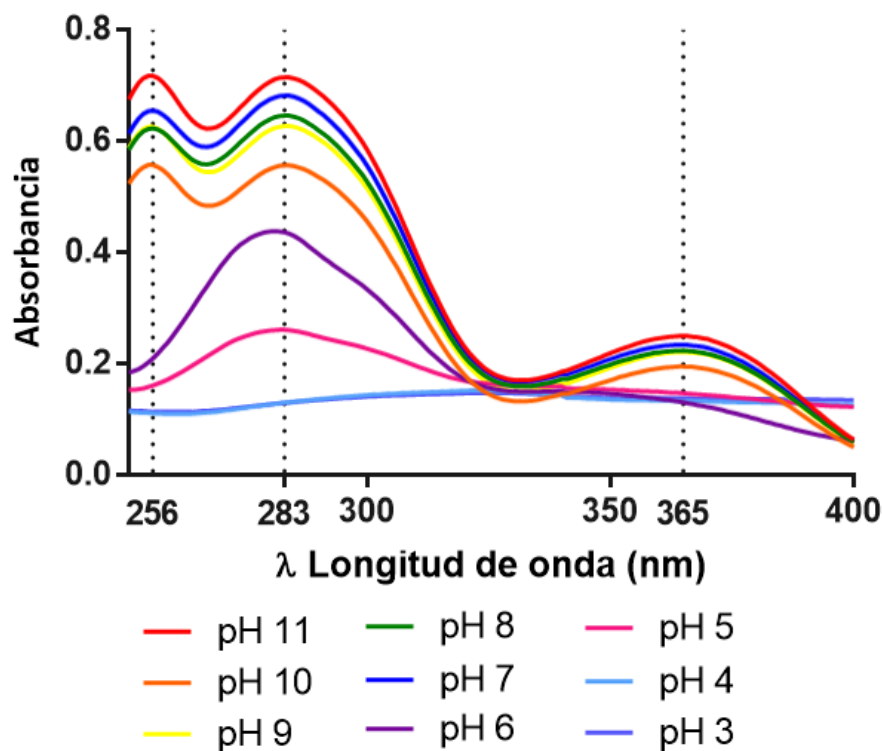


Figura II.3.3. Espectro de absorción de soluciones de AF al 0,001% m/m disueltas en agua MilliQ a pH de 3 a 11.

Teniendo en cuenta que por un criterio práctico las disoluciones AF utilizadas en el desarrollo de la Tesis fueron realizadas con agua MilliQ como solvente ($\text{pH} \approx 6$), los espectros siguientes se obtuvieron a este pH. Se realizaron soluciones variando la concentración de vitamina desde 2 hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Puede observarse en la **Figura II.3.4** que el AF presentó linealidad en la absorbancia a concentraciones dentro del rango estudiado, con un $R^2 = 0,99$.

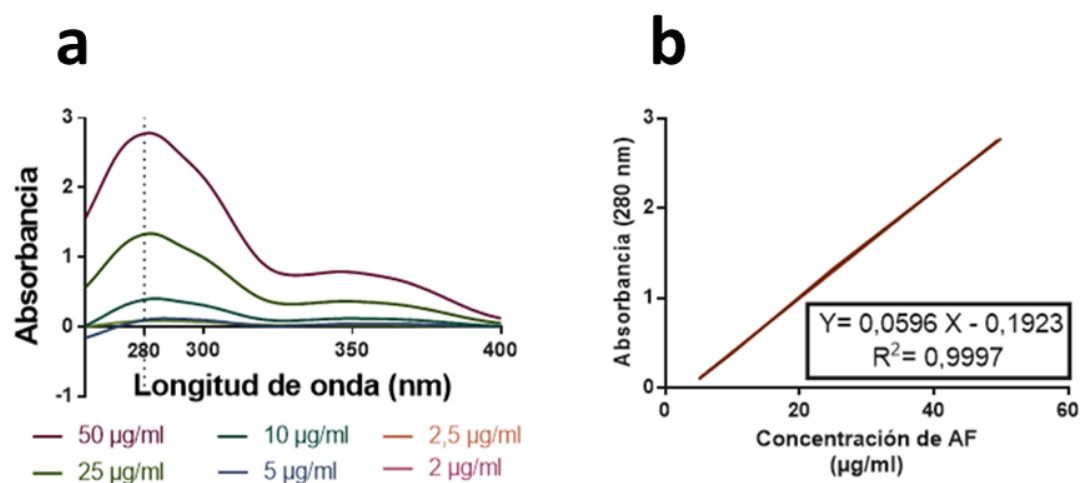


Figura II.3.4. (a) Espectros de absorbancia en la región UV de soluciones de AF a distintas concentraciones en agua MilliQ y (b) su correspondiente curva de calibración a $\lambda = 280$ nm.

Este enfoque permitió iniciar la investigación de la interacción entre el QA y el QS con AF empleando la técnica de espectroscopía UV-Vis descrita por Chanphai y col. (2017). La misma consistió en determinar una constante de afinidad (K_{af}) a partir del aumento de la absorbancia ($\lambda = 280$ nm) en los espectros debida al agregado de concentraciones crecientes de QA y QS a una solución de AF (10 µg/ml) (**Figura II.3.5**). A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se realizó la linealización y se determinó la ecuación de la recta (**Figura II.3.6**), cuyo valor de pendiente corresponde a K_{af} entre ambas especies.

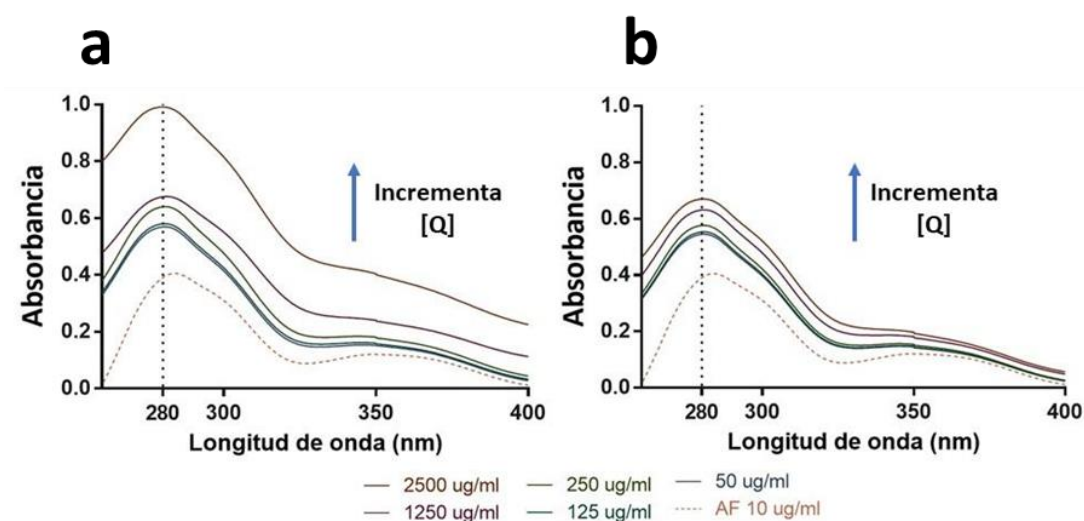


Figura II.3.5. Espectros de absorbancia en la región UV de AF 10 µg/ml con concentraciones variables de (a) QA y (b) QS obtenidos a pH 6, 25°C.

Las K_{of} obtenidas fueron de 2,13 para la interacción QA-AF y 1,78 para QS-AF. Estas constantes fueron notablemente inferiores respecto a lo reportado por otros autores (Bourassa y col., 2011; Chanphai y col., 2017), lo que puede atribuirse a las características moleculares intrínsecas de los Q aquí empleados como el PM, el DD y la polidispersidad del polímero.

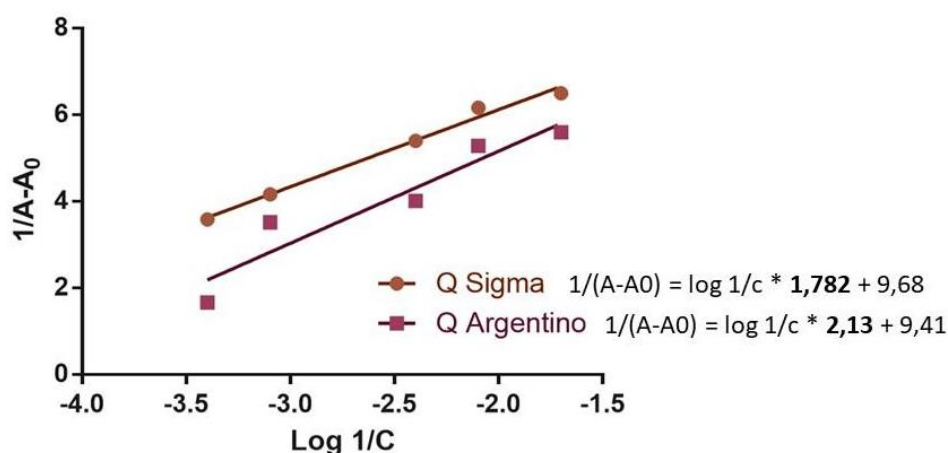


Figura II.3.6. Linealización de valores de absorbancia a 280nm de los sistemas mixtos QA-AF y con QS-AF.

II.3.2. Simulaciones de dinámica molecular

Debido a que durante el *screening* los sistemas Q-AF son tratados de forma estática, un modelo más preciso implica el estudio de simulación por DM. Esta técnica simula el movimiento de los distintos átomos del sistema a lo largo del tiempo. Se utilizó la conformación obtenida en el *docking* como estructura de partida para realizar las DMs y se hizo un muestreo lo suficientemente extenso como para poder verificar la estabilidad de la unión Q-AF. Como punto de partida, se seleccionaron las conformaciones que presentaron la menor energía de unión del AF al Q y que también se obtuvieron con mayor frecuencia. Esta elección se fundamenta con diversos estudios donde han demostrado que las formas más frecuentes tienden a tener una entropía favorable, lo que las hace más propensas a aparecer en situaciones experimentales (Bottegoni y col., 2006; Chang y col., 2008; Cosconati y col., 2010). En la **Figura II.3.7** se muestra como ejemplo los *clusters* generados a partir de las conformaciones obtenidas de las 256 evaluaciones de *docking* del AF frente a un

sistema, representados en forma de histograma. Dada la longitud molécula de Q y que tiene la posibilidad de interactuar en ambas caras de cada uno de los azúcares que lo conforman, es esperable que se obtenga una gran variedad de *clusters*. A partir de los datos del histograma se determinó que el *cluster* que posee los conformeros de menor energía implicando mayor estabilidad (*Cluster 1*) y el *cluster* con los conformeros que se obtuvieron con mayor frecuencia (*Cluster 2*) no son coincidentes. Cabe destacar que partiendo de estos diferentes *clusters* los resultados obtenidos en las dinámicas fueron similares.

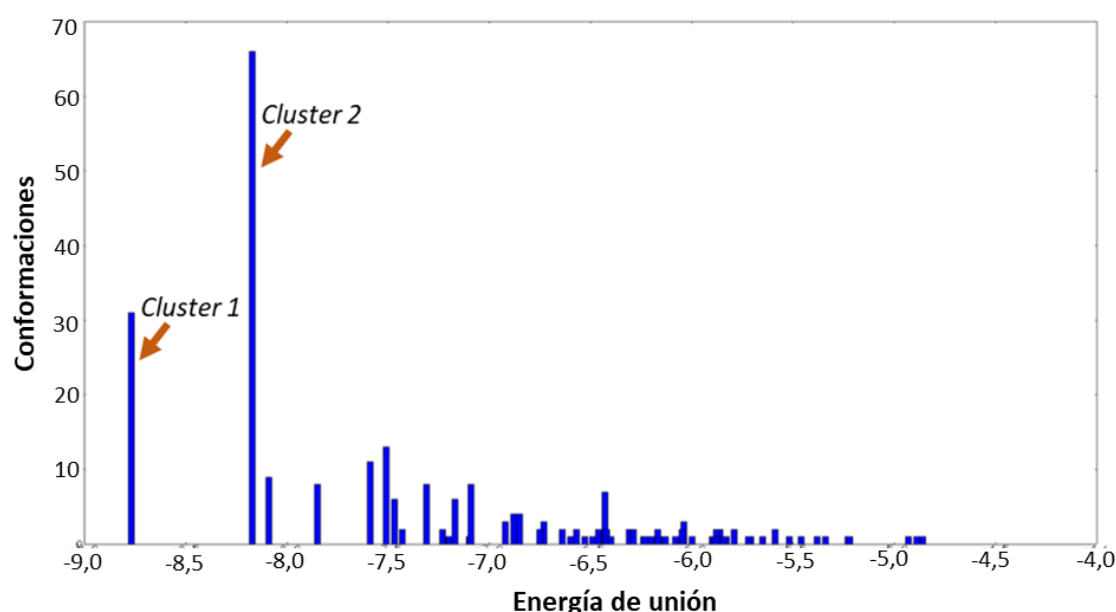


Figura II.3.7. Histograma obtenido de la evaluación de *docking* del AF en el sistema.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de *docking* indicaron que, en todas las estructuras con la menor energía de unión y mayor frecuencia, la interacción predominante es de naturaleza electrostática. Esta se dio entre un grupo carboxilato (-COO^-) del AF con el amonio (-NH_3^+) de un monómero de Q y el otro (-COO^-) del AF con el amonio (-NH_3^+) del monómero adyacente, presentándose el esqueleto de AF de forma extendida a lo largo de la estructura lineal del Q (**Figura II.3.8**). Se demuestra que el sistema es estable a pH 5, manteniéndose el AF unido al Q.

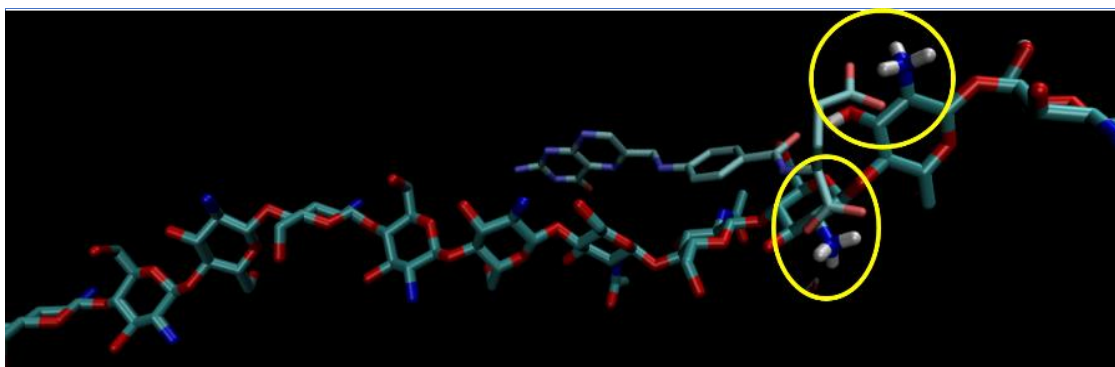


Figura II.3.8. *Docking* molecular que ilustra la interacción electrostática Q y AF mediada por los grupos -NH_3^+ del Q y ambos -COO^- del AF. Referencias: oxígeno (rojo), nitrógeno (azul), hidrógeno polar (blanco), carbono (cian).

Se tomaron como punto de partida las conformaciones de *docking* y se realizaron simulaciones por DM para analizar la estabilidad de la interacción entre el Q y el AF y verificar las interacciones que los vinculan. Durante las DMs, si bien se observa la doble interacción ilustrada en la **Figura II.3.9 a**, no es muy frecuente. Lo que prevalece es una doble interacción, pero por parte de un solo carboxilato del AF, tal como se observa redondeado en verde en la **Figura II.3.9 a** y, en menor medida, como en la **Figura II.3.9 b**. En cuanto al otro grupo carboxilato de AF, gracias a que las DM se realizan dentro de una caja de aguas discretas, se observa como frecuentemente interactúa con moléculas de agua o con algún heteroátomo de Q mediado por agua, como se observa redondeado en rosa en la **Figura II.3.9 a**. En algunas DM, se observa que la estructura de AF se despliega alejando su porción aromática de la cadena de Q. Sin embargo, ambos compuestos continúan ligados gracias a la doble interacción por parte de un solo carboxilato del AF con un NH_3^+ y un -OH del Q (**Figura II.3.9 c**). Luego vuelve a la posición anterior, extendiéndose junto con la cadena de Q.

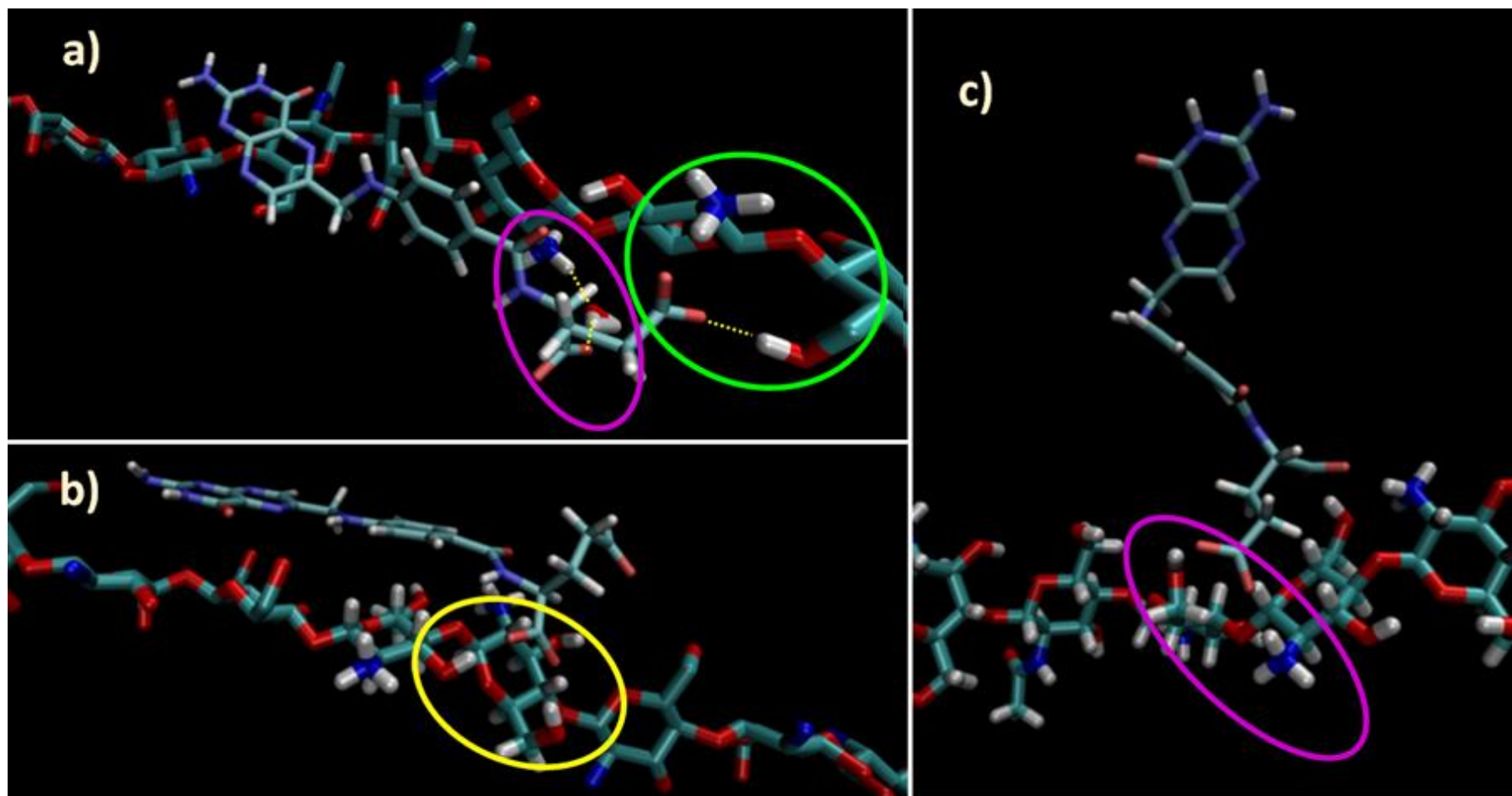


Figura II.3.9. Distintas conformaciones e interacciones observadas en el sistema Q-AF. Se redondean las interacciones que involucran a los grupos carboxilato del AF. Referencias: oxígeno (rojo), nitrógeno (azul), hidrógeno polar (blanco), carbono (cian).

En esta sección se muestra que las interacciones más fuertes a pH 5 fueron la interacción simultánea de uno de los carboxilatos del AF con a) un grupo amonio (C-2) del Q por interacción electrostática y b) un grupo -OH adyacente al amonio (ya sea con un hidroxilo en C-3 adyacentes al mencionado $-\text{CH}-\text{NH}_3^+$ o con un hidroxilo en C-6 del azúcar vecino) por interacción tipo enlace de hidrógeno. Los resultados son alentadores ya que el desarrollo de los sistemas mixtos se aplicará en matrices alimentarias en la que podría incorporarse como ingrediente cuyo pH, en general, tiene valores alrededor de 5. Cuando los sistemas atraviesen el tracto intestinal (pH $\approx 7-8$), el grupo amonio del Q quedaría neutralizado y con él desaparecería la interacción principal ($-\text{COO}^- / -\text{NH}_3^+$) permitiendo la liberación de AF al ambiente intestinal, donde se da la absorción de la vitamina, asegurando biodisponibilidad.

II.3.3. Actividad antioxidante

Químicamente, un antioxidante es un agente reductor, esto es, una molécula que puede transferir electrones y/o donar hidrógenos (Alam y col., 2013). La inclusión de bioactivos con propiedades antioxidantes en la dieta presenta un potencial notable para retardar o prevenir la aparición de enfermedades degenerativas, mejorando la calidad de vida (Stavrou y col., 2018). Las interacciones *carrier*-ligando o matriz-bioactivo, pueden modificar la actividad biológica de los componentes intervinientes. Previamente, se ha investigado la capacidad antioxidante o atrapadora de radicales libres tanto del Q (Abd El-Hack y col., 2020) como del AF (Zhao y col., 2018). Entre la comunidad científica existe un consenso en cuanto a que la sinergia de compuestos con propiedades antioxidantes podría prevalecer sobre enfoques basados en compuestos aislados, demostrando una mayor efectividad en el largo plazo (Alam y col., 2013). A este respecto, la investigación de Martínez y col. (2019) demostró que la acción antioxidante de la betanina experimenta un incremento sustancial al ser administrada en conjunto con proteínas de quinoa, superando así las actividades antioxidantes de los compuestos individuales. Por tanto, resulta de interés en este contexto, el estudio del impacto de las interacciones moleculares sobre las propiedades antioxidantes de las sustancias intervinientes.

Algunos estudios informan una débil actividad antioxidante del Q, mientras que otros informan que la actividad es nula (Anraku y col., 2018). Sin embargo, muchos estudios coinciden en el efecto potenciador de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos cuando se encuentran unidos a la cadena de Q, viéndose la actividad antioxidante de los bioactivos mejorada en los sistemas mixtos, ya sea que el Q nativo tuviera o no actividad antioxidante (Abd El-Hack y col., 2020). Se reportó que la actividad antioxidante del Q aumenta con la disminución del PM. Los quitoooligosacáridos expresaron la actividad más alta, mientras que los Q de alto PM no mostraron actividad antioxidante contra los radicales superóxido e hidroxilo (Sun y col., 2004). La actividad antioxidante del Q, que puede mejorarse aún más mediante la derivatización con grupos químicos del Q nativo (Sun y col., 2008, 2011).

Distintos estudios han señalado que el AF, además de ser una vitamina importante en la nutrición debido a los efectos sobre el tubo neural en el desarrollo embrionario (FAO, 2002; Assanelli y col., 2004; Frommherz y col. 2014), podría presentar un efecto antioxidante beneficioso para la salud. Según un estudio inicial, el AF elimina eficazmente los radicales libres *in vitro* y además ejerce efectos antioxidantes directos. Según un estudio *in vitro*, el AF no solo puede eliminar los radicales tioles de manera eficiente, sino también reparar estos tioles a pH fisiológico. Posteriormente, el AF inhibe significativamente el daño de los radicales en la célula (Joshi y col., 2001; Zhao y col., 2018). El AF también se ha reportado como depurador de otros radicales, $\text{CCl}_3\text{O}^{2-}$, N_3^- , SO_4^{2-} , Br_2^{2-} , $-\text{OH}$, y O^{2-} (Joshi y col., 2001) y su actividad antioxidante ha sido demostrada *in vivo* (Alvares Delfino y col., 2007; Liu y col., 2012). Además, el AF tiene capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (Alvares Delfino y col., 2007; Joshi y col., 2001; Zhao y col., 2018), lo cual sería de suma importancia para el diseño de nuevos ingredientes alimentarios.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta sección se evaluó la actividad antioxidante de los QA, QS y AF y se estudió cómo se modifica la actividad antioxidante al desarrollar un sistema mixto con Q-AF. Las soluciones mixtas QA:AF y QS:AF fueron preparadas a una relación de 1:10 y se estudió su actividad antioxidante por las metodologías ABTS y FRAP (**Figura II.3.10**).

Como puede observarse en la **Figura II.3.10 a** el AF exhibió una mayor capacidad antirradicalaria mediante el ensayo ABTS al estar en el sistema mixto. El QS mostró capacidad antirradicalaria por sí mismo ($4 \cdot 10^{-4}$ mg AG/ml de solución) sin embargo para el control de QA esta fue nula. Por lo tanto, la capacidad de eliminación de radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ aumentó notablemente cuando AF se combinó en matriz de Q. La cantidad final expresada como mg de GA/ml de solución alcanzó aproximadamente un valor de $5 \cdot 10^{-3}$ para AF y de $1 \cdot 10^{-2}$ en los sistemas mixtos con ambos Q, lo que indica un carácter de sinergia para los sistemas mixtos. La expresión "sinérgico" se utilizó anteriormente para describir sistemas mixtos que presentan un valor más alto para una propiedad específica que la suma de la respuesta generada por los componentes individuales (Pérez y col., 2007; Reichert y col., 2018).

En cuanto a la actividad antioxidante determinada mediante FRAP (**Figura II.3.10 b**), la cantidad final expresada como mg de GA/ml de solución alcanzó aproximadamente un valor de $5,0 \cdot 10^{-5}$ para AF, $8,6 \cdot 10^{-5}$ para QA-AF y de $7,5 \cdot 10^{-5}$ para QS-AF. Los controles de ambos Q presentaron actividad antioxidante, siendo la capacidad del QA el triple que la de QS ($3,7 \cdot 10^{-5}$ y $1,1 \cdot 10^{-5}$ mg AG/ml de solución respectivamente). Por esta metodología puede observarse también un efecto de sinergia en los sistemas mixtos.

El comportamiento de la actividad antioxidante de un compuesto dado, solo o en un sistema mixto, puede variar de un método a otro dependiendo de factores como el mecanismo de reacción involucrado, la solubilidad del antioxidante, el estado de oxidación, el pH y el tipo de sustrato propenso a la oxidación (Alam y col., 2013). Esto puede observarse al comparar los resultados numéricos obtenidos mediante ABTS y FRAP. Sin embargo, el resultado global de sinergia en la actividad antioxidante se ve reflejado en ambas metodologías, siendo esto un resultado alentador para el desarrollo de los sistemas mixtos. Fathima y col. (2022) desarrollaron nanopartículas de Q-AF y estudiaron su actividad antioxidante por la metodología del radical DPPH. Las nanopartículas mostraron una actividad de eliminación de radicales DPPH mejorada respecto al AF libre, incrementándose en un 28 %, a una concentración de 1 mg/ml. En estudios anteriores de co-encapsulación de AF con vitamina C o ácido cafeico (Jiao y col., 2018; Wusigale y col., 2021), se encontró que la actividad antioxidante se alteró después de recubrir con el biopolímero Q y también mostró que

tal recubrimiento no solo conserva la actividad antioxidante inicial de vitamina C sino que la aumentó.

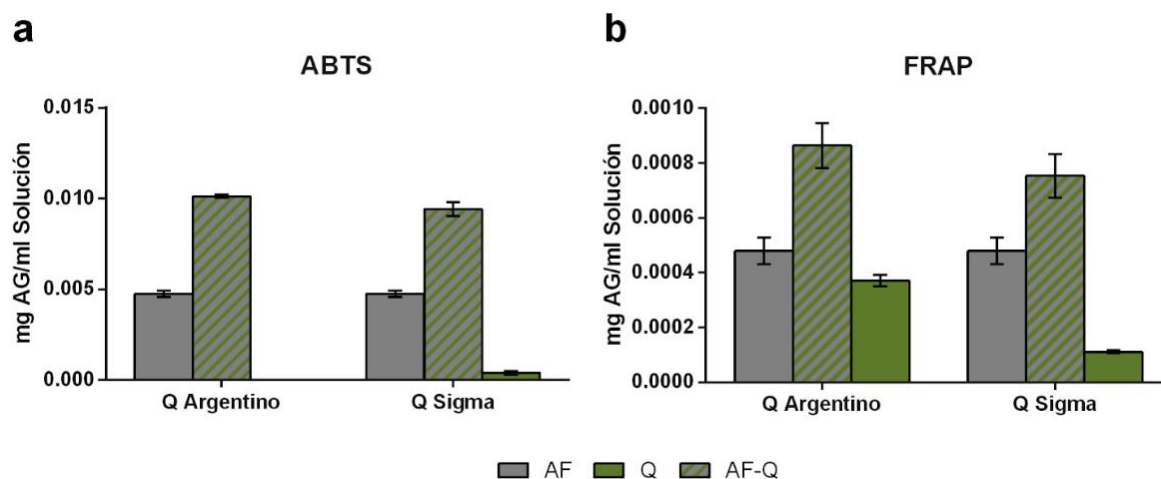


Figura II.3.10. (a) Actividad antirradicalaria evaluada por ABTS **(b)** Actividad antioxidante evaluada por FRAP. Soluciones de AF, Q y AF-Q. Media $\pm$ SD. n = 3.

II.3.4. Citotoxicidad. Viabilidad celular en línea celular Caco- 2

Luego de caracterizar algunos de los aspectos fisicoquímicos de las muestras, la investigación continuó con la caracterización en un modelo biológico *in vitro*. Se utilizó la línea celular Caco-2, una línea continua de células de adenocarcinoma colorectal epitelial humano. Esta línea celular es usada en forma oficial para estudiar los procesos de permeabilidad (Dou y col., 2019; Kowapradit y col., 2010) y de biodisponibilidad en modelos gastrointestinales *in vitro* (Minekus y col., 2014).

Para definir la citotoxicidad de un biomaterial se pueden utilizar como parámetros tanto la adhesión celular como su morfología, ya que son probablemente los aspectos más importantes de la interacción celular con un biomaterial. En este sentido, se realizó la caracterización de la morfología de las células tratadas con QA y QS mediante microscopía de contraste de fase. Las células Caco-2 generalmente presentan diferencias morfológicas con el aumento del número de pasajes, durante este ensayo se trabajó con células en pasajes 60-70. Los cultivos se observaron normales, constituidos por células planas y escamosas cuyos contornos se presentaron

ligeramente definidos, de acuerdo Jahn y col. (2011). Como se observa en la **Figura II.3.11**, el cultivo de Caco-2 progresó en islas planas, expandiéndose con el tiempo, con gránulos correspondientes al almacenamiento de glucógeno (Ferrareto y col., 2007). Cuando el cultivo se daña, las células comienzan a encogerse y redondearse y pierden su capacidad de adhesión en la superficie de la placa de cultivo (Elsayed, y col., 2015; Chakrabarti y col., 2003). Bajo el tratamiento de Q, no se observó una disrupción en la monocapa de Caco-2 ni se observaron diferencias notorias.

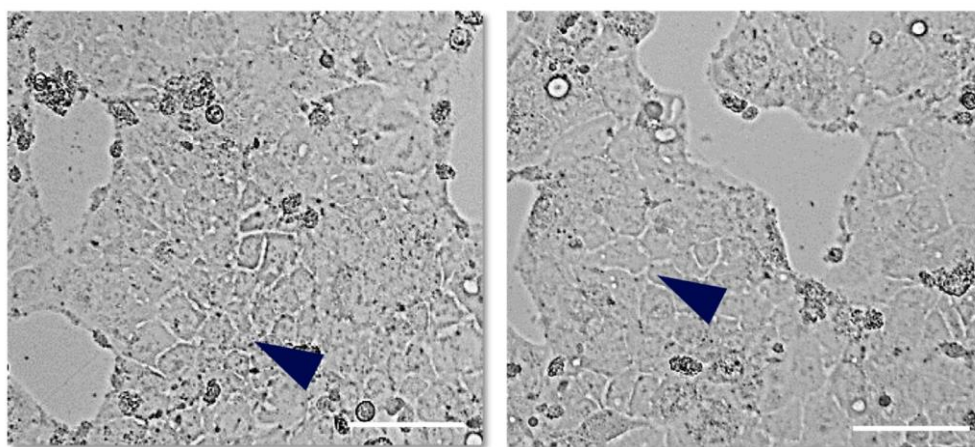


Figura II.3.11. Microscopía óptica de contraste de fase de monocapa de células Caco-2. Flechas azules señalan células planas y escamosas con bordes levemente definidos, organizadas en forma de isla. Barra de escala 50 μm .

Se realizaron pruebas de viabilidad celular empleando la técnica de MTT para determinar la actividad metabólica de las células Caco-2 frente a distintos tratamientos de Q, AF y sistemas mixtos. Tanto en los tratamientos con QA como con QS se observó un aumento en la actividad metabólica con respecto al control de células en todas las concentraciones utilizadas (**Figuras II.3.12 a y b**). El aumento de viabilidad pudo corroborarse mediante microscopía óptica de contraste de fase (**Figuras II.3.13**), observándose una confluencia mayor en la muestra tratada respecto al control, incubadas ambas bajo las mismas condiciones. En el caso de las células tratadas con AF, no se observaron diferencias significativas respecto al control para ninguna de las concentraciones utilizadas (**Figura II.3.12 c**). En función de estos resultados, la concentración seleccionada para estudiar el efecto de las matrices mixtas fue de 250

µg/ml ya que es el tratamiento que promovió mayores diferencias, estadísticamente significativas respecto del control.

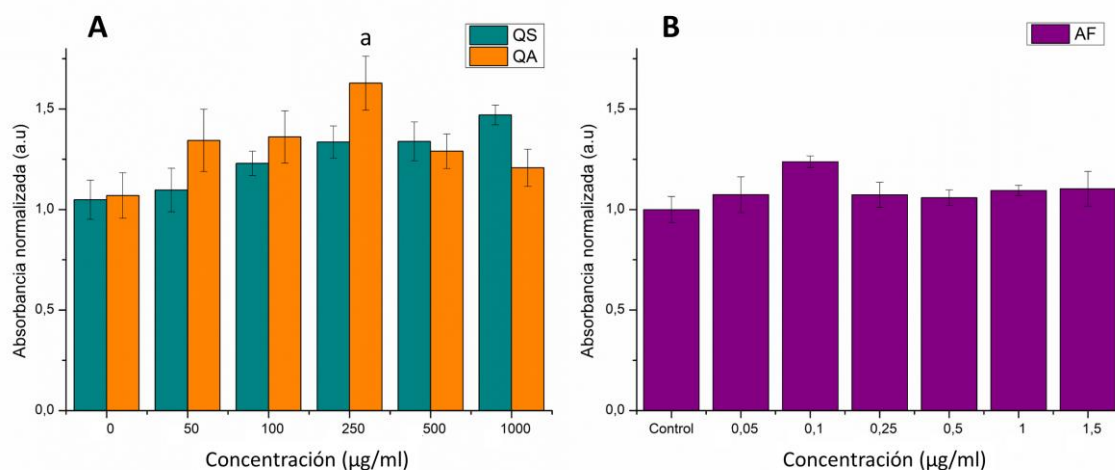


Figura II.3.12. Viabilidad celular de Caco-2 por MTT. Tratado con **(A)** QS, QA y **(B)** AF. Media $\pm$ SD. n = 6. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

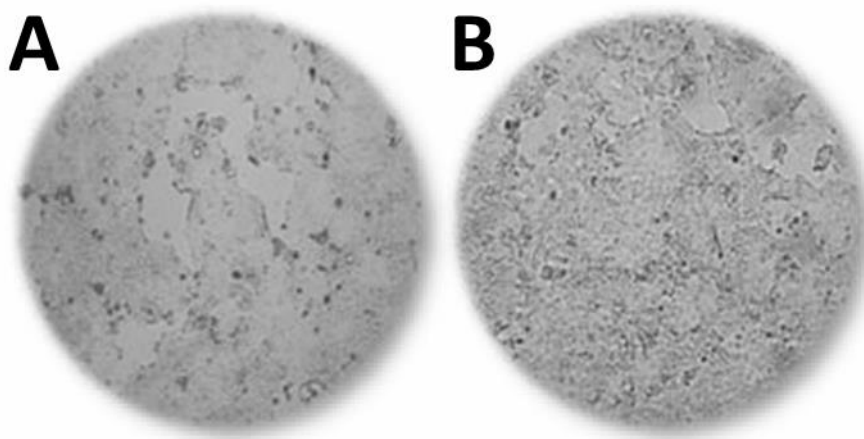


Figura II.3.13. Microscopía de contraste de fase de células Caco-2. **(A)** Control, **(B)** Tratamiento con QA 250 µg/ml.

El efecto citotóxico y potencialmente antiproliferativo de las formulaciones derivadas de Q en las células Caco-2 fue estudiado por diversos autores. Las nanopartículas de Q (Loh, y col., 2012; Je y col., 2017), los nanocompuestos de Q (Kowapradit y col., 2010)

y los Q modificados químicamente (Wongwanakul y col., 2016) fueron evaluados previamente en términos de su biocompatibilidad y su potencial uso como vehículos de administración de fármacos por vía oral. Un Q de bajo peso molecular, que generó suspensiones de baja viscosidad, se evaluó en su forma libre sin mostrar efectos nocivos en las células Caco-2 e incluso demostró una mayor proliferación celular, en concordancia con los resultados de esta Tesis (Salcedo y col., 2012). Las vías celulares y moleculares que regulan esta proliferación inducida por Q en células Caco-2 siguen siendo desconocidas. Loh y col. (2012) informaron un efecto de la condición de pH de los tratamientos con Q; Q de PM medio a pH 6,0 aplicado durante 72 h aumentó la proliferación de Caco-2 en comparación con la condición de pH 7,4. Por el contrario, un Q modificado químicamente para aumentar su solubilidad en agua (Q cuaternizado a través de la unión con cloruro de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamonio), mostró algunos efectos negativos sobre la proliferación al disminuir la viabilidad celular (Wongwanakul y col., 2016). Di Santo y col. (2020) estudiaron la biocompatibilidad del QA en líneas celulares eucariotas de fibroblastos de ratón (3T3-L1), endoteliales humanas (EA.hy926), Caco-2 y del epitelio pigmentario de la retina humano (ARPE-19) y en bacterias probióticas (*Lactocaseibacillus casei* BL23). Los resultados obtenidos indicaron que el QA no afectó la proliferación de las células eucariotas y procariotas estudiadas, presentando una mayor proliferación las células ARPE-19. Sobre la base de estos hallazgos, plantearon la hipótesis de que la diferencia obtenida en la proliferación podría estar relacionada con diferentes estrategias de captación (*uptake*) celular.

Por otra parte, en la **Figura II.3.14** se observó que, en los tratamientos con las matrices mixtas donde se mantuvo la concentración de Q en 250 µg/ml y las concentraciones de AF fueron variables, que no se registraron incrementos en la viabilidad respecto al tratamiento realizado únicamente con AF. Por lo tanto, puede concluirse que este aumento en la viabilidad celular está determinado principalmente por el Q. Fathima y col. (2022) estudiaron la viabilidad celular en células tratadas con nanopartículas de Q-AF mediante el ensayo MTT después de la incubación con varias concentraciones de AF libre y nanopartículas de Q-AF que oscilaron entre 25 y 400 µg/mL durante 24 h. La viabilidad de las células Caco-2 fue superior al 90 % en todas las concentraciones de nanopartículas de Q-AF. Los valores registrados para las diferentes concentraciones

enumeradas confirman que el AF encapsulado no resultó tóxico y mostró estabilidad y citocompatibilidad con las células de mamíferos impactadas con el Q. La toxicidad también se comprobó mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), que se determina según la liberación de LDH de la membrana celular de las células lisadas a causa de los tratamientos. La liberación de LDH de las células Caco-2 debido al AF libre y nanopartículas de Q-AF fue limitada en comparación con el control después de 24 h, lo que sugiere que no hubo daño en la membrana plasmática. En comparación con estudios previos, el tratamiento con nanopartículas de Q no alteró la viabilidad de las células Caco-2. Por lo tanto, estudiar la biocompatibilidad *in vitro* es un parámetro importante para garantizar que los sistemas basados en Q no tengan efectos tóxicos en modelos *in vivo* (Manigandan, 2018) y en el caso de esta Tesis el sistema mixto Q-AF.

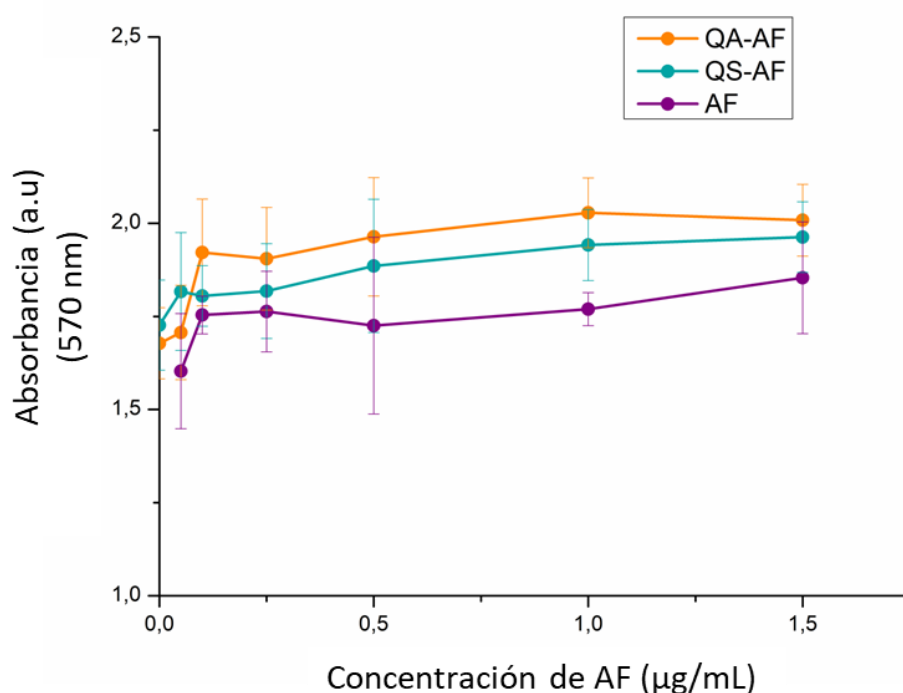


Figura II.3.14. Viabilidad celular de Caco-2 determinada por el método MTT. Tratado con AF, QA-AF y QS-AF, concentración de Q fija a 250 µg/mL. Media $\pm$ desvío estándar, n=6.

II.3.5. Contenido de humedad en muestras liofilizadas

El contenido de humedad en sistemas deshidratados es de suma importancia tras la aplicación del proceso de secado, dado que el agua remanente ejerce un efecto

significativo en la estabilidad del sistema. El contenido de humedad en las muestras liofilizadas se muestra en la **Tabla II.3.1**. Los valores obtenidos fueron superiores a los reportados por Luo y col. (2019), en este trabajo caracterizaron Q obtenidos de diferentes fuentes naturales que presentaron un contenido de humedad que osciló entre 0,18 y 2,7 % (b.h.). Kanwal y col. (2021) estudiaron microencapsulados obtenidos por la tecnología *microspray* utilizando Q como matriz con el objetivo de encapsular aceite de pescado. Las microcápsulas contuvieron un porcentaje de humedad de entre 3,8 y 5 %. Esta diferencia sustancial se debe a la naturaleza de las metodologías de deshidratación utilizadas para obtener las muestras.

Tabla II.3.1. Contenido de humedad en muestras liofilizadas determinado por método gravimétrico.

Muestras	Relación Q:AF	Contenido de humedad (%)
AF	0:1	9,97 ± 0,08
	1:0	15,00 ± 2,00
QS	1:1	13,00 ± 1,00
	1:2	12,10 ± 0,60
	1:10	9,20 ± 0,60
	1:0	15,00 ± 0,70
QA	1:1	12,80 ± 0,90
	1:2	14,10 ± 1,00
	1:10	9,90 ± 0,80
	1:0	15,00 ± 0,70

* media ± SD para n=2.

II.3.6. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se obtuvieron imágenes de AFM para estudiar los detalles topográficos que muestran las características morfológicas de los sistemas deshidratados obtenidos del secado *in situ* (sobre soporte) de las soluciones mixtas QA-AF y QS-AF. Las micrografías AFM se muestran en la **Figura II.3.15**. La primera columna muestra la imagen obtenida por la técnica AFM, la segunda muestra la escala de color entre la altura máxima y la mínima y la tercera es una representación en tres dimensiones (3D) para cada imagen de la primera columna.

Así, la **Figura II.3.15 A**, correspondiente a AF, describe formas cristalinas definidas como un sistema particulado constituido por estructuras con forma de aguja con una

altura promedio de 6,37 nm. No se detectaron aglomeraciones de cristales. El AF fue caracterizado previamente por Pérez y col. (2014b) mediante esta técnica, aunque se trató de un sistema inmerso en butanol ya que parte del polvo quedaba atrapado en el microtip del cantiléver. Estas imágenes indicaron una matriz de materia agregada considerablemente más heterogénea y rugosa con diferencias de pico a valle que superaban los 20 nm.

En comparación, la morfología de la superficie de QA (**Figura II.3.15 B**) y QS (**Figura II.3.15 C**) se caracterizan por una superficie corrugada, como informó previamente Lewandowska (2015). La superficie de estos *films* presentó una serie de grupos/cúmulos individuales que podrían indicar aglomerados de cadenas de Q. Estos se mantuvieron unidos para dar una superficie con una estructura de "picos y valles" (Assis y col., 2002). Además, se puede observar en las imágenes una tendencia de los aglomerados a formar "hebras" similares a fibrillas (Rubina y col., 2020).

Kocun y col. (2011) llevaron a cabo un estudio de la adsorción del Q de soluciones preparadas en *buffer* acetato de sodio (pH 4,5-5,5) sobre un sustrato de mica. Las imágenes de AFM mostraron dos morfologías distintas. Por un lado, hebras individuales de Q y por el otro, hebras agregadas, con formas alargadas en ambos casos. Sin embargo, una diferencia significativa entre sus hallazgos y los resultados aquí mostrados es la alta concentración de sales (acetato de sodio), que puede impactar en la conformación que adquiere el Q. Además, es importante destacar que la solubilidad del Q no depende únicamente del pH del solvente, sino también de su naturaleza. Por lo tanto, la elección del solvente puede influenciar drásticamente el patrón conformacional del Q, como fue demostrado por Pigaleva y col. (2014).

La formación de superficies de los sistemas mixtos QS-AF y QA-AF resultó similar a la de QS y QA individuales, respectivamente, lo que sugiere que la estructura de los Q predominó en la superficie mixta. Los cambios observados en la topografía podrían estar relacionados con las interacciones entre ambos componentes que conducen al aumento del tamaño de los microdominios. La **Figura II.3.15 D** corresponde a las muestras de QS-AF, cuya superficie se volvió desigual y más irregular que la formada por QS. De manera contraria, la superficie del sistema mixto QA-FA presentó dominios

de tamaños más pequeños en comparación con QA, con una disminución concomitante de la irregularidad de la superficie.

El tamaño promedio de partícula, la rugosidad y la altura obtenidos usando las imágenes AFM de la **Figura II.3.15** se dan en la **Tabla II.3.2**; este análisis se realizó para estudiar las características de la superficie de las películas aplicadas por *spin-coating* y dar idea de las interacciones entre el Q y el AF detectables a nivel topográfico. El cálculo de los parámetros de rugosidad a partir de los datos de altura medidos mediante la técnica AFM proporciona valores que contienen información de todo tipo de irregularidades (Antonio y col., 2012). En la literatura, existen pocos estudios que demuestren que estos parámetros se hayan utilizado en investigaciones de matrices alimentarias; no obstante, esta herramienta puede proporcionar información valiosa. La rugosidad se asoció con la humectabilidad y la adhesividad de materiales específicos (Lu y col., 2022). Como se puede observar en la **Tabla II.3.2.**, la rugosidad de ambos Q resultó bastante diferente, el AF mostró un valor intermedio entre QA y QS. No obstante, los sistemas mixtos exhibieron valores de rugosidad muy similares. Aunque para el caso QS-AF el valor resultante fue intermedio a los correspondientes a una sola especie y para el caso QA-AF, la rugosidad fue menor que los valores promedio obtenidos para los componentes individuales. Evidentemente, las características moleculares de cada Q determinaron la rugosidad en cada sistema binario. Joergensen y col. (2011) reportaron un estudio sobre mucina y pectinas, con diferente PM y grado de funcionalización, para aplicaciones submaxilares bovinas. Compararon, calificaron y cuantificaron los diferentes comportamientos de interacción encontrados entre los biopolímeros en función de la rugosidad, obteniendo información valiosa por análisis de las micrografías topográficas tomadas por AFM. Los valores de rugosidad informados para los sistemas mixtos mucina-pectina estuvieron en el orden encontrado para las mezclas aquí estudiadas, siendo mayores para la pectina de mayor peso molecular

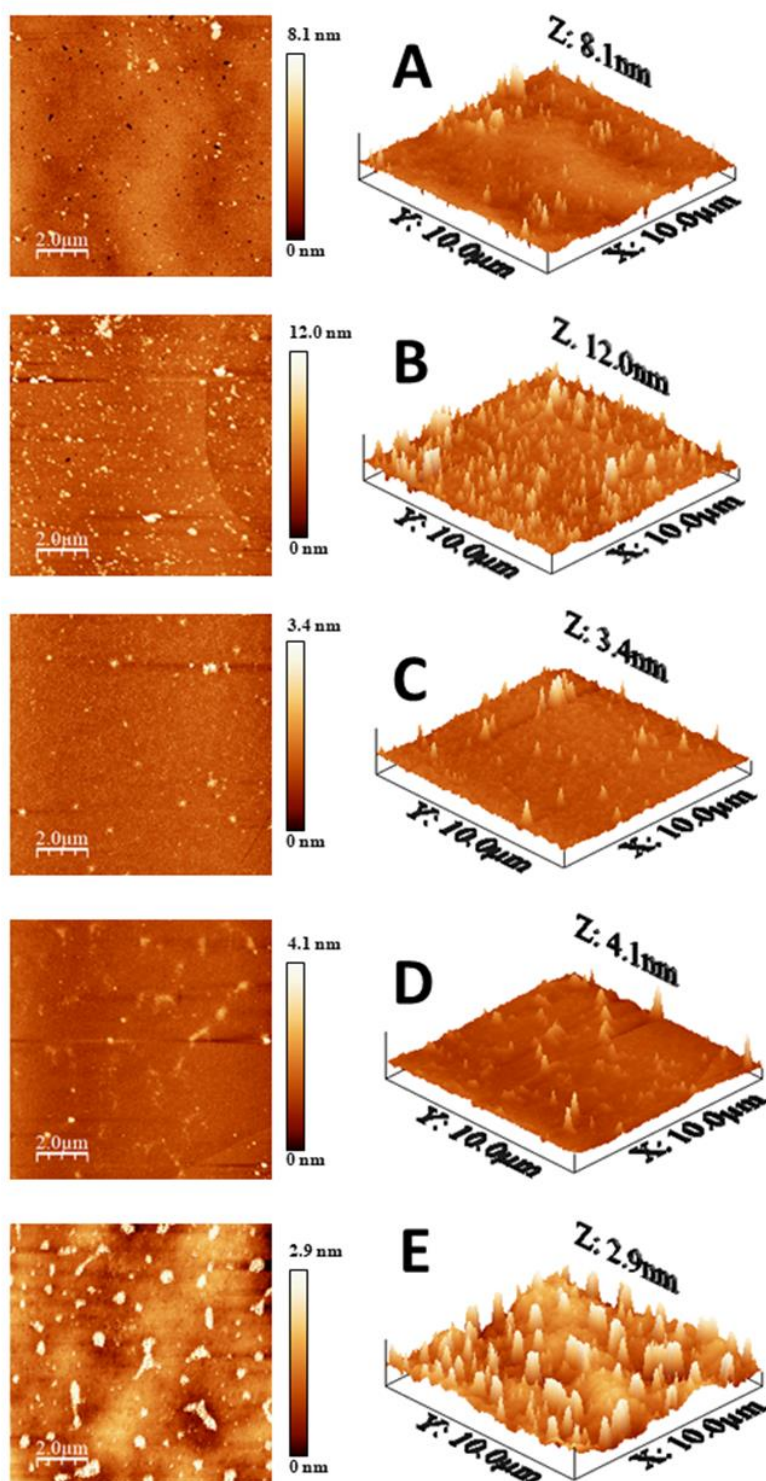


Figura II.3.15. Topografías obtenidas por microscopía de fuerza atómica de soluciones de (A) AF, (B) QS, (C) QA, (D) sistema mixto QS-AF, (E) sistema mixto QA-AF.

Tabla II.3.2. Tamaño de partícula y rugosidad de muestras obtenidas por AFM.

Muestra		Tamaño de partícula (nm)*	Rugosidad (nm)*
	AF	18,17 ± 2,00	0,65 ± 0,02
	QS	34,54 ± 0,80	0,22 ± 0,01
	QA	51,56 ± 4,00	0,91 ± 0,05
Sistemas mixtos	QS-AF	63,38 ± 2,73	0,47 ± 0,02
	QA-AF	8,61 ± 0,75	0,41 ± 0,03
LbL	QS-AF	36,12 ± 3,33	2,57 ± 0,23
	QA-AF	50,91 ± 3,74	2,08 ± 0,18

* media ± SD para n=2. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

Entre las diferentes técnicas de procesamiento propuestas para desarrollar y estudiar recubrimientos nanoestructurados, la deposición LbL aparece como una de las técnicas más atractivas (Alves y col., 2010; Gribova y col., 2012). Entre los métodos LbL reportados en la literatura, el *spin-coating* aparece como una buena alternativa para producir rápidamente películas delgadas uniformes, utilizando los mismos materiales del *dip-coating* y promoviendo el autoensamblaje electrostático *in situ* (Almeida y col., 2020). La estructura y la topografía de los ensamblajes de LbL influyen en propiedades como la adhesión, la biocompatibilidad y la liberación de fármacos (Marken y col., 2008). En este sentido, la **Figura II.3.16** muestra las imágenes AFM obtenidas por los recubrimientos LbL; la primera capa o *layer* depositada corresponde al Q mientras que la segunda al AF. Estas imágenes exhiben características diferentes en la topografía con respecto a las obtenidas de los sistemas mixtos en solución. A primera vista, se puede ver que los sistemas LbL QS-AF (**Figura II.3.16 A**) y QA-AF (**Figura II.3.16 B**) describieron patrones similares, incluso las distancias pico a valle resultaron en el mismo orden, 19,8 y 16,8 nm, respectivamente. Para ambos casos se pueden observar dominios agrupados con pocos espacios entre ellos. Aunque en el caso de QA-AF los espacios sin dominios fueron más notorios, pudiendo visualizarse el soporte de mica. Las películas de LbL presentaron mayor rugosidad que las de las soluciones mixtas. La existencia de una topografía superficial más rugosa de la muestra obtenida por LbL podría indicar la presencia de estructuras interpenetradas separadas y con mayor altura (Almeida y col., 2020; Marudova y col., 2016).

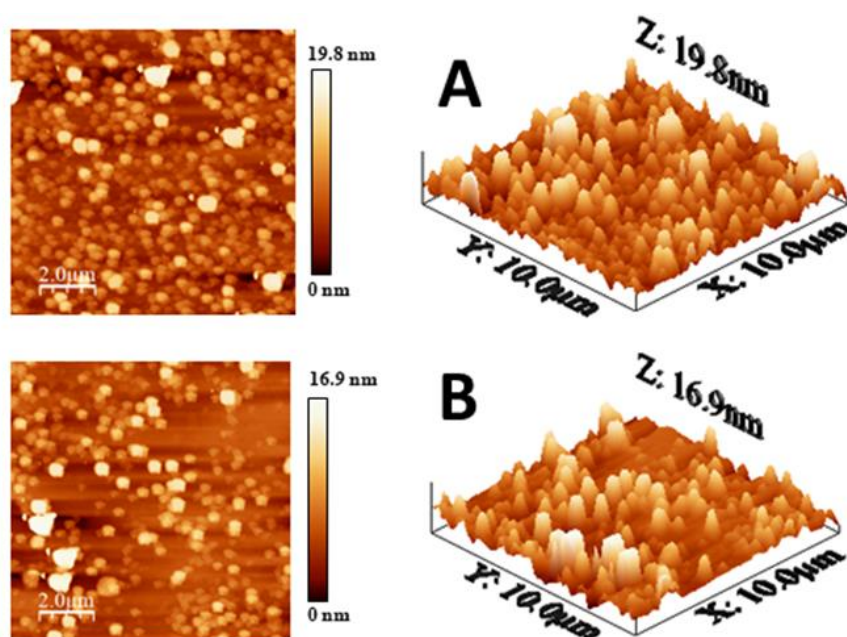


Figura II.3.16. Topografías obtenidas por microscopía de fuerza atómica de muestras sembradas por técnica LbL **(A)** QS-AF, **(B)** QA-AF.

II.3.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es una herramienta ampliamente usada para analizar compuestos e interacciones entre compuestos de distinta naturaleza. Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes (Carbonaro y Nucara, 2009; Barraza-Garza y col., 2013).

Los espectros FTIR de QA y QS se muestran en **Figura II.3.17**. Tanto QA como QS produjeron un patrón muy distintivo que mostró las bandas principales ya reportadas en trabajos previos (Weißpflog y col., 2021; Prudkin-Silva y col., 2020), prácticamente sin diferencia entre ambos Q. Presentaron bandas anchas, correspondiéndose a un biopolímero amorfo o con cristalinidad no extensiva (Santagapita y col., 2012). Las bandas relevantes que presentaron los Q son las relacionadas con el estiramiento del enlace amida en 1631 cm^{-1} y la protonación del grupo amino en 1525 cm^{-1} . El estiramiento OH se observa entre 3100 y 3800 , con máximos alrededor de 3424 cm^{-1} ; el típico estiramiento asimétrico y simétrico C-H a 2939 y 2896 cm^{-1} , respectivamente;

el estiramiento del enlace amida a 1631 cm^{-1} y la protonación del grupo amino a 1525 cm^{-1} (y su deformación a 1415); el balanceo de C-H en 1382 , el estiramiento de C-N amida en 1322 y el pico principal de C-O-C en 1093 y 1072 , 1152 y 1021 cm^{-1} .

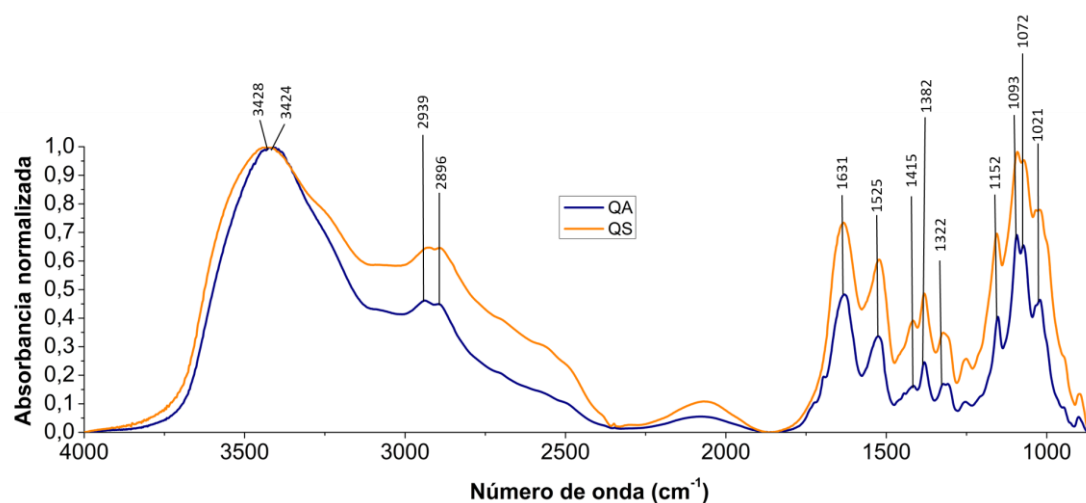


Figura II.3.17. Espectro FTIR de QA y QS.

Las **Figuras II.3.18** y **II.3.19** muestran los espectros IR de los sistemas mixtos QA:AF y QS:AF en las diferentes relaciones de masas, respectivamente. Al pH de preparación de los sistemas mixtos, el AF se encuentra protonado. La comparación completa del AF protonado con respecto al AF neutro, obtenido al analizar el polvo de AF comercial (99,2 % de pureza), se muestra en la **Figura II.3.20**. Las bandas principales características de AF, que surgen de las vibraciones OH, NH, C—N y C—O, fueron reportadas previamente (Assadpour, Jafari, y Maghsoudlou, 2017; Raouf y col., 2014). Las bandas de 1456 , 1485 y 1519 cm^{-1} corresponden al anillo de pteridina; la flexión NH da señales a 1544 y 1606 cm^{-1} ; el C—C aromático a 1571 cm^{-1} ; el C—N en 1639 cm^{-1} y el estiramiento de C—O en 1692 cm^{-1} . El estiramiento OH de los grupos carboxílicos (región del ácido L-glutámico), el NH_2 y el NH del anillo de pteridina dan señales entre 3000 y 3600 cm^{-1} , entre otras. El AF mostró algunas señales bien conocidas y distintivas, reportadas previamente (Corfield y col., 2020); las cuales se observan en cada sistema mixto estudiado con cambios de intensidad relativa entre los componentes (**Figuras II.3.18** y **II.3.19**). La zona de $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ mostró varias bandas de AF, predominando los espectros mixtos, lo que dificultó la identificación de

las principales bandas de Q. En cambio, entre 1200 y 800 cm^{-1} del C-O-C predominaron las bandas correspondientes al Q.

Las señales correspondientes al AF fueron nítidas, más típicas de un material cristalizado que de un material amorfo -como se ratificará por la técnica de difracción de rayos x (PXRD) en la **Sección II.3.8**- casi sin modificación en los sistemas mixtos. La posición de los máximos de OH corresponden al AF en los sistemas mixtos, con un aumento en el área de la señal a números de onda más altos debido a la contribución del Q (**Figura II.3.17**). Sin embargo, hubo algunas zonas donde se revela una interacción entre QA y AF: la banda en 1382 se desplazó a 1388 cm^{-1} y se intensificó con respecto al AF simple (1391 cm^{-1}). De la primera derivada de los espectros de la **Figura II.3.18** -que se muestra en la **Figura II.3.21**- se pueden obtener las mismas conclusiones, respaldando el análisis.

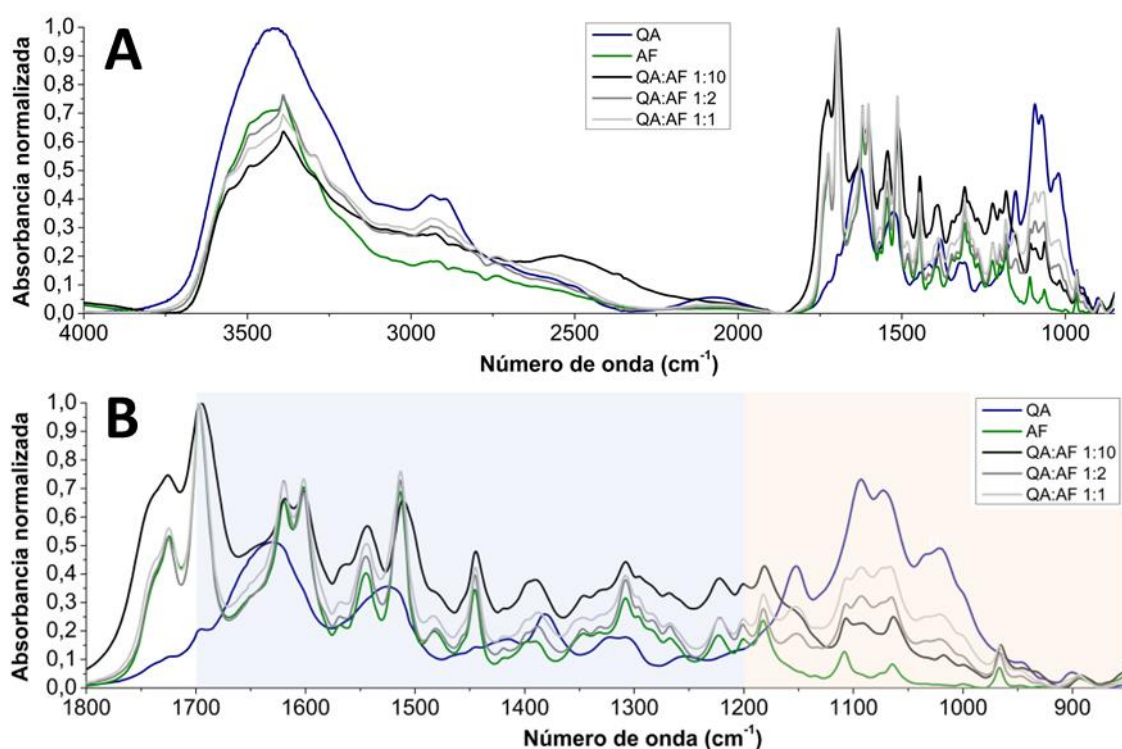


Figura II.3.18. Espectro FTIR de QA, AF y sistemas mixtos. **(A)** espectro completo **(B)** detalle entre 850 y 1800 cm^{-1} .

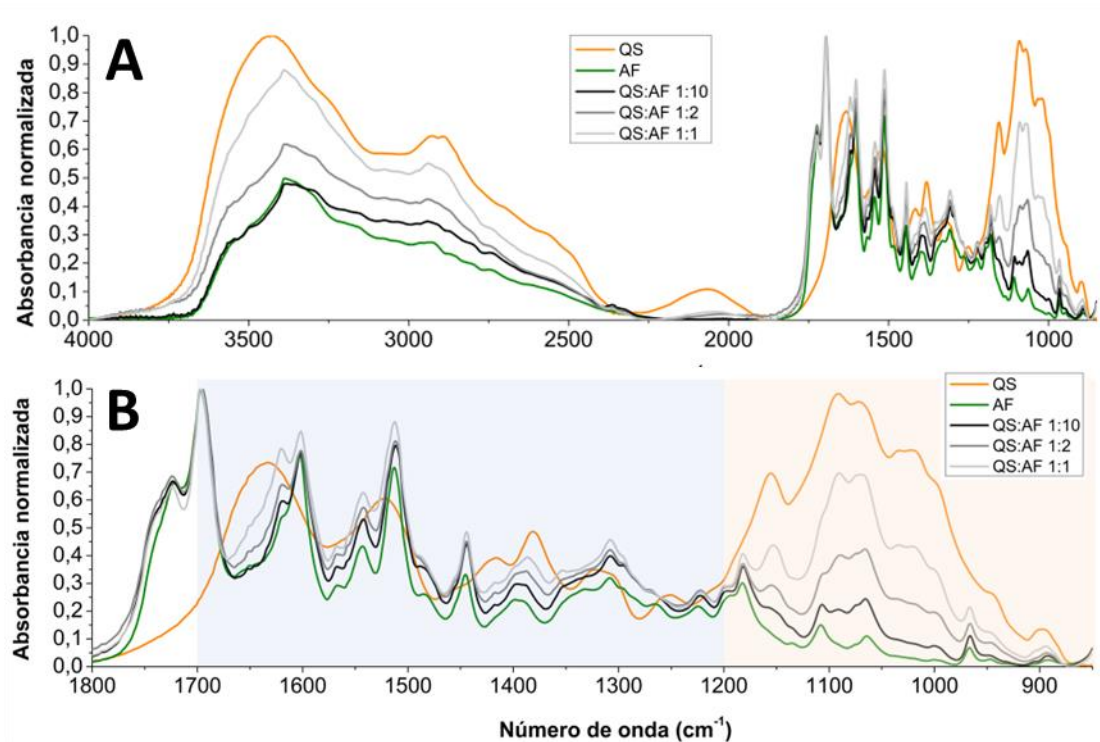


Figura II.3.19. Espectro FTIR de QS, AF y sistemas mixtos. (A) espectro completo (B) detalle entre 850 y 1800 cm^{-1} .

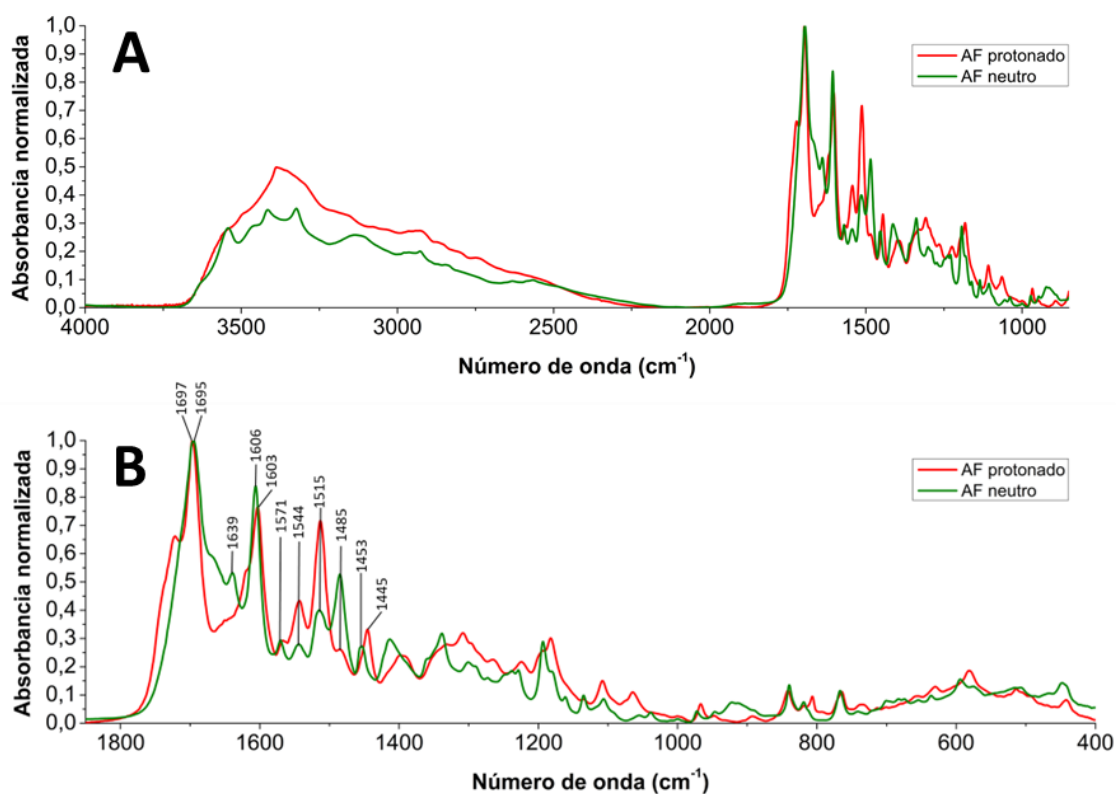


Figura II.3.20. Espectro FTIR de AF protonado y neutro. (A) espectro completo (B) detalle entre 850 y 1800 cm^{-1} .

El método de transformación de espectros FTIR por derivada es utilizado para mejorar la resolución de las bandas que presentaron las muestras. Una derivada de primer orden es la tasa de cambio de absorbancia con respecto a la longitud de onda, la misma comienza y termina en cero. También pasa por cero a la misma longitud de onda que el máximo de la banda de absorbancia. A ambos lados de este punto hay bandas positivas y negativas con un máximo y un mínimo en las mismas longitudes de onda que los puntos de inflexión en la banda de absorbancia. La ventaja del ajuste por derivadas se puede apreciar de mejor manera en espectros complejos de FTIR en donde se dificulta su interpretación cualitativa o cuantitativa, se puede utilizar para resolver y localizar picos en una "envoltura". Sin embargo, hay que tener en cuenta que las bandas nítidas se realzan a expensas de las anchas y esto puede permitir la selección de un pico adecuado, incluso cuando hay una banda ancha debajo (Stuart, 2005).

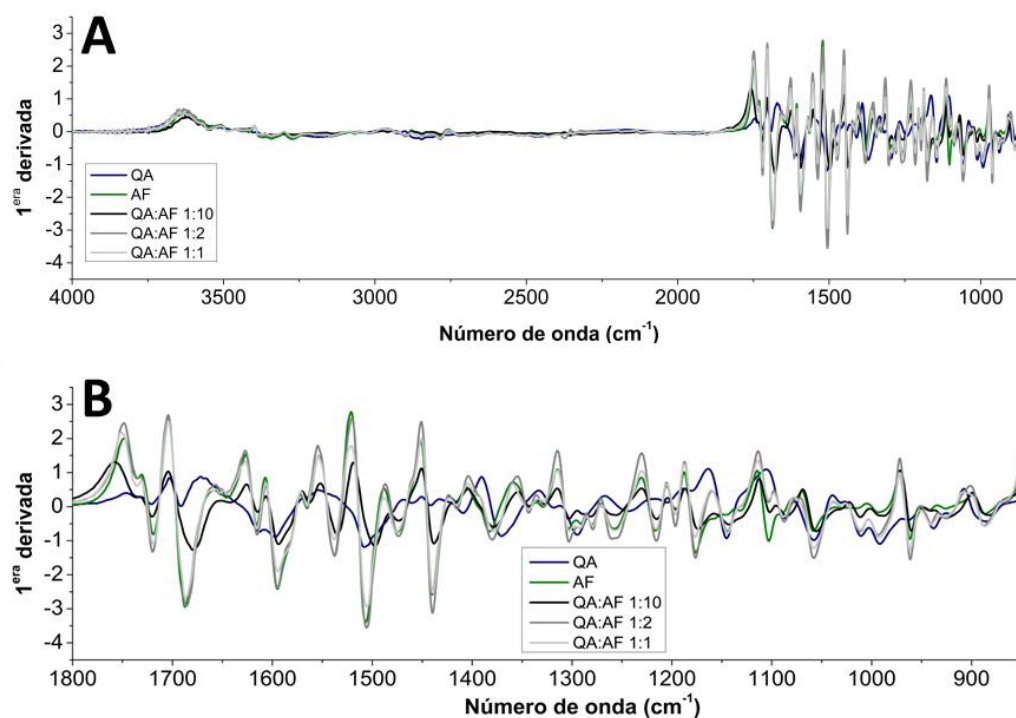


Figura II.3.21. Primera derivada del espectro FTIR de QA, AF y sistemas mixtos. **(A)** espectro completo **(B)** detalle entre 850 y 1800 cm^{-1} .

II.3.8. Estructura cristalina

Se realizaron determinaciones de difracción de rayos X sobre polvos para analizar los cambios estructurales de los componentes de las muestras de QA-AF y QS-AF y se relacionaron con otras variables comúnmente consideradas en alimentos, como la presencia de otros componentes, el pH y las concentraciones de ingredientes. El difractograma del QA presenta dos señales amplias a aproximadamente $12,5^\circ$ y $25,0^\circ$ en 2θ (**Figura II.3.22**), como se informó anteriormente para un Q tratado en una solución acuosa de HCl (Nguyen y col., 2019; Qiao y col., 2021). Estas señales son características de un material amorfo, pero muestran alguna estructura parcialmente organizada. El patrón de difracción de la muestra de AF utilizada como control presentó varios picos más intensos y estrechos (**Figura II.3.22**), característicos de un material cristalino (Nguyen y col., 2019). Los principales picos fueron en $2\theta = 6,8^\circ, 8,1^\circ, 13,4^\circ, 14,4^\circ, 16,1^\circ, 26,4^\circ$ y $27,6^\circ$, obteniéndose picos concordantes con estudios previos (Beagan y col., 2016; Mohammed y col., 2021; Vora y col., 2002). Los datos obtenidos coincidieron con el difractograma del compuesto en su estado protonado (**Figura II.3.23**), lo que se relaciona con el hecho de que durante la preparación de la muestra se utilizó HCl acuoso para mejorar la solubilidad del Q, también corroborado mediante los espectros FTIR y ^1H -NMR y ^{13}C -NMR. Los difractogramas de las muestras preparadas usando QA y diferentes proporciones de AF también mostraron picos agudos en la misma posición y con intensidades relativas idénticas a las obtenidas para el AF usado como control (**Figura II.3.22**). Estos resultados mostraron que la estructura de AF se mantuvo en el sistema mixto. Además, la forma del AF fue independiente de la relación QA:AF, ya que a medida que aumentó la proporción del AF, también aumentaron las intensidades de sus picos, mientras que las señales asociadas al QA disminuyeron. Se obtuvieron resultados análogos para los sistemas mixtos QS-AF (**Figura II.3.24**). Nguyen y col. (2019) informaron un patrón de difracción de AF semejante al mostrado en esta Tesis, ya que dicho patrón desapareció en nanopartículas de Q-AF y ácido poli(láctico-co-glicólico).

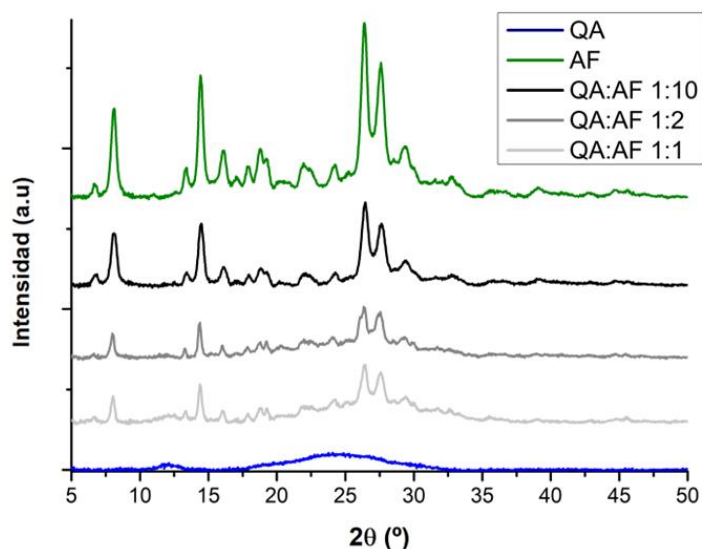


Figura II.3.22. Difractogramas obtenidos mediante DRX de polvos de QA, AF y soluciones mixtas en diferentes proporciones QA:AF.

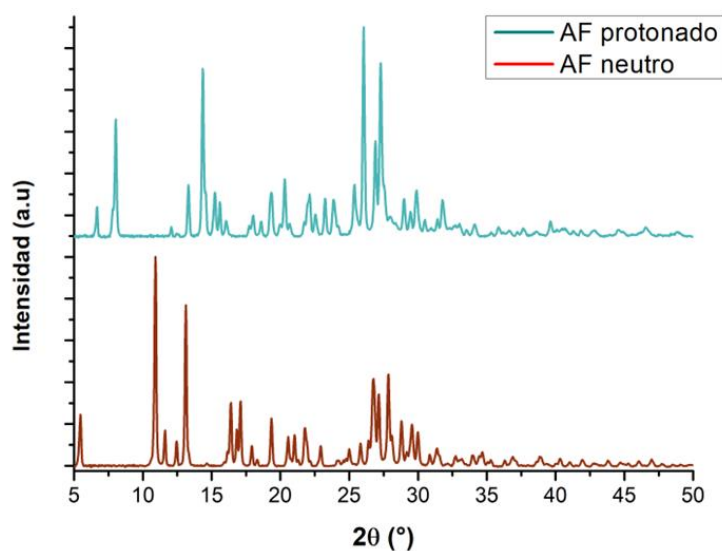


Figura II.3.23. Difractograma obtenidos mediante DRX, normalizado de AF neutro (polvo comercial) y AF protonado (solubilizado en HCl y liofilizado).

Cuando se repitieron los experimentos, pero con muestras obtenidas después de secar las mezclas al vacío en lugar de usar un liofilizador, las señales de los AF observadas en los difractogramas (**Figura II.3.25**) concordaron con los datos obtenidos para el compuesto sin tratamiento alguno, es decir, el AF en estado neutro. Este resultado evidentemente estuvo asociado al proceso de deshidratación. El HCl se evaporaría más eficientemente al usar una bomba de vacío en comparación con la liofilización, y es

probable que pudiera eliminarse de las muestras antes que el solvente -agua- se elimine por completo.

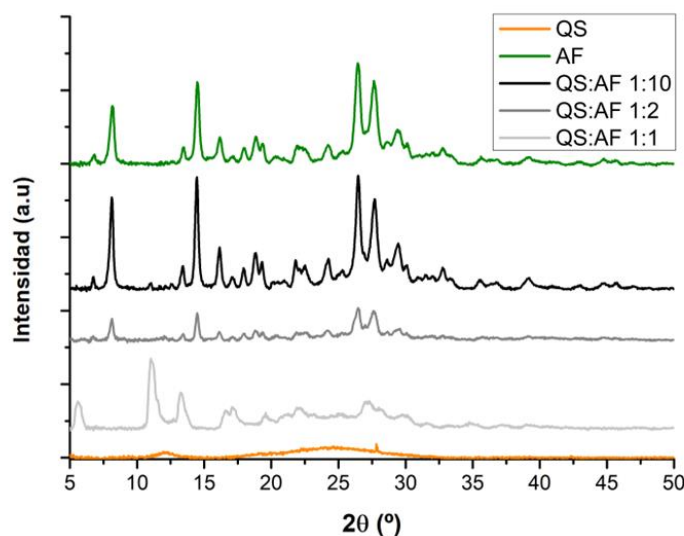


Figura II.3.24. obtenidos mediante DRX de polvos de QS, AF y soluciones mixtas en diferentes proporciones QS:AF.

Para el análisis de las diferentes muestras realizadas en esta Tesis se utilizaron como referencia espectros FTIR y patrones pDRX del AF en sus formas neutra y protonada. El difractograma obtenido para el precursor AF sólido sin ningún tratamiento (**Figura II.3.23**) concuerda con el obtenido a partir de los datos reportados del compuesto en su estado neutro (Mastropaolo et al., 1980). Cuando el AF se recristaliza en una solución acuosa de HCl c.a. 1 M, las señales del difractograma son diferentes (**Figura II.3.23**). Se sugiere que, después de este tratamiento, el AF se encontró en su estado protonado. Se obtuvieron datos de FTIR (**Figura II.3.20**) y RMN (**Figura II.3.26**) para confirmar esta hipótesis, ya que no se informaron datos de pDRX para la forma protonada de AF. En los estudios de RMN de esta muestra, la multiplicidad, la integración y la posición de las señales concuerdan con los resultados obtenidos por pDRX. Además, sus desplazamientos de la forma neutra al estado protonado son los mismos que los informados anteriormente.

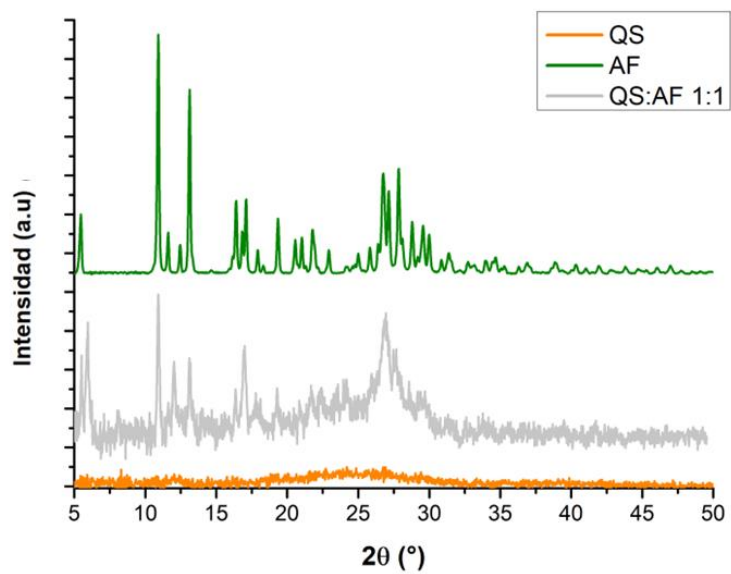


Figura II.3.25. Difractogramas obtenidos mediante DRX de polvos obtenidos por secado al vacío de QS, AF y solución mixta en proporción 1:1.

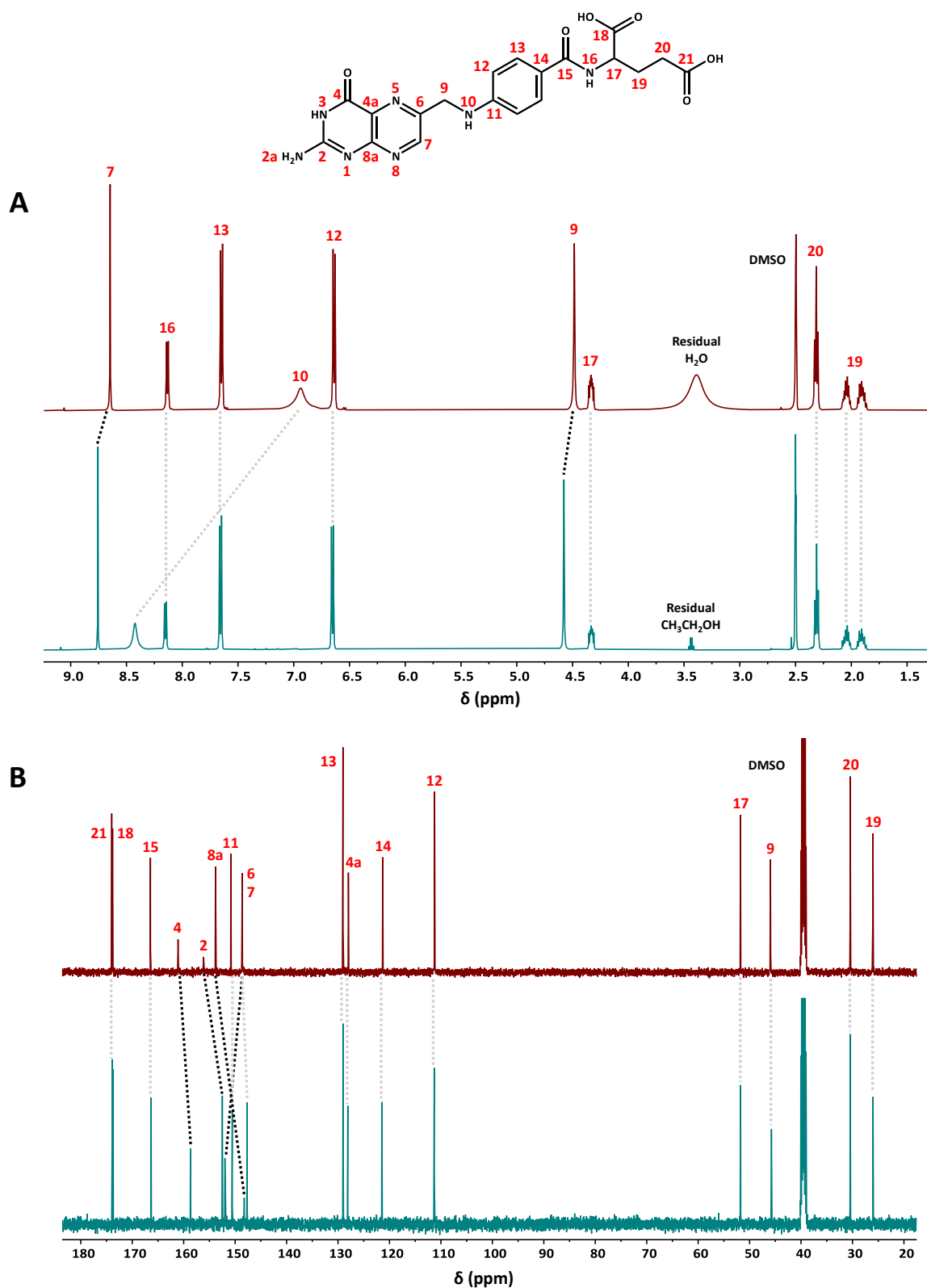


Figura II.3.26. Espectros de ^1H -NMR (A) y ^{13}C -NMR (B) de AF en su forma neutra (rojo) y en su estado protonado (verde) en DMSO-d_6 . El desplazamiento de las señales se muestra con líneas de puntos. La asignación de las señales fue confirmada mediante experimentos HSQC y HMBC.

II.3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó SEM para estudiar la ultraestructura y morfología en la nanoescala de los agregados obtenidos. Las micrografías obtenidas para QA y QS se muestran en las **Figuras II.3.27 y II.3.28**, respectivamente. Ambos Q formaron grandes agregados, compactos, con una superficie corrugada, exhibieron una naturaleza grumosa con superficies relativamente ásperas, características que pueden ser atribuidas a fuertes interacciones Q-Q (Franca y col., 2008; Korchagina y Philippova, 2010). En su superficie se pueden observar algunas fibras, que le dan su rugosidad característica, como se informó anteriormente en los estudios de AFM (**Sección II.3.6**). No hay partículas discretas, como se espera de un sólido amorfo según los resultados de pDRX (**Sección II.3.8**). Por el contrario, AF muestra partículas en forma de aguja como se observa en las micrografías AFM (**Sección II.3.6**). Estas partículas muestran una forma regular con caras y aristas definidas, rasgos característicos de los materiales cristalinos, como confirmó la técnica de pDRX (**Sección II.3.8**). En los sistemas mixtos AF y Q se obtuvieron los mismos agregados que para el Q, pero se encontraron partículas aglomeradas sobre la superficie asociadas al AF, con mayor rugosidad y tamaño cuando la proporción de AF fue incrementándose. Sin embargo, su forma, caras y aristas no están bien definidas como en las imágenes tomadas para muestras de AF solo. Las partículas de AF serían menos rígidas y se disponen formando una red de fibras entrecruzadas. Previamente, Prudkin y col. (2020) informaron que en complejos insulina con QA, la morfología superficial de la proteína se vio alterada, de forma análoga a lo observado en la presente Tesis.

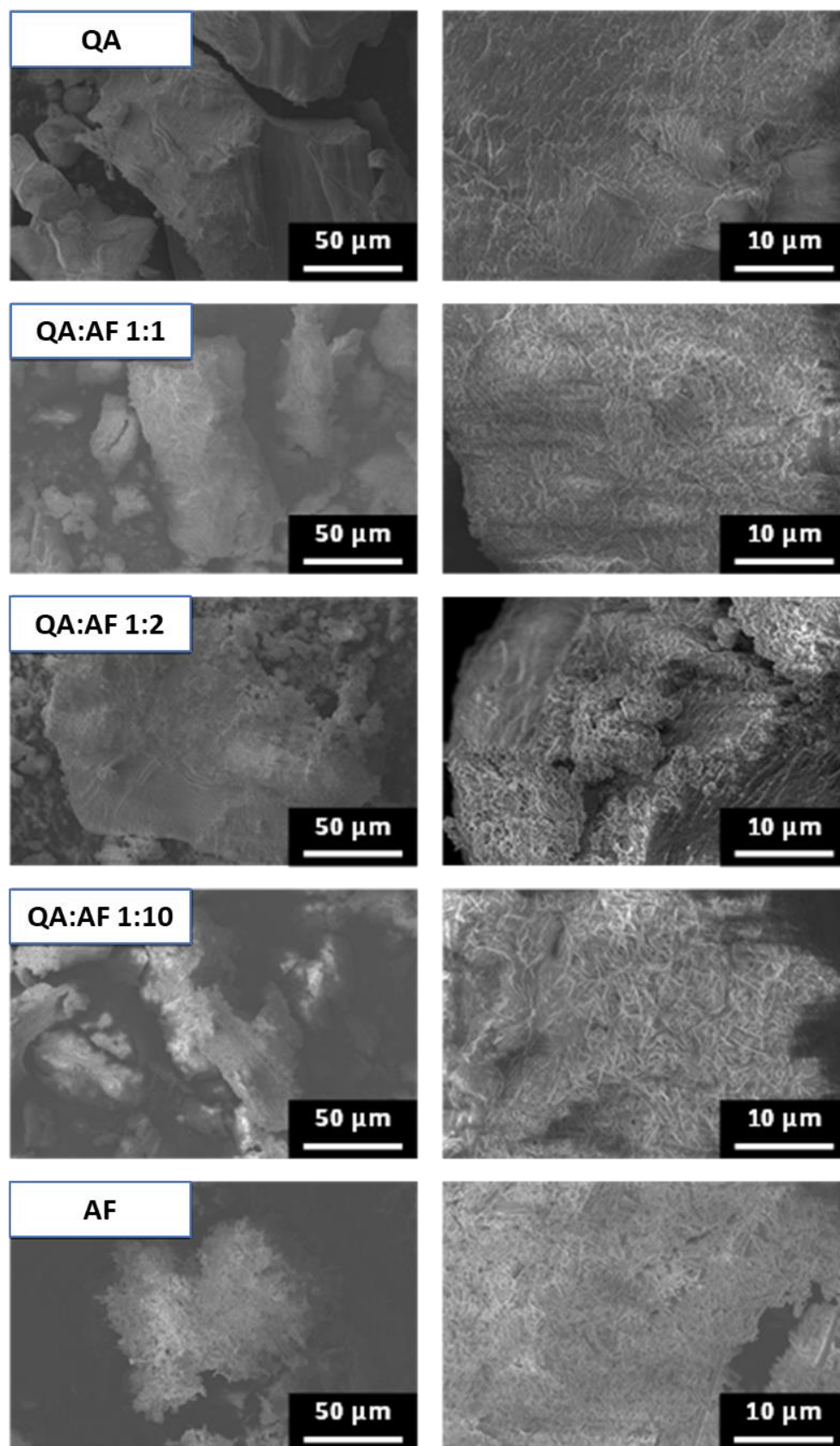


Figura II.3.27. Micrografías SEM de sistemas deshidratados por liofilización de QA, AF y sistemas mixtos en diferentes proporciones de QA:AF.

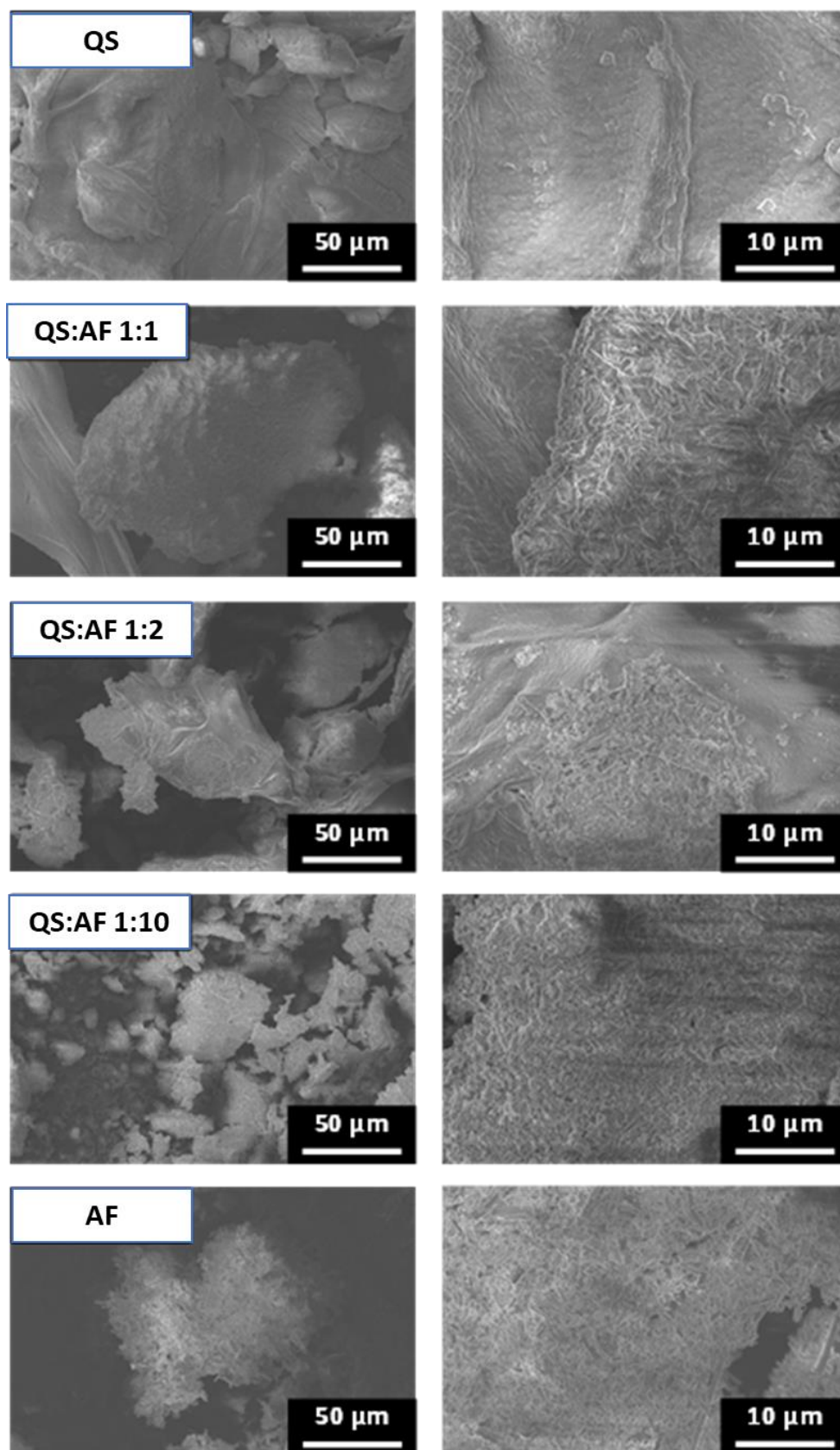


Figura II.3.28. Micrografías SEM de sistemas deshidratados por liofilización de QS, AF y sistemas mixtos en diferentes proporciones de QS:AF.

II.3.10. Bioaccesibilidad de AF en sistemas liofilizados

La bioaccesibilidad es el porcentaje de bioactivo liberado a través del tracto gastrointestinal con respecto al total contenido inicialmente en la matriz que lo transporta (Shahidi y Peng, 2018). Puesto que los sistemas mixtos liofilizados Q-AF podrían utilizarse como una estrategia para la vehiculización y protección del AF, es de gran interés evaluar la bioaccesibilidad de la vitamina luego de la digestión gastrointestinal simulada. Con este enfoque, se evaluó la bioaccesibilidad del AF cuantificando la vitamina en el sobrenadante obtenido de la digestión *in vitro* de los sistemas mixtos liofilizados y resuspendidos QA-AF y QS-AF, junto a sus controles (QA, QS, AF y blanco de digestión). La concentración de AF luego de finalizado el proceso de digestión, o sea la fracción bioaccesible, se determinó aplicando el protocolo microbiológico oficial de la AOAC (método 992.05, 2000) que consiste en la utilización de una cepa de bacterias ácido lácticas, *Lactocaseibacillus casei* BL23 (*L. casei* BL23), auxótrofa para AF, como se detalló en la **Sección II.2.15**.

En la **Figura II.3.29** se representa la bioaccesibilidad de AF, mostrando el porcentaje de retención de AF luego de la digestión gastrointestinal de los sistemas mixtos liofilizados QA-AF y QS-AF (relación Q:AF = 1:10). Los sistemas evaluados fueron resuspendidos en agua MilliQ. Tanto los controles de ambos Q como el blanco de digestión no promovieron el crecimiento microbiano, confirmando la validez de la auxotrofia de la cepa utilizada para el ensayo y demostrando que los reactivos y enzimas utilizadas en la digestión *in vitro* no interfirieron durante el protocolo de cuantificación de la vitamina.

Adicionalmente, al comparar los sistemas mixtos con el control se pudo determinar que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de retención de la vitamina vehiculizado con cualesquiera de los Q estudiados. Este comportamiento sugiere que la estabilidad o resistencia de la vitamina en la concentración estudiada y sometida a condiciones del tratamiento de preparación de muestra, liofilización y la subsiguiente digestión *in vitro* fue equivalente en presencia o ausencia del biopolímero. A fines comparativos, Corfield y col. (2023) estudiaron la bioaccesibilidad de AF en sistemas mixtos con proteína de suero de leche (WPI) y con β -lactoglobulina (β lg), que

funcionarían como portadores para el AF. Estos autores informaron valores diferentes en la bioaccesibilidad para cada uno de los complejos promovidos, observando que los sistemas basados en WPI permitieron obtener una mayor bioaccesibilidad para la vitamina. Shakoor y col. (2022) estudiaron el efecto en la bioaccesibilidad del AF cuando se vehiculiza en matrices de naturaleza proteica (proteína de garbanzo) o de polisacárido (alginato), utilizando un proceso de digestión simulada. Los resultados mostrados por los autores revelaron que tales matrices aumentaron significativamente la bioaccesibilidad de la vitamina. Mientras tanto, la matriz de alginato mejoró la liberación controlada, la bioaccesibilidad y la estabilidad del AF, convirtiéndola en la opción más favorable. Esta discrepancia en los resultados de bioaccesibilidad puede atribuirse a variaciones en las concentraciones de AF estudiadas, el pH de las soluciones, el tratamiento de las muestras y la naturaleza del material utilizado como vehículo para la vitamina. Evidentemente, la bioaccesibilidad depende en gran medida de la plataforma diseñada como reservorio de AF.

Una de las ventajas clave del uso de Q como material para micro y nanoencapsulación es su resistencia a la degradación gástrica. Sin embargo, puede ser degradado eficientemente por la microbiota intestinal, donde la vitamina puede liberarse para ser absorbida (Maleki y col., 2022; Rosales-Martínez y col., 2019). En cuanto a los reservorios basados en Q, Carrasco-Sandoval y col. (2023) investigaron el impacto del PM y del DD del Q en la bioaccesibilidad de la quercetina encapsulada en nanopartículas de zeína recubiertas con alginato y Q. La bioaccesibilidad de la quercetina aumentó cuando se encapsuló con las proteínas y con sistemas proteína-alginato. Además, la incorporación de recubrimientos de Q con mayor DD y menor PM resultó en un aumento de la bioaccesibilidad de la quercetina. Los autores postularon que este fenómeno podría atribuirse a la capacidad de las sales biliares para establecer un complejo electrostático más intenso con Q de mayor DD, dificultando la digestibilidad del bioactivo al impedir estéricamente la acción de las enzimas digestivas. Además, una menor tasa de liberación de quercetina se relacionó con una menor solubilidad en el caso de Q de mayor PM y mayor viscosidad de la capa de recubrimiento formada alrededor de los sistemas de quercetina-zeína-alginato. A diferencia de los resultados de Shahidi y Peng (2018), no se observaron diferencias

significativas en la bioaccesibilidad del AF en sistema mixto con QA y QS, por lo tanto no se puede atribuir un efecto debido a la diferencia de PM de los Q estudiados en esta Tesis.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que los sistemas mixtos Q-AF podrían considerarse apropiados para la vehiculización de AF ya que la bioaccesibilidad del bioactivo es elevada.

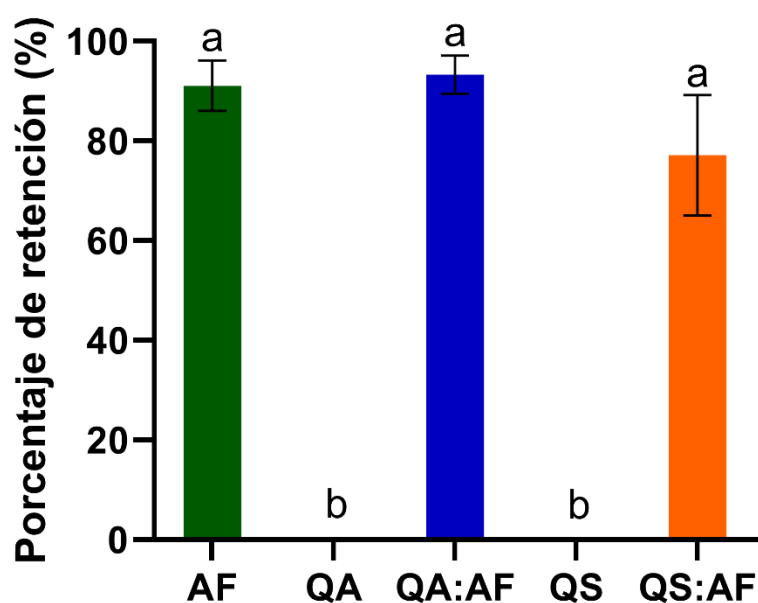


Figura II.3.29. Bioaccesibilidad de AF en sistemas liofilizados luego de la digestión *in vitro*. La concentración de AF de todos los sistemas fue de 1% (p/p). Se representan los promedios y su desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas y letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

II.4. Conclusiones parciales

Con la intención de generar un sistema deshidratado a base de QA que pueda constituir una cubierta comestible para alimentos y, a su vez, un reservorio de ácido fólico, se produjeron y caracterizaron varios sistemas mixtos compuestos por el polisacárido y la vitamina en diferentes concentraciones.

- El QA y el AF pudieron combinarse sin separación macroscópica de fases en el período de tiempo en que se elaboraron los sistemas mixtos y se caracterizaron mediante las diversas técnicas empleadas.
- Se obtuvieron diferencias en el valor de la constante de asociación (K_{af}) entre el QA y QS y el AF con respecto a datos reportados en bibliografía. Dichas diferencias obedecerían a diferencias en el PM y el DD de los Q estudiados.
- Se observa que hay un efecto sinérgico en la actividad antioxidante de AF cuando se encuentra en presencia de Q por las dos metodologías estudiadas en esta Tesis.
- Las soluciones mixtas de Q-AF resultaron favorables para la proliferación celular de la línea Caco-2, siendo el Q el componente que aporta el efecto dominante. El Q no afectó a la morfología normal de las células estudiadas.
- El estudio de las dinámicas moleculares mostró que a pH 5 las interacciones más fuertes se dieron entre el carboxilato del AF y el grupo amonio del Q, así como también interaccionaron mediante puentes de hidrógeno con -OH adyacentes al amonio, sea del C de este o de otro monómero. Estos resultados son alentadores ya que la investigación se enfoca en la formulación de un ingrediente o recubrimiento (*coating*) elaborado a partir QA y AF con aplicación en la industria alimentaria. Cuando este ingrediente atraviese el tracto gastrointestinal y alcance el intestino (pH $\approx$ 7-8), el grupo amonio del Q se encontrará en su estado neutro. En este medio, la principal interacción ($-\text{COO}^- / -\text{NH}_3^+$) no se dará, permitiendo la liberación del AF en el intestino donde la vitamina será absorbida.
- La interacción entre cada Q con AF fue detectada por FTIR y los patrones de sistemas mixtos de difracción de rayos X denotaron que la contribución de AF aumenta al aumentar la concentración de vitamina en la matriz.

- La ultraestructura y la topografía se caracterizaron por SEM y AFM, cuyas imágenes manifestaron consistencia, con una naturaleza grumosa caracterizada por dominios relativamente pequeños y rugosos, características que pueden atribuirse a patrones de Q y AF. Una mayor rugosidad detectada por el método de recubrimiento por *spin-coating* indica que las nanoentidades de AF podrían interpenetrar el lecho de Q previamente depositado. Además, el patrón angular de la ultraestructura aumenta con la concentración de AF, lo que respalda los hallazgos supramoleculares observados mediante difractogramas.
- El consumo de estos reservorios de AF como estructura de recubrimiento o simplemente como ingrediente alimentario podría ser una forma adecuada de aumentar la ingesta de la masa requerida de vitamina correspondiente a la dosis diaria recomendada. Como se muestra en este capítulo, la bioaccesibilidad de los AF no disminuyó con la posibilidad de utilizar el recubrimiento estructurado como protección de alimentos, tales como quesos, frutas, verduras, etc. Los Q podrían constituir un sistema de encapsulación que proteja a AF de la degradación, mejorando su bioaccesibilidad y gestión de su liberación.
- La bioaccesibilidad de la vitamina en los sistemas liofilizados no presentó diferencias significativas cuando se encuentra en los sistemas mixtos con QA o QS, respecto al control de AF libre. Este resultado permite asegurar que el QA puede ser empleado eficientemente como matriz para entrapar, proteger y vehiculizar AF, el cual sería incorporado a los alimentos como ingrediente o como un *coating*.
- Son pocos los estudios sistemáticos con este abordaje ya que la mayoría de ellos sólo se realizan en laboratorios. Se necesitan ensayos más amplios para demostrar claramente su eficacia y seguridad, de acuerdo con la legislación pertinente, estos estudios procederán con la aplicación de los sistemas mixtos QA-AF y QS-AF en alimentos modelo, seguido de la evaluación de sus efectos *in vivo*.

Capítulo III: Sistema mixto Q – AF. Propiedades interfaciales (O/W) y desempeño en sistemas dispersos

III.1. Introducción

III.1.1. Formación de la película interfacial y adsorción a las interfases

Cualquier sustancia tensioactiva tiende a acumularse en la interfase formando películas monomoleculares que se denominan monocapas. Si la concentración del tensioactivo es elevada, estas películas son fuertemente condensadas y con un gran carácter viscoelástico (Motaghian y col., 2022). Las sustancias de alto peso molecular con actividad interfacial que poseen grupos hidrofóbicos, como polisacáridos y proteínas, pueden acumularse en la interfase gracias a que presentan en su estructura cantidades significativas de grupos polares y no-polares (Alves y Tavares, 2019). Sin embargo, a altas concentraciones pueden formar agregados entre las moléculas en la subfase. Esto dependerá de la solubilidad que presente la sustancia, definida en función de las interacciones existentes con el agua. Además, dichas interacciones estarán influenciadas por el pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa (Biviano y col., 2020).

La actividad superficial o interfacial de una sustancia es una medida de su habilidad para acumularse en una interfase, sea esta aire/agua (A/W) o aceite/agua (O/W), respectivamente. Tales sustancias tienden a acumularse cuando la energía libre (ΔG) del estado adsorbido es significativamente menor que la del estado en disolución (Rodríguez Patino y col., 2007). La diferencia energética entre ambos estados está determinada por las variaciones en las energías de las interacciones de las moléculas involucradas, como también por efectos entrópicos (Miller y Fainerman, 2001). Los cambios en las energías de las interacciones que ocurren como consecuencia de la adsorción tienen su origen en dos puntos, uno asociado con la interfase y otro con las moléculas del tensioactivo en sí mismas. Con respecto al primer punto, al adsorberse una molécula tensioactiva en una interfase es capaz de apantallar el contacto entre las moléculas de ambas fases. El contacto directo de ambas es reemplazado por contactos entre segmentos no polares del tensioactivo y moléculas de la fase no-polar, y entre segmentos polares y moléculas de agua (Disalvo y col., 2014). Estas interacciones disminuyen la ΔG generada en la interfase. Con respecto al segundo punto, los

polímeros tensioactivos tienen en sus moléculas segmentos polares y no-polares; cuando la molécula se disuelve en agua estos últimos manifiestan un efecto hidrofóbico, energéticamente desfavorable, la consecuencia es entonces su difusión y adsorción a la interfase. Las moléculas del tensioactivo son capaces de maximizar el número de interacciones favorables entre los segmentos polares y el agua mientras minimizan el número de interacciones desfavorables entre segmentos no-polares y el agua. La fuerza impulsora que gobierna la adsorción de las moléculas anfifílicas a una interfase es la hidrofobicidad. Sin embargo, otros tipos de interacciones pueden también contribuir a la actividad superficial, favoreciendo o dificultando la adsorción (interacciones electrostáticas, puentes hidrógeno, etc.) (Maestro y Gutfreund, 2021). Los efectos entrópicos asociados con el proceso de adsorción se deben a que cuando una molécula de biopolímero se adsorbe en la interfase, se confina en una región que es considerablemente más pequeña que el volumen que ocuparía en el seno del líquido, de forma que su movimiento molecular queda restringido. Estos efectos son entrópicamente desfavorables y así una molécula solamente se adsorberá en una interfase si la energía ganada en las interacciones es suficientemente grande como para contrarrestar la disminución de entropía. Es decir, que cuando la energía de adsorción es mayor que la energía cinética de las moléculas, éstas se fijan fuertemente a la interfase presentando una elevada actividad superficial. Cuando ocurre lo contrario, las moléculas tienden a localizarse principalmente en el seno del líquido presentando una baja actividad superficial (Zhou y col., 2022).

El descenso de la ΔG de un sistema, lo cual ocurre cuando una molécula superficialmente activa se adsorbe en una interfase, se manifiesta como un descenso en la tensión superficial, ya que se requiere menor energía para aumentar el área superficial entre las fases no-polar y acuosa. La magnitud de este descenso depende de la eficacia con que las moléculas blindan el contacto directo entre las fases, así como de la fuerza de las interacciones entre los segmentos hidrofóbicos del tensioactivo y la fase no-polar (Disalvo y col., 2014). Cuanto mayor sea la eficacia del tensioactivo en blindar las interacciones entre las fases, más baja será la tensión superficial. La habilidad de las moléculas de un tensioactivo en evitar las interacciones directas entre

los fluidos inmiscibles está gobernada por el empaquetamiento óptimo en la interfase, que dependerá de la arquitectura molecular (Lu y col., 2022).

Además de conocer la disponibilidad de un tensioactivo para adsorberse, sobre lo cual informa la termodinámica, es muy importante también conocer la velocidad a la que este proceso ocurre. Esta característica, junto con la disminución de la tensión superficial y la de poder crear una película interfacial con propiedades mecánicas adecuadas son las tres propiedades más importantes que debe presentar cualquier tensioactivo en la estabilización de emulsiones o espumas (Pletnev, 2001). La velocidad de adsorción depende de las características moleculares del tensioactivo (tamaño, conformación e interacciones), la viscosidad de la fase continua y de condiciones extrínsecas (temperatura, agitación mecánica, etc.). El estudio del proceso de adsorción se puede dividir en dos etapas. En primer lugar, el movimiento de las moléculas de tensioactivo del seno del líquido a la interfase por difusión, seguido por la incorporación de las moléculas de tensioactivo a la interfase, lo cual incluye el desplegamiento y el reordenamiento de las moléculas adsorbidas (Luo y col., 2021). Las etapas mencionadas se muestran en la **Figura III.1.1**.

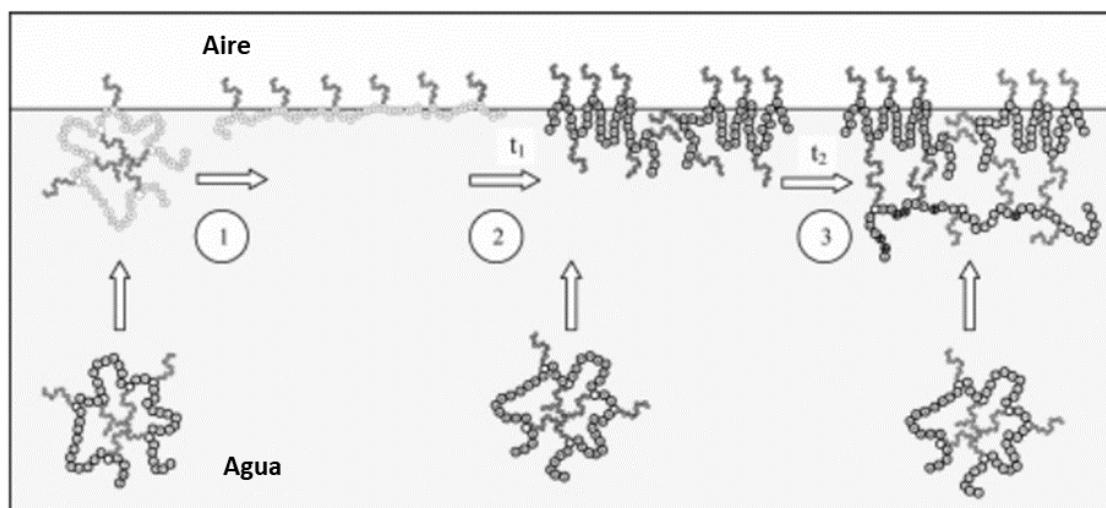


Figura III.1.1. Diferentes etapas del proceso de adsorción de un compuesto polimérico durante la difusión continua desde el *bulk* de la solución hasta la interfase A/W: **1** difusión, **2** desplegamiento, **3** reordenamiento.

III.1.2. Conformación espacial de las moléculas de los polímeros tensioactivos en la interfase

La formación de monocapas estables de compuestos poliméricos, como proteínas y polisacáridos, depende de la atracción que ejerce la subfase sobre sus moléculas. A bajas concentraciones, los tensioactivos poliméricos forman películas monomoleculares insolubles tanto en la interfase A/W como O/W, de forma que los segmentos no-polares predominan en la fase hidrofóbica, mientras que los segmentos polares se encuentran en contacto con el agua (Lotito y Zambelli, 2017). Los polímeros pueden presentar diferentes orientaciones en la interfase ya que el número de residuos o de segmentos en contacto con la interfase dependerá de la flexibilidad molecular de la cadena y de la afinidad de esta por el medio de disolución (Pérez y col., 2009). Las configuraciones de un polímero flexible en el plano bidimensional de la interfase pueden ser representados como se muestra en la **Figura III.1.2**:

- I. Filas (trains):** hace referencia a los segmentos que están en contacto directo con la interfase.
- II. Lazos (loops):** son los segmentos del polímero entre los trenes orientados hacia el seno de la subfase o fuera de ella.
- III. Colas (tails):** son los segmentos terminales de las cadenas de polímeros.

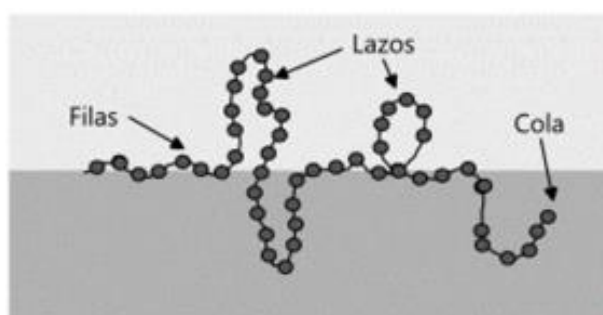


Figura III.1.2. Configuraciones de un polímero tensioactivo en la interfase A/W. Adaptado de Pérez (2005).

III.1.3. Sistemas dispersos: emulsiones

Una emulsión es un sistema disperso que consta de dos líquidos inmiscibles, uno disperso que consta de pequeñas gotas esféricas y otra fase continua, mayoritaria en volumen. Son sistemas multiescala y termodinámicamente inestables. Las emulsiones se utilizan ampliamente en los sectores farmacéutico, químico, alimentario, cosmético y otros campos (Gao y col., 2021; Yang y col., 2017). Durante el almacenamiento a largo plazo, las emulsiones pueden sufrir diversos procesos de desestabilización, tales como floculación, coalescencia, maduración de Ostwald, cremado y sedimentación (Figura III.1.3), que eventualmente conducen a la separación de fases (Karthik y col., 2017).

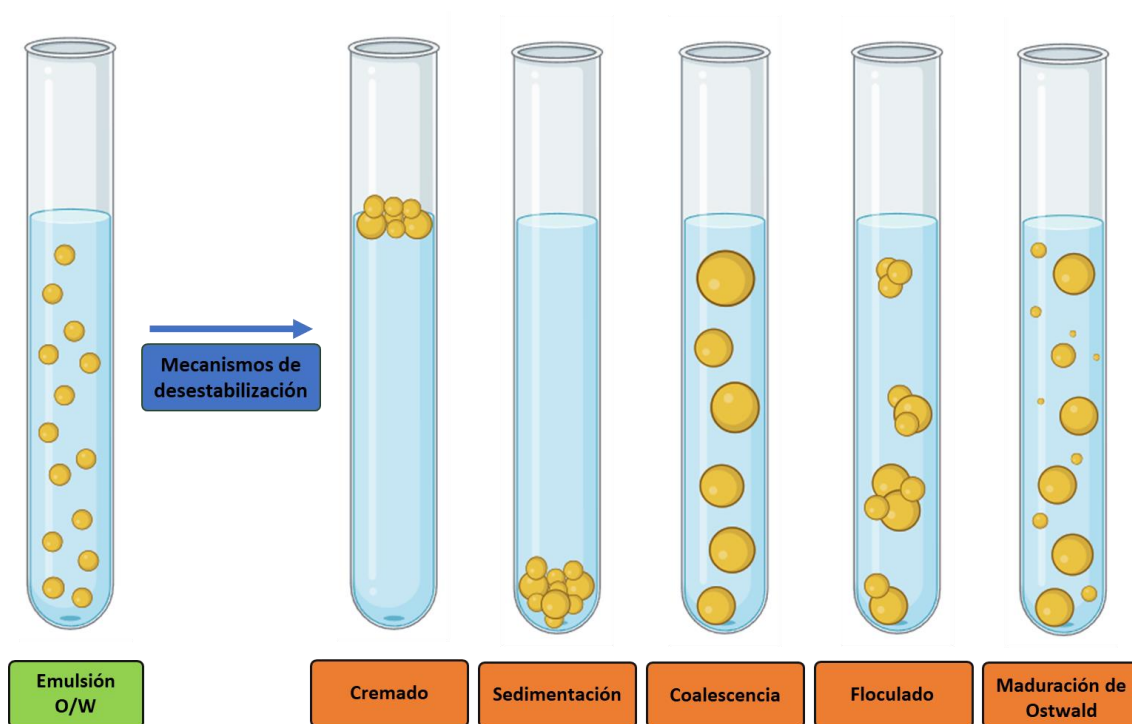


Figura III.1.3. Esquema de los mecanismos de desestabilización de las emulsiones. Adaptado de Zang y col. (2020).

Generalmente se requieren estabilizantes como emulsionantes, espesantes y viscosantes para resistir el estrés ambiental e incrementar la vida útil de las emulsiones. Las funciones principales de los agentes emulsionantes o estabilizantes son adsorber rápidamente a la superficie de las gotas recién formadas, reducir la tensión interfacial en una cantidad apreciable y proteger a las gotitas recién formadas

de la floculación o coalescencia formando una capa interfacial protectora alrededor de ellas (Klinkesorn, 2013) **Figura III.1.4**. Los emulsionantes son de gran importancia para el rendimiento de los productos alimenticios a base de emulsiones; sin embargo, la mayoría de los emulsionantes utilizados en los alimentos son sintéticos, incluidos los etoxilatos de alcoholes grasos (Martínez-Gallegos y col., 2011), ésteres de sorbitán (Sonwai y col., 2017) y ésteres de sacarosa (Ariyaprakai y col., 2019). El reemplazo de emulsionantes sintéticos por emulsionantes naturales ha despertado gran interés debido a sus ventajas seguras y efectivas, aumentando así su aceptabilidad en los productos alimenticios por parte de los consumidores. Algunos polisacáridos naturales como goma arábiga, pectina, galactomananos y Q contienen grupos no polares en sus cadenas de carbohidratos hidrófilos, por lo que poseen propiedades emulsionantes (Dickinson, 2003).

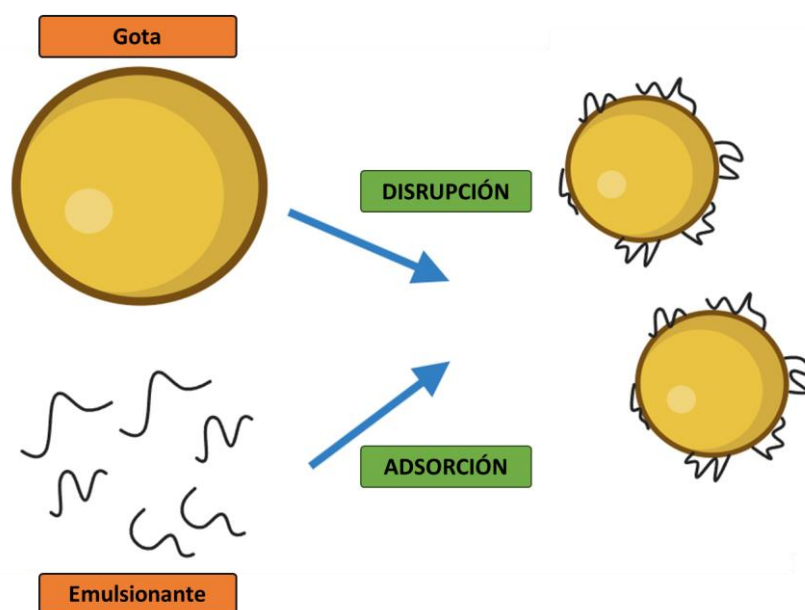


Figura III.1.4. Proceso de formación/estabilización de emulsiones. Requiere la disrupción mecánica de las gotas grandes acompañada de una adsorción rápida del emulsionante en la nueva interfase O/W. Adaptado de Dickinson (2009).

III.1.4. Sistemas dispersos: nanoemulsiones (NE)

Las NE O/W consisten en gotas de aceite, típicamente con radios entre 10 y 100 nm, que se dispersan en una fase acuosa (Mason y col., 2006; McClements y Rao, 2011; Tadros y col., 2004). Se han atribuido varias ventajas a las NE sobre las emulsiones

convencionales, debido a su reducido tamaño de gota son más estables en términos de separación gravitacional y agregación de partículas (Mason y col., 2006).

Los enfoques utilizados para formar NE generalmente se clasifican como métodos de alta o baja energía (McClements y Rao, 2011; Tadros y col., 2004). Los métodos de alta energía consisten en aplicar altas fuerzas disruptivas con dispositivos mecánicos capaces de romper las gotas de aceite y dispersarlas en la fase acuosa, como homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores y sonificadores. Los enfoques de baja energía se basan en la formación de pequeñas gotas de aceite dentro de sistemas mixtos de aceite, agua y surfactante cuando se alteran la solución o las condiciones ambientales, como la emulsificación espontánea y los métodos de temperatura de inversión de fase (Anton y Vandamme, 2009; Solans y col., 2005). Ambos enfoques pueden formar gotas de dimensiones submicrónicas, pero los métodos de alta energía son más adecuados para la mayoría de las aplicaciones en la industria alimentaria por varias razones: (a) se pueden usar emulsionantes naturales, (b) se requieren niveles más bajos de emulsionante, (c) la producción a escala es más sencilla, y (d) disponibilidad de equipos. (Salvia-Trujillo y col., 2017)

Las estructuras de tamaño nanométrico, como las NE O/W, se consideran herramientas útiles con gran potencial en el sector alimentario. Recientemente, el desarrollo de NE cargadas con componentes alimentarios lipófilos e hidrófilos ha demostrado el potencial de las mismas como vehículo para administrar estos ingredientes bioactivos en aplicaciones alimentarias (Assadpour y Jafari, 2018). Estos sistemas de encapsulación y administración basados en emulsiones han mostrado un rendimiento excelente en la protección, la liberación controlada y la administración dirigida a sitios específicos de componentes bioactivos (Kotta y col., 2012). La absorción fisiológica y biodisponibilidad de los componentes bioactivos están estrechamente asociadas con la estabilidad física y química de las emulsiones. Los factores más importantes que influyen en la estabilidad, liberación, absorción y biodisponibilidad de los componentes bioactivos en diversos sistemas de administración vía emulsión incluyen la composición del aceite y la fracción volumétrica, la estructura y densidad de la interfase, el tamaño de las gotas y las condiciones de dispersión (Mayer y col., 2013; R. Zhang y col., 2020).

III.1.5. Q como emulsionante

La función de los emulsionantes es adsorberse rápidamente en la superficie de las gotas formadas en la emulsión y crear una capa protectora a su alrededor, lo que reduce la tensión interfacial entre las dos fases inmiscibles y protege contra la coalescencia de las gotas formadas que tienden a revertirse a gotas más grandes (Dickinson, 2009; Klinkesorn, 2013).

El Q es un buen candidato como emulsionante para estabilizar sistemas dispersos de aceite en agua. En un medio ácido ($\text{pH} < \text{pKa}$) los grupos amino están cargados positivamente mientras que los grupos acetilo son neutros, lo que convierte al Q en un polímero tensioactivo anfifílico (**Figura I.3**). Además, el Q aumenta la viscosidad de la fase continua, dificultando la difusión de la fase dispersa y reduciendo la tasa de agregación de las gotas (Sharkawy, Barreiro y Rodrigues, 2020). Al igual que con otros polielectrolitos, las capas adsorbidas de Q ofrecen la ventaja de combinar la estabilización en emulsión estérica y electrostática (March y Napper, 1977). Debido a sus grupos polares, el quitosano también proporciona una estabilización adicional debido a las fuerzas de hidratación (Del Blanco y col., 1999).

La capacidad emulsionante del Q depende en gran medida del DD y del PM. Aumenta para los Q de bajo PM con DD inferior al 60% o superior al 86%, mientras que cuando los valores de DD se hallan entre 65-77%, la capacidad emulsionante depende significativamente de la concentración (Thambiliyagodage y col., 2023).

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la concentración de Q sobre la distribución de tamaños de partícula y potencial- ζ en solución acuosa.
- Caracterizar el comportamiento interfacial en equilibrio del Q en la interfase A/W y O/W.
- Caracterizar el comportamiento interfacial dinámico del Q mediante su capacidad para reducir la tensión en la interfase O/W en el tiempo.
- Establecer los parámetros cinéticos que describen las etapas del proceso de adsorción de los sistemas en interfases O/W.
- Determinar las propiedades mecánicas de dichos *films* mediante ensayos de reología dilatacional interfacial.
- Estudiar la formación y la estabilidad de las nano y microemulsiones generadas mediante homogeneizador de alta presión según el tamaño de gota (floculación y/o coalescencia) y en cuanto a su estabilidad coloidal mediante potencial ζ .
- Evaluar el desempeño del Q como espesante en nano y microemulsiones generadas mediante homogeneizador de alta presión.

III.2. Materiales y métodos

III. 2.1. Materiales

El QA, QS y AF utilizados han sido descritos en la **Sección II.2.1**. Se utilizó *buffer* acetato pH 4,6, y se consideraron dos valores de fuerza iónica (FI): 0,3M (alta fuerza iónica, AFI) y 0,03M (baja fuerza iónica, BFI), preparado con agua MilliQ. El aceite de girasol comercial utilizado fue adquirido en supermercado (Mercadona, España) el cual fue filtrado mediante el uso del agente filtrante FLORISIL® de Merck (Darmstadt, Alemania).

Todos los demás reactivos fueron de calidad analítica. Siempre se utilizó agua MilliQ en todos los experimentos.

III. 2.1.1. Purificación del aceite de girasol

Se mezclaron aceite de girasol y FLORISIL® en proporción 5:1 (p/p) en un vaso de precipitados. Se agitó *overnight* a 600 rpm. Se centrifugó a 10000 g durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue el aceite purificado que se utilizó en los ensayos.

III.2.2. Determinación de la distribución de tamaños de partícula de la fase acuosa

La determinación del tamaño de partícula se basa en la dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica aprovecha el movimiento browniano constante de las partículas debido a la colisión con las moléculas del líquido que las rodea. La muestra es iluminada con el láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad dependiente del tamaño de las partículas. La variación en las fluctuaciones se correlaciona con el coeficiente de difusión de la partícula y consecuentemente, con el diámetro hidrodinámico de la partícula (L. Zhang y col., 2019). A este fin se utilizó el equipo de DLS (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Inglaterra) (**Figura III.2.1**) y el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o Z-average) se obtiene por el método de cumulantes.



Figura III.2.1. Imagen del equipo Zetasizer Nano-Zs para determinación del tamaño de partícula y de potencial ζ .

III.2.3. Potencial- ζ

El potencial- ζ es una forma de ponderar la carga neta de una partícula y, por tanto, constituye una aproximación útil a la estabilidad del sistema coloidal en estudio (Rezaei y col., 2020; Yu y col., 2021). La carga neta en la superficie de una partícula está afectada por la distribución de iones de la región circundante (**Figura III.2.2 A**). Existe una concentración de iones de carga opuesta en las proximidades de la partícula en que se diferencian dos capas. La capa más interna, conocida como *capa de Stern*, donde los iones están fuertemente ligados, y una región más externa, conocida como *capa difusa*, donde los iones están ligados más débilmente. Por fuera de esta, existe un límite imaginario en que los iones del medio se mueven libremente. A este límite se lo conoce como *plano de deslizamiento*, y el potencial asociado a éste se lo conoce como potencial- ζ . Las medidas de potencial- ζ se basan en la movilidad electroforética, a un ángulo fijo de 17°.

De acuerdo con esta técnica, las soluciones se colocan en celdas capilares provistas de dos electrodos, uno positivo y uno negativo, por medio de los cuales se aplica un campo eléctrico a 25 °C (**Figura III.2.2 B**).

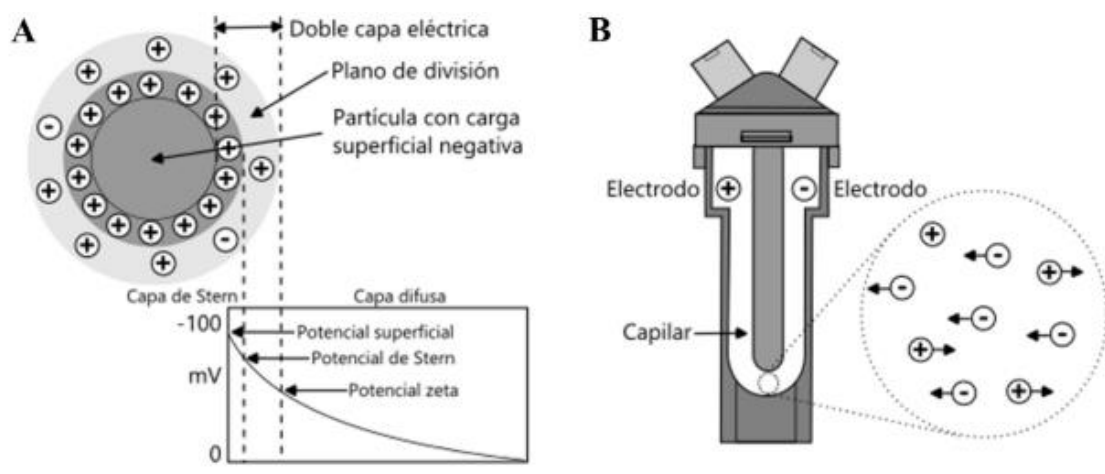


Figura III.2.2. (A) Esquema de una partícula cargada y de la doble capa de hidratación que la rodea. (B) Celda capilar con electrodos a cada lado. Malvern Instruments Ltd. (2013).

Las partículas cargadas migran hacia el electrodo con carga opuesta. Las fuerzas viscosas que actúan sobre las partículas tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. La ecuación de Henry (**Ecuación III.2.1**) relaciona la velocidad a la que migran las partículas (movilidad electroforética), con su potencial- ζ . A saber:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\mu} \quad \text{Ecuación III.2.1}$$

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

El potencial- ζ de las fases acuosas fue determinado mediante el equipo de DLS (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Inglaterra) (**Figura III.2.1**). Empleando las celdas capilares Malvern DTS1070 (Malvern Instruments, Inglaterra).

III.2.4. Propiedades de la interfase

Por definición, la tensión superficial se refiere a la interfase gas-líquido, mientras que la tensión interfacial a la interfase líquido-líquido. Ambas propiedades son determinadas usando instrumentos denominados tensiómetros superficiales o interfaciales, respectivamente. Estos tensiómetros son empleados para obtener información sobre las características de las superficies o de las interfases y las propiedades de los surfactantes, tales como su concentración en exceso, la presión superficial generada, la concentración micelar crítica y cinética de adsorción (Felix y col., 2019; Rodríguez Patino y col., 2008).

Existen fundamentalmente dos tipos diferentes de tensiómetros que difieren de acuerdo con el principio físico en el que se basan, si las mediciones son dinámicas o estáticas, y en sí son capaces de medir la tensión superficial, la interfacial o ambas. Las medidas estáticas se realizan en superficies o interfases que se encuentran en equilibrio, mientras que las dinámicas se llevan a cabo en sistemas de no equilibrio (Sagis y Fischer, 2014; Sagis y Yang, 2022).

Los métodos empleados en esta Tesis fueron:

- Tensiómetro tipo Wilhelmy: método basado en la medida de una fuerza
- Tensiómetro de gota: método dinámico basado en una medida geométrica

A continuación, se presentan los fundamentos de ambos métodos empleados para medir tensiones superficiales e interfaciales en condiciones de equilibrio y dinámicas, con el fin de determinar las características estructurales y la estabilidad de las interfases generadas por QA, QS, AF y sus sistemas mixtos.

III.2.4.1. Tensiómetro tipo Wilhelmy

Este tensiómetro permite medir la dependencia de la tensión superficial o interfacial con la concentración de surfactante en la subfase. Este método consiste en medir la fuerza adicional sobre una placa vertical inmersa parcialmente en un líquido.

El tensiómetro consta de dos partes, la unidad de medida y una interfase que permite la adquisición de datos (**Figura III.2.3**). La interfase incluye la fuente de alimentación y

un indicador digital. La unidad de medida posee la placa de Wilhelmy que se suspende de un brazo de balanza. Esta placa es de platino, de superficies rugosas y es el sensor de la tensión en la interfase. Además, se encuentra también una camisa de circulación de agua termostatzada en cuyo interior se deposita el vaso conteniendo la solución a medir. La calibración del equipo es automática. Las puertas anchas de la abertura en frente permiten el fácil acceso al compartimiento que mide, y proporciona la protección contra disturbios ambientales.



Figura III.2.3. Fotografía del Tensiómetro de Wilhelmy.

Principio de funcionamiento

Esta técnica posee una gran importancia debido a su universalidad, precisión y simplicidad. Se fundamenta en que las moléculas de la interfase están sujetas a un esfuerzo (tensión). Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado. El cuerpo sólido en estos tensiómetros es una lámina de platino rectangular suspendida verticalmente. El borde inferior de la lámina se pone en contacto con el líquido y de ese modo se moja. La fuerza F con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse, como

lo muestra la **Figura III.2.4**. Si L_b es la longitud mojada, entonces la tensión superficial (σ) es:

$$\sigma = \frac{F}{L_b \cdot \cos \theta} \quad \text{Ecuación III.2.2}$$

donde θ es el ángulo de contacto; es decir, el ángulo entre la superficie de la lámina y la tangente a la línea de mojado. Para medir tensiones interfaciales, la placa debe mojarse completamente por el líquido que se encuentra en el vaso o cápsula de medición.

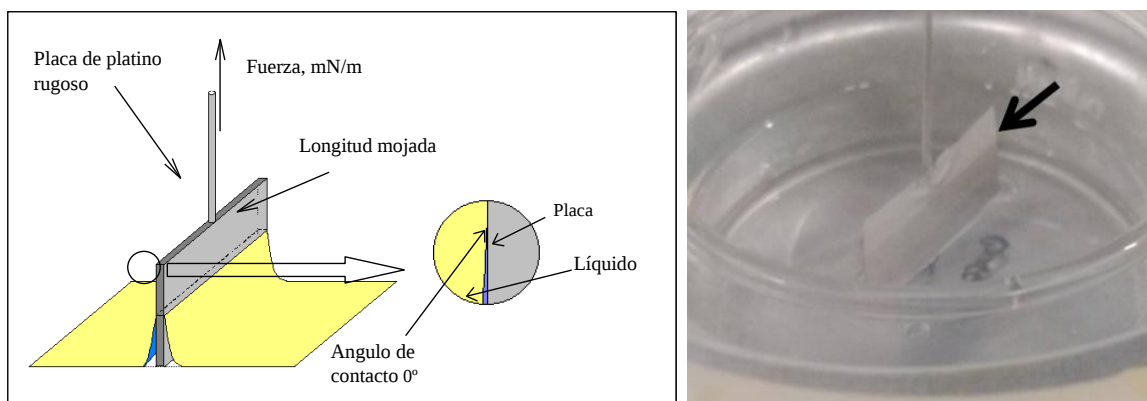


Figura III.2.4. Placa del tensiómetro tipo Wilhelmy en posición de medida.

Descripción del dispositivo y procedimiento experimental

El dispositivo empleado para realizar las medidas de tensión superficial e interfacial en el equilibrio fue un tensiómetro digital Sigma 701 (KSV, Finlandia), el cual consta de un vaso circular, con un área de termostatización de $63,6 \text{ cm}^2$, donde se introduce la cápsula o vaso conteniendo la solución acuosa que se desea medir. La humedad en el interior del receptáculo del tensiómetro se mantiene constante mediante colocación de un recipiente con agua dentro de este.

La longitud mojada de la placa de platino está determinada por $2l + 2b$, donde l , es el largo de la placa y b , su espesor. En este caso las dimensiones de la placa de platino son: $l = 19,9 \text{ mm}$ y $b = 0,1 \text{ mm}$ por lo que $L_b = 40 \text{ mm}$. La temperatura del sistema se mantiene constante $\pm 0,5^\circ\text{C}$, mediante circulación de agua por una camisa que rodea el recipiente de medida desde un termostato.

Este equipo se ha utilizado para realizar medidas de la presión de equilibrio de las soluciones de los Q empleados en esta Tesis. Dicha presión (π_{eq}) se determina a partir de la medida de la tensión superficial, siendo:

$$\pi_{eq} = \sigma_o - \sigma_e$$

Ecuación III.2.3

Donde π_o es la tensión superficial o interfacial de la fase acuosa en ausencia de tensioactivo y π_e es el valor de equilibrio correspondiente a la tensión superficial o interfacial cuando en la interfase acuosa hay un exceso de tensioactivo. Para la interfase A/W se usó el valor $\sigma_o = 72,8$ mN/m, mientras que para interfase O/W $\sigma_o = 26$ mN/m.

Se prepararon soluciones de QA y QS al 0,5% p/p en *buffer* acetato pH 4,6 a AFI y BFI. Una vez solubilizados, se realizaron diluciones seriadas 1:2 y 1:5 obteniendo varias concentraciones en el rango de $2,5 \cdot 10^{-5}$ y 0,5 % p/p, para ambos Q. Se colocaron 20 ml de cada solución (fase acuosa, W) en las cápsulas de medición (**Figura III.2.6**) y se conservaron a 4 °C durante 24 h con el fin de alcanzar el estado de equilibrio, momento en que la tensión superficial fue medida, previo atemperado de cada muestra a 20 °C. En primer lugar, se realizó la medición de la tensión superficial en la interfase A/W de las diferentes muestras. Para ello, se subió la plataforma con el vaso que contenía el líquido hasta que entró en contacto con la placa, momento en que comenzó la medida. De esta manera se midió la tensión superficial de la subfase a la temperatura deseada, que en estas experiencias se mantuvo constante a 20 °C. Se asume que la tensión superficial alcanza el equilibrio, cuando la medida no varía más de 0,1 mN/m en 30 minutos. Una vez alcanzado el equilibrio, se realizó la medición de la interfase O/W de la misma muestra. Para ello, se agregó lentamente aceite de girasol purificado (fase oleosa, O) sobre la superficie de la muestra (**Figura III.2.6**) y se continuó la medición hasta alcanzar el equilibrio nuevamente.

Antes de realizar cualquier medida de tensión con el tensiómetro de Wilhelmy la placa de platino se calentó a la llama de un mechero Bunsen, con el fin de eliminar cualquier impureza que pudiera contaminar la superficie. Las cápsulas de vidrio se limpiaron exhaustivamente, para ello se usó primero una mezcla compuesta por ácido sulfúrico y

peróxido-disulfato de amonio, se enjuagaron con agua destilada varias veces y se secaron en estufa.



Figura III.2.6. Aspecto de las cápsulas de medición conteniendo: **(A)** la solución equilibrada de Q sobre la que se determinó la presión superficial (A/W) y **(B)** sistema sobre el que se midió la presión interfacial (O/W).

III.2.4.2. Tensiómetro de gota

Principio de funcionamiento

Los métodos de gota montada o sésil pueden ser empleados para determinar tensiones/presiones superficiales o interfaciales de líquidos. La forma de una gota de líquido depende de un balance entre fuerzas gravitacionales y superficiales. Las fuerzas superficiales favorecen la forma esférica de la gota ya que ésta minimiza el área de contacto entre el líquido y su alrededor. Las fuerzas gravitacionales tienden a ocasionar una elongación, si la gota es pendiente, o un aplastamiento, si se encuentra sobre una superficie. La forma de equilibrio adoptada por la gota está determinada por su volumen, densidad y su tensión superficial o interfacial (Pérez, 2005).

Este método dinámico, se basa en la obtención de la medida de tensión superficial debido a variaciones en la geometría de una gota de líquido suspendida en aire. El perfil de la gota es procesado de acuerdo con la ecuación fundamental de Laplace para obtener la tensión interfacial o superficial (**Ecuación III.2.4**).

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \cdot \sin \theta) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad \text{Ecuación III.2.4}$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas en una posición dada del perfil de la gota, b es el radio de curvatura de la gota, θ es el ángulo del perfil de la gota y C es una

constante de capilaridad, $C = g \Delta\rho/\sigma$, donde σ es la tensión interfacial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de las dos fases y g es la aceleración de la gravedad.

El software empleado calcula tres parámetros característicos de la gota, que son área, A , volumen, V y σ . La exactitud promedio de la tensión interfacial con el equipo utilizado en este trabajo es de 0,1 mN/m. Sin embargo la reproducibilidad de los resultados se encuentra en un rango que oscila entre 0,5 y 1,5 %, la reproducibilidad mínima corresponde a las determinaciones realizadas a altas temperaturas (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999).

Descripción del dispositivo y procedimiento experimental

Dependiendo de la densidad relativa de los dos fluidos entre los que se encuentra la interfase a estudiar, la gota puede estar montada o colgante. En esta Tesis se utilizó la modalidad de **gota colgante**.

Una vez formada la gota, su perfil es digitalizado y analizado a través de una cámara CCD acoplada a un digitalizador de perfil de imágenes conectado a un procesador. Para mantener el control visual de la gota, la imagen de esta es visualizada en forma permanente en un monitor de video. El esquema del equipo utilizado se muestra en la **Figura III.2.7**. Una fotografía del tensiómetro de gota se ofrece en la **Figura III.2.8**. **Figura III.2.7**. Esquema de los componentes y sistema operativo del tensiómetro de gota.

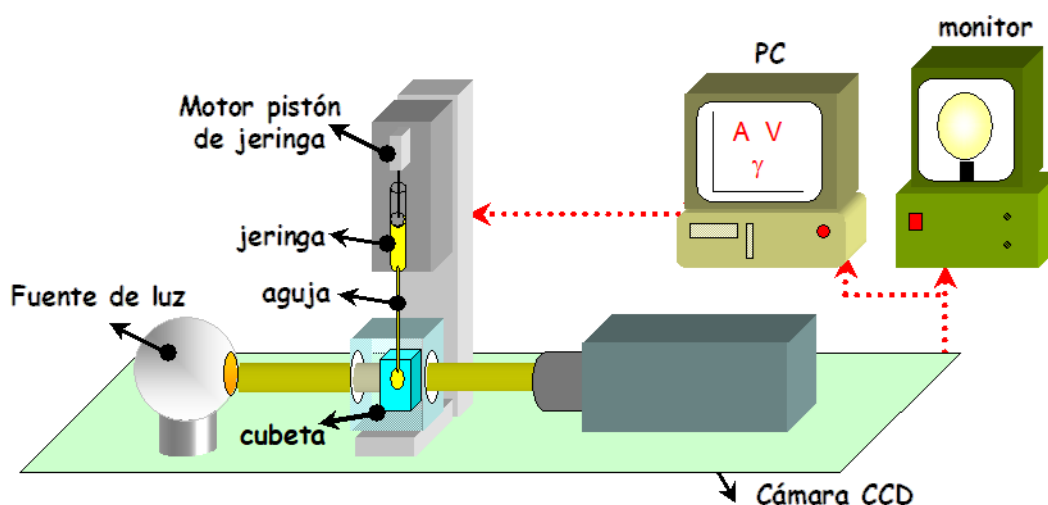


Figura III.2.7. Esquema de los componentes y sistema operativo del tensiómetro de gota.

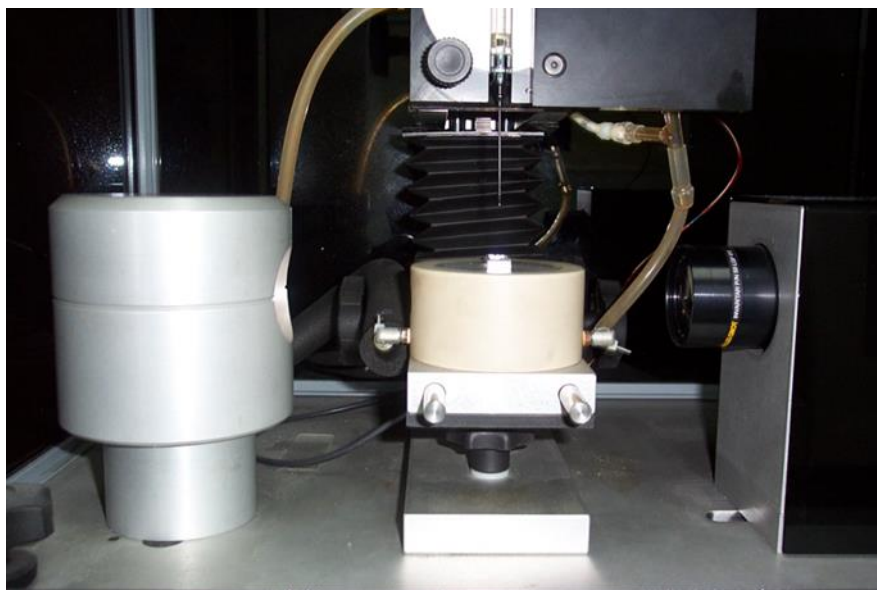


Figura III.2.8. Imagen del tensiómetro de gota.

Antes de la medición se debe limpiar la jeringa para eliminar las impurezas en su interior, se utilizaron ácido acético, agua y etanol en ese orden para realizar los lavados. Una vez limpia, se absorbe el volumen correspondiente a la capacidad total de la jeringa. Posteriormente se limpia la aguja, se monta en la jeringa y se la coloca en el soporte especialmente diseñado para mantenerla en posición vertical, el soporte se ajusta mediante tornillos. Se coloca la fase oleosa en la cubeta de medición. Se observa en la pantalla la punta de la aguja, la cual debe quedar perfectamente centrada en la parte superior del monitor.

La formación de la gota puede producirse automáticamente una vez que comienza la medición, indicando en el programa la cantidad de microlitros a descargarse para su formación. Una vez formada la gota, se inicia inmediatamente la adquisición de datos de tensión interfacial en función del tiempo. A partir de los 15 s comienzan las oscilaciones sinusoidales para la obtención de los parámetros reológicos. Estos son: el módulo dilatacional interfacial (E), con sus componentes elástica (E_d) y viscosa (E_v) y el ángulo de fase y su tangente ($\tan \delta$) que es la viscoelasticidad relativa de la película. Estos datos fueron registrados a lo largo del tiempo y con una amplitud ($\Delta A/A$) y una frecuencia angular (ω). El método de medición comprende una serie de compresiones y expansiones periódicas sinusoidales con incremento y disminución del volumen de la gota a la amplitud deseada. El módulo dilatacional interfacial, E , derivado de un

cambio sinusoidal en la tensión interfacial, σ , resultante de un pequeño cambio sinusoidal en el área interfacial puede ser descrito como:

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad \text{Ecuación III.2.5}$$

$$A = A_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad \text{Ecuación III.2.6}$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = - \frac{d\pi}{d \ln A} \quad \text{Ecuación III.2.7}$$

Donde σ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y deformación, δ es el ángulo entre la deformación y esfuerzo, $\pi = \sigma_0 - \sigma$ es la presión interfacial y σ_0 es la tensión interfacial en ausencia del tensioactivo. El módulo elástico es la parte real del módulo dilatacional interfacial, se obtiene como $E_d = |E| \cdot \cos \delta$. La parte imaginaria es el módulo viscoso, $E_v = |E| \cdot \sin \delta$. La tangente del ángulo de pérdida queda definida como $\tan \delta = E_v / E_d$.

Los experimentos se realizaron a 20 °C, manteniendo la temperatura constante mediante la circulación de agua por una camisa externa. Cada muestra fue cargada en una jeringa limpia y colocada en el equipo, que contó con una cápsula con aceite de girasol purificado. Luego se formó la gota de 8 μ l de muestra y se mantuvo durante 6000 s a 20 °C para obtener los datos de la adsorción dinámica a la interfase O/W. A partir de los 15 s de medición, la gota se sometió a deformaciones repetidas con cinco ciclos de oscilación seguidos de un tiempo correspondiente a 50 ciclos sin ninguna deformación hasta el tiempo necesario para completar la adsorción de la fase acuosa.

III.2.5. Sistemas emulsionados

Se elaboraron sistemas dispersos emulsionados en proporción O:W de 10:90, utilizando aceite de girasol purificado como fase oleosa y soluciones de QA, QS o soluciones mixtas Q-AF como fase acuosa. Además, se realizó un ensayo agregando QA o QS como agente espesante.

Las emulsiones O/W se prepararon agregando lentamente aceite de girasol purificado a la fase acuosa, la fase continua, con homogenización en serie con un Ultra-Turrax T25 Basic (Alemania) (Figura III.2.9) aplicando una velocidad de rotación de 2000 rpm durante 2 min. A continuación, las distintas pre-emulsiones se pasaron una vez por un homogeneizador de válvula de alta presión EmulsiFlex-2000-C5 (Alemania) (Figura III.2.10) a 70 MPa. La temperatura se controló durante la emulsificación y siempre fue inferior a 35 °C.



Figura III.2.9. Imagen del homogeneizador Ultra-Turrax T25 Basic.



Figura III.2.10. Imagen del homogeneizador de alta presión EmulsiFlex-2000-C5.

Sobre las emulsiones con la fase acuosa mixta Q-AF en la proporción Q:AF 100:1 se realizó el agregado de QA o QS como espesante. Para ello, se preparó una solución espesante de Q al 2% (p/p) en *buffer* acetato pH 4,6 en AFI. Se mezcló la emulsión con la solución espesante en las proporciones 1:0, 2:1, 1:1 y 1:1,5 (emulsión:espesante) y se agitó suavemente con agitador magnético durante 30 min.

Las emulsiones obtenidas (**Figura III.2.9**) fueron trasvasadas a tubos y a frascos cerrados herméticamente y conservadas a 4 °C durante todo el periodo en que se estudió su estabilidad.

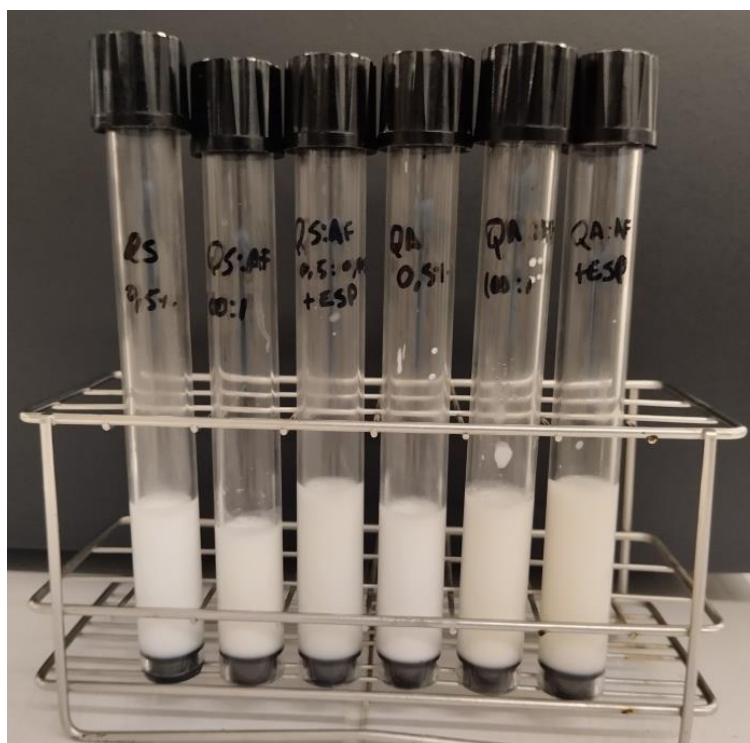


Figura III.2.9. Aspecto macroscópico de las emulsiones O/W, 10:90 elaboradas con QA, QS, QA:AF y QS:AF.

III.2.6. Estabilidad de sistemas emulsionados

III.2.6.1. Determinación de la carga superficial de las gotas

Se determinó la carga superficial de las emulsiones por la medición del potencial- ζ en un equipo de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Las muestras fueron previamente diluidas 1:100 con agua MilliQ y se inyectaron en la cubeta descrita en la **Sección III.2.3**. El potencial- ζ se

determinó a 25 °C realizando diez lecturas por muestra, y se reportó como el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas en al menos tres muestras preparadas independientemente.

III.2.6.2. Cambios en el tamaño de gota en la nano y microescala

Los diámetros promedio y las curvas de distribución de gotas de las emulsiones se determinaron por dispersión estática de luz en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) (**Figura III.2.10**). El rango de medición del equipo se encuentra entre los 0,1 nm a 1000 nm. Se utilizó el índice de refracción (RI) de la fase dispersa correspondiente al aceite de girasol (1,47) y su parámetro de absorción (0,001). El tamaño de gota se informa como el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ($D_{32} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$) y el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro De Broucker ($D_{43} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$), donde n_i es el número de gotas de diámetro d_i (Camino y col., 2009).

El parámetro D_{32} brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas, en términos de área. D_{43} , referido a volumen de gota equivalente, está relacionado con cambios en el tamaño de gota que involucran procesos de desestabilización. Los parámetros informados corresponden al promedio y la desviación estándar de al menos tres mediciones muestras preparadas independientemente.



Figura III.2.10. Imagen del equipo Mastersizer 2000, Malvern Instrument (Worcestershire, Inglaterra).

III.2.6.3. Viscosidad de los sistemas emulsionados

La viscosidad fue determinada utilizando un reómetro Advanced Rheometer AR 2000 (TA Instruments, Dinamarca). Se trabajó usando una velocidad de corte controlada de forma tal que se aumentó exponencialmente la rotación de la placa de 60 mm desde 0,1 hasta 100 s^{-1} , durante un período de prueba de 20 minutos a una temperatura de 20°C . El reómetro adquirió los datos de la velocidad de rotación o de corte y midió el esfuerzo cortante, y se graficó la viscosidad expresada en Pa.s en función de la velocidad de corte en s^{-1} .



Figura III.2.11. Imagen del equipo reómetro Advanced Rheometer AR 2000 (TA Instruments, Dinamarca).

III.3. Resultados

III.3.1. Isotermas de adsorción superficial de la interfase A/W en equilibrio

Con el objetivo final de evaluar su capacidad emulsionante, se determinó primeramente la actividad superficial de soluciones de QA y QS en *buffer* acetato. Las presiones superficiales, en la interfase A/W, para las soluciones de QA y QS en función de la concentración de Q. Se obtuvieron así las llamadas isotermas π -concentración, que se muestran en la **Figura III.3.1**.

Se detectó un incremento en la presión superficial para ambos Q a AFI a medida que aumentó la concentración de Q en la solución, alcanzando finalmente un valor de meseta cuando la superficie A/W se encontró saturada. Inicialmente, a bajas concentraciones de Q, se observó un aumento drástico de la presión superficial; luego, a medida que la concentración se incrementó, la presión superficial aumentó gradualmente hasta alcanzar un valor asintótico, denominado presión de saturación (π_{sat}). Esta evolución se ha asociado previamente a un aumento de la concentración de agente tensioactivo en la superficie A/W, lo que provoca un aumento en la presión superficial a la disminución de la tensión superficial (Dickinson, 1998). Sin embargo, una vez que la superficie está saturada, las concentraciones más altas del tensioactivo no resultaron en una mayor disminución de la tensión superficial (Tie y col., 2003). A concentraciones inferiores a la concentración de saturación, la capa de biopolímero en la interfase aún no está completamente formada y la disminución de la tensión a medida que aumenta la concentración de Q puede estar asociada con el establecimiento de interacciones en la interfase A/W de las moléculas ya adsorbidas después de la difusión. Sin embargo, por encima de la concentración de saturación, las moléculas de Q se redireccionan hacia el *bulk* de la solución y se orientan en un arreglo o rearreglo que permita que cada grupo constituyente interactúe con la fase con la que tenga mayor afinidad. Las moléculas pueden formar agregados en los que las porciones hidrofóbicas se orientan dentro del grupo y las porciones hidrofílicas se exponen al solvente.

Para las soluciones a AFI se observó una tendencia sigmoide, viéndose más marcada dicha tendencia en la isoterma π -concentración de QS. Este comportamiento es típico de biopolímeros y surfactantes, y está asociado a los diferentes niveles de organización molecular en la interfase (Álvarez Gómez y Rodríguez Patino, 2006; Rodríguez Patino y col., 2007). El valor de presión alcanzado en la saturación para el QS y QA fue de 26 mN/m y 22,5 mN/m, respectivamente. En las soluciones a BFI se observó un incremento de la presión superficial con el aumento de la concentración en ambos Q, sin alcanzar un *plateau* correspondiente al equilibrio en la interfase. En ausencia de sales o en concentraciones suficientemente bajas, las cadenas de Q altamente cargadas tienden a formar capas relativamente delgadas cuando se adsorben en superficies con cargas opuestas. Estos resultados pueden atribuirse a la presencia de fuertes interacciones electrostáticas intramoleculares. En altas concentraciones de sal, una repulsión intramolecular más débil debido a los efectos de apantallamientos de cargaas puede hacer que el Q se adsorba en una estructura más compacta y delgada. Por el contrario, las cadenas de Q tienden a formar una capa de interfaz más gruesa (Klinkesorn, 2013).

Roy y col. (2017), trabajando con el mismo Q comercial, QS, en *buffer* acetato a pH 5,5, reportaron que la presión de saturación (π_{sat}) fue a 25 mN/m, correspondiéndose con los valores obtenidos en nuestras mediciones. Los autores indicaron en este trabajo que lo más apropiado para la descripción de la actividad superficial de los biopolímeros es reportar la concentración de saturación (C_{sat}) ya que cuanto menor es la concentración a la que se alcanzó el punto de saturación, mayor es el poder emulsificante. En su estudio, la C_{sat} del Q fue de 0,3 % m/v y en esta Tesis alrededor de 0,25 % m/m.

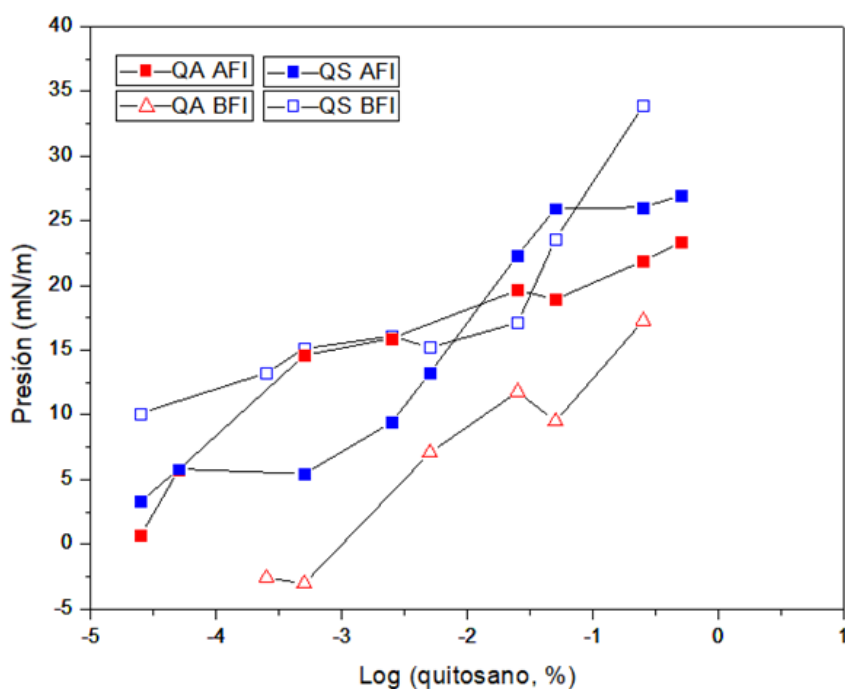


Figura III.3.1 Isotherma de adsorción de QA y QS para la interfase aire-agua. Efecto de la fuerza iónica en la presión superficial. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,3\text{ M}$ (AFI) e $I = 0,03\text{ M}$ (BFI), $\text{pH} = 4,6$

En el trabajo realizado por Carrera y col. (2023) se estudiaron dos Q, uno de alto PM y DD= 81 % (CH81-HMW) y otro de bajo PM y DD= 86 % (CH86-LMW). Los autores reportaron que la C_{sat} resultó dependiente de las características del Q, ya que se determinó C_{sat} de aproximadamente 0,2 y 0,3% p/p para CH81-HMW y CH86-LMW, respectivamente. Estos valores fueron inferiores a la concentración de saturación encontrada para otros agentes con actividad interfacial como las proteínas (Cicuta, 2007; Felix y col., 2019; Martinez y col., 2009). Esto puede explicarse por el mayor tamaño de las moléculas de Q en comparación con las proteínas. De hecho, el Q de mayor peso molecular (CH81-HMW) fue el de menor C_{sat} , en concordancia con nuestros resultados.

Aunque la mayoría de los polisacáridos no tienen tendencia a adsorberse en la superficie A/W debido a su hidrofilia, existen algunos polisacáridos con actividad superficial reportada, como los alginatos de propilenglicol (Baeza y col., 2005). Sus propiedades tensioactivas se han asociado a un aumento del grado de esterificación, lo que reduce el carácter hidrofílico global de las moléculas. La superficie A/W se saturó a una concentración de alginatos de propilenglicol de 0,1% p/p.

En general, estos resultados muestran que los Q estudiados poseen actividad superficial. Si bien los reportes generalmente concluyen una baja actividad superficial para Q, la mayoría de los estudios se han centrado en concentraciones de Q muy bajas o con baja concentración de electrolitos añadidos. Por tanto, las diferencias encontradas pueden atribuirse a la fuerza iónica relativamente alta utilizada en esta Tesis (0,3 M), ya que previamente se informó que por encima de 0,3 M de *buffer* acetato, la actividad superficial del Q aumenta drásticamente (Skorik y col., 2016). Pepić y col. (2008) estudiaron la interfase A/W de Q en solución acuosa, la tensión superficial permaneció constante y cercana a la del agua pura, lo que indica que el Q no difundió a la interfase. Esto podría explicarse a la ausencia de grandes grupos hidrofóbicos que tengan la posibilidad de adsorberse en la superficie. Sin embargo, al utilizar *buffer* acetato, las secuencias hidrófobas de moléculas de Q autoagregadas podrían adsorberse en la superficie, lo que da como resultado una tensión superficial diferente a la del disolvente. La mayor adsorción de Q a la interfase en estas condiciones puede explicarse por interacciones hidrofóbicas más fuertes que entran en juego con fuerzas iónicas más altas cuando se filtran las cargas. Geng y col. (2005) demostraron que, al estudiar soluciones acuosas de Q (DD= 54 %) en ácido acético, la tensión superficial resultó menor a medida que la concentración de Q fue mayor, mientras que la viscosidad de la solución se mantuvo sin cambios. Una explicación plausible para estos resultados obedecería a una asociación más fuerte entre los grupos acetilo hidrófobos, como resultado del cribado electrostático de los grupos amino cargados con alta fuerza iónica, a los valores de pH constantes del *buffer* acetato empleado (6,0–6,5). En este sentido, Skorik y col. (2016) han demostrado que el Q puede formar partículas agregadas coloidalmente estables que se autoensamblan, en soluciones de cloruro sodio (0,3 M) o *buffer* acetato de sodio (0,3 M), creando nanopartículas estables con un diámetro entre 10 y 30 nm. Estas soluciones de nanopartículas han mostrado una mayor hidrofobicidad en los estudios de fluorescencia de pireno (Amiji, 1995), lo que sugiere que estas nanopartículas pueden tener propiedades superficiales prometedoras. Por lo tanto, el Q se puede considerar como un emulsionante *pickering* hidrofílico (Biviano y col., 2020).

III.3.2. Tamaño de partículas y potencial- ζ de soluciones

III.3.2.1. Soluciones de Q

Para verificar la formación de agregados en las soluciones de Q en *buffer* acetato pH 4,6 a AFI y BFI, se determinaron el tamaño promedio de partícula (Z_{ave}) y el índice de polidispersidad (PDI) a partir de distribuciones de tamaño de partícula medidas por DLS. Además, se muestran las distribuciones de tamaño expresadas en intensidad y volumen en función del diámetro hidrodinámico (**Figuras III.3.2 y III.3.3**). Debido a que ambos Q presentaron un comportamiento homólogo, se muestran los gráficos de QA. A partir de los resultados obtenidos respecto al tamaño de partícula, se observó que en las condiciones estudiadas para ambos Q, el Z_{ave} aumentó en forma paulatina con el incremento de la concentración desde 0,05 %. Además, el QA, que presenta mayor peso molecular, mostró Z_{ave} mayores con respecto al QS en este régimen de concentraciones, en concordancia con lo reportado por Carrera Sánchez y col. (2023). Por otra parte, se determinó que manteniendo la FI constante e incrementando la concentración de Q el tamaño de los agregados aumentó, presentando picos con mayor área, tanto en intensidad como en volumen. Se consideró a la concentración 0,25 % como la concentración de agregación crítica (CAC), ya que todas las muestras formaron agregados significativamente de mayores tamaños a partir de esta concentración (Carrera Sánchez y col., 2023). En la CAC, el QA a BFI presentó el salto de Z_{ave} más importante, el QS a AFI presentó el menor salto y las otras dos muestras presentaron un tamaño intermedio y no hubo una diferencia sustancial entre ellas. En este sentido, se vio un efecto de la fuerza iónica y del peso molecular de Q en los Z_{ave} obtenidos, los tamaños de partícula fueron mayores para el QA a BFI. El Z_{ave} a la concentración 0,50 % (p/p) se pudo estudiar únicamente a AFI, debido a que no fue posible la disolución a BFI, y se vio que no hubo un efecto del peso molecular del Q en esas condiciones.

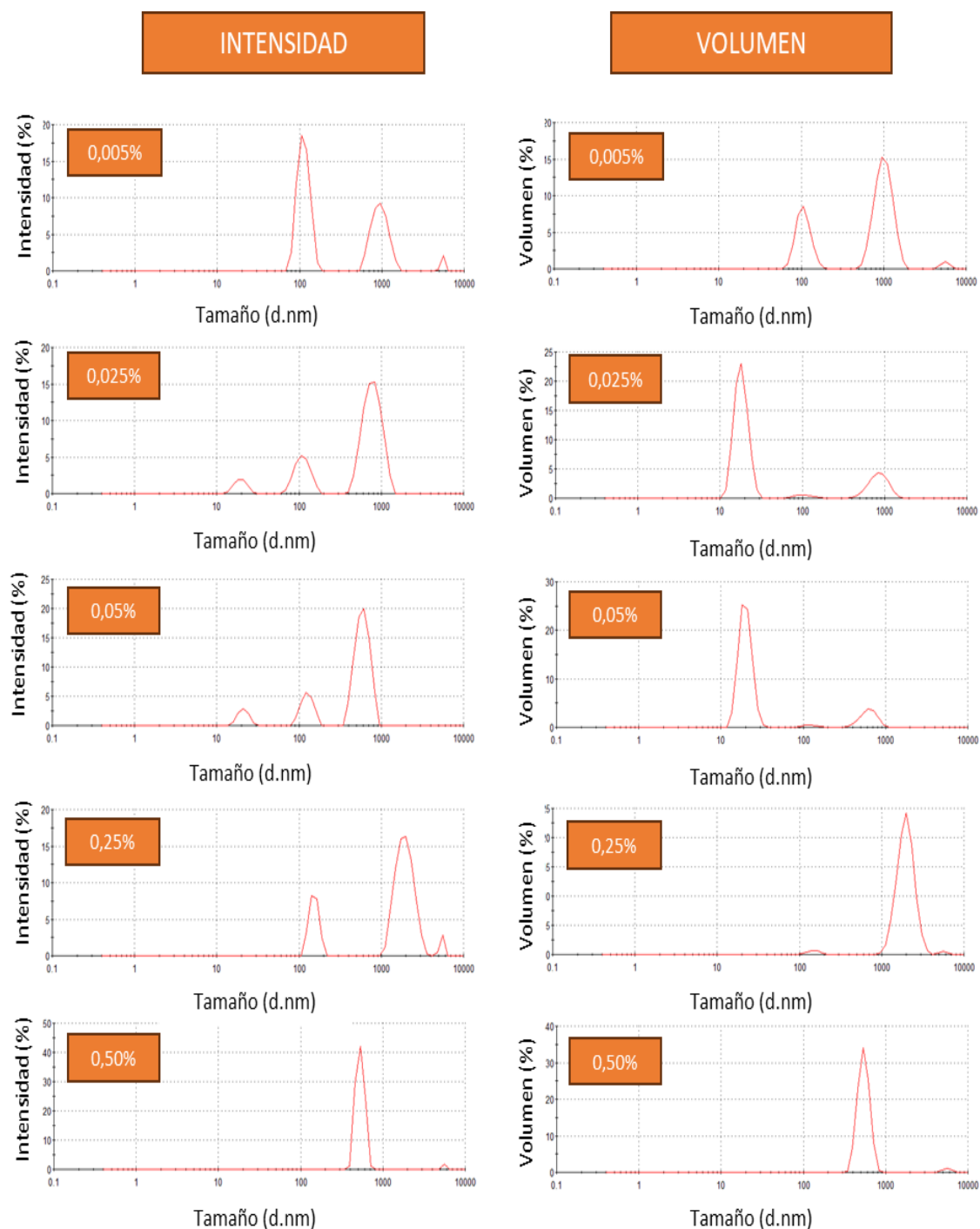


Figura III.3.2. Distribución de tamaño de partícula expresado en intensidad y volumen para QA y QS en función de la concentración de biopolímero. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

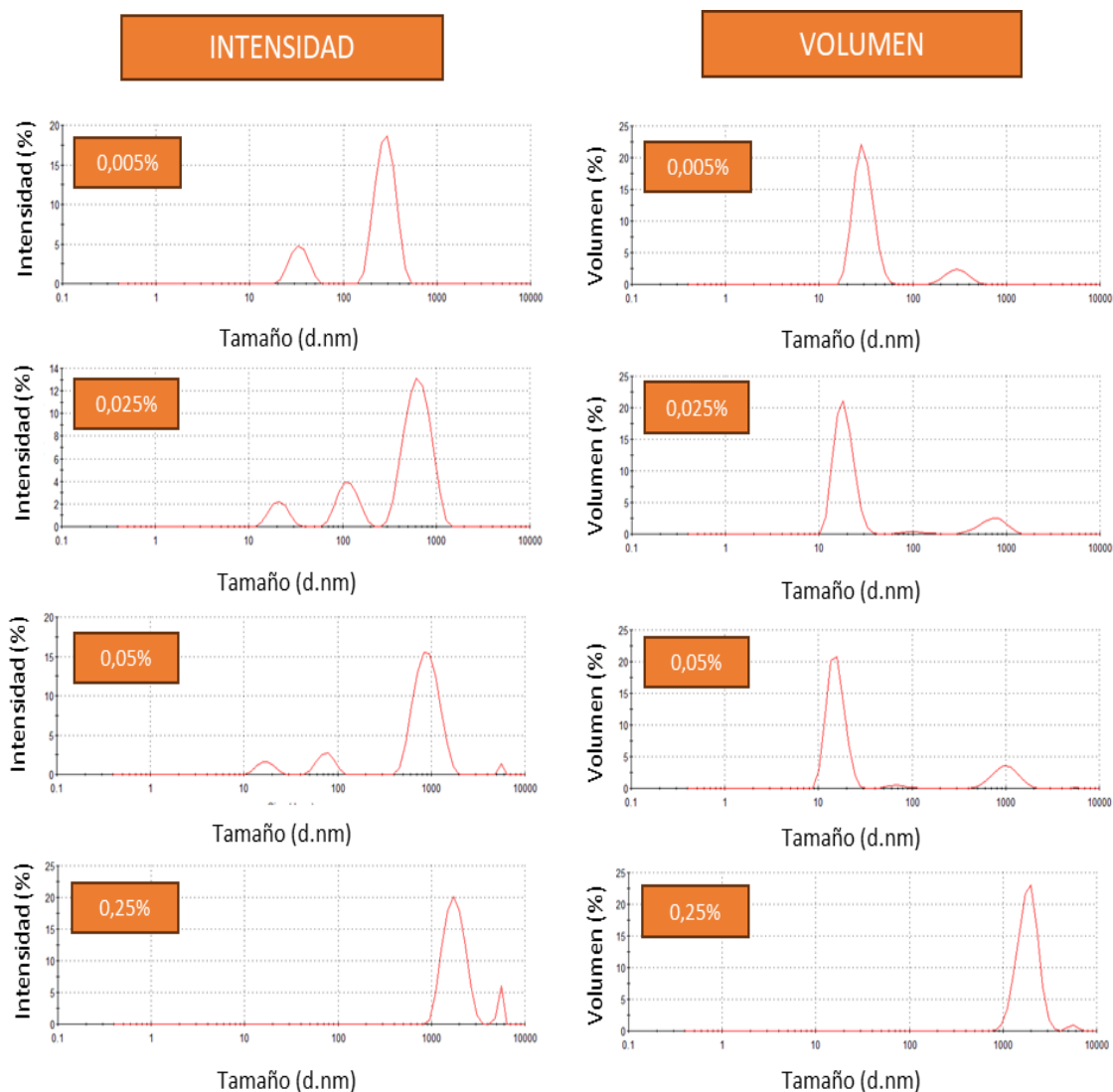


Figura III.3.3. Distribución de tamaño de partícula expresado en intensidad y volumen para QA y QS en función de la concentración de biopolímero. T= 20 °C, I= 0,03 M (BFI), pH= 4,6

El PDI es un parámetro importante que describe el ancho de la distribución del tamaño de las partículas. Se define como la intensidad de la luz dispersada por varias fracciones de partículas que difieren en sus tamaños y se calcula como $PDI = (\text{ancho}/\text{media})^2$ (Ochnio y col., 2018). En todas las condiciones se obtuvieron valores de PDI superiores a 0,1, lo que implicó distribuciones polidispersas. Los valores de PDI elevados también pueden asociarse a la presencia de una población cuyo tamaño de partícula es mayor al límite de detección del equipo, como sucedió con los Q en AFI en la mayor concentración. Koppolu y col. (2014) reportaron que en el desarrollo de nanopartículas de Q la composición de la sal precipitante jugó un papel importante en

la formación de partículas, cuando lo hicieron con sales que contuvieron aniones fuertemente hidratados se produjeron partículas con un PDI bajo, mientras que los aniones más débiles dieron como resultado partículas agregadas con PDI altos. Estudios similares realizados por otros autores utilizando la técnica DLS demostraron que, en soluciones de acetato de sodio 0,5 M, el Q formó partículas estables con un diámetro de 20 a 30 nm a valores de pH entre 3 y 6, mientras que a pH 2 se formaron partículas más pequeñas, de 15 nm aproximadamente. Además, no se detectó formación de partículas por debajo de pH 5 con Q solo sin adición de sales (Biviano y col., 2020). Otros estudios han mostrado resultados similares (Wang y Heuzey, 2016), concluyendo que las propiedades del Q (peso molecular, longitud de la cadena, grado de desacetilación) afectan fuertemente el tamaño de las partículas formadas. De esta manera, se obtuvieron partículas con un diámetro de 20-30 nm utilizando Q de bajo PM (30 kDa) y para una concentración de 0,05 % a pH 4. Comparando estos resultados con los diámetros de partícula obtenidos en esta Tesis, aproximadamente 500 nm con 0,05 % (p/p) del biopolímero, se obtuvieron valores 15 veces mayores, lo que está asociado con el mayor PM del Q utilizado. De esta forma, según los resultados obtenidos de la isoterma de adsorción (**Figura III.3.1**) y a partir de la determinación de los tamaños de los agregados mediante DLS (**Figuras III.3.2 y III.3.3**), se puede afirmar que en concentraciones inferiores a la CAC, los sistemas de Q podrían formar una película en monocapa constituida por agregados macromoleculares coloidalmente estables. Carrera Sánchez y col. (2023) obtuvieron tamaños de partícula similares con Q de peso molecular de 221 y 425 kDa, utilizando *buffer* acetato 0,25 M como medio acuoso.

Estas partículas agregadas podrían autoensamblarse y adsorberse en la superficie A/W como tales. Sin embargo, a concentraciones superiores al CAC, la película formada por la adsorción de agregados más grandes puede conducir a la formación de multicapas colapsadas. Es de destacar que la adsorción de estos agregados más grandes fue coincidente con la C_{sat} , es decir, cuando la actividad superficial alcanzó su máximo.

La formación de agregados de Q en solución también se vio favorecida por el aumento de la concentración de Q en la subfase y por la fuerza iónica utilizada, ya que podría blindar las interacciones repulsivas debido a la carga positiva de los grupos amino. Es

decir, la presencia de iones en el sistema podría aumentar la asociación entre grupos acetilo hidrófobos como resultado del cribado electrostático de los grupos amino cargados. Este efecto puede mejorar las interacciones hidrofóbicas, inter e intramoleculares, así como interacción con el aire, la fase hidrofóbica. Pepić y col. (2008), informaron que en soluciones de *buffer* acetato a pH 6-6,5 el carácter hidrofóbico del Q se volvió más fuerte debido a la menor protonación de los grupos amino libres de las moléculas de Q en comparación con una solución acuosa de Q sin iones, permitiendo la formación de agregados del polisacárido Q a través de interacciones hidrofóbicas. El DD de los Q también tiene influencia en el tamaño de partícula debido a que se relaciona con el carácter hidrofóbico del grupo acetilo (Franca y col., 2011; Rinaudo, 2006). En este sentido, Ottøy y col. (1996) observaron que un mayor grado de acetilación implica una tendencia más pronunciada a formar agregados de Q. Los Q estudiados en esta Tesis presentan un grado de desacetilación similar, por lo cual no sería criterioso atribuir diferencias en el tamaño de partícula desde este aspecto.

Se determinaron los valores de potencial- ζ para las soluciones de QA y QS a la CAC. Se obtuvieron valores de $53,9 \pm 1,6$ y $52,6 \pm 1,6$ mV a BFI, mientras que para la condición a AFI los valores fueron menores, de $34,5 \pm 1,7$ y $29,3 \pm 1,0$ mV. Comparando ambas condiciones de trabajo, a BFI se obtuvieron valores más altos de potencial- ζ a igual concentración Q, lo cual se relaciona con los agregados formados que exponen mayor cantidad de residuos cargados hacia la fase acuosa con el consecuente incremento en la carga superficial. Rodrigues Costa y col. (2018) obtuvieron valores de potencial- ζ de dispersiones de Q 0,01 % de 60 mV. En términos generales, los biomateriales con valores altos de potencial- ζ , alta carga, sea esta positiva o negativa resultan más eficientes en la estabilización de dispersiones coloidales (Pérez y col., 2014; Visentini y col., 2019).

III.3.2.2. Soluciones mixtas Q-AF

Se determinó el tamaño de partícula de las soluciones mixtas Q-AF y para una relación biopolímero:vitamina de 100:1. Se obtuvieron valores de Z_{ave} significativamente mayores. Para los sistemas QA-AF el Z_{ave} fue de $3534,5 \pm 291,3$ nm con un PDI de 0,31

$\pm 0,06$ mientras que para los sistemas QS-AF el Z_{ave} fue de $2770,5 \pm 176,1$ nm y su PDI de $0,18 \pm 0,03$. Los resultados de PDI bajos indican que las partículas correspondientes a los sistemas mixtos tuvieron una distribución menos dispersa con respecto a las partículas de Q sola. A partir de esto, se puede concluir que el AF causó la agregación de los Q al favorecer interacciones inter e intramoleculares débiles.

La adición de AF no causó cambios en el potencial- ζ en los sistemas mixtos, al menos en el rango de concentraciones de Q y AF estudiadas. En coincidencia con estos resultados, Zema y Pilosof (2018) no observaron cambios en este parámetro luego de la adición de AF a β -Ig o a gelatina y concluyeron que la interacción entre ambas biomoléculas ocurre sin modificación significativa de la carga superficial de la proteína.

III.3.3. Isotermas de adsorción en la interfase O/W

La fase oleosa seleccionada fue el aceite de girasol comercial, ya que éste es muy utilizado a nivel industrial y en emulsiones alimentarias por ser comercialmente estable durante el almacenamiento (Kalaydzhiev y col., 2019). Sin embargo, desde el punto de vista de estudios básicos, su utilización puede no ser conveniente debido a la presencia de componentes con actividad interfacial, tales como monoglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos. De acuerdo con Wüstneck y col. (1999), estos contaminantes pueden ser esenciales para el comportamiento interfacial del aceite. Por esta razón, se realizó la purificación del aceite que se utilizó en los ensayos, con el objetivo de eliminar los compuestos interferentes mencionados.

En la **Figura III.3.4** se encuentran representadas las isotermas de adsorción para la interfase O/W de ambos Q. Las isotermas obtenidas no presentaron una tendencia sigmoidea y no se observó alguna inflexión importante en todo el rango de concentraciones estudiado, sugiriendo que no ocurrió ningún cambio estructural a nivel de interfase. Se determinó que a 0,5 y 0,25 % p/p ambos Q presentaron una mínima actividad interfacial mientras que las concentraciones inferiores estudiadas no generaron actividad interfacial.

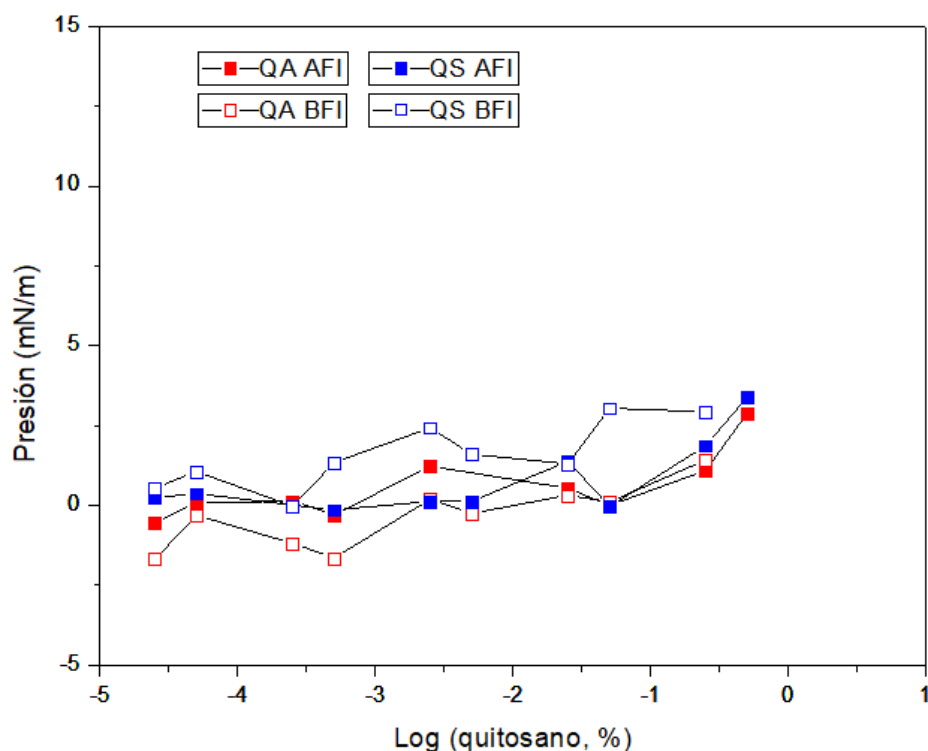


Figura III.3.4. Isoterma de adsorción de QA y QS para la interfase O/W. Efecto de la fuerza iónica en la presión interfacial. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,3\text{ M}$ (AFI) e $I = 0,03\text{ M}$ (BFI), $\text{pH} = 4,6$

El comportamiento de los Q en la interfase O/W fue apreciablemente menor al exhibido en la interfase A/W. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza hidrofóbica de la fase oleosa formada por triglicéridos y ácidos grasos. Wüstneck y col. (1999) y Camino y col. (2009) obtuvieron la misma tendencia en las isotermas de presión superficial o interfacial para las interfases A/W o O/W al estudiar el comportamiento de β -lactoglobulina e hidroxipropilmetilcelulosas, respectivamente. Valores menores de presión en la interfase O/W han sido reportados también por Rotureau y col. (2004) al trabajar con derivados anfifílicos de dextrano y por (Ganzevles y col., 2007) en mezclas de β -lactoglobulina y pectinas. La mejor solvatación ofrecida por la fase aceite para los grupos hidrofóbicos, en comparación con el aire, puede explicar la menor eficiencia de los Q para incrementar la presión interfacial en la interfase O/W. Mędrzycka y Zwierzykowski (2000) propusieron que existen más interacciones entre las moléculas de la cadena carbonada del surfactante en la interfase A/W. Tales interacciones estarían presentes en un menor número o ausentes en la interfase O/W. Payet y Terentjev (2008) estudiaron las propiedades interfaciales del Q (DD= 80 %) en la interfase A/W y O/W, concluyendo que el Q no presentó

actividad superficial o interfacial en concentraciones inferiores al 0,1 %. En este trabajo y para concentraciones más altas, se detectó una disminución gradual de la tensión interfacial, lo que indica una cinética de adsorción lenta del Q en la interfaz O/W y un reordenamiento gradual de las partes hidrofílicas y más hidrofóbicas de las cadenas del biopolímero en la interfase. Sin embargo, la disminución general de la tensión interfacial fue pequeña en comparación con la de las moléculas tensioactivas más comúnmente estudiadas. Estos hallazgos están respaldados por los resultados de un estudio de Babak y col. (1999), en el que se midió la tensión interfacial de soluciones de Q de baja concentración a pH 4,6 y concluyó que no se adsorbió Q en la interfase en las condiciones dadas. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la tensión interfacial a la concentración medida más alta.

III.3.4. Adsorción de Q a la interfase O/W. Enfoque dinámico

Para las estudiar la cinética de adsorción interfacial y las propiedades dilatacionales interfaciales de las soluciones de Q en la interfase O/W se seleccionaron las concentraciones de polisacárido que presentaron mayor actividad interfacial en los ensayos realizados en equilibrio con el tensiómetro de Wilhelmy. Las muestras ensayadas fueron de QA y QS, en las siguientes condiciones de concentración y fuerza iónica:

- 0,50 % AFI
- 0,25 % AFI
- 0,25 % BFI

En las **Figuras III.3.5 y III.3.6** se muestra la dinámica de adsorción (π vs tiempo) de las soluciones de QA y QS respectivamente, obtenidas con un tensiómetro de gota. La presión interfacial del QA a BFI presentó un comportamiento semejante al QA más concentrado y a AFI a cortos tiempos, pero luego la presión manifestó aumento y se asemejó al patrón de QA preparado a la misma concentración y mayor fuerza iónica. Por lo tanto, en la actividad interfacial del QA se observó un efecto de la fuerza iónica a tiempos cortos ($t= 15$ s) y un efecto de la concentración en la presión interfacial a tiempos prolongados ($t= 6000$ s). Tal como se señaló previamente, a AFI los agregados

de polímero formados presentaron mayor hidrofobicidad lo cual favoreció su migración a la interfase. A la concentración de 0,25 % los agregados presentaron un menor tamaño por lo cual estos migraron más rápidamente respecto a los agregados a 0,50 %, que necesitaron más tiempo para alcanzar a interfase. A BFI los grupos amino están más cargados, por lo tanto, la hidrofobicidad es menor y la estructuración en la interfase se da a mayor tiempo. Por otra parte, para el QS no se observó un efecto atribuible a la concentración ni a la fuerza iónica en lo respectivo a la actividad interfacial. Para ambos Q, el valor de equilibrio de la tensión interfacial detectada mediante esta metodología en el período de 6000 s (1,7 h) coincidió aproximadamente con el obtenido en el método de la placa de Wilhelmy, medido en las soluciones en el equilibrio a $t = 24$ h (Figura III.3.4).

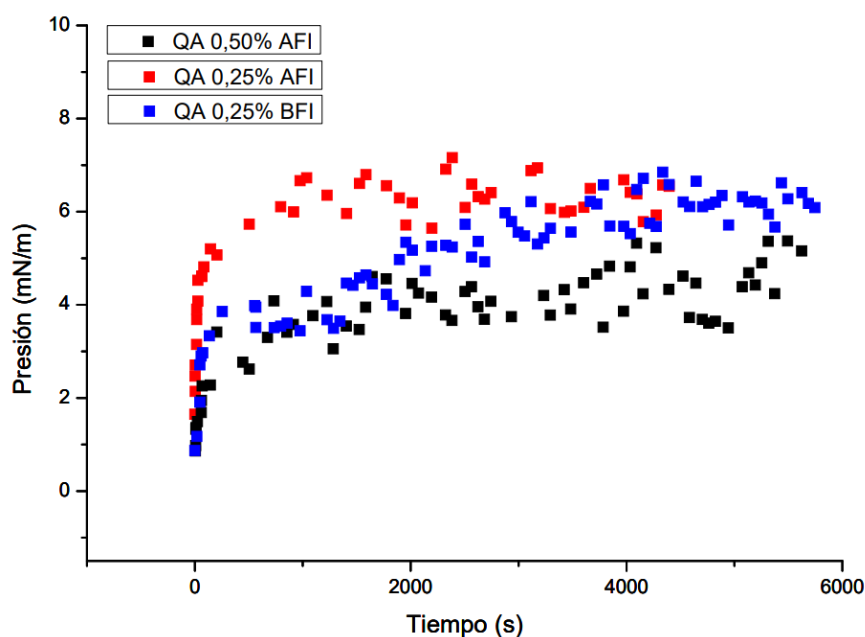


Figura III.3.5. Evolución en el tiempo de la presión interfacial (π vs t) durante la formación de películas de QA en la interfase O/W a distintas concentraciones y fuerza iónica en la subfase. Inserto: a cortos tiempos. $T = 20$ °C, $I = 0,3$ M (AFI) e $I = 0,03$ M (BFI), $pH = 4,6$

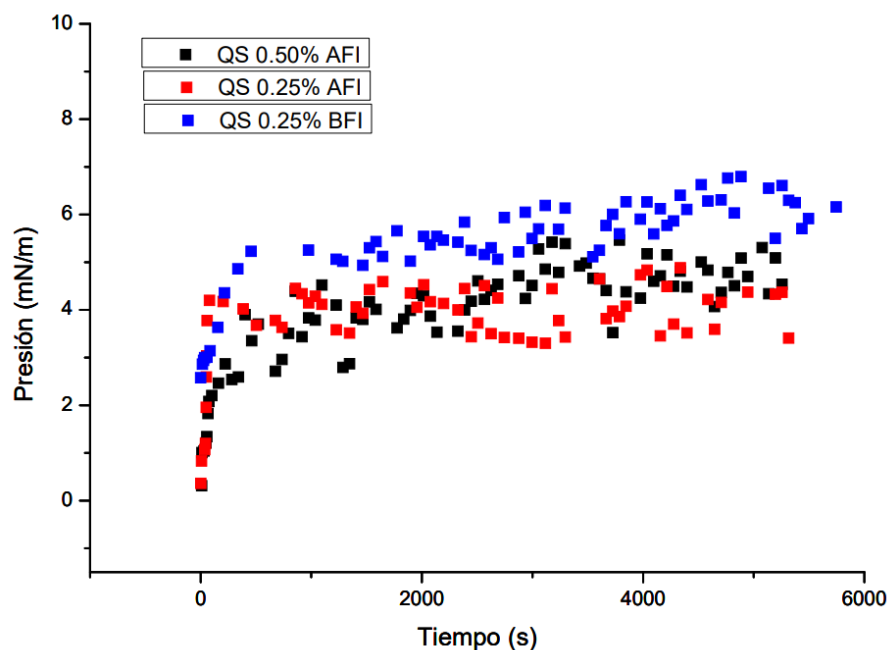


Figura III.3.6. Evolución en el tiempo de la presión interfacial (π vs t) durante la formación de películas de QS en la interfase O/W a distintas concentraciones y fuerza iónica en la subfase. $T= 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I= 0,3\text{ M}$ (AFI) e $I= 0,03\text{ M}$ (BFI), $\text{pH}= 4,6$

Lopes y col. (2019) estudiaron la tensión interfacial de un QS y oligómeros (quitoligosacáridos) obtenidos a partir de QS y los resultados indicaron que ambos presentaron una pequeña variación entre la tensión interfacial inicial (26,0 mN/m) y final (21,0 mN/m), que refleja su baja capacidad para estabilizar la interfase O/W. A pH 3,0, los grupos amino primarios del Q se protonan (NH_3^+), estos grupos pueden interactuar electrostáticamente con los dominios hidrofílicos de la interfase; sin embargo, pocas regiones hidrofóbicas, es decir, grupos acetilo, están disponibles para las interacciones debido al alto grado de desacetilación ($\sim 85\%$) del Q utilizado. Además, la menor flexibilidad del Q y los oligómeros en comparación con proteínas como el WPI también corrobora su menor capacidad para estabilizar la interfase (Qun y Ajun, 2006). Por otra parte, Payet y Terentjev (2008) reportaron que un Q ($\text{PM } 10^5 - 3 \cdot 10^5\text{ g/mol}$, solubilizado en ácido acético) no presentó actividad superficial ni en la interfase A/W ni actividad interfacial en la de parafina/agua (interfase O/W) para concentraciones inferiores al 0,1 % p/p. Para concentraciones más altas de Q, la tensión interfacial (tanto para A/W como O/W) disminuyó más lentamente, y la disminución general es pequeña en comparación con las moléculas anfifílicas

tradicionales. Para soluciones con 1 y 2 % (p/p) de Q, la tensión interfacial de saturación fue 31 mN/m después de 16 h, que se corresponde con los valores de saturación obtenidos en esta Tesis y también con los reportados con otros glúcidos, como el glucopiranosido y la maltosa (Payet y Terentjev, 2008). Sin embargo, puede observarse una gran diferencia respecto al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, ya que se reporta que lo alcanza en cuestión de horas en contraposición con los segundos que tardan el QA y QS. Cabe agregar que, para alcanzar el estado de equilibrio, un factor importante es la facilidad que tenga la molécula polimérica para llevar a cabo dicho reordenamiento. A su vez dependerá de la flexibilidad molecular y de cómo están distribuidos los grupos hidrofóbicos en la molécula (Pérez y col., 2015).

La cinética de adsorción del Q, al igual que otros biopolímeros como proteínas o polisacáridos con actividad superficial (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa), se lleva a cabo en varias etapas (Pérez y col., 2008; Rodríguez Patino y col., 2008). Primero, a presiones superficiales relativamente bajas, tiene lugar una rápida difusión de las moléculas de Q desde la solución a la superficie caracterizado por el rápido aumento según lo detectado en la presión superficial. Esta etapa presenta una rápida disminución de la tensión superficial y puede ser descrita mediante una expresión modificada de la ecuación de Ward y Tordai (Ward y Tordai, 1946) para correlacionar los cambios de presión superficial con el tiempo:

$$\pi = 2C_0KT\left(\frac{Dt}{3,14}\right)^{1/2}$$

Ecuación III.3.1

donde C_0 es la concentración en la subfase, K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y D es el coeficiente de difusión. Si la difusión a la interfase controla el proceso de adsorción, entonces una representación de presión (π) vs $t^{1/2}$ será lineal (MacRitchie, 1990; Xu y Damodaran, 1994) y la pendiente de la recta resultante corresponderá a la velocidad de difusión k_{Dif} .

Luego, tiene lugar una etapa más lenta en la que las moléculas penetran a través de la capa superficial. La cinética en esta etapa es más lenta, ya que existe una barrera energética después de la fase de difusión y el proceso pasa a estar controlado por adsorción; finalmente, en la superficie puede tener lugar un reordenamiento de

moléculas previamente adsorbidas. Las macromoléculas con PM mayor a 105 y de configuración lineal se adsorben de forma prácticamente irreversible en la superficie debido al gran número de grupos hidrófobos (N-acetilo, en el caso del Q) cuya inmersión en el medio no polar conduce a una ganancia considerable en la energía libre del sistema (Babak y col., 2007).

Por otra parte, la velocidad de desplegamiento de las moléculas y la de reordenamiento en la interfase pueden ser analizadas a través de la siguiente ecuación de primer orden (Graham y col., 1979):

$$\ln \left(\frac{\pi_f - \pi_t}{\pi_f - \pi_0} \right) = -k_i t \quad \text{Ecuación III.3.2}$$

donde π_f , π_0 y π_t son las presiones superficiales al final del tiempo de cada etapa, a un tiempo inicial t_0 y a cualquier tiempo t , respectivamente y k_i es una constante de velocidad de primer orden. En la práctica, la aplicación de la **Ecuación III.3.2** evidencia dos o más regiones lineales. La pendiente inicial es considerada como la constante de velocidad de la etapa de desplegamiento (k_{Des}), mientras que la segunda pendiente corresponde a la constante de velocidad de la etapa de reordenamiento molecular del polímero en la interfase (k_R) (Pizones Ruiz-Henestrosa y col., 2014).

En las **Figuras III.3.7 A y B** se muestran los ajustes de los datos experimentales con las ecuaciones mencionadas para la concentración QA en la subfase igual a 0,50 %, como un ejemplo del procedimiento aplicado. Las constantes obtenidas de la aplicación de los modelos para todas las concentraciones de Q consideradas se resumen en la **Tabla III.3.1**, indicando los correspondientes valores de R^2 para verificar la bondad de los ajustes.

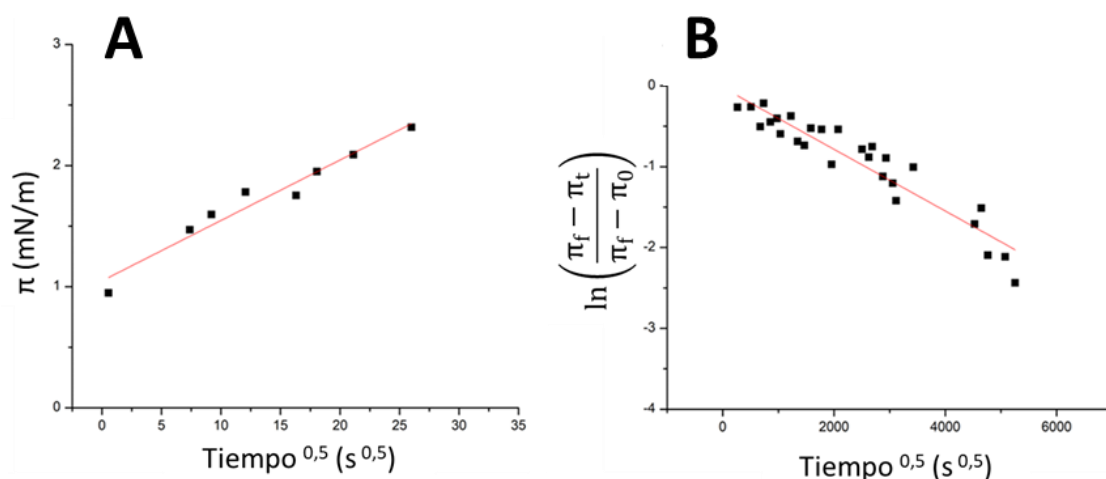


Figura III.3.7. Ajuste de los datos experimentales de π vs tiempo para las etapas de difusión (A) desplegamiento (B) del QA y QS a la interfase O/W. Concentración de QA en la subfase: 0,50% p/p.

La **Tabla III.3.1** muestra los parámetros cinéticos de adsorción derivados de las **Ecuaciones III.3.1** y **III.3.2**. De estos resultados se puede concluir que el proceso de adsorción inicial de los sistemas está controlado por difusión, lo que hace posible la estimación de k_{Dif} . Al comparar las k_{Dif} entre Q, no se observaron diferencias significativas a las concentraciones y FI estudiadas. Como fue reportado por Rodríguez Patino y col. (2008), la velocidad de adsorción de un biopolímero hacia la superficie se ve afectada por diferentes factores, como su PM, estructura, carga, hidrofobicidad superficial, etc. Carrera Sánchez y col. (2023) estudiaron la cinética de difusión en la interfase A/W de dos Q y obtuvieron valores de K_{Dif} en concordancia con los obtenidos para QA y QS. Estos autores observaron que el Q con DD menor fue adsorbido con mayor velocidad a pesar de tener un mayor PM, lo cual se relacionó con el carácter hidrofóbico de este Q. El mayor carácter hidrofóbico podría actuar como fuerza impulsora de la difusión debido a su mayor incompatibilidad con la fase acuosa, dando lugar a la formación de una película estabilizada mediante el fenómeno de *pickering*. Respecto a esto último, otros autores han podido comprobar que el aumento de la fuerza iónica en el medio conduce a un aumento de la hidrofobicidad del Q, lo que facilita su adsorción en la interfase O/W y la consecuente reducción de la tensión interfacial (Skorik y col., 2016).

En lo que respecta a la k_{Des} , sólo la muestra QS 0,25% AFI presentó diferencias significativas con respecto a las demás condiciones estudiadas. Esto se contrapone a lo reportado por otros autores, que han informado que el aumento de la fuerza iónica en el medio condujo a un aumento de la hidrofobicidad del Q, lo que facilitó su adsorción en la superficie O/W y la reducción de la tensión interfacial (Skorik y col., 2016). Por otra parte, Rodriguez Patino, Rodriguez Niño y Carrera Sánchez (1999) al estudiar la adsorción de aislados de proteínas del suero lácteo, encontraron que la adsorción y penetración ocurrieron más fácilmente a mayores concentraciones. Camino (2010) obtuvo valores de k_{Des} en el mismo orden que los presentados en esta Tesis, habiendo trabajado con HPMCs a concentraciones 1 y 0,01 % en la interfase O/W, y observó que el aumento de la concentración fue acompañado por el aumento leve de la k_{Des} .

Tabla III.3.1. Parametros cinéticos derivados de la aplicación de las ecuaciones III.3.1 y III.3.2 que describen cada una de las etapas de adsorción de QA y QS a la interfase O/W. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI) e I= 0,03 M (BFI), pH= 4,6

Muestra	k_{Dif} , mN/m.s ^{1/2} (R ²) *	k_{Des} , x10 ⁻⁴ s ⁻¹ (R ²) *
QA 0,50% AFI	0,12 ±0,07 ^a (0,96)	3,25 ±0,78 ^a (0,91)
QA 0,25% AFI	0,15 ±0,03 ^a (0,93)	3,72 ±0,59 ^a (0,90)
QA 0,25% BFI	0,18 ±0,11 ^a (0,92)	2,99 ±0,76 ^a (0,94)
QS 0,50% AFI	0,25 ±0,08 ^a (0,97)	3,44 ±0,62 ^a (0,90)
QS 0,25% AFI	0,31 ±0,01 ^a (0,96)	1,51 ±0,40 ^b (0,83)
QS 0,25% BFI	0,14 ±0,14 ^a (0,96)	2,45 ±0,17 ^a (0,89)

*media ±SD para n=2. Diferentes letras indican diferencias significativas para p≤0,05.

El parámetro k_R no pudo ser determinado para ninguna de las muestras. Como se muestra en la **Figura III.3.6 B** al representar $\ln (\pi_f - \pi_t / \pi_f - \pi_0)$ (s⁻¹) en función del tiempo se determinó una única región lineal, correspondiente a k_{Des} . La ausencia de una segunda región lineal podría atribuirse a un completo desplegamiento de las moléculas de Q en la interfase, sin requerir reordenamientos posteriores, al menos en el tiempo evaluado y en las concentraciones consideradas, tal como lo reportado por Bustos (2022). Baeza y col. (2005) obtuvieron resultados similares al estudiar la adsorción de alginatos de propilenglicol (PGA) en la interfase A/W, ya que sólo observaron una constante de primer orden, relacionada con la penetración del polisacárido en la interfase.

III.3.5. Cinética de adsorción interfacial de soluciones mixtas Q-AF

Posteriormente se estudió el comportamiento de las soluciones mixtas de ambos Q con el bioactivo de interés, el AF. Se seleccionaron las soluciones de Q al 0,5 % a AFI por ser la concentración en la que las emulsiones elaboradas se mantuvieron estables durante más tiempo, como se explicará en la **Sección III.3.6**. Las soluciones de Q fueron preparadas doblemente concentradas y se mezclaron con soluciones de AF de forma tal de obtener soluciones mixtas en las proporciones Q:AF de 25:1 y 100:1. Se analizaron también las soluciones simples de AF en las concentraciones correspondientes (0,02 % y 0,005 %).

La evolución en el tiempo de la presión interfacial generado por el Q debido a la adición del AF se representa en las **Figuras III.3.10 y III.3.11**. El AF modificó las propiedades del solvente provocando que el sistema tenga actividad interfacial, con lo cual la vitamina podría contribuir en forma aditiva o competitiva con el Q. Considerando que el Q tiene capacidad para formar complejos con el AF en soluciones mixtas acuosas (**Capítulo II**) los cambios observados en la presión pueden explicarse en términos de la actividad interfacial de los mismos y eventualmente de los agregados formados.

Los sistemas mixtos de ambos Q con mayor concentración de AF (**Figuras III.3.10 A y III.3.11 A**) presentaron mayor actividad interfacial en comparación con el Q solo. Se puede observar que la vitamina determinó el comportamiento de los sistemas mixtos en términos de la tendencia general de la curva, pudiendo ser causado por las estructuras columnares que adopta la vitamina a pHs bajos, formando agregados de mayor tamaño (Gottarelli y col., 1994). Además, puede observarse que en los sistemas mixtos formados por QA, con baja concentración de AF (**Figura III.3.10 B**), a cortos tiempos tuvo un comportamiento que se corresponde con el AF solo y a largos tiempos se observó un efecto aditivo. Por su parte, los sistemas mixtos de QS con baja concentración de AF (**Figura III.3.11 B**) presentaron un efecto aditivo ya que la actividad interfacial fue mayor con respecto a los controles de ambos compuestos solos.

Los sistemas mixtos QA-AF y QS-AF alcanzaron mayores valores de presión interfacial en la interfase O/W respecto al Q solo. Este resultado coincide con un estudio de la actividad interfacial de un concentrado de proteína de suero bubalino en la interfase A/W, la que se vio incrementada cuando se complejó con AF (Bustos, 2022).

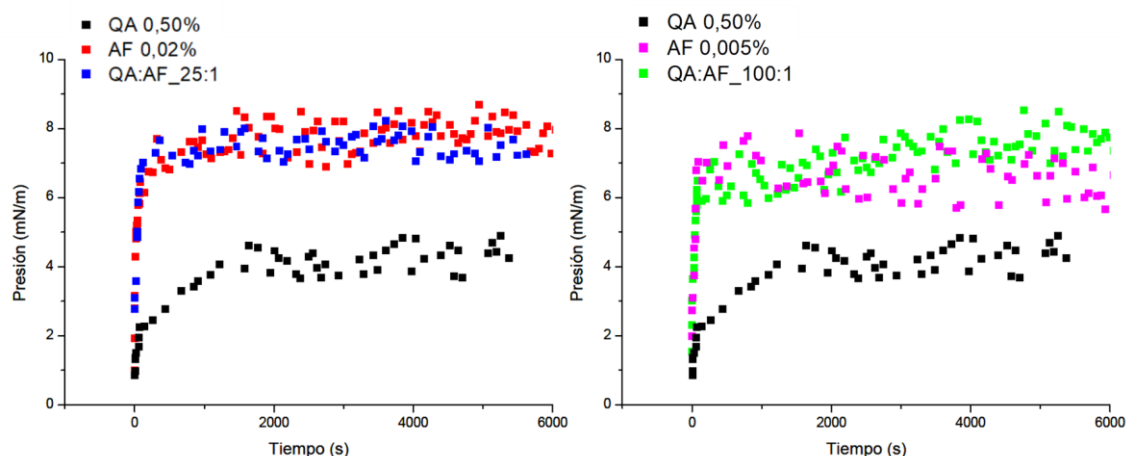


Figura III.3.10. Evolución en el tiempo de la presión interfacial (π vs t) durante la formación de películas de QA, AF y soluciones mixtas en la interfase O/W a distintas concentraciones en la subfase. $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,3\text{ M}$ (AFI), $\text{pH}=4,6$

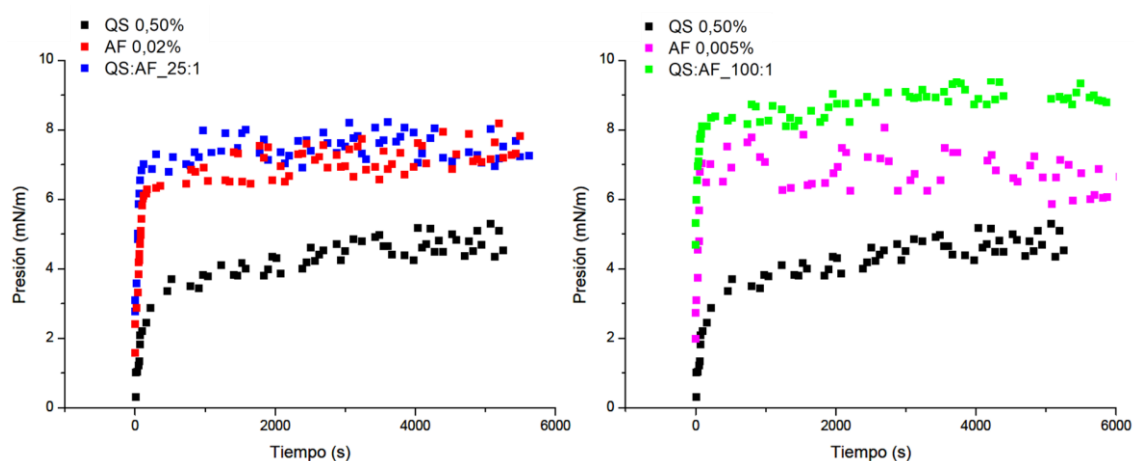


Figura III.3.11. Evolución en el tiempo de la presión interfacial (π vs t) durante la formación de películas de QS, AF y soluciones mixtas en la interfase O/W a distintas concentraciones en la subfase. $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,3\text{ M}$ (AFI), $\text{pH}=4,6$

La adsorción interfacial de los sistemas mixtos en el tiempo también se caracterizó mediante parámetros cinéticos usando las **Ecuaciones III.3.1 y III.3.2** y los valores obtenidos se presentan en la **Tabla III.3.2**.

Tabla III.3.2. Ecuaciones cinéticas de la adsorción de AF y soluciones mixtas con QA y QS a la interfase O/W. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

Muestra	k_{Dif} , mN/m.s ^{1/2} (R ²) *	k_{Des} , x10 ⁻⁴ s ⁻¹ (R ²) *
AF 0,02%	0,41 ±0,03 ^a (0,96)	3,38 ±0,33 ^a (0,00)
AF 0,005%	0,73 ±0,51 ^a (0,93)	3,99 ±0,28 ^a (0,00)
QA 0,50%	0,12 ±0,07 ^a (0,96)	3,25 ±0,78 ^a (0,91)
QA:AF 25:1	0,39 ±0,24 ^a (0,96)	3,16 ±0,74 ^a (0,78)
QA:AF 100:1	0,59 ±0,10 ^a (0,97)	2,75 ±0,59 ^a (0,87)
QS 0,50%	0,25 ±0,08 ^a (0,97)	3,44 ±0,62 ^a (0,90)
QS:AF 25:1	0,39 ±0,20 ^a (0,96)	1,63 ±0,17 ^b (0,84)
QS:AF 100:1	0,32 ±0,03 ^a (0,97)	2,17 ±0,93 ^a (0,71)

*media ±SD para n=2. Diferentes letras indican diferencias significativas para p≤0.05.

En la etapa de difusión las k_{Dif} obtenidas para los sistemas mixtos Q-AF en distintas proporciones no fue significativamente diferente ($p < 0,05$) a la de los Q y AF solos. Se determinó una etapa de deplegamiento con su k_{Des} asociada, sin embargo en las condiciones del ensayo realizado, los sistemas mixtos Q-AF no mostraron una etapa de reordenamiento. Los valores obtenidos de las constantes cinéticas k_{Des} tampoco mostraron diferencias significativas, a excepción de la muestra QS:AF en la relación 25:1. Lo cual requiere mayores estudios para una conclusión definitiva. A este respecto, Bustos (2022) estudió la cinética de adsorción de concentrado proteico de lactosuero bubalino y los sistemas mixtos con AF en la interfase A/W, no encontrando diferencias significativas.

III.3.6. Características dilatacionales interfaciales de Q

En general, las propiedades viscoelásticas de la capa de biopolímero adsorbida en las interfases A/W y O/W pueden predecir la estabilidad de las espumas y emulsiones (Murray, 2002). Por lo tanto, el módulo dilatacional interfacial (E) puede reflejar la resistencia mecánica de la capa absorbida interfacial, que se deriva del cambio en la tensión interfacial (γ) (estrés dilatacional) resultante de un pequeño cambio en el área de la superficie (deformación dilatacional) (Lucassen y van den Tempel, 1972). El

módulo de dilatación de la superficie (E , $E=E_d+iE_v$) incluye una parte real (componente de almacenamiento o componente elástica, $E_d=|E|\cos\delta$) y una imaginaria (componente de pérdida o componente viscosa, $E_v=|E|\sin\delta$), en las que el ángulo de fase (δ) entre tensión y deformación es una representación de la viscoelasticidad relativa ($\tan \delta = E_v/E_d$) de la capa interfacial absorbida (Rodríguez Patino, Rodríguez Niño, y Carrera Sánchez, 1999; Xiong y col., 2018).

Se estudió el comportamiento reológico dilatacional a nivel interfacial del Q. Dicho comportamiento se representó como la variación de la E_d en el tiempo, ya que esta varió de la misma manera que el E , (**Ecuación III.2.7**). La E_d para el QA y para el QS en función del tiempo se muestran en la **Figuras III.3.8 A y B** respectivamente, para distintas concentraciones y FI. Se puede observar que las soluciones a baja concentración de ambos Q presentaron mayor E_d respecto a las otras condiciones de trabajo, siendo más notorio en el QA. Los datos experimentales publicados por Babak y col. (2007) indican que la elasticidad superficial dinámica aumentó fuertemente sólo en concentraciones altas del orden de 0,1 %. Carrera Zánchez y col. (2023) estudiaron el efecto de la concentración de Q encontraron que E_d aumentó con la concentración bajo condiciones de saturación o no saturación. Estos autores obtuvieron diferencias significativas de E_d en Q de alto PM atribuida a la incorporación de más agregados a la superficie una vez saturado y al carácter más hidrofóbico del Q con mayor PM y menor DD, lo que facilitó las interacciones hidrofóbicas entre los agregados de Q adsorbidos. En esta Tesis se observó que los valores de E_d fueron mayores para BFI.

Los valores de E_d en todas las condiciones aumentaron con el tiempo debido a la formación gradual de una película adsorbida con carácter elástico de agregados de Q. En lo que respecta a otros polímeros, como HPMCs (Camino y col., 2009) y aislado de proteína de soja (Zhang y col., 2021), se observó un comportamiento semejante en la interfase O/W. El empaquetamiento más estrecho de las macromoléculas es consecuencia de la existencia de asociaciones dentro de las moléculas adsorbidas, como lo reflejó el incremento significativo en E_d (Rodríguez Patino y col., 1999). Las interacciones intramoleculares hidrofóbicas entre las moléculas de Q necesarias para formar una película elástica estarían restringidas por la solvatación de los grupos hidrofóbicos en la fase oleosa (Camino y col., 2009). Por lo tanto, el aumento continuo

en E_d con el tiempo de adsorción está relacionado con un reordenamiento del Q que formó una capa o *film* interfacial más elástica a medida que el Q se adsorbió en la superficie.

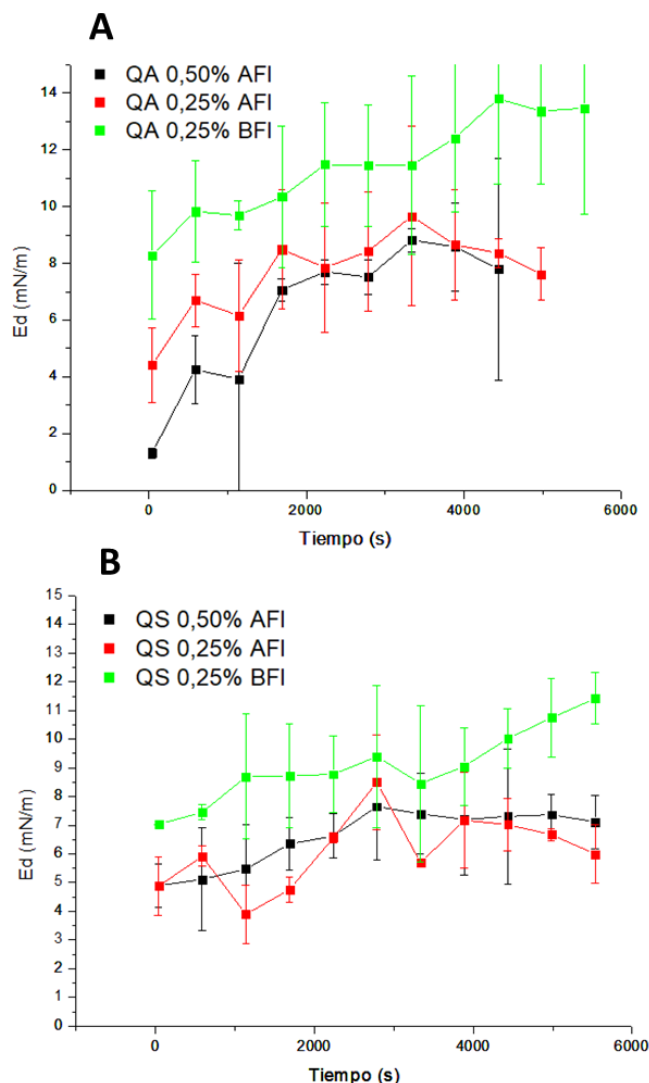


Figura III.3.8. Evolución en el tiempo de E_d durante la formación de películas de QA (A) y QS (B) en la interfase O/W a distintas concentraciones y fuerza iónica en la subfase.
Media $\pm$ SD para $n = 2$. $T = 20^\circ\text{C}$, $I = 0,3\text{ M}$ (AFI) e $I = 0,03\text{ M}$ (BFI), $\text{pH} = 4,6$

El comportamiento reológico de las películas generadas por QA y QS también puede analizarse en una forma más global observando la variación de viscoelasticidad relativa, $\text{tg } \delta$, ya que $\text{tg } \delta = E_v/E_d$ en función del tiempo (**Figura III.3.9 A y B**). La $\text{tg } \delta$ se mantuvo prácticamente constante en el tiempo para ambos Q en las condiciones estudiadas, a excepción del QA 0,50 % AFI. Esto evidencia que las variaciones del E_d

analizadas previamente fueron también acompañadas por una variación en el E_v de forma simultánea y proporcional a lo largo del tiempo estudiado (Baeza y col., 2004; Pérez y col., 2009). Otros autores han estudiado películas de Q adsorbidas en interfase A/W y observaron un aumento significativo en los módulos viscoelásticos de dilatación al agregar acetato de sodio 0,3 M (Babak y col., 2007; Erni y col., 2011). Babak y col. (2007) estudiaron el comportamiento del Q en la interfase O/W en un largo tiempo ($t > 30\,000$ s) y observaron que las capas de adsorción de Q experimentaron una notable fluidificación, es decir que en el tiempo el componente viscoso se volvió mayor que el componente elástico, $E_v > E_d$. Al igual que los resultados obtenidos por Camino y col. (2009) para HPMCs, los valores de $\text{tg } \delta$ muy por debajo de 1 alcanzados tras la adsorción, indicaron que las películas presentaron una estructura similar a un gel, lo que implicó la asociación de los grupos hidrofóbicos del polímero (Kita y col., 1999).

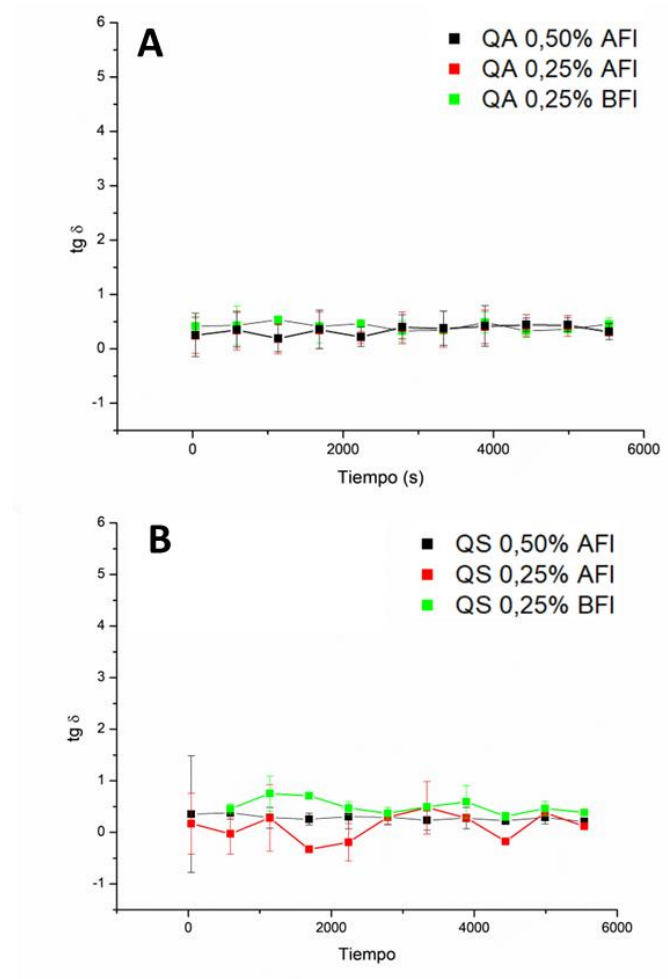


Figura III.3.9. Evolución en el tiempo de $\text{Tg } \delta$ durante la formación de películas de QA (A) y QS (B) en la interfase aceite – agua a distintas concentraciones y fuerza iónica en la subfase.

Media $\pm$ SD para $n = 2$. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,3\text{ M}$ (AFI) e $I = 0,03\text{ M}$ (BFI), $\text{pH} = 4,6$

III.3.7. Características dilatacionales interfaciales de soluciones mixtas Q - AF

En cuanto al análisis reológico de las soluciones mixtas, se analizó también la E_d . Los sistemas mixtos de QA con ambas concentraciones de AF se comportaron de la misma forma que el AF a tiempos cortos. Para la concentración de AF mayor este comportamiento se mantuvo con un ascenso mantenido a lo largo del tiempo, así como también los sistemas mixtos con mayor concentración de AF (0,02 %) y los Q (0,50 %). Por otra parte, la solución de AF solo en la menor concentración presentó un valor de E_d menor (**Figura III.3.12**).

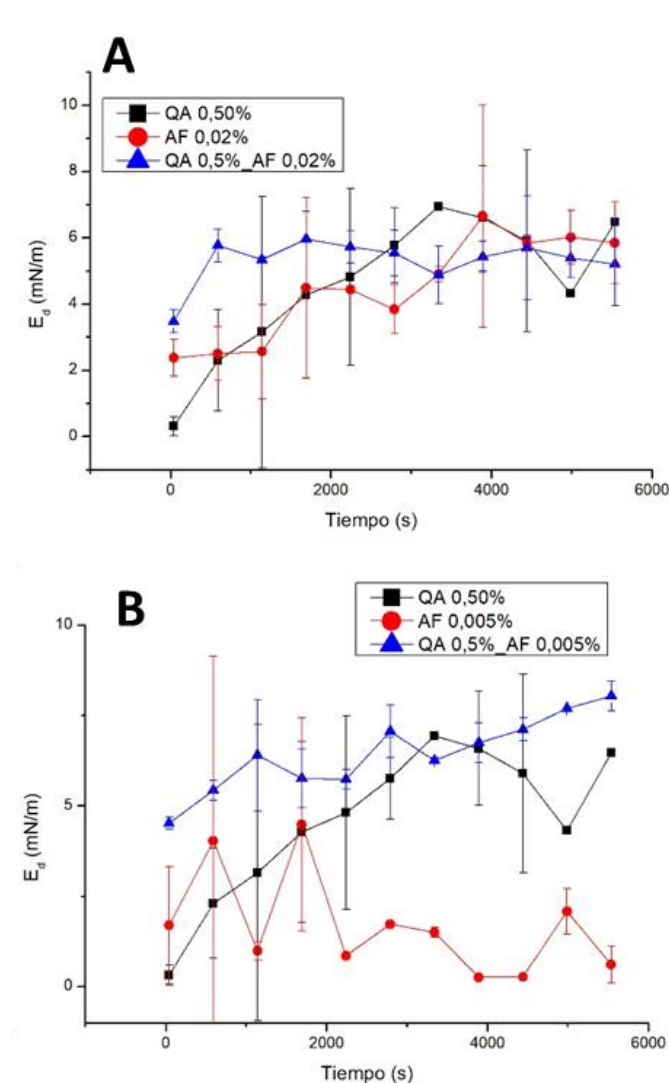


Figura III.3.12. Evolución en el tiempo de E_d durante la formación de películas de QA, AF y las respectivas soluciones mixtas, QA:AF en relación 25:1 (**A**) y QA:AF en relación 100:1 (**B**) en la interfase O/W a distintas concentraciones en la subfase. Media $\pm$ SD para $n=2$. $T=20^\circ\text{C}$, $I=0,3$ M (AFI), $\text{pH}=4,6$

En la **Figura III.3.13** se presenta la evolución de E_d en el tiempo para los sistemas mixtos de QS, el cual a concentraciones altas de AF (0,02 %) tiene un comportamiento competitivo. Sin embargo, a concentraciones bajas de AF (0,005 %) presentó un comportamiento aditivo con aporte tanto del QS como el AF. Además, manifestaron una tendencia al equilibrio. Esto se tradujo en un aumento del carácter sólido de las películas interfaciales, lo cual a su vez se asocia con la formación de una estructura rígida y cohesiva en la interfase.

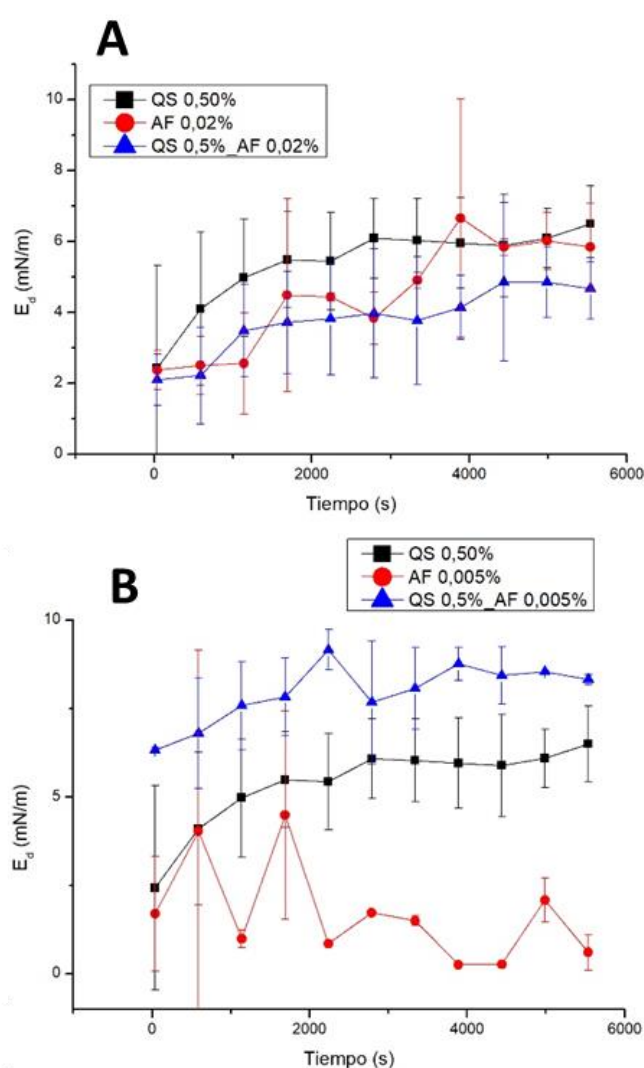


Figura III.3.13. Evolución en el tiempo de E_d durante la formación de películas de QS, AF y las respectivas soluciones mixtas, QS:AF en relación 25:1 (**A**) y QS:AF en relación 100:1 (**B**) en la interfase O/W a distintas concentraciones en la subfase. Media $\pm$ SD para $n=2$. $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,3\text{ M}$ (AFI), $\text{pH}=4,6$

Por último, se analizó la $\text{tg } \delta$ en función del tiempo para los sistemas mixtos con QA (Figura III.3.14) y QS (Figura III.3.15). Inicialmente los valores de $\text{Tg } \delta$ fueron mayores, indicando un mayor valor de la componente viscosa (E_v) respecto a E_d . Sin embargo, a partir de los 1000 s la $\text{Tg } \delta$ se mantuvo estable durante el tiempo estudiado.

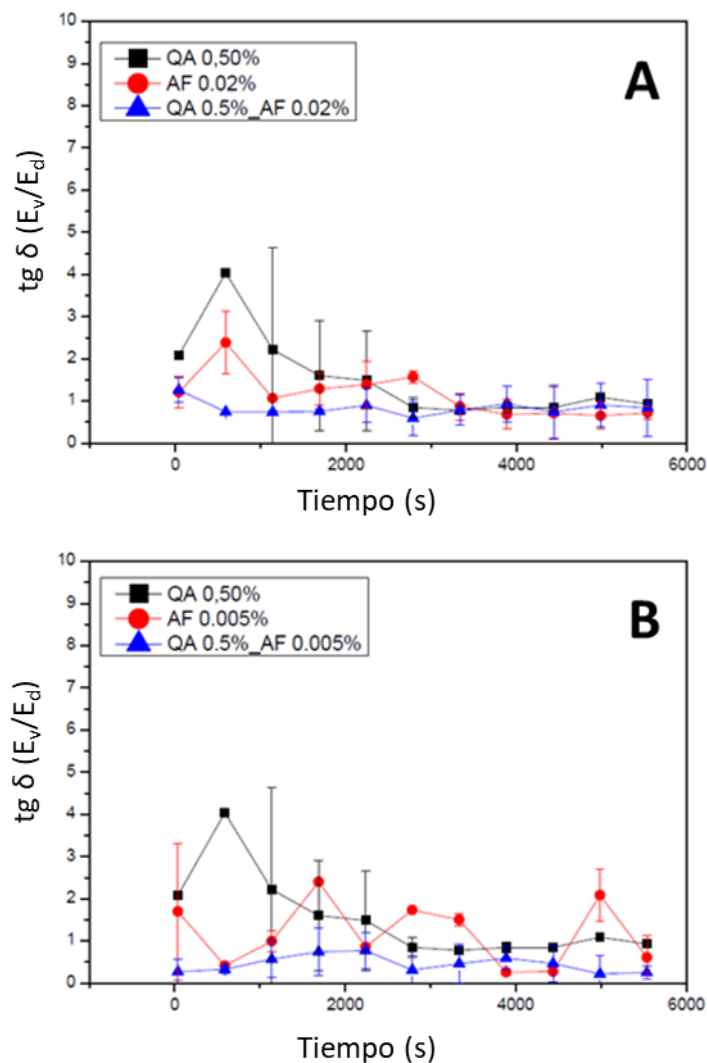


Figura III.3.15. Evolución en el tiempo de $\text{tg } \delta$ durante la formación de películas de QA, AF y las respectivas soluciones mixtas QA:AF en relación 25:1 (A) y QA:AF en relación 100:1 (B) en la interfase O/W con distintas concentraciones de AF en la subfase. Media $\pm$ SD para $n=2$. $T=20^\circ\text{C}$, $I=0,3\text{ M (AFI)}$, $\text{pH}=4,6$

El comportamiento de $\text{tg } \delta$ se mantuvo constante a lo largo del tiempo estudiado en los sistemas de QS con alta concentración de AF, lo que indica que los valores de E_v y E_d variaron simultáneamente. Para el sistema con baja concentración de AF el

comportamiento de la viscoelasticidad relativa de la película guardó correspondencia con la tendencia del QS solo (**Figura III.3.16**).

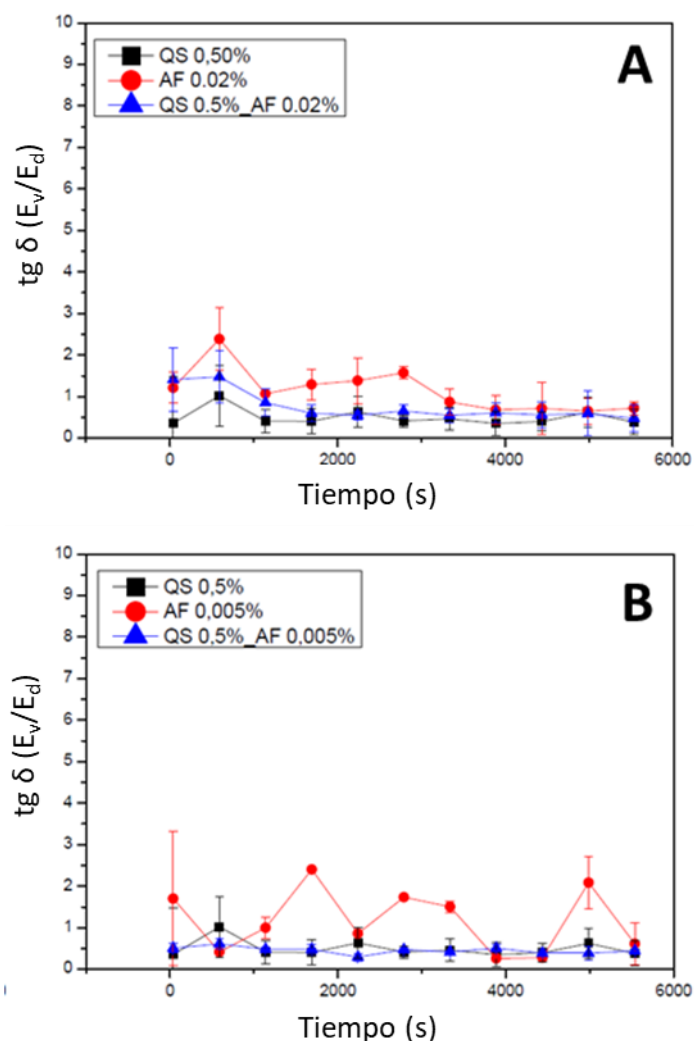


Figura III.3.16. Evolución en el tiempo de $\text{tg } \delta$ durante la formación de películas de QS, AF y las respectivas soluciones mixtas QS:AF en relación 25:1 (**A**) y QS:AF en relación 100:1 (**B**) en la interfase O/W con distintas concentraciones de AF en la subfase. Media $\pm$ SD para $n = 2$.

$T = 20^\circ\text{C}$, $I = 0,3\text{ M}$ (AFI), $\text{pH} = 4,6$

III.3.8. Estabilidad de las emulsiones O/W

El término estabilidad en una emulsión se refiere a la habilidad para resistir los cambios en sus propiedades a través del tiempo; cuando más estable es una emulsión, más lento es el proceso de cambio en sus propiedades (McClements, 2011). El tiempo durante el cual una emulsión debe ser estable, depende de la naturaleza del producto alimentario (Dickinson, 2009). Algunas emulsiones alimentarias se generan en etapas intermedias durante un proceso de manufactura del producto final por lo tanto sólo se

necesita que sea estable durante algunos segundos, minutos u horas. Otras emulsiones deben presentar estabilidad por días, meses o hasta años previamente a su consumo.

III.3.8.1. Distribución del tamaño de gota

En primer lugar, evaluar el tamaño de las gotas de una emulsión a lo largo del tiempo es una de las formas más comunes y sencillas de medir la estabilidad de una emulsión. Esto se atribuye al efecto significativo del tamaño de las gotas sobre la separación gravitacional de las emulsiones (McClements, 2007). Cuanto mayor sea el tamaño de la gota, mayor será la velocidad de formación de cremado o sedimentación (Shao y col., 2020), lo que es perjudicial para la estabilidad a largo plazo de la emulsión. Por lo tanto, un buen emulsionante debería poder proporcionar un tamaño de gota pequeño (Niu y col., 2023).

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones se realizó un seguimiento del tamaño de gota diariamente hasta los 7 días. Este ensayo se realizó tres veces. Para facilitar la visualización e interpretación de los resultados, en la **Figura III.3.17** se graficaron los días 0, 1 y 7 de una de las emulsiones, por ser los días más representativos en el comportamiento de las emulsiones O/W en relación aceite:solución de Q de 10:90. Recordemos que la fase acuosa estuvo formada por QA, QS, QA-AF o QS-AF.

Es importante aclarar que el pico presente en varias de las muestras a 0,1-0,2 nm es un artefacto de las mediciones, por lo tanto, no se consideró en el análisis. Inicialmente, en el día 0, se obtuvieron distribuciones bi o trimodales para ambos Q, con un volumen (%) predominante en la población cuyo promedio se presentó a 0,7 nm aproximadamente. En referencia a esto, Mitidieri y Wagner (2002) y Palazolo y col. (2005) también encontraron poblaciones trimodales al estudiar emulsiones O/W preparadas con proteínas de soja mediante homogenizador ultraturrax. Las emulsiones preparadas con la fase acuosa con mayor concentración de Q presentaron una población con tamaños de partícula de 150 nm que representaron un bajo % de volumen. Al día 1 se incrementó en volumen o apareció la población de 150 nm, que en la mayoría de los casos representó el mayor volumen % en la muestra, a excepción de las muestras QA 0,25 % AFI y QS 0,25 % BFI. Estas muestras también fueron las que

presentaron mayor estabilidad en el día 7. Con el transcurso del tiempo se observó que las poblaciones se desplazaron hacia tamaños de gota mayores, indicando disminución o pérdida progresiva en la estabilidad de las emulsiones por floculación/cremado.

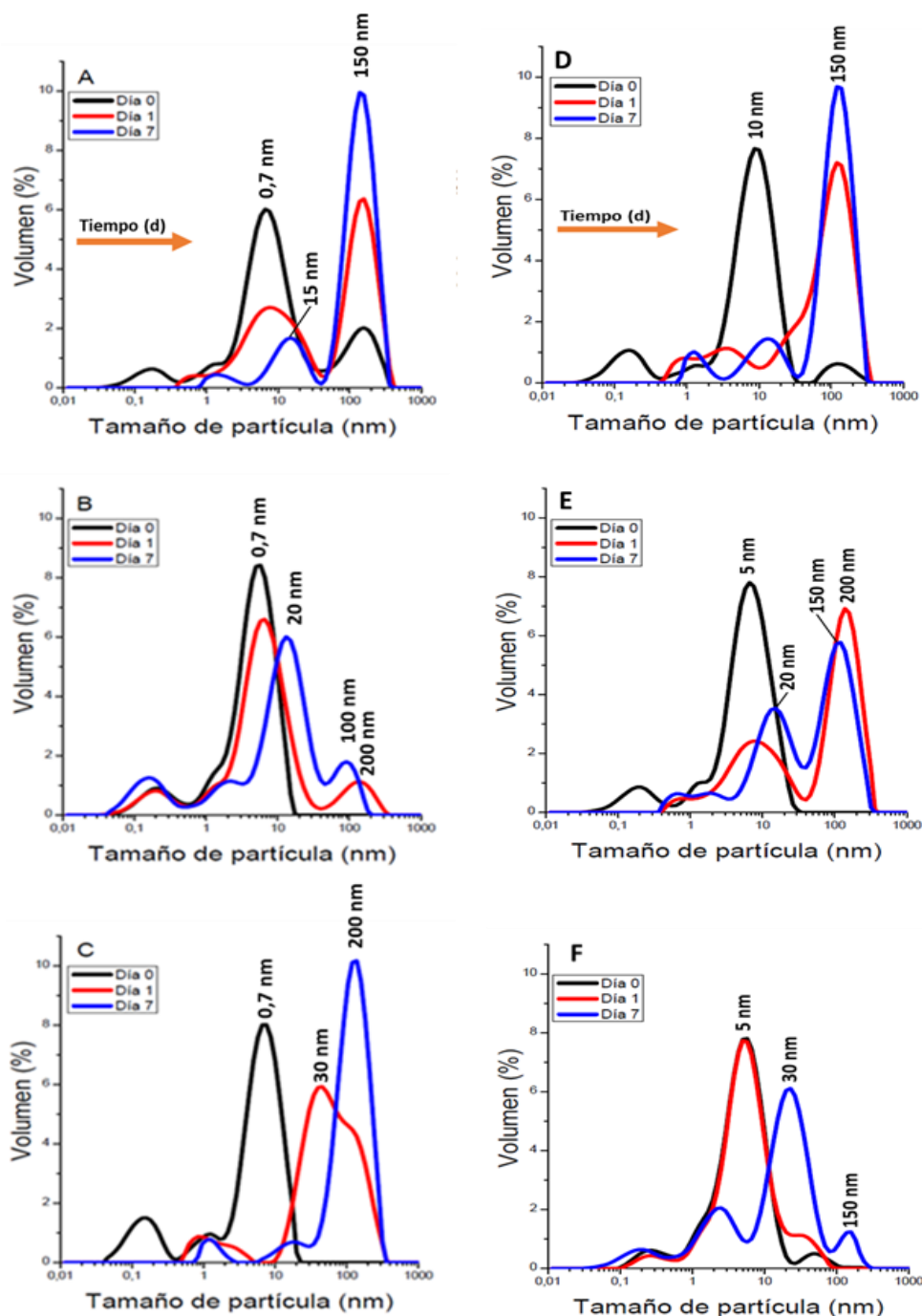


Figura III.3.17. Tamaño de gota en muestras emulsiones O/W 10:90 elaboradas con QA (A) 0,50 % AFI; (B) 0,25 % AFI; (C) 0,25 %BFI y con QS (D) 0,50 % AFI; (E) 0,25 % AFI; (F) 0,25 %BFI
T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI) e I= 0,03M (BFI), pH= 4,6

Posteriormente se evaluó si el agregado de AF a la fase acuosa de las emulsiones 0,50 % y AFI podría modificar la estabilidad de las emulsiones **Figuras III.3.18 A y III.3.19 A**. Para ello, se agregó AF en una proporción Q:AF de 100:1, además se estudió la relación 25:1 (resultados no mostrados) que presentaron un comportamiento similar. Las emulsiones de QA-AF presentaron una mayor estabilidad en los días 1 y 7 con respecto al QA solo. Se vio un corrimiento en el tamaño de gota de la población de mayor diámetro, aunque menos pronunciado, y el volumen de la población a 100-150 nm fue considerablemente menor. Por otra parte, en las emulsiones de QS-AF la estabilidad al día 1 mejoró, ya que la población de mayor tamaño de partícula fue 4 veces menor que la fase acuosa de QS. Con el agregado de AF la estabilidad de las emulsiones se vio mejorada, principalmente a día 1, siendo este resultado relevante para aplicaciones tecnológicas. Esto puede asociarse con la mayor presión interfacial alcanzada para los sistemas mixtos respecto a los Q solos. Con el objetivo de extender la estabilidad de las emulsiones preparadas con el sistema mixto se evaluó el efecto del agregado de soluciones concentradas de Q como espesante en las emulsiones **Figuras III.3.18 B, C, D y III.3.19 B, C, D**.

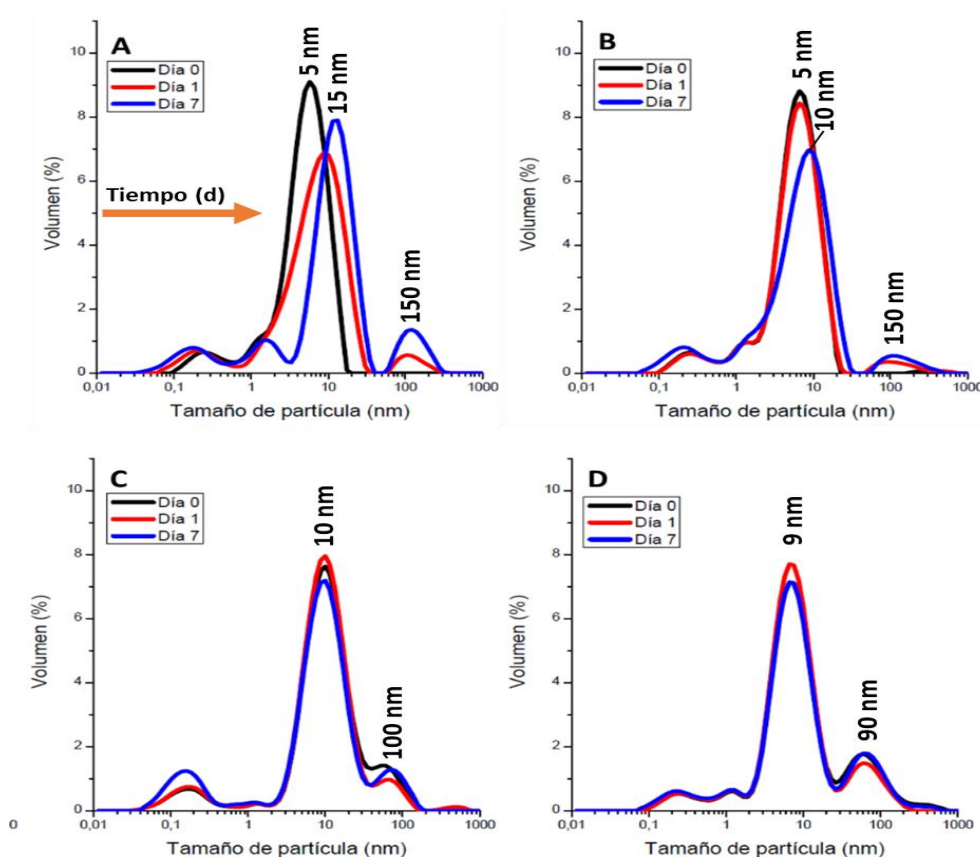


Figura III.3.18. Tamaño de gota en muestras emulsiones O/W 10:90 elaboradas con QA-AF en

relación 100:1 con diferentes proporciones de QA como espesante (QA-AF:espesante). **A** 1:0; **B** 2:1; **C** 1:1; **D** 1:1,5. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

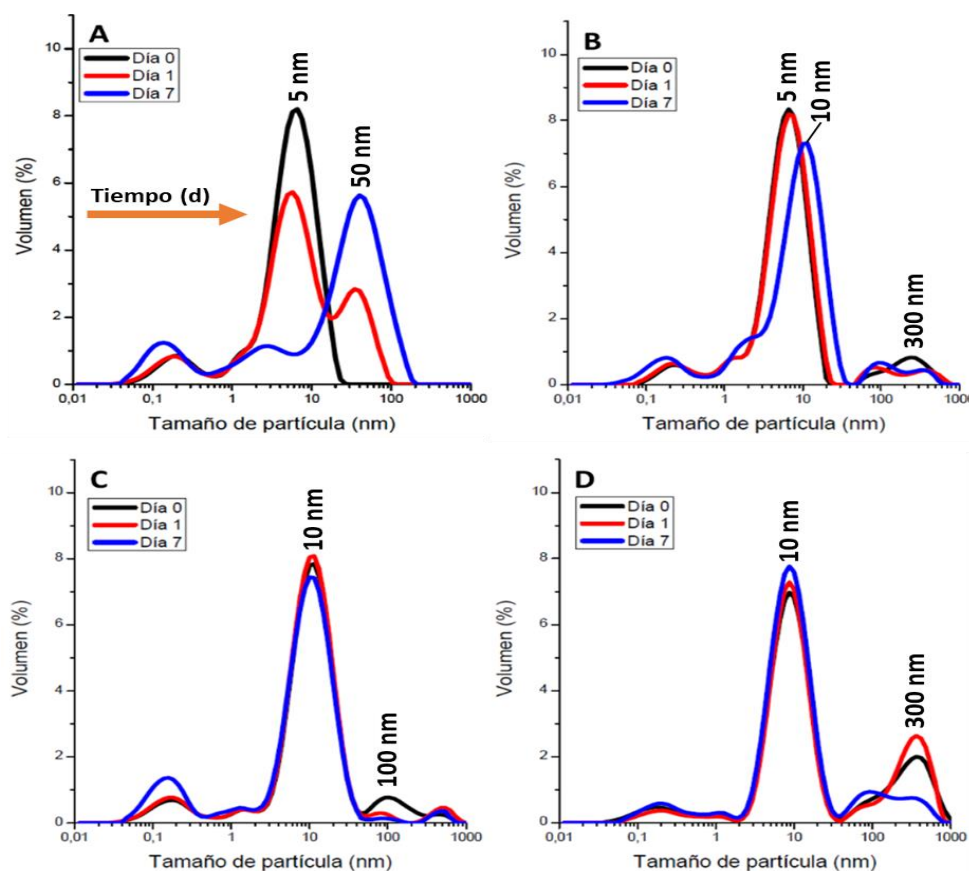


Figura III.3.19. Tamaño de gota en muestras emulsiones O/W 10:90 elaboradas con QS-AF en relación 100:1 con diferentes proporciones de QS como espesante (QS-AF:espesante). **A** 1:0; **B** 2:1; **C** 1:1; **D** 1:1,5. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

Para ello se estudiaron tres relaciones emulsión Q-AF:espesante, las cuales fueron 2:1, 1:1 y 1:1,5. En todas las relaciones estudiadas se determinó una mejora significativa en la estabilidad de las emulsiones; el pico predominante en cuanto al volumen permaneció en valores de tamaño de partícula alrededor de 5-10 nm, sin corrimiento para las relaciones 1:1 y 1:1,5 mientras que para la relación 2:1 hubo un corrimiento hacia valores levemente mayores (15 nm). Estos resultados pueden atribuirse a que las altas concentraciones de polisacáridos conducen a una mayor viscosidad de la fase continua (Lopes y col., 2019). El Q actúa como espesante e inhibe o enlentece la floculación y el cremado de las gotas, permitiendo una mayor estabilidad de la emulsión demostrada por la conservación del tamaño de gota pequeño.

Los parámetro estadísticos de la distribución del tamaño de partícula se calculan a partir de los resultados utilizando los diámetros derivados $D[m,n]$, un método aceptado internacionalmente de definir la media del tamaño de las partículas. En esta Tesis se estudiaron tres estadísticos:

- **$D_{4,3}$ (o diámetro promedio de De Brouker):** es el diámetro medio en volumen. Está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización.
- **$D_{3,2}$ (o diámetro promedio de Sauter):** es el diámetro medio del área superficial. Brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas.
- **Span:** es la medida de la anchura de la distribución. Cuanto más estrecha sea la distribución, tanto más pequeño será el intervalo.

Estos valores se presentan en las **Tablas III.3.3 y III.3.4**. Se obtuvo que los valores de $D_{4,3}$ para ambos Q se incrementaron con el transcurso del tiempo, indicando que se produjeron procesos de desestabilización de las emulsiones tales como la floculación y la coalescencia. Huang y col. (2021) reportaron que emulsiones O/W elaboradas con microgeles de Q presentaron valores de $D_{4,3}$ en el mismo orden que los reportados en esta Tesis.

Con respecto, al QS se observó que a AFI los $D_{4,3}$ son menores a mayor concentración de QS y a la misma concentración (0,25 %), a AFI y BFI iónica se comportan de manera similar. En cambio, para el QA al 0,25 % no hay una diferencia en el comportamiento de $D_{4,3}$ a las diferentes FI iónicas estudiadas y a la concentración de 0,50 % presenta valores de $D_{4,3}$ menores respecto al QS a la misma concentración.

Tabla III.3.3. Span, diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouker ($D_{4,3}$) derivadas de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de QS preparadas con *buffer* acetato a alta y baja fuerza iónica. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI) e I= 0,03 M (BFI), pH= 4,6

		Span		$D_{4,3}$ (μm)		$D_{3,2}$ (μm)	
QS 0,50%	t₀	1,75	$\pm 0,06^{a,A}$	7,06	$\pm 1,00^{a,A}$	1,61	$\pm 0,02^{a,A}$
	t₁	10,60	$\pm 0,75^{a,B}$	26,24	$\pm 1,65^{a,B}$	1,40	$\pm 0,03^{a,A}$
	t₂	7,11	$\pm 5,04^{a,AB}$	34,36	$\pm 2,00^{a,B}$	1,15	$\pm 0,08^{a,A}$
	t₇	4,48	$\pm 2,62^{a,AB}$	64,88	$\pm 9,51^{a,C}$	4,69	$\pm 5,10^{a,A}$
QS 0,25%	t₀	1,83	$\pm 0,95^{a,A}$	12,79	$\pm 2,02^{a,A}$	1,10	$\pm 0,25^{a,A}$
	t₁	2,51	$\pm 0,32^{b,A}$	81,35	$\pm 7,93^{b,B}$	0,86	$\pm 0,08^{a,A}$
	t₂	1,78	$\pm 0,15^{a,A}$	104,53	$\pm 0,96^{b,C}$	11,36	$\pm 1,91^{b,B}$
	t₇	1,46	$\pm 0,47^{a,A}$	104,97	$\pm 5,36^{b,C}$	15,52	$\pm 1,63^{b,B}$
QS 0,25%	t₀	12,11	$\pm 7,53^{b,A}$	17,97	$\pm 8,78^{a,A}$	1,59	$\pm 0,20^{a,A}$
	t₁	2,	$\pm 0,40^{b,B}$	86,64	$\pm 2,07^{b,B}$	8,08	$\pm 0,50^{b,B}$
	t₂	1,77	$\pm 0,15^{a,B}$	111,44	$\pm 3,03^{b,C}$	15,84	$\pm 0,90^{b,C}$
	t₇	1,70	$\pm 0,06^{a,B}$	107,77	$\pm 14,41^{b,C}$	21,40	$\pm 2,14^{c,D}$

* media $\pm$ SD, n= 2. Para cada característica estudiada: letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre concentraciones de QS y FI a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en una concentración de QA y FI a distintos tiempos ($p < 0,05$)

Tabla III.3.4. Span, diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouker ($D_{4,3}$) derivadas de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de QS preparadas con *buffer* acetato a alta y baja fuerza iónica. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI) e I= 0,03M (BFI), pH= 4,6

		Span		$D_{4,3}$ (μm)		$D_{3,2}$ (μm)	
QA 0,50%	t₀	1,90	$\pm 0,02^{a,A}$	4,71	$\pm 0,04^{a,A}$	1,27	$\pm 0,05^{a,A}$
	t₁	5,62	$\pm 2,89^{a,AB}$	16,96	$\pm 2,76^{a,AB}$	1,13	$\pm 0,20^{a,A}$
	t₂	2,94	$\pm 0,08^{a,AB}$	8,20	$\pm 0,59^{a,A}$	0,89	$\pm 0,01^{a,A}$
	t₇	7,09	$\pm 2,10^{a,B}$	23,94	$\pm 5,17^{a,B}$	0,82	$\pm 0,01^{a,A}$
QA 0,25%	t₀	2,40	$\pm 0,05^{a,A}$	15,99	$\pm 1,92^{b,A}$	0,68	$\pm 0,01^{a,A}$
	t₁	3,11	$\pm 0,26^{a,A}$	73,17	$\pm 6,39^{b,B}$	9,16	$\pm 0,32^{b,B}$
	t₂	1,88	$\pm 0,04^{a,A}$	105,59	$\pm 3,93^{b,C}$	13,19	$\pm 0,69^{b,B}$
	t₇	1,56	$\pm 0,02^{b,A}$	113,56	$\pm 4,02^{b,C}$	20,89	$\pm 1,08^{b,C}$
QA 0,25%	t₀	3,12	$\pm 4,45^{a,AB}$	15,42	$\pm 1,90^{ab,A}$	1,25	$\pm 0,05^{a,A}$
	t₁	2,41	$\pm 0,03^{a,A}$	83,15	$\pm 4,48^{b,B}$	7,81	$\pm 0,61^{b,BC}$
	t₂	7,49	$\pm 0,02^{b,B}$	52,99	$\pm 1,95^{c,C}$	1,00	$\pm 0,05^{a,A}$
	t₇	4,14	$\pm 1,39^{ab,AB}$	61,4	$\pm 8,38^{c,C}$	4,35	$\pm 4,47^{a,AC}$

* media $\pm$ SD, n=2. Para cada característica estudiada: letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre concentraciones de QS y FI a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en una concentración de QA y FI a distintos tiempos ($p < 0,05$)

Los iones CH_3COO^- presentes en el disolvente (*buffer* acetato) se unen a las gotitas de la nanoemulsión a por la atracción de carga debida a las cargas positivas (NH_3^+) del Q, que se encuentran en la superficie de las gotitas. En un rango muy alto, el aumento en la concentración de ácido acético en el *buffer* aumenta el número de contraiones (CH_3COO^-), lo que aumenta el efecto protector sobre los grupos amino positivos del Q (Wani, Pandith y Sheikh, 2021). Entonces, cuando hubo una baja concentración del biopolímero, tanto a AFI como a BFI, los aniones se asociaron al Q de forma tal que se saturó, viéndose neutralizadas las cargas. Debido al efecto de blindaje, la densidad de carga en la superficie de las gotitas disminuyó significativamente (Wani, Pandith y Sheikh, 2021). Cuando hubo mayor concentración de Q, la cantidad de iones en el *buffer* en condiciones de AFI, no alcanzaron para saturar todas las cargas del biopolímero quedando grupos NH_3^+ libres que aportaron hidrofobicidad a las gotitas de la NE. Por tanto, no tendieron a pegarse y flocular, conservando tamaños de gotita menores a lo largo del tiempo estudiado. La distancia sobre la cual una especie cargada ejerce su fuerza electrostática (conocida como longitud de detección de Debye) es función de la fuerza iónica del medio. Cho y col. (2006) demostraron que la longitud del cribado de Debye se redujo en más de seis veces cuando la fuerza iónica aumentó de una concentración de 0,009 a 0,46 M. Esto se atribuye al efecto de detección de los contraiones, es decir, iones acetato sobre los grupos amino cargados positivamente, lo que lleva a una disminución de las interacciones polímero-disolvente.

En la **Tabla III.3.5** se presentan las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de QS-AF y QA-AF con diferentes proporciones de solución de Q como espesante.

Tabla III.3.5. Span, diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouker ($D_{4,3}$) derivadas de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de QS-AF y QA-AF con diferentes proporciones de solución de Q como espesante. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

		Span	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{3,2}$ (μm)
Emulsión QS-AF: espesante 1:0	t₀	2,22 $\pm$ 0,16 ^{a,A}	3,55 $\pm$ 0,06 ^{a,A}	1,02 $\pm$ 0,15 ^{a,A}
	t₁	2,21 $\pm$ 0,20 ^{a,A}	5,36 $\pm$ 0,18 ^{a,A}	1,31 $\pm$ 0,05 ^{a,A}
	t₂	9,63 $\pm$ 0,21 ^{a,B}	21,17 $\pm$ 1,60 ^{a,A}	1,46 $\pm$ 0,05 ^{a,A}
	t₇	10,38 $\pm$ 1,28 ^{a,B}	50,76 $\pm$ 11,71 ^{a,B}	1,06 $\pm$ 0,23 ^{a,A}
Emulsión QS-AF: espesante 2:1	t₀	2,32 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	29,06 $\pm$ 6,26 ^{b,A}	1,83 $\pm$ 0,41 ^{bc,A}
	t₁	2,26 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	23,29 $\pm$ 3,37 ^{a,A}	1,93 $\pm$ 0,01 ^{b,A}
	t₂	2,44 $\pm$ 0,03 ^{a,A}	21,26 $\pm$ 5,38 ^{a,A}	1,58 $\pm$ 0,38 ^{ab,AB}
	t₇	2,80 $\pm$ 0,38 ^{a,A}	23,09 $\pm$ 2,22 ^{b,A}	1,18 $\pm$ 0,07 ^{a,B}
Emulsión QS-AF: espesante 1:1	t₀	2,43 $\pm$ 0,53 ^{a,A}	20,47 $\pm$ 4,25 ^{ab,A}	1,34 $\pm$ 0,06 ^{ab,A}
	t₁	2,46 $\pm$ 0,30 ^{a,A}	21,14 $\pm$ 3,16 ^{a,A}	1,27 $\pm$ 0,01 ^{a,AB}
	t₂	2,69 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	20,10 $\pm$ 1,44 ^{a,A}	1,10 $\pm$ 0,03 ^{a,AB}
	t₇	3,43 $\pm$ 0,20 ^{a,A}	16,21 $\pm$ 0,76 ^{b,A}	0,80 $\pm$ 0,01 ^{a,B}
Emulsión QS-AF: espesante 1:1,5	t₀	33,58 $\pm$ 2,70 ^{b,A}	85,02 $\pm$ 10,81 ^{c,A}	1,92 $\pm$ 0,05 ^{c,A}
	t₁	26,16 $\pm$ 10,48 ^{b,A}	65,55 $\pm$ 26,73 ^{b,B}	2,63 $\pm$ 0,24 ^{c,B}
	t₂	2,68 $\pm$ 0,86 ^{a,B}	22,77 $\pm$ 4,62 ^{a,C}	1,97 $\pm$ 0,04 ^{b,A}
	t₇	6,47 $\pm$ 5,37 ^{a,B}	28,13 $\pm$ 9,63 ^{ab,C}	1,86 $\pm$ 0,09 ^{b,A}
Emulsión QA-AF: espesante 1:0	t₀	2,19 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	4,39 $\pm$ 0,03 ^{a,A}	1,13 $\pm$ 0,10 ^{a,A}
	t₁	1,96 $\pm$ 0,19 ^{a,A}	6,24 $\pm$ 0,01 ^{a,A}	2,12 $\pm$ 0,08 ^{a,B}
	t₂	2,36 $\pm$ 0,21 ^{a,A}	8,07 $\pm$ 1,60 ^{a,A}	1,20 $\pm$ 0,05 ^{a,A}
	t₇	7,60 $\pm$ 1,09 ^{a,B}	19,49 $\pm$ 1,04 ^{ab,B}	1,23 $\pm$ 0,10 ^{ab,A}
Emulsión QA-AF: espesante 2:1	t₀	1,79 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	7,26 $\pm$ 1,58 ^{a,A}	2,14 $\pm$ 0,07 ^{b,A}
	t₁	2,04 $\pm$ 0,08 ^{a,A}	13,18 $\pm$ 1,78 ^{ab,AB}	2,28 $\pm$ 0,11 ^{a,A}
	t₂	2,05 $\pm$ 0,24 ^{a,A}	13,19 $\pm$ 0,28 ^{a,AB}	1,90 $\pm$ 0,01 ^{bc,AB}
	t₇	2,57 $\pm$ 0,18 ^{b,A}	17,73 $\pm$ 4,50 ^{ab,B}	1,43 $\pm$ 0,01 ^{ac,B}
Emulsión QA-AF: espesante 1:1	t₀	4,37 $\pm$ 1,20 ^{a,A}	17,54 $\pm$ 2,80 ^{b,A}	1,39 $\pm$ 0,01 ^{a,A}
	t₁	3,72 $\pm$ 1,48 ^{a,A}	19,83 $\pm$ 4,58 ^{b,A}	1,31 $\pm$ 0,02 ^{b,A}
	t₂	3,88 $\pm$ 0,83 ^{a,A}	15,91 $\pm$ 1,38 ^{ab,A}	1,10 $\pm$ 0,01 ^{a,A}
	t₇	3,80 $\pm$ 1,31 ^{b,A}	13,67 $\pm$ 3,74 ^{a,A}	0,82 $\pm$ 0,06 ^{b,A}
Emulsión QA-AF: espesante 1:1,5	t₀	7,62 $\pm$ 0,30 ^{b,A}	19,30 $\pm$ 5,04 ^{b,A}	2,26 $\pm$ 0,05 ^{b,A}
	t₁	7,17 $\pm$ 1,08 ^{b,A}	19,08 $\pm$ 4,64 ^{b,A}	2,49 $\pm$ 0,01 ^{a,A}
	t₂	8,07 $\pm$ 0,91 ^{b,A}	22,42 $\pm$ 1,82 ^{b,A}	2,25 $\pm$ 0,04 ^{c,A}
	t₇	9,48 $\pm$ 1,84 ^{c,A}	24,02 $\pm$ 4,95 ^{b,A}	2,01 $\pm$ 0,02 ^{c,A}

* media $\pm$ SD, n=2. Para cada característica estudiada: letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre proporciones de Q como espesante a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en una proporción de Q como espesante a distintos tiempos (p<0,05)

Las NE preparadas con los sistemas mixtos como fase acuosa presentaron valores menores de diámetro promedio con respecto a las emulsiones preparadas únicamente con Q. A la vez, las NE preparadas con QA-AF presentaron tamaños de gota menores que las de QS-AF y la tendencia de incremento en el tamaño de gota con el tiempo es concordante. Con el agregado de espesante los promedios $D_{4,3}$ fueron mayores respecto a la emulsión sin espesante, presentando valores que se correspondieron a los del día 2 de la emulsión sin espesante. Si bien estos fueron mayores, se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo estudiado, indicando que las NEs se mantuvieron estables al menos durante 7 días. El aumento de la viscosidad restringe el movimiento ascendente de las gotitas agregadas o de mayor tamaño, disminuyendo la posibilidad de cremado en las NE (Árnadóttir, 2013).

En otros trabajos informan que al mezclar Liu et al. (2016) mezclaron emulsiones primarias y lactoferrina y luego usaron una licuadora y un homogeneizador de alta presión para redispersar las gotas y obtener emulsiones multicapa estables. Sin embargo, Fotticchia et al. (2014) indicaron que se pueden preparar emulsiones multicapa estables usando Q o poli-L-lisina en la emulsión primaria, aunque se produce una floculación por puenteo en la etapa inicial. Liao y col. (2023) estudiaron emulsiones O/W primarias que presentaron tamaños de gota alrededor de 300 nm y a medida que aumentó la relación emulsión-pectina baja en metoxilo, todas las emulsiones mostraron un aumento en el tamaño de las gotas y los valores de Pdl, lo que atribuyeron al hecho de que las moléculas del polímero cargadas negativamente se adsorbieron en la superficie de las gotas o se formaron agregados de gotas recubiertas con el polímero. Se encontró un resultado similar en un estudio de emulsiones multicapa estabilizadas con quitosano/pectina (Liu y col., 2019).

III.3.8.2. Potencial- ζ de emulsiones

En las emulsiones O/W el aumento del potencial- ζ se puede relacionar con una capa protectora cargada más gruesa alrededor de las gotas de aceite, lo que lleva a una mayor estabilidad de la emulsión, mientras que la disminución del potencial- ζ se asocia con la disminución de la estabilidad de la emulsión (Meng y col., 2022; Tian y col., 2022).

Durante todo el periodo de tiempo de estudio de estabilidad de las emulsiones los valores de potencial- ζ se mantuvieron entre 47 y 52 mV. Por lo tanto, el proceso de desestabilización de las emulsiones no puede ser atribuido a una modificación en las cargas de la emulsión. Xie y col. (2023) estudiaron emulsiones O/W de Q complejoado con hidrolizado de arroz y obtuvieron valores de potencial- ζ que oscilaron entre 47,3 y 66,5 mV, lo que sugirió que todas las emulsiones presentaron una buena estabilidad.

III.3.8.3. Viscosidad de emulsiones

La viscosidad de la fase continua juega un papel clave en la estabilidad de la emulsión. Esto se debe al hecho de que esta propiedad tiene un efecto significativo sobre la separación gravitacional de la emulsión (McClements y Gumus, 2016). La mayor viscosidad de la fase continua puede impedir el movimiento de las gotas, inhibiendo así el proceso de formación de cremado o sedimentación. Algunos polisacáridos naturales, como el Q, tienen un peso molecular relativamente grande, lo que aporta efecto espesante significativo y a menudo se utilizan con este fin en la industria alimentaria (Li y Nie, 2016).

Se estudió la viscosidad de las emulsiones Q-AF con y sin Q como espesante para evaluar la mejora en la estabilidad de las emulsiones y atribuir este efecto a una mayor viscosidad de la fase continua. En la **Figura III.3.20** se representa la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte de las emulsiones a base de Q, con y sin fracción de espesante. En primer lugar, todas las muestras exhibieron un comportamiento similar al newtoniano en el rango de velocidades de corte empleadas, ya que la viscosidad aparente se mantuvo constante. Se determinó que el agregado de Q como espesante provocó el incremento de la viscosidad de las emulsiones en un orden de magnitud, tanto para QA como para QS. Previamente, Zinoviadou y col. (2011) estudiaron el efecto del agregado de Q en la fase acuosa de emulsiones O/W de estearoil 2-lactilato de sodio y aceite de maíz y determinaron que a medida que aumentó el contenido de Q (0,48 %) en los complejos, se mantuvo el comportamiento newtoniano y aumentó la viscosidad de las muestras desde 0,005 hasta 0,9 Pa.s. Por otra parte, Lopes y col. (2019) estudiaron emulsiones con aislado de proteína de suero como emulsionante y con adición de Q como espesante, y observaron una disminución en la viscosidad

aparente a medida que aumentó la velocidad de corte, ya que la presencia de Q condujo a la formación de una estructura gelificada que sufrió rupturas a medida que aumentaba la velocidad de corte, con un comportamiento pseudoplástico, que se atribuyó a la deformación de estructuras floculadas formadas en presencia de Q.

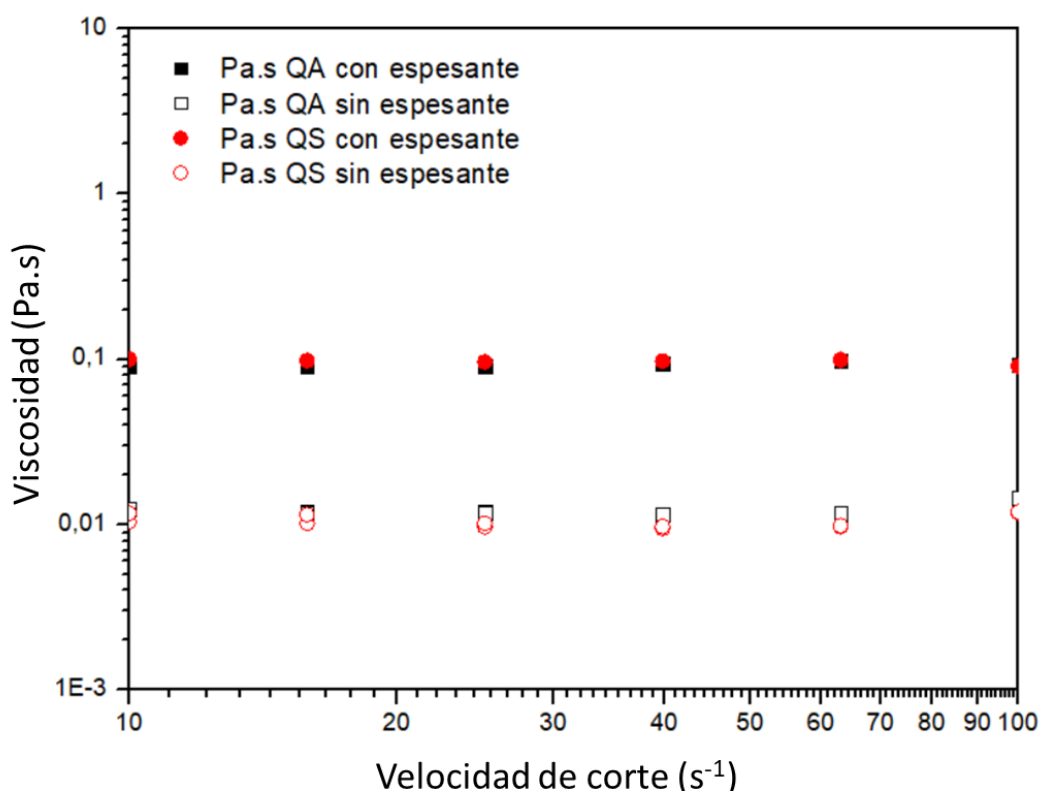


Figura III.3.20. Viscosidad en función de la velocidad de corte para emulsiones de QA y QS con y sin agregado de espesante. T= 20 °C, I= 0,3 M (AFI), pH= 4,6

La viscosidad de las soluciones y emulsiones de Q aumentó con el aumento de las concentraciones de Q, y la red de cadenas de Q formada redujo la dispersión de las gotas en soluciones concentradas, estabiliza el contacto entre las gotas y mejora la estabilidad de la emulsión, tal lo explicado por Huang y col. (2019). En función de los resultados obtenidos, la utilización de Q como estabilizante y espesante de emulsiones O/W podría ser un abordaje promisorio para incrementar su estabilidad.

III.4. Conclusiones parciales

- El Q como componente alimentario alternativo, fue capaz de reducir la presión superficial, incluso alcanzándose la saturación en sistema A/W.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, puede concluirse que los Q considerados, QA y QS, mostraron un comportamiento interfacial semejante. A AFI, el QS y el QA alcanzan la saturación de la interfase A/W a concentraciones de 0,05 y 0,25% respectivamente y una presión superficial de 23-25 mN/m. Las diferencias en las concentraciones de saturación podrían deberse al peso molecular de los Q estudiados. A BFI no se observó un *plateau* asociado a la saturación de la monocapa.
- La distribución de tamaños de partícula determinado en soluciones de Q a pH 4,6 mostró cambios apreciables (en la visualización de los picos) con la variación de la concentración de Q. De forma que, incrementando la concentración de Q, los agregados formados presentaron mayor tamaño. También se advirtieron cambios en el parámetro Z_{ave} , mostrando un comportamiento homólogo con la variación de la concentración.
- Las soluciones de Q presentaron valores de potencial- ζ positivos y altos, por lo tanto serían eficientes en la estabilización de dispersiones coloidales. Estos valores no se vieron modificados al incrementar la concentración de biopolímero.
- En la interfase O/W no se observó una actividad interfacial destacable a bajas concentraciones de QA y QS, por los métodos de equilibrio y dinámico. A las mayores concentraciones estudiadas (0,25-0,50%) se determinó actividad interfacial moderada. El comportamiento fue equivalente bajo condiciones de AFI y BFI.
- Desde el punto de vista reológico, los Q formaron películas viscoelásticas una vez adsorbidos en la interfase y los valores alcanzados por la componente elástica del módulo dilatacional interfacial (E_d) fueron similares entre ambos Q en las mismas condiciones. A BFI los valores de E_d fueron superiores, lo cual fue atribuido a la magnitud de cargas dependiente de la fuerza iónica.

- Los valores de presión interfacial O/W obtenidos en el equilibrio fueron equivalentes a los valores alcanzados en el estudio dinámico, en cuestión de segundos.
- Las diferencias entre los resultados informados en la bibliografía y los reportados en esta Tesis pueden atribuirse a una amplia distribución en el PM y DD de los Q analizados y posiblemente también a las distribuciones de los diferentes monómeros en las moléculas.
- A pesar de presentar una baja actividad interfacial, el estudio de la estabilidad emulsiones O/W (10:90) demostró que el uso de Q en la fase acuosa ayudó a mantener estables dichas emulsiones en el periodo de tiempo estudiado.
- El agregado de Q como espesante permitió una mayor estabilidad de las emulsiones indicando que el impedimento para la floculación-cremado de gotas sería de tipo cinético y no termodinámico.

El Q, aunque no posee categoría de aditivo alimentario, cuenta con antecedentes de GRAS y buenas propiedades interfaciales por lo cual podría ser un ingrediente promisorio para ser incorporado en el CAA, solo o como *carrier* de vitaminas y utilizado en sistemas dispersos emulsionados.

Capítulo IV: Sistema mixto quitosano – ácido fólico como *coating* aplicado en un queso de pasta blanda

IV.1. Introducción

IV.1.1. Industria quesera en la Argentina

Argentina se destaca en la producción láctea mundial, ocupa el noveno lugar en producción de leche cruda y el quinto en producción de quesos y leche entera en polvo. Pese a ello, no existe una cultura fuerte que caracterice o tipifique los quesos argentinos, lo cual puede deberse a la joven tradición quesera. Sin embargo, en Argentina se producen más de 45 variedades de queso, algunas de las cuales tienen características diferentes a los quesos tradicionales de Europa en virtud de las diferencias en las materias primas utilizadas y las condiciones de producción (Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, 2023).

IV.1.1.1. Exportación

En 2022, las exportaciones totales de queso aumentaron en comparación con el mismo período de 2021 (+5,7%). En particular, este aumento interanual es el mismo que en 2021. La participación del rubro quesos en las exportaciones del país es del 28,3%. Entre las exportaciones totales de queso, el queso de pasta blanda tiene el mayor volumen de exportación, con un 56,2%, seguido del queso de pasta semidura (33,6%) y luego el queso de pasta dura (9,6%). En términos de variación interanual, los quesos blandos y semiduros crecieron un +6,3% y un +17,5% respectivamente. Las pastas duras fueron las únicas que registraron un descenso (-28,5%) (Consortio Regional de Experimentación Agrícola, 2022).

IV.1.1.2. Mercado interno

Según los últimos datos reportados por Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP), las ventas internas acumuladas de leche (en equivalentes en litros) en 2022 fueron las mismas que en 2021 (-0,03%). en las ventas de leche en polvo, agravando su caída en los últimos años. Por el contrario, las ventas de queso aumentaron (+1 punto porcentual), mientras que la leche líquida y otros productos lácteos (leche saborizada, manteca, postres lácteos y yogur) aumentaron ligeramente (+0,1 % y +0,4 %, respectivamente).

En general, el consumo de lácteos sigue una tendencia a la baja, aunque aumentan las ventas de productos más básicos: leche líquida no refrigerada, quesos de segunda y tercera marca y yogur bebible por litro, en detrimento de aquellos productos de mayor valor agregado y por ende menos económicos. El mercado más concentrado de quesos es el de los quesos de pasta blanda, seguido por los quesos semiduros y en menor medida quesos de pasta muy blanda, rallados y de pasta dura (Subsecretaría de Planificación Federal y Proyectos Prioritarios, 2022).

IV.1.2. Definiciones según el CAA

El Código Alimentario Argentino (CAA, 2006) en el artículo 605, Capítulo VIII (Alimentos Lácteos) define al queso como: “el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes”.

A su vez clasifica los quesos según dos criterios, el contenido porcentual de materia grasa del extracto seco y el contenido porcentual de humedad. Dependiendo del porcentaje de materia grasa del extracto seco (Método de toma de muestra: FIL 50 C: 1999), los quesos se clasifican en:

- **Extra graso o Doble crema:** cuando contengan no menos del 60%.
- **Grasos:** cuando contengan entre 45,0 y 59,9%.
- **Semigrasos:** cuando contengan entre 25,0 y 44,9%.
- **Magros:** cuando contengan entre 10,0 y 24,9%.
- **Descremados:** cuando contengan menos de 10,0%.

De acuerdo con el contenido porcentual de humedad (Método de toma de muestra: FIL 50 C: 1999), los quesos se clasifican en:

- **Quesos de baja humedad (pasta dura):** hasta 35,9%.
- **Quesos de mediana humedad (pasta semidura):** entre 36,0 y 45,9%.

- **Quesos de alta humedad (pasta blanda):** entre 46,0 y 54,9%.
- **Quesos de muy alta humedad (pasta muy blanda):** no menor a 55,0%.

En el Artículo 622 del mismo capítulo se define al Queso Cremoso: “se entiende el producto de alta y muy alta humedad, elaborado con leche entera entera o leche estandarizada, con o sin el agregado de crema, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. Deberá cumplir con las siguientes exigencias:

- a. Masa: cruda, moldeada, refrigerada, salada y madurada en frío.
- b. Pasta: blanda, cerrada, algo elástica y grasosa; sabor dulce característico, ligeramente ácido; aroma suave y agradable; color blanco-amarillento uniforme.
- c. Contenido de grasas en el extracto seco, mín. 50,0%.
- d. Corteza: entera, lisa o ligeramente rugosa, de consistencia adecuada.
- e. Forma: cilíndrica achatada o paralelepípeda.
- f. Tiempo de maduración y peso:
 - Mín. 20 días, para los que pesan menos de 2,5 kg.
 - Mín. 30 días, para los que pesan 2,5 a 5,0 kg.
- g. El rotulado deberá efectuarse en conformidad con las exigencias establecidas en el presente Código.

Este producto se rotulará: “Queso Cremoso”.”

IV.1.2.2. Valor nutricional

El queso es un concentrado de leche estable compuesto principalmente por caseínas y grasas, por tanto, el valor nutritivo es alto. La cuajada está compuesta de caseínas insolubles coaguladas por la conversión enzimática de κ -caseína en para- β -caseína (Picciotti y col., 2022). Dado que la leche es la materia prima principal a partir de la cual se elabora el queso, los componentes y las características fisicoquímicas de los quesos están determinados por esta materia prima (Ertekin y col., 2023).

A su vez, los componentes del queso afectan directamente sus propiedades funcionales de textura y reología. Los principales constituyentes del queso son

proteínas, lípidos, calcio, fósforo, sodio y agua. Las cantidades de estos elementos presentes en el queso dependerán tanto de las técnicas de elaboración como de los diferentes tipos de queso.

Según la técnica de elaboración, los quesos contienen entre un 10-30 % de proteínas. La mayor parte de las proteínas se encuentra degradada y solubilizada en oligopéptidos y aminoácidos que se forman debido a la acción de una serie de enzimas proteasas durante la maduración. Este proceso aumenta la digestibilidad de las proteínas y confiere al producto final su textura y sabor. Los lípidos presentes en el queso se encuentran en forma emulsionada como glóbulos envueltos en una red proteica y provienen de los lípidos de la leche (triglicéridos, fosfoglicéridos y esfingósidos). El contenido de grasa y la composición de los ácidos grasos en el queso dependen de la alimentación y el período de lactación del animal del cual proviene la leche. Además, el contenido de grasa es responsable de muchas propiedades sensoriales y de textura del queso aportando un efecto plastificante e inhibe la formación de enlaces entre las caseínas (Johnston, 1984).

Durante la maduración la acción de las lipasas microbianas produce ácidos grasos de cadenas cortas y libres. Estos ácidos grasos son volátiles e intervienen en la formación del aroma. El contenido de vitaminas liposolubles, especialmente A y D, es función del contenido de lípidos en el producto, llegando a valores de 70% en quesos enriquecidos con nata mientras que el contenido de vitaminas hidrosolubles es bajo debido a que éstas son eliminadas junto con el suero líquido. Durante el desuerado se pierde entre un 80-85 % de las proteínas hidrosolubles, las vitaminas del grupo B son en gran parte eliminadas.

IV.1.2.2 Fortificación de quesos

Los productos lácteos fortificados representan el 42,9 % del mercado de alimentos fortificados. Son los portadores más populares de compuestos funcionales o bioactivos (vitaminas, ácidos grasos, etc.) y son alimentos nutraceuticos muy extendidos. Los productos lácteos suelen estar presentes en muchas dietas y representan una manera fácil de incorporar compuestos bioactivos a estas matrices (Picciotti y col. 2022). En general, el queso es un medio adecuado para transportar compuestos bioactivos y esta

incorporación le confiere numerosos beneficios nutricionales. La fortificación del queso debe garantizar la conservación y protección de la actividad de los ingredientes bioactivos en la matriz, durante la conservación y la maduración (Kumar, 2015). Además, la incorporación de los bioactivos al queso no debe comprometer las propiedades sensoriales y fisicoquímicas para no dañar la aceptabilidad y palatabilidad del queso por parte de los consumidores. En la fortificación de quesos la técnica más utilizada es la microencapsulación de los bioactivos a agregar. Este procedimiento asegura la estabilidad de los compuestos bioactivos en la matriz del *carrier*, protegiéndolos de la degradación por la exposición al oxígeno, la luz y los iones metálicos y minimiza las interacciones con otros componentes de la matriz láctea (Picciotti y col. 2022). En el caso de la vitamina empleada en esta Tesis, Madziva, Kailasapathy y Phillips (2006) estudiaron la administración de AF encapsulado en alginato, pectina y gomas. Estas cápsulas de alginato y pectina tuvieron una buena retención de AF en queso cheddar. La encapsulación aumentó la estabilidad del AF durante el período de maduración de 3 meses en comparación con el AF libre en el queso. Observaron que, para una mejor distribución de las cápsulas en los quesos, las cápsulas de AF deberían agregarse a la leche en lugar de a la cuajada o inyectarse en el bloque prensado.

Las innovaciones alimentarias pueden contribuir positivamente al desarrollo de alimentos más saludables y sostenibles. Sin embargo, a pesar de diversos beneficios en términos de salud y medio ambiente, las innovaciones alimentarias suelen generar ciertas reticencias en parte de los consumidores (Siegrist y Hartmann, 2020). Diversos factores explican esta apatía, tales como un nuevo gusto vinculado a un proceso de ruptura, el miedo a una pérdida de naturalidad o carácter tradicional, la desconfianza hacia las nuevas tecnologías y hábitos culturales con percepciones específicas (Hindsley y Ashton Morgan, 2022; Yang y Hobbs, 2020). Para mejorar la aceptabilidad de productos innovadores que respondan a los desafíos de la alimentación del mañana en términos de salud y sostenibilidad, es necesario comprender mejor las reacciones de los consumidores ante estos nuevos alimentos y resaltar algunas posibilidades que permitan compensar esta reticencia (Guiné y col. 2021). A pesar de las reacciones heterogéneas que dependen de las culturas, los valores éticos o los ingresos, varios

estudios han demostrado que las innovaciones tecnológicas pueden ser aceptadas si los consumidores ven como interés la vida útil y la seguridad y si los alimentos no se distorsionan en su imagen, en su calidad, ingredientes y/o en su sabor (Dettori, Floris, y Dessì, 2020; Rabadán, 2021). Gracias al consumo repetido de un alimento, los consumidores pudieron memorizar y reconocer las propiedades sensoriales características de estos productos. Por lo tanto, es probable que los consumidores habituales detecten fácilmente incluso pequeños cambios en la calidad sensorial. La frontera entre cambios aceptables e inaceptables es difícil de determinar *a priori*. Por este motivo, se recomienda encarecidamente probar la aceptabilidad de nuevos productos antes de lanzarlos al mercado (Martin y col., 2023; Vanhonacker y col., 2013)

IV.1.3. Textura de los quesos

La textura es un factor clave en el proceso de aceptación de un alimento, y en consecuencia un parámetro de calidad. En este sentido, es necesaria su determinación usando distintos métodos, de los cuales los más utilizados son los métodos instrumentales y de análisis sensorial. La Organización Internacional de Normalización ISO (1992) define la textura como “Todos los atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto perceptible por medios químicos, táctiles por receptores apropiados, visuales y auditivos”. La textura, la estructura y la composición de los alimentos están vinculados y determinan la percepción sensorial (Devezeaux de Lavergne, Van de Velde, y Stieger, 2017). Los términos de textura sensorial están acotados lingüísticamente debido a las posibles interpretaciones en diferentes idiomas.

IV.1.4. Quitosano como *film* y recubrimiento comestible

Un *film* o recubrimiento comestible se define como cualquier tipo de material utilizado para recubrir o envolver alimentos que se utilice para mejorar la calidad, la seguridad, las propiedades organolépticas y nutricionales, principalmente mediante la extensión de la vida útil y para mantener el sabor, el color y/o el valor nutricional del alimento (Robertson, 2013). Pueden consumirse junto con el producto evitando así la

generación de residuos, e incluso si se retira es una opción sustentable ya que son elaborados con materiales biodegradables (Costa y col., 2018).

Los *films* y recubrimientos comestibles difieren en la forma en que se producen y aplican. Los recubrimientos comestibles, se aplican en forma de solución directamente sobre la superficie del alimento mediante diferentes metodologías y después del secado se forma una capa delgada. Por otro lado, los *films* se forman y secan por separado elaborando un material independiente que luego se utiliza para cubrir el alimento (**Figura I.4**) (Díaz-Montes y Castro-Muñoz, 2021; Summo y De Angelis, 2022). Ambos tienen generalmente un espesor inferior a 0,3 mm (Debeaufort y Voilley, 2009).

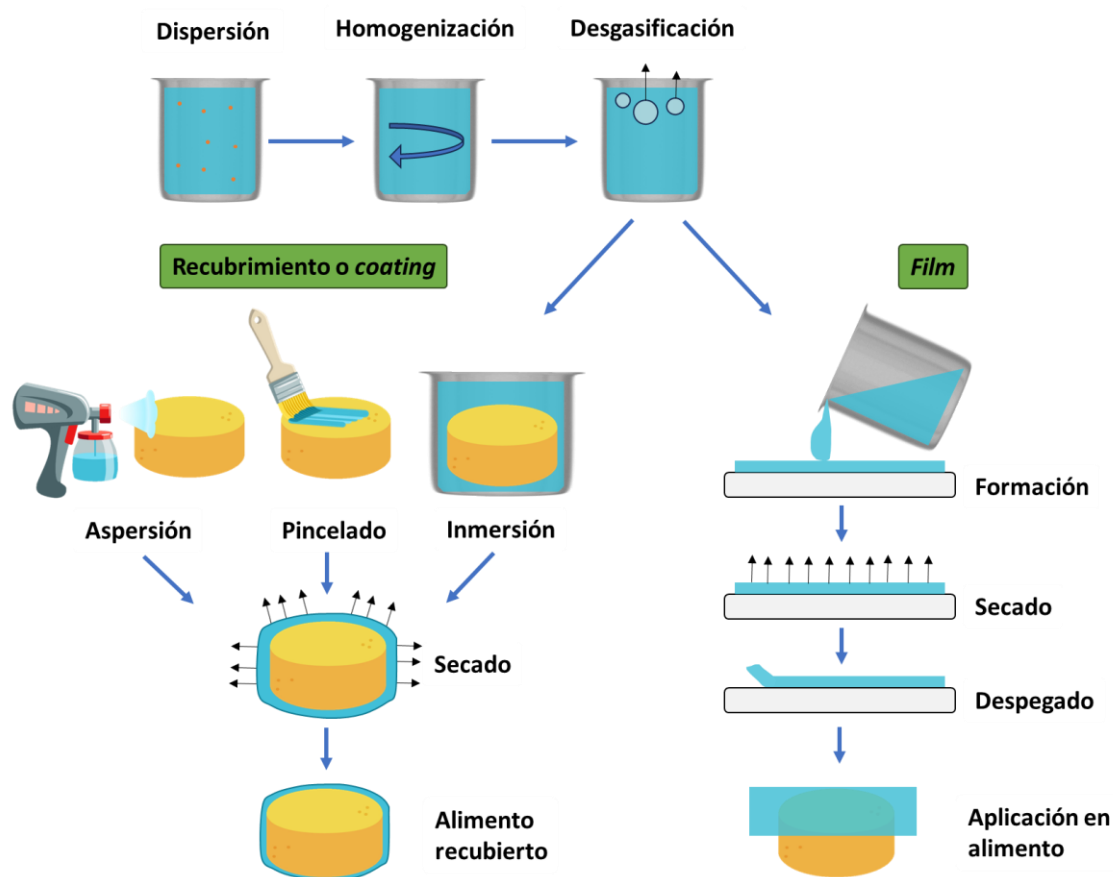


Figura I.4. Esquema de formación de recubrimiento y *film* para aplicación en alimentos.
Tomado de Salah y col. (2020) con modificaciones.

Las propiedades del alimento pueden verse mejoradas ya sea debido a la composición del *film* o recubrimiento, que puede tener propiedades beneficiosas por sí solo, o a su capacidad de ser portadores o *carriers* de ingredientes activos que se consumen con el

recubrimiento. Una de las principales ventajas es que permiten una migración lenta y controlada de los compuestos bioactivos desde el recubrimiento a la matriz alimentaria. Los ingredientes que pueden incorporarse a los recubrimientos o *films* son antimicrobianos, antioxidantes, bioactivos, aromatizantes, colorantes o edulcorantes (Acevedo-Fani, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2017).

Para la formulación de *films* y recubrimientos comestibles de Q, las concentraciones de polímero varían del 1 al 3% (p/v) y se disuelven en una solución acuosa acidificada con ácido acético o ácido láctico en concentraciones que oscilan entre el 1% y el 3% (Leceta y col., 2013). Estos se caracterizan por ser transparentes o ligeramente amarillentos, de superficie lisa, flexibles y cohesivos, con una alta resistencia mecánica (comparable a muchos polímeros comerciales), hidrófilos, inocuos, biocompatibles, biodegradables y aptos para una amplia gama de alimentos. En este sentido, se han realizado diversos estudios sobre *films* y recubrimientos comestibles de Q embebidos con diferentes compuestos bioactivos con el fin de evaluar los efectos de estas sustancias en numerosos productos alimenticios tales como carnes, pescados y mariscos, productos lácteos, frutas y vegetales (Muñoz-Tebar y col., 2023). En la **Tabla IV.1.1** se presentan estudios de aplicaciones de *films* y recubrimientos de Q con bioactivos en diversas clases de alimentos.

Tabla IV.1.1. Estudios de aplicaciones de *films* y recubrimientos de Q con bioactivos en alimentos. Tomada de Padmaja y Bhatt (2020) con modificaciones.

Solución de quitosano (concentración)	Alimento	Técnica de aplicación	Moléculas o extractos evaluados (concentración)	Resultados	Referencia
Quitosano (1,5% p/v)	Corvina roja fresca	Recubrimiento	Extracto de pepita de uva y polifenoles de té (0,2% p/v de cada uno, por separado)	Ambos extendieron la vida útil del pescado 6-8 días más respecto al control.	(Li y col., 2013)
Quitosano (1% p/v)	Huevos	Recubrimiento	Lizosima (0-60% respecto al Q)	20% p/v lizosima-Q mantienen la calidad del huevo por 3 semanas más respecto al control.	(Yuceer y Caner, 2014)
Quitosano (1% p/v)	Carne inoculada con <i>E. coli</i> O157:H7	Film	Fagos encapsulados en liposomas	Presentó actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i> O157:H7 sin impactar en las propiedades sensoriales.	(Cui y col., 2016)
Quitosano (2% p/v)	Tomate cherry	Film	Nanopolvos de dióxido de titanio (1% p/v)	Exhibió fotodegradación de etileno, podría retrasar el proceso de maduración y extender la vida útil del tomate cherry.	(Kaewklin y col., 2018)
Quitosano (1,5% p/v)	Frutilla	Recubrimiento	Nisina, natamicina, extractos de granada y de pepita de uva (1% p/v de cada uno, por separado).	Los agentes antimicrobianos incrementaron la calidad y extendieron la vida útil de las frutillas por encima de 30 días.	(Duran y col., 2016)
Quitosano (2% p/v)	Langostinos	Film	Aceite esencial de <i>Z. clinopodioides</i> , extracto de granada, nanopartículas de celulosa (1% v/v de cada uno, separados y combinados)	Los langostinos con el tratamiento combinado presentaron la mejor actividad antibacterial y propiedades organolépticas luego de 11 días.	(Mohebi y Shahbazi, 2017)
Quitosano (1,6% p/v)	Queso iraní	Recubrimiento	Natamicina (18,5 ppm)	No presentaron modificaciones en características composicionales ni organolépticas. Disminuyó el deterioro tras 6 semanas de almacenamiento.	(Nottagh y col., 2020)

Motivación de este estudio

Generar un sistema de entrega controlada como fuente de AF permanente para las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la matriz del queso, que sea nutriente para las que constituyen el cultivo *starter*, y acelerando el proceso de maduración.

Objetivos particulares

- Diseñar un recubrimiento comestible a base de QA y AF a los fines de fortificar un queso de pasta blanda tipo cremoso con la vitamina.
- Determinar el efecto de la aplicación del recubrimiento diseñado en las características fisicoquímicas y/o composicionales de quesos de pasta blanda tipo cremoso.
- Evaluar la bioaccesibilidad de la vitamina contenida en el queso luego de la maduración.
- Estudiar el impacto de los digeridos de queso obtenidos por digestión simulada *in vitro* en la viabilidad celular de células del epitelio intestinal (Caco-2) y su efecto antioxidante local.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Materiales

El QA y el AF utilizados han sido descriptos en la **Sección II.2.1**. Todos los demás reactivos fueron de calidad analítica. Siempre se utilizó agua MilliQ en todos los experimentos.

IV.2.1.1. Quesos de pasta blanda

Los quesos de pasta blanda utilizados en la esta Tesis fueron gentilmente donados por la empresa *Lácteos Azul* (Partido de Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron hormas de 4 kg de queso de pasta blanda tipo cremoso de lotes diferentes (**Figura IV.2.1**).



Figura IV.2.1. A Fotografía de horma de queso cremoso y **B** su información nutricional informada en el envase.

La tecnología básica de elaboración de queso es similar para casi todas las variedades. Sin embargo, las elaboraciones de cada tipo se diferencian entre sí por una cantidad de pequeños cambios que producen diferencias notables en el producto final. En general estas diferencias residen en la utilización de distintos tipos de fermentos, temperaturas de cocción, corte de la cuajada, agregado de aditivos, tamaño del grano

de queso, tipos y tiempo de salado, tiempos y condiciones (temperatura, humedad, envasado) de maduración entre otras. Los quesos utilizados en esta Tesis se elaboraron en la planta industrial, según el diagrama de flujo de la **Figura IV.2.2**.

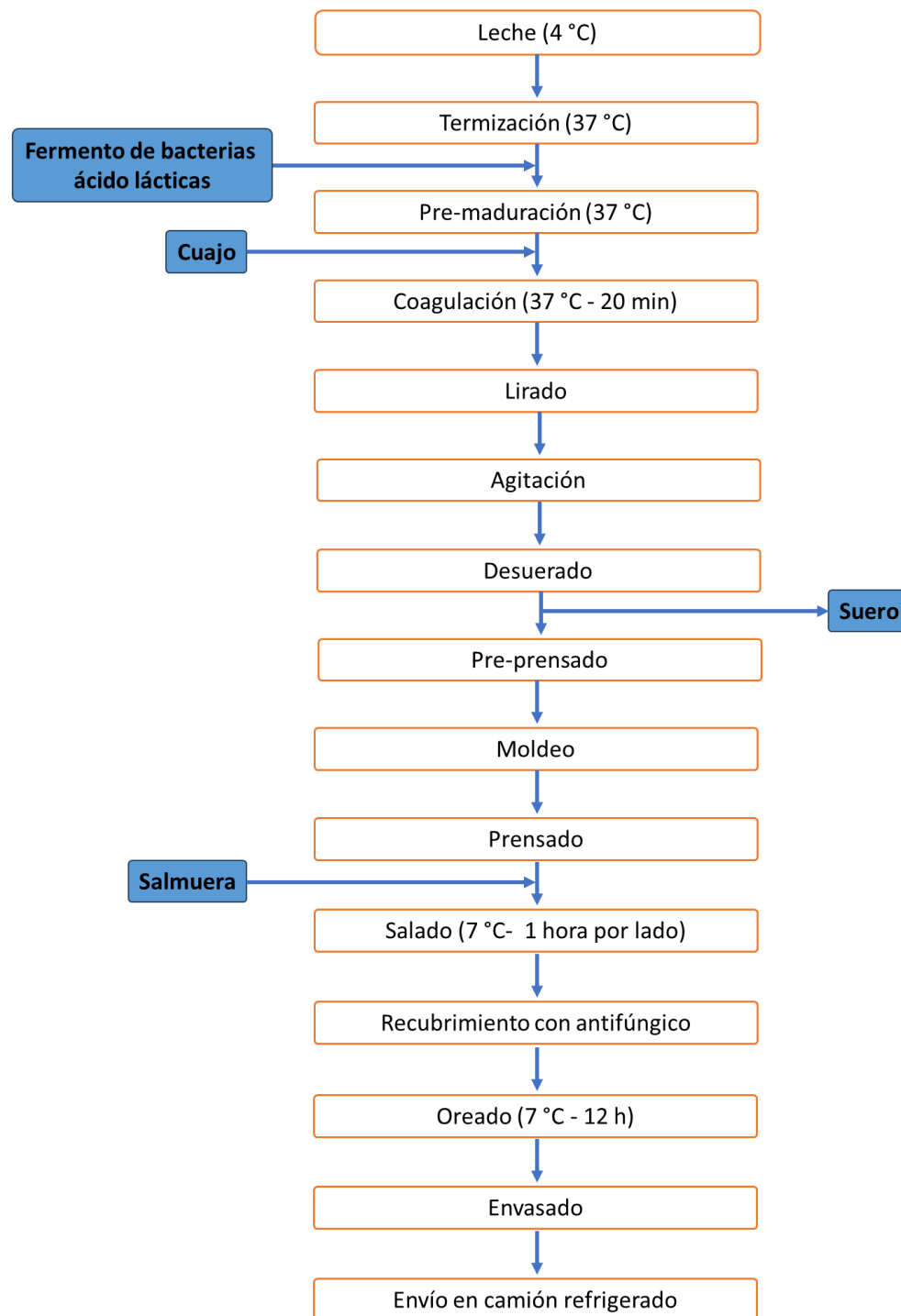


Figura IV.2.2. Diagrama de flujo de elaboración de queso de pasta blanda.

IV.2.2. Preparación de recubrimiento comestible (RC)

Se prepararon soluciones de recubrimiento o *coating* comestible (RC) a partir de una solución al 2 % p/p de QA. Se preparó una solución doblemente concentrada de AF en agua MilliQ. Se mezclaron la solución de QA y la de AF en igual volumen, obteniéndose una solución con concentración final de 1 % p/p de QA. La masa de AF en el RC se calculó en función de la Ingesta Diaria Recomendada de AF (400 µg) por porción, es decir, la idea fue asegurar que una porción de 30 g de queso contuviera 400 µg de AF. Además, se prepararon soluciones de RC de QA y de AF solos en las mismas concentraciones (Figura IV.2.3).

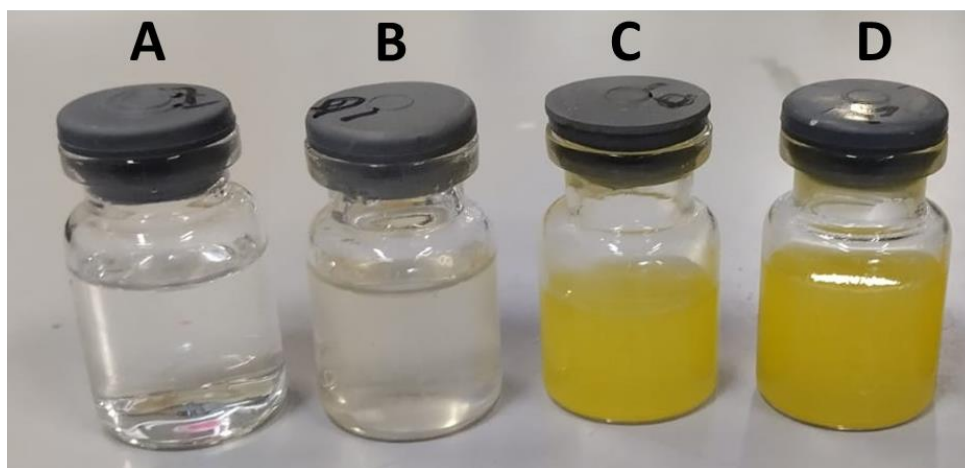


Figura IV.2.3. Aspecto macroscópico de soluciones de recubrimiento comestible
A control, B QA, C AF, D QA-AF

IV.2.3. Procedimiento de aplicación de recubrimiento comestible sobre muestras de quesos de pasta blanda

En ocasiones, debido al número de tratamientos y sus correspondientes repeticiones los experimentos suelen ser, incluso a escala piloto, costosos, consumen mucho tiempo, requieren de gran espacio para su almacenamiento y suelen ser de baja reproducibilidad (Gutiérrez-Méndez, Trancoso-Reyes y Leal-Ramos, 2013). Se han sugerido algunas alternativas para la producción de queso a escala piloto para diferentes usos. Salles y col., (1995) informaron un modelo de queso para la evaluación de atributos sensoriales y compuestos de sabor. Milesi, Candioti y Hynes (2007) informaron el uso de mini quesos blandos para monitorear las poblaciones microbianas y la proteólisis durante la maduración del queso.

En esta Tesis, cada horma de queso fue cortada en 36 porciones cúbicas de 6 x 6 x 4 cm de arista y de 100 g aproximadamente de forma tal que quedaron definidos mini quesos a los cuales se le asignó un tratamiento (solución control, QA, AF, QA-AF) de forma aleatoria, obteniéndose las muestras de queso qcontrol, qQA, qAF, qQA-AF. Se colocaron las porciones sobre rejillas y se aplicaron los RC correspondientes con el método de pincelado, primero en la parte superior y las demás caras expuestas, se dejaron orear por 1 h a 4 °C. Se voltearon y se aplicó el tratamiento en la base de cada muestra. Se dejaron orear durante 24 h a 4 °C. Se envasó cada una de las piezas en bolsas individuales de Cryovac (Sealed Air, Argentina), se sellaron con una termoselladora al vacío. Se procedió a la maduración a 4 °C. Se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos en los quesos a los 0, 10 y 20 días luego de la aplicación de los RC.

IV.2.4. Caracterización fisicoquímica y composicional de muestras de quesos de pasta blanda

IV.2.4.1. Determinación de pH

El pH se determinó utilizando un pHmetro para sólidos Testo 205 (Alemania) (**Figura IV.2.4**). Se realizó un pinchazo en la pieza de queso a una profundidad de 1,5 cm, de forma tal que el sensor del equipo se encuentre totalmente dentro de la muestra. La medición se realizó por cuatrimplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.



Figura IV.2.4. A Fotografía de pHmetro para sólidos, B detalle de los sensores de pH y de temperatura

IV.2.4.2. Determinación de actividad de agua (aw)

La actividad de agua (aw) se determinó por el método oficial 925.09 (AOAC, 2005) utilizando un higrómetro de punto de rocío Aqualab 3TE (**Figura IV.2.5**) (Decagon Devices, Estados Unidos). La medición se realizó por cuatuplicado y los resultados se expresaron como la media $\pm$ la desviación estándar.



Figura IV.2.5. Fotografía de higrómetro de punto de rocío Aqualab 3TE.

IV.2.4.3. Determinación de contenido de sodio

Se determinó el contenido de sodio mediante la técnica de fotometría de llama, para ello se utilizó el equipo Metrolab 315 (Wiener lab, Argentina) ajustado con filtro para registrar sodio (Na). Se preparó una solución patrón de Na 10 ppm utilizando NaCl. Se calibró el equipo nebulizando agua bidestilada y posteriormente la solución patrón, ajustando al valor 140 mmol/l. Luego se realizó una curva de calibración con soluciones de Na menos concentradas, desde Na 2 ppm. Se pesaron al miligramo 2 g de muestra de queso en crisoles de cerámica. Se calentaron en una placa calefactora hasta cese de liberación de humo y luego se colocaron en una mufla a 500 °C hasta obtener cenizas blancas. Se solubilizaron las cenizas con agua bidestilada y se trasvasaron a un matraz, filtrando a través de un papel de filtro. Se llevó a volumen y se realizaron las diluciones necesarias para que la medición se encontrara dentro del rango dado por la curva de calibración. Se realizaron los cálculos (**Ecuación IV.2.1**) para obtener el contenido de Na por cada 100 g de muestra.

$$mg\ Na/100g = 0,01629 \times \frac{x}{142} \times \frac{dil.}{inv.} \times \frac{1^\circ\ dil.}{P} \times 100 \quad \text{Ecuación IV.2.1}$$

Donde: x: valor otorgado por el equipo, P: peso de la muestra, dil. inv.: inversa de la dilución, 1 °dil: la primera dilución realizada.

IV.2.4.4. Determinación de contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las muestras de queso mediante el método gravimétrico según la Norma FIL 4A:1982. Brevemente, se colocaron 25 g de arena lavada en placas de Petri con una varilla de vidrio, para una mejor distribución del calor y evitar la formación de costras superficiales que dificulten la evaporación de agua. Se colocaron en estufa a 102 °C hasta peso constante y se enfriaron en desecador. Una vez frías, se pesaron al miligramo 10 g de muestra en pequeños trozos y se mezcló con la arena. Se secó en estufa a 102 °C durante 24 h. Se enfrió en desecador y se procedió al pesaje de la placa. Posteriormente se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el extracto seco (X) y a partir de este valor el porcentaje de humedad (contenido de humedad en 100 g de queso). El extracto seco (X) se expresa en %. Es decir, en gramos de extracto seco por 100g de queso.

$$X = \frac{C-A}{B-A} \times 100$$

Ecuación IV.2.2

$$\% \text{ HUMEDAD} = 100 - X$$

Ecuación IV.2.3

Donde: X: extracto seco, A: peso de la cápsula con la arena y varilla, B: peso de la cápsula con la arena, varilla y la muestra fresca, C: peso de la cápsula con la arena, varilla y la muestra desecada, B-A: peso de la muestra fresca, C-A: peso de la muestra desecada, % humedad: contenido de humedad por cada 100 g de queso.

IV.2.4.5. Determinación de contenido de proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó mediante el método de cuantificación de nitrógeno total Kjeldahl, se utilizó el equipo semiautomático Kjeldahl (UDK 129 Distillation Unit, VELP Scientifica SRL, Italia). La medición se realizó por cuatuplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar. Este método consta de tres etapas: digestión del alimento, destilación y titulación.



Figura IV.2.6. Fotografía de equipo semiautomático Kjeldahl UDK 129 Distillation Unit.

Brevemente, se colocaron 0,2 g de muestra en un tubo de digestión junto a 1 g de mezcla catalizadora Kjeldahl (4,98 g de K_2SO_4 + 0,02 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) y 6 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dispusieron los tubos en una gradilla y se colocaron sobre un mechero hasta completar la digestión. La solución contenida en los tubos se torna traslúcida. Una vez frío, se agregaron 15 ml de agua destilada y 10 gotas de fenolftaleína. Se colocó en el equipo Kjeldahl con NaOH al 35 % p/v. Se destiló en un Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de ácido bórico 2 % p/v y 4 gotas de colorante Tashiro. El contenido del Erlenmeyer se tornó de violeta a verde. Por último, se tituló el destilado con ácido sulfúrico, 0,05 N. Se tomó el volumen de ácido requerido para que virar el indicador a violeta nuevamente y se realizaron los cálculos (**Ecuaciones IV.2.4 y 2.5**) para obtener el contenido de nitrógeno en 100 g de queso. Se utilizó el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,38 correspondiente a leche y productos lácteos para calcular el contenido de proteína en 100 g de queso.

$$\%N = \frac{V_{H_2SO_4} \times f_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4} \times 0,0014 \times 100}{Peso\ muestra}$$

Ecuación IV.2.4

$$\%P = \%N \times f_{\text{leche y productos lácteos}} \quad \text{Ecuación IV.2.5}$$

Donde: % N: contenido de nitrógeno por cada 100 g de muestra, $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: volumen gastado de ácido, $f_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: factor del ácido, $N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: normalidad del ácido, %P: contenido de proteína por cada 100 g de muestra, $f_{\text{leche y productos lácteos}}$: factor de conversión de nitrógeno a proteína.

IV.2.4.6. Determinación de contenido de grasas

Se utilizó la técnica de determinación de contenido de grasas con butirómetro según van-Gulik (ISO 3433). Con este fin se rellenó el butirómetro van-Gulik con 15 ml de ácido sulfúrico (densidad: $1,522 \pm 0,005$ g/ml). Se pesaron $3 \pm 0,2$ g de queso en el vaso de vidrio perforado y luego se introdujo cuidadosamente en el butirómetro. Se colocó en un baño María a 70-80 °C con la escala hacia arriba, agitando hasta que el queso estuvo completamente disuelto. Una vez disuelto, se añadió 1 ml de alcohol amílico a través de la abertura de la escala y ácido sulfúrico hasta la marca del 15 % de la escala. Se cerró, homogeneizó y reguló la temperatura durante 5 minutos en el baño María a 65 °C. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Se devolvió al baño maría a 65 °C por 5 minutos. Luego se ajustó la columna de grasa al punto cero y se obtuvo la lectura del contenido en grasa absoluto. La lectura se tomó en el extremo inferior del menisco, la **Ecuación IV.2.5** se usó para obtener el porcentaje de grasa en la muestra.

$$\%Grasa = \frac{\text{Valor medido} \times 3}{\text{Peso inicial queso}} \quad \text{Ecuación IV.2.5}$$

IV.2.4.7. Determinación de color superficial

El color superficial se determinó con un fotocolorímetro portátil (CM-700d Konica Minolta, Japón) midiendo los parámetros L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB, empleando el iluminante C y observador CIE 2°. La medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

El espacio de color $L^*a^*b^*$, también referido como CIELAB, es actualmente uno de los espacios de color más populares y uniformes usados para evaluar el color de un

objeto. Este espacio de color es ampliamente usado porque correlaciona los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana (**Figura IV.2.7. A**). Las coordenadas medidas fueron la luminosidad L^* , que varía de 0 a 100 (correspondiente respectivamente al blanco y al negro), y las coordenadas de color opuesto: a^* y b^* , que varían de -60 a $+60$, donde a^* asume valores negativos para el verde y valores positivos para el rojo, mientras que b^* asume valores negativos para el azul y positivos para el amarillo (Guiné y col. 2017).

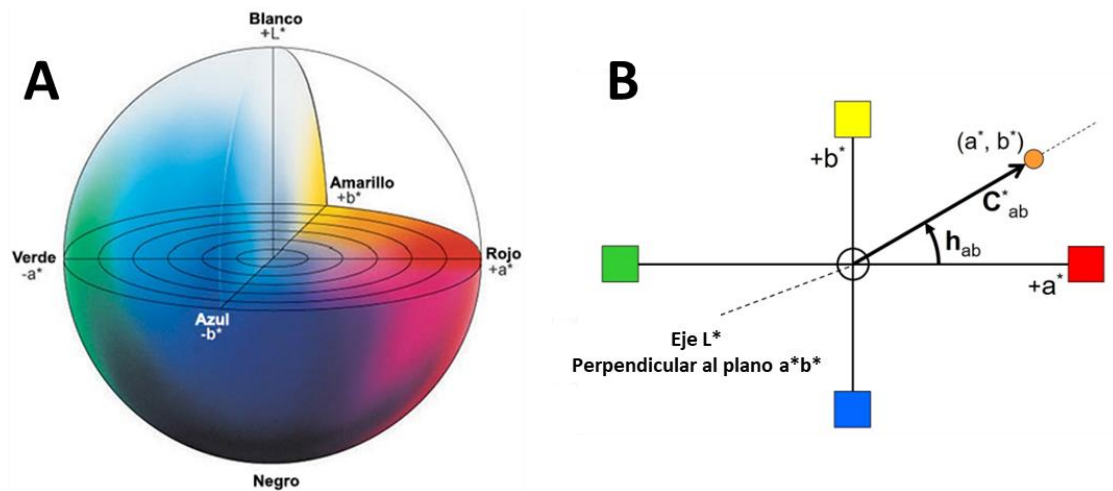


Figura IV.2.7. A Espacio CIE $L^*a^*b^*$ en tres dimensiones. Tomado de Konica Minolta. **B** Espacio CIE $L^*a^*b^*$ en dos dimensiones, donde C es croma y h el ángulo de tono. Tomado de Prospector®.

Las coordenadas cartesianas se pueden utilizar para calcular las coordenadas polares o cilíndricas (**Figura IV.2.7. B**), donde h° representa el ángulo de tono y C el croma, como se define en las **Ecuaciones IV.2.6 a,b,c** y **IV.2.7**:

$$h^\circ = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \text{ para } a^* > 0; b > 0 \quad \text{Ecuación IV.2.6. a}$$

$$h^\circ = 180^\circ + \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \text{ para } a^* < 0; b > 0 \quad \text{Ecuación IV.2.6. b}$$

$$h^\circ = 270^\circ + \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \text{ para } a^* < 0; b < 0 \quad \text{Ecuación IV.2.6. c}$$

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Ecuación IV.2.7

La diferencia de color total (ΔE), fue el parámetro considerado para la evaluación general de la diferencia de color, entre una muestra y el control (designado con un subíndice 0) en la ecuación (**Ecuación IV.2.8**):

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

Ecuación IV.2.8

La muestra de control en cada tiempo se utilizó como referencia. Un ΔE más grande denota un mayor cambio de color con respecto al material de referencia. Una escala típica para la evaluación de la diferencia de color es la siguiente: ΔE en el rango [0,0 – 2,0] corresponde a diferencias irreconocibles, en el rango [2,0 – 3,5] corresponde a diferencias posibles de reconocer por un observador experimentado y más de 3,5 corresponde a claras diferencias de color (Guiné y col., 2017).

IV.2.5. Caracterización de BAL en los quesos de pasta blanda

Se cuantificaron las BAL según la normativa ISO 15124:1998. Para ello se pesaron 20 g de queso en una bolsa *stomacher* (Whirl-Pak, EE. UU.) y se agregaron 180 ml de agua peptonada salina (Biokar, Beauvais, Francia), se homogeneizó durante 30 s en un equipo *stomacher*. Inmediatamente se realizaron diluciones decimales sucesivas con agua peptonada salina. Se sembraron 0,1 o 1 ml de las diferentes diluciones en placas de Petri estériles para contar entre 30 y 300 unidades formadores de colonia (UFC) por placa. Posteriormente se colocaron aproximadamente 15 ml de agar Man, Rogosa, and Sharp (MRS) (Biokar, Beauvais, Francia) previamente preparado y atemperado a 47 °C. Las placas se homogeneizaron cuidadosamente y se incubaron en jarra de anaerobiosis con un sobre de anaerobiosis (Anaerogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.), a 30 °C durante 72 h. Pasada la incubación, se realizó el recuento de UFC y se calcularon las $\log_{10}$ UFC/g de queso.

IV.2.6. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de muestras de queso

El equipo más usado para determinar los parámetros requeridos de textura es el texturómetro o una máquina universal de Testo, que recopila la mayoría de las pruebas en un solo aparato y porque desarrolla una técnica de simulación, es decir, simula la mordedura de un alimento. Con este equipo se lleva a cabo el Análisis del Perfil de Textura (TPA). La prueba consiste en una doble compresión uniaxial a velocidad constante (**Figura IV.2.8**) realizada con dos placas paralelas, una base fija y un émbolo móvil, a una velocidad de desplazamiento (deformación) lineal constante. En el primer ciclo, la muestra se comprime hasta un desplazamiento determinado, y luego sus restos se comprimen nuevamente con un tiempo de descanso, en términos de segundos, luego que el émbolo fue retirado.

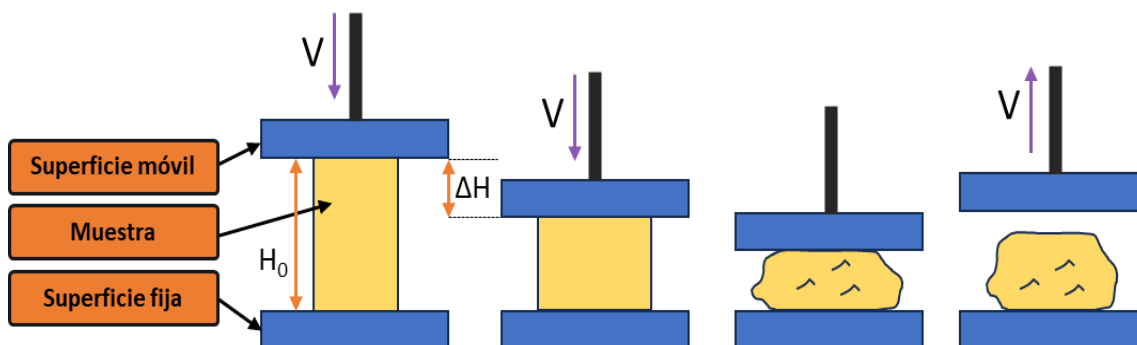


Figura IV.2.8. Compresión uniaxial a velocidad constante, donde H_0 es la altura inicial de la muestra, ΔH la diferencia de altura de la muestra por la compresión y V la velocidad de desplazamiento de la superficie móvil. Tomado y adaptado de Castañeda (2002).

La curva típica de TPA (fuerza-tiempo) obtenida mediante el texturómetro Instron se muestra en la **Figura IV.2.9**, los picos positivos se corresponden con el primer y el segundo ciclo de masticación, respectivamente. A partir de esta curva pueden calcularse los diferentes parámetros texturales, definidos en la **Tabla IV.2.1**.

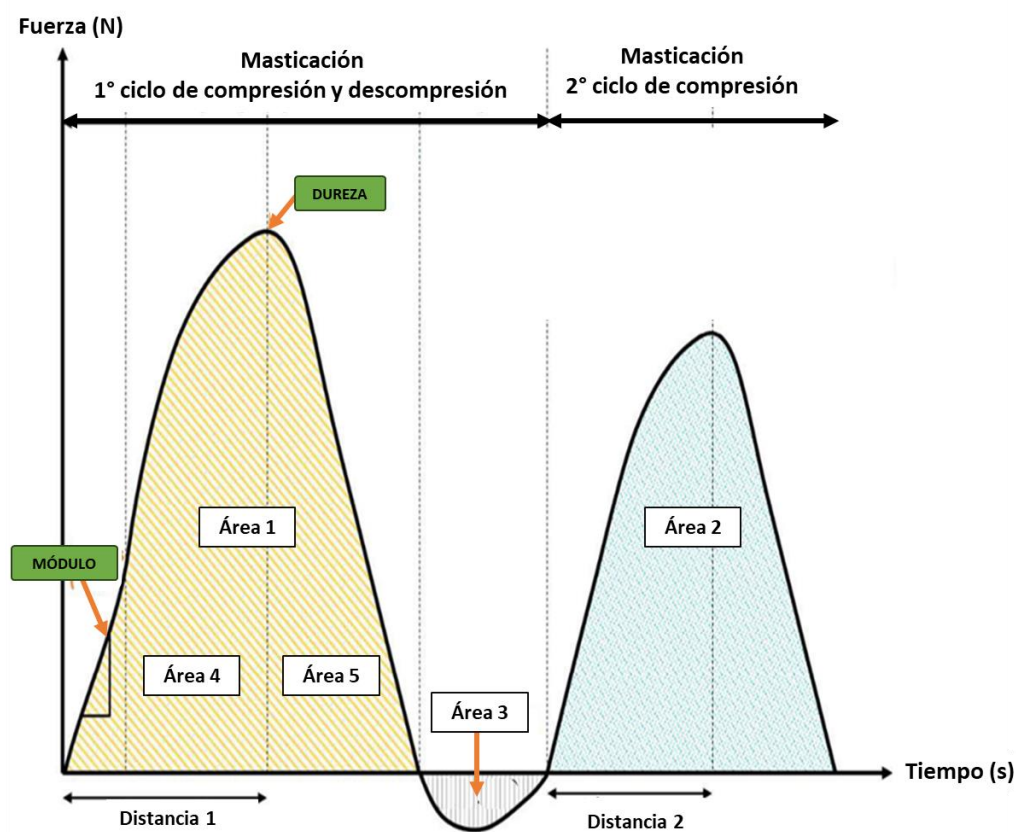


Figura IV.2.9. Curva típica de TPA (fuerza-tiempo) obtenidas mediante el equipo Instron.

En esta Tesis se utilizó la maquina universal de testeo Instron 2519-103 (Massachusetts, EE. UU.), equipado con una celda de carga de 100 N y un plato de compresión cilíndrico de 35 mm de diámetro. Las muestras de 15 x 15 x 15 mm, luego fueron colocados en placas de Petri y se atemperaron a 25 ± 1 °C. El ensayo consistió en someter cada muestra de queso a un doble ciclo de compresión del 70 % con respecto a su altura inicial, a una velocidad constante de 1 mm/s (**Figura IV.2.10**). Además, se estableció un tiempo de recuperación entre ambas compresiones de 5 s. Se realizaron al menos 7 repeticiones por cada muestra de queso y se obtuvieron las curvas fuerza-tiempo fueron tratadas con el software Origin (Origin Pro 2018, Origin Lab Corp, Northampton, MA, USA) para obtener los diferentes parámetros texturales.

Tabla IV.2.1. Parámetros texturales obtenidos de la curva fuerza-tiempo de TPA.

Parámetro textural	Definición	Cálculo
Dureza	Fuerza requerida para una deformación predeterminada.	Punto máximo en el primer pico (Dureza)
Adhesividad	Trabajo necesario para superar las fuerzas adhesivas entre la muestra y el émbolo.	Área negativa entre la primera y la segunda compresión. (Área 3)
Cohesividad	Fuerza de los enlaces internos en la muestra.	El área de trabajo durante la segunda compresión dividida por el área de trabajo de la primera compresión. (Área 2/Área 1)
Elasticidad	La velocidad a la que un material deformado vuelve a su condición no deformada después de que se elimina la fuerza deformante.	La distancia de la altura detectada durante la segunda compresión dividida por la distancia original de compresión (Distancia 2/Distancia 1)
Gomosidad	La energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado.	(Dureza * Cohesividad)
Masticabilidad	Energía necesaria para masticar un alimento sólido hasta que esté listo para tragar.	(Dureza * Cohesividad * Elasticidad)
Resiliencia	Es una medida de qué tan bien un producto lucha por recuperar su posición original. Es un parámetro similar a la elasticidad.	Es la relación entre el área de la segunda mitad del primer ciclo de compresión y el área de la primera mitad del mismo ciclo. (Área 5/Área 4)



Figura IV.2.10. A Máquina universal de testeo Instron 2519-103; B, C y D etapas de la primera compresión y descompresión de muestra de queso.

IV.2.7. Bioaccesibilidad del AF. Digestión in vitro de muestras de quesos

Se evaluó la bioaccesibilidad del AF remanente en los quesos luego de la maduración. Se pesaron 5 g de muestra de queso de cada tratamiento o 5 g de agua para el control y se realizó el protocolo INFOGEST (Minekus y col., 2014), tal como fue detallado previamente en la **Sección II.2.14**.

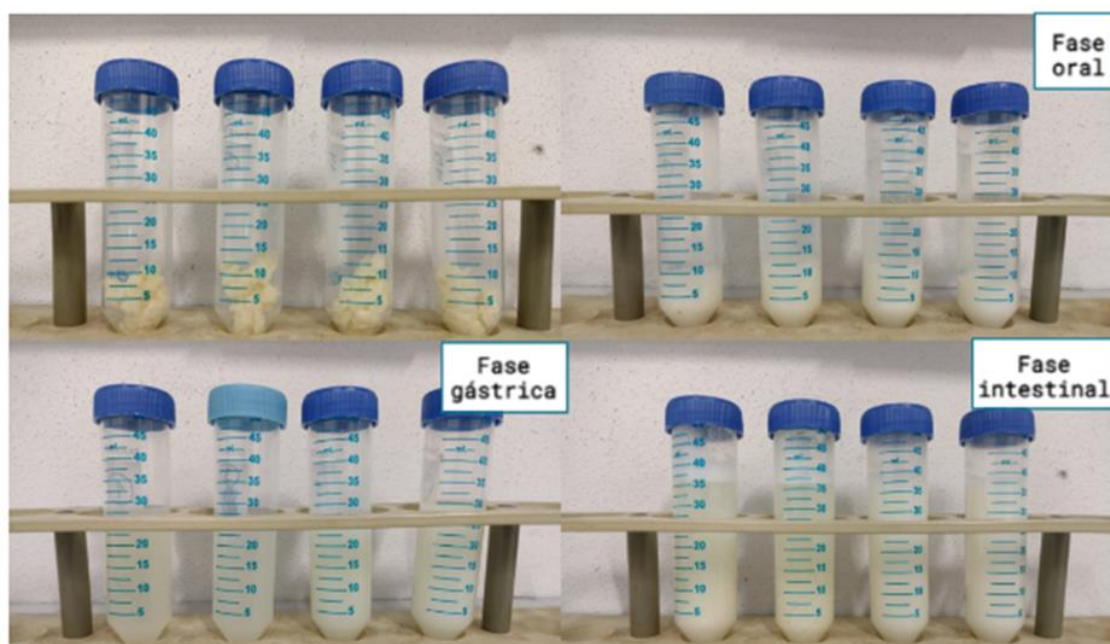


Figura IV.2.11. Fotografías tapas de la digestión *in vitro* de queso con recubrimiento comestible: **A** qControl, **B** qQA, **C** qAF, **D** qQA-AF.

Se tomaron los sobrenadantes obtenidos (control*, qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF*) luego de la centrifugación, los cuales serán utilizados para las determinaciones subsiguientes. Cabe señalar que es una buena práctica filtrar las muestras de digeridos de alimentos con filtros de 0,22 o 0,45 μm que garantizan la eliminación de bacterias antes del trabajo de cultivo celular (Kondrashina y col., 2023). En este sentido, los digeridos se filtraron a través de filtros de 0,45 y 0,22 μm , se alicuotaron y se almacenaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

IV.2.8. Evaluación de la biodisponibilidad del AF

Los sobrenadantes o digeridos obtenidos en la digestión *in vitro* de los quesos fueron analizados para cuantificar el AF biodisponible. La cuantificación del AF se realizó mediante el método microbiológico estandarizado oficial de la AOAC (método 992.05, 2000), tal como fue detallado previamente en la **Sección II.2.15**. Los sobrenadantes fueron diluidos en agua MilliQ estéril de forma tal que se obtuvo una concentración estimada detectable por *L. casei* BL23.

IV.2.9. Actividad antioxidante de los sobrenadantes de digeridos de queso

Se estudió la actividad antioxidante de los sobrenadantes de digeridos de queso mediante los métodos FRAP y ABTS, descritos en la **Secciones II.2.6.2 y II.2.6.2** respectivamente.

IV.2.10. Evaluación de viabilidad de células Caco-2 con sobrenadantes de digeridos de queso

Para determinar la actividad metabólica de las células Caco-2 frente a los digeridos obtenidos en la digestión *in vitro* de los quesos se realizaron pruebas de viabilidad celular empleando el ensayo de reducción de MTT. Con este fin, se sembraron $4 \cdot 10^4$ células por *well* en placas *multiwell* de 96 *wells* en medio DMEM suplementado con 10 % SFB. Se incubaron 24 h en estufa a 37 °C con 5 % de CO₂. Para realizar una curva dosis respuesta se colocaron entre 0 y 80 % del control* y agua estéril se utilizó medio DMEM suplementado con 10 % SFB para la preparación de estos tratamientos. Se incubaron 24 h en estufa a 37 °C con 5 % de CO₂. Se realizó el ensayo de reducción de MTT, previamente descrito en la **Sección II.2.7.1**. Cada ensayo se realizó al menos por triplicado y se representó como la media $\pm$ el desvío estándar.

Una vez obtenida la curva dosis respuesta, se seleccionaron tres concentraciones de control*, siendo que cada uno de estos porcentajes:

1. No provocó una diferencia significativa de mayor mortalidad con respecto al control.
2. Provocó una diferencia significativa de mayor mortalidad con respecto al control, presentando una mortalidad leve.
3. Provocó una diferencia significativa de mayor mortalidad con respecto al control, presentando una mortalidad pronunciada.

Se realizó el mismo ensayo de viabilidad celular con las tres concentraciones mencionadas de control*, qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF*. Cada ensayo se realizó al menos por triplicado y se representó como la media $\pm$ el desvío estándar.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Caracterización fisicoquímica y composicional de los quesos de pasta blanda

La calidad del queso generalmente se condice con el rendimiento, por tanto, cuando se tiene una buena calidad el rendimiento será óptimo. Para elaborar quesos de buena calidad es trascendental que tanto la composición como los parámetros fisicoquímicos sean acordes al tipo de queso. De este modo, la actividad microbiológica y enzimática será ideal durante el madurado (Hill, 2010). En este sentido, se analizó la evolución durante la maduración de algunos de los parámetros principales que se tienen en cuenta en la industria quesera, como la humedad, el contenido de proteína y grasa, el pH, la a_w y el contenido de sodio (Na^+). Los parámetros mencionados son indicadores confiables de las transformaciones físicoquímicas y bioquímicas que ocurren en el interior de la matriz de caseína durante la maduración. Se consideraron los análisis realizados a los 0, 10 y 20 días de maduración a 7 °C, contados desde la aplicación de los RC en los quesos.

El pH del queso es un parámetro físicoquímico muy importante que afecta la textura, el *flavour* y la seguridad microbiológica del queso. Está determinado por el balance entre la acidificación generada por los microorganismos del cultivo *starter* y por la capacidad de la cuajada de resistir cambios en el pH (capacidad *buffer*). El valor del pH dependerá del tipo de queso y, por tanto, de su composición (Hill y Kethireddipalli, 2012)(McSweeney, 2007). Durante la elaboración del queso, con el agregado del cultivo *starter* de BAL se supone una tasa constante de desarrollo de ácido láctico de forma tal que el pH de la leche ($\text{pH}_{\text{inicial}} \approx 6,6-6,8$) disminuye rápidamente inicialmente y luego se ralentiza. Los principales componentes del queso que amortiguan los cambios de pH son las caseínas y sus productos de degradación, el fosfato inorgánico y los ácidos orgánicos (McSweeney, 2007).

En la **Tabla IV.3.1** se muestra la variación de pH de las muestras de quesos con diferentes tratamientos a lo largo del tiempo de maduración. Puede observarse que el pH no sufrió variaciones destacables en el tiempo considerado, así como tampoco

puede atribuirse un efecto del tratamiento sobre este parámetro. Martegani (2006) establece que el pH de la cuajada fresca disminuye a un valor de alrededor de 5,2, se mantiene estable por un tiempo y luego comienza a ascender paulatinamente en ciertos quesos, donde puede llegar a valores de 5,4 o 5,6; o fuertemente en otros, madurados por mohos y levaduras, en los cuales puede llegar a la neutralidad. Cano Embuena y col. (2017) estudiaron recubrimientos comestibles elaborados con Q y aceites esenciales y no observaron diferencias entre los quesos tratados y control en el pH inicial (pH 5,2) ni durante el proceso de madurado, que disminuyó en ambos casos hasta un valor de 4,85.

Tabla IV.3.1. Características fisicoquímicas de las muestras de quesos tratados con recubrimientos comestibles.

Queso	Día	pH*	aw*
qControl	Día 0	5,65 ±0,05 ^{a,A}	0,990 ±0,002 ^{a,A}
	Día 10	5,80 ±0,10 ^{a,A}	0,988 ±0,003 ^{a,A}
	Día 20	5,60 ±0,01 ^{a,A}	0,985 ±0,005 ^{a,A}
qQA	Día 0	5,60 ±0,01 ^{a,A}	0,984 ±0,005 ^{a,A}
	Día 10	5,85 ±0,05 ^{a,B}	0,987 ±0,005 ^{a,A}
	Día 20	5,65 ±0,05 ^{a,A}	0,982 ±0,005 ^{a,A}
qAF	Día 0	5,65 ±0,05 ^{a,A}	0,987 ±0,001 ^{a,A}
	Día 10	5,80 ±0,10 ^{a,A}	0,980±0,001 ^{a,A}
	Día 20	5,75 ±0,05 ^{a,A}	0,975 ±0,005 ^{a,A}
qQA-AF	Día 0	5,65 ±0,05 ^{a,A}	0,981 ±0,002 ^{a,A}
	Día 10	5,90 ±0,10 ^{a,B}	0,985 ±0,002 ^{a,A}
	Día 20	5,95 ±0,05 ^{b,B}	0,979 ±0,002 ^{a,A}

* media ± SD para n=4. Para cada parámetro estudiado: letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento de RC a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en un tratamiento de RC a distintos tiempos (p<0,05).

La a_w tiene una fuerte influencia en las propiedades físicas, químicas, bioquímicas y microbiológicas de los alimentos y se relaciona con la calidad, estabilidad y seguridad de los quesos (Marcos, 1993). Desde el inicio del tiempo de maduración los valores de actividad de agua se mantuvieron estables en todas las muestras, tanto control como con los diferentes tratamientos (**Tabla IV.3.1**). Se obtuvieron valores concordantes con respecto a los obtenidos en otros trabajos, que indican una actividad acuosa de 0,98

en quesos de pasta blanda tradicionales (Pasquali y col. 2022) y tratados con recubrimientos comestibles basados en Q (Cano Embuena y col. 2017).

El contenido de sal juega un papel importante en su aceptabilidad, sabor, olor y tiene un efecto sobre la actividad del agua y, por lo tanto, ejerce control sobre el crecimiento microbiano, la a_w , la actividad enzimática y los cambios bioquímicos durante la maduración del queso (Nottagh y col., 2020). Además, el contenido de sal influye en el grado de hidratación de la caseína y, por tanto, en el grado de agregación de la caseína, en el queso, lo que afecta su susceptibilidad a la degradación enzimática. En consecuencia, el contenido de sal también influye en aspectos de la composición del queso distintos del contenido de humedad. Para la mayoría de las variedades, el contenido de sal del queso se correlaciona positivamente con los niveles de lactosa no fermentada y el pH e inversamente con los niveles de proteólisis primaria, o niveles de pH 4,6 (N soluble) y lipólisis, medida por las concentraciones de ácidos grasos libres (Guinee, 2007). Como se observa en la **Tabla IV.3.2** no existió una influencia en el contenido de sodio en los quesos con la aplicación de los diferentes RC. El resultado obtenido estuvo en línea con el hallazgo de Ramos y col. (2012), quienes informaron que un recubrimiento basado en un aislado de proteína de suero no afectó el contenido de sal del queso recubierto durante el almacenamiento. Sin embargo, los valores obtenidos fueron significativamente menores a los reportados en la tabla nutricional del producto comercial. Esto podría deberse a una diferencia en la técnica utilizada para la determinación del Na^+ .

Tabla IV.3.2. Contenido de sodio por cada 100 g de queso en el producto madurado.

Muestras de Queso	mg Na^+ /100g queso
qControl	174,39 $\pm$ 17,47 ^a
qQA	170,13 $\pm$ 16,54 ^a
qAF	180,46 $\pm$ 10,43 ^a
qQA-AF	167,50 $\pm$ 5,78 ^a

* media $\pm$ SD para n=3. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento de RC ($p < 0,05$).

Para la evaluación de la calidad de los quesos y el efecto de la aplicación de los RC, así como también para su clasificación según lo definido por el CAA, se determinaron el contenido de humedad, de grasa y de proteína de los quesos. Estos datos se presentan en la **Tabla IV.3.3**.

Tabla IV.3.3. Análisis composicional de muestras de queso tratados con RC.

Queso	Día	Contenido de humedad (%) [*]	Contenido de grasa en base seca (%) [*]	Contenido de proteína (%) [*]
qControl	Día 0	52,99 ±0,77 ^{a,A}	39,88 ±0,29 ^{a,A}	23,76 ±3,46 ^{a,A}
	Día 10	52,64 ±0,82 ^{a,A}	42,29 ±0,82 ^{a,B}	21,73 ±2,37 ^{a,A}
	Día 20	53,26 ±0,71 ^{a,A}	41,46 ±0,95 ^{a,A}	19,88 ±1,16 ^{a,A}
qQA	Día 0	51,32 ±1,13 ^{a,A}	40,32 ±0,48 ^{a,A}	24,25 ±3,50 ^{a,A}
	Día 10	51,91 ±0,90 ^{a,A}	41,34 ±0,63 ^{ab,A}	22,08 ±1,28 ^{a,A}
	Día 20	53,09 ±0,78 ^{a,A}	41,03 ±0,96 ^{a,A}	20,62 ±0,34 ^{a,A}
qAF	Día 0	51,28 ±1,07 ^{a,A}	38,75 ±1,25 ^{a,A}	24,37 ±3,63 ^{a,A}
	Día 10	52,64 ±1,34 ^{a,A}	41,44 ±0,48 ^{ab,A}	22,20 ±1,14 ^{a,A}
	Día 20	51,84 ±2,19 ^{a,A}	41,79 ±0,75 ^{a,A}	20,59 ±0,71 ^{a,A}
qQA-AF	Día 0	51,65 ±1,55 ^{a,A}	39,57 ±0,63 ^{a,A}	24,82 ±3,15 ^{a,A}
	Día 10	52,18 ±1,79 ^{a,A}	40,00 ±0,75 ^{b,B}	21,65 ±2,34 ^{a,A}
	Día 20	52,63 ±0,23 ^{a,A}	42,22 ±0,91 ^{a,B}	20,38 ±1,47 ^{a,A}

* media ± SD para n=4. Para cada característica estudiada: letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento de RC a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en un tratamiento de RC a distintos tiempos (p<0,05).

Desde el punto de vista legal, las muestras de quesos estudiados cumplen con lo establecido por el Código Alimentario Argentino (Capítulo VIII - Artículo 605 - (Res Conj. SPyRS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006)) para “quesos de pasta blanda” en lo que respecta al contenido humedad de y para “quesos semigrasos” según su contenido de grasas.

En los quesos de pasta blanda el agua es el principal componente ya que representa más de la mitad de su porcentaje en peso. El contenido de humedad influye en el pH final del queso porque determina la cantidad de lactosa residual/fermentable en el queso; y la historia del pH, a su vez, influye en la humedad del queso al afectar la velocidad y el grado de sinéresis. La humedad final del queso también está fuertemente influenciada por las condiciones de envasado y maduración (Hill y

Kethireddipalli, 2012). Como se observa en la **Tabla IV.3.2**, el contenido de humedad de las muestras de queso fue constante durante la maduración y no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los quesos recubiertos y el control. Los quesos se mantuvieron envasados al vacío durante toda la maduración a 7 °C, por lo cual es esperable que no existiera una variación en el contenido de humedad debido a que este tipo de envasado no permite el desuerado o pérdida de humedad. Al contrario de los hallazgos de Nottagh y col. (2020) que observaron diferencias significativas, donde los quesos blandos recubiertos con Q presentaron mayor porcentaje de humedad que el control. Estas diferencias se atribuyeron al hecho de que el recubrimiento comestible a base de Q por su naturaleza hidrofílica, podría absorber moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno y/o reducir la difusión de agua desde el interior (Jafarizadeh Malmiri y col., 2011).

Los valores del contenido de grasa en materia seca tanto para las muestras recubiertas como para las de control fueron constantes durante la maduración, en concordancia con lo informado por Nottagh y col. (2020) para quesos recubiertos con Q. Ramos y col. (2012) informaron que el contenido de grasa en un queso regional recubierto utilizando aislado de suero en polvo fue constante durante el almacenamiento mientras que Yilmaz y Dagdemir (2012) informaron resultados contrarios sobre el queso Kashar recubierto con cera de abejas, donde el contenido de grasa de la muestra de control fue mayor que el de las muestras recubiertas. El contenido de grasa resultó menor con respecto al definido por el CAA para quesos cremosos y al informado en la tabla nutricional del queso estudiado, esto puede atribuirse a un bajo contenido de grasa en la leche de partida utilizada como materia prima (Ertekin y col., 2023).

Los estudios realizados durante los últimos años han demostrado que los quesos son potencialmente buenas fuentes de proteínas y péptidos bioactivos. Parte de estas proteínas y péptidos provienen de la propia leche, pero la mayoría de ellos se obtienen durante la elaboración del queso (Mushtaq y col., 2015). Hoy en día, se sabe que el nivel de su formación durante el procesamiento del queso está determinado por numerosos factores, incluidas las condiciones del tratamiento térmico de la leche y las condiciones de maduración del queso (tipo y actividad de los agentes proteolíticos,

condiciones y duración del proceso de maduración) (Barac y col., 2019). El contenido de proteína fue constante durante todo el período de maduración (**Tabla IV.3.2**). Esto se atribuye al hecho que durante la maduración la caseína se descompone en péptidos y aminoácidos más pequeños por proteólisis, por lo que el contenido total de nitrógeno se mantiene invariable (Hettinga y Lettink, 2018).

IV.3.2. Caracterización del color y aspecto de los quesos de pasta blanda

El color del queso puede ser muy variable a lo largo del proceso de maduración y depende de varios factores diferentes, incluido el tipo de leche, las operaciones de procesamiento y las condiciones de maduración (Kongo y Malcata, 2016). En la **Figura IV.3.1** se puede observar el aspecto de las muestras de quesos en los días 0, 10 y 20 de maduración desde la aplicación del RC. A simple vista, se puede ver que las muestras de quesos en el día 0 presentaron un aspecto característico de los quesos sin madurar, con un color blanquecino y una superficie brillante debido a la reciente aplicación de los RC. Las muestras de quesos qAF y qQA-AF presentaron una leve tonalidad amarilla, aportada por el color característico del AF, por ellos resultaba un parámetro importante a medir con miras a su aceptabilidad. Durante el proceso de maduración, tanto al día 10 como 20 no se observaron diferencias a simple vista entre las muestras de quesos control y las que poseen los diferentes tratamientos. En todos los casos el aspecto fue el característico de los quesos de pasta blanda, con una superficie y coloración homogénea en todas sus caras.

Se realizó la caracterización del color de los quesos mediante el método instrumental y se obtuvieron los valores para los parámetros L, a* y b*, los cuales se representaron en la **Figura IV.3.2**. La coordenada L (**Figura IV.3.2 A**) indica la luminosidad de la muestra. El qControl, correspondiente al queso fresco sin RC, presentó un valor de L igual a $90,02 \pm 0,33$, cercano al reportado para el requesón $L = 88,40$ (Yasin y Shalaby, 2013) y un queso de pasta blanda $L = 92,60$ (Guiné y col., 2017). La disminución en los valores de L durante la maduración se asocia a la concentración de los componentes del queso (Chudy y col., 2020), sin embargo, al ser un queso de pasta blanda envasado al vacío no existe una disminución en la humedad que provoque dicha concentración. En este

sentido, todas las muestras de quesos con tratamiento presentaron valores de L similares a todos los tiempos estudiados. Estos valores son cercanos a 100 (blanco), lo que indica que son muestras con claros y con alta luminosidad.

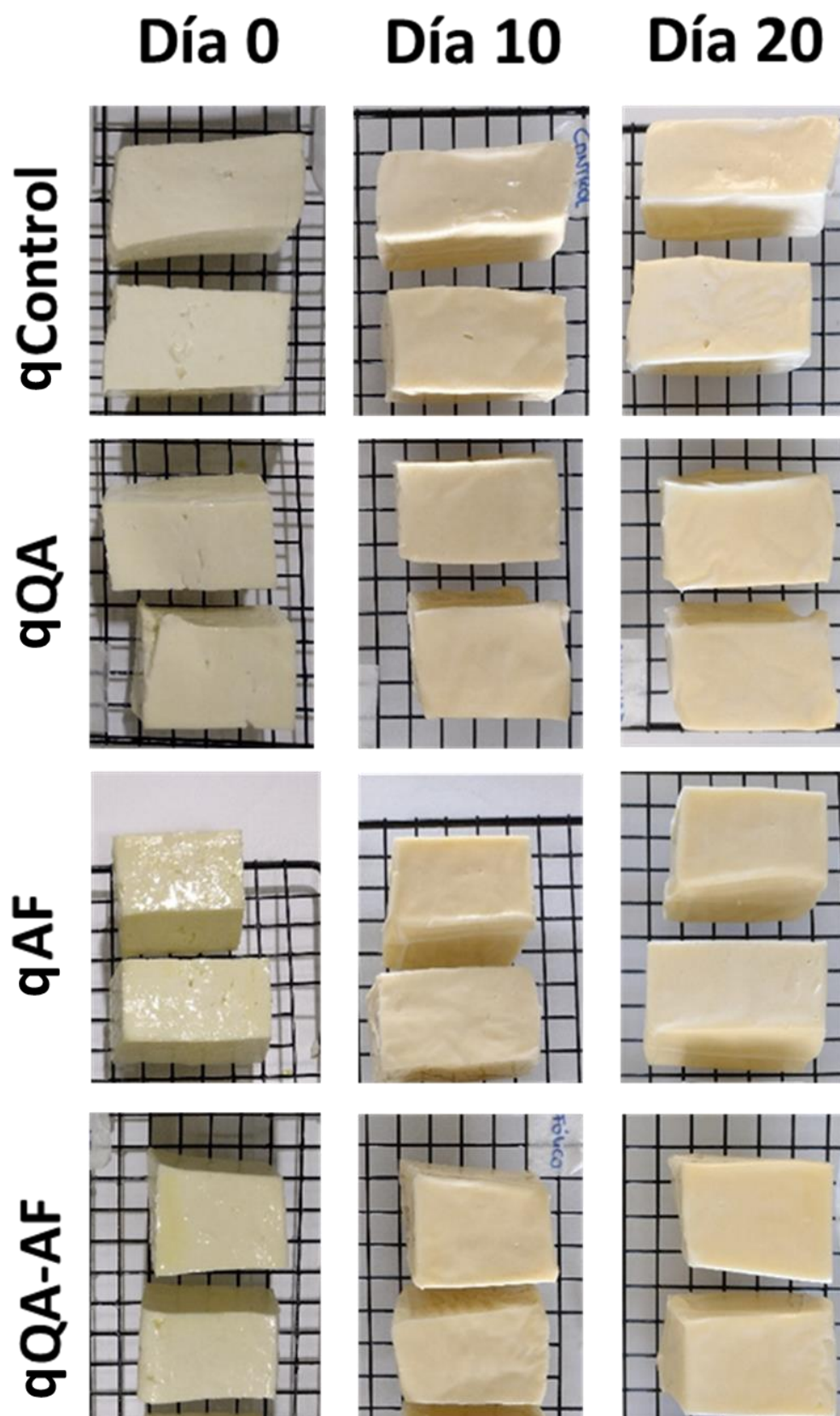


Figura IV.3.1. Aspecto de los quesos en los tiempos 0, 10 y 20 días, con los diferentes tratamientos (qControl, qQA, qAF y qQA-AF).

La **Figura IV.3.2 A** presenta los valores de la coordenada de color a^* para las muestras de queso analizadas. El qControl presentó un valor de a^* de $-1,87 \pm 0,11$, el cual es similar al reportado por Guiné y col. (2017) para un queso de pasta blanda, siendo en ese caso $a^* = -1,51$. Ambos valores son negativos, indicando la presencia de una coloración verdosa en lugar de rojiza. La misma tendencia hacia el color verde fue observada en las muestras con cualesquiera de los tratamientos.

El gráfico mostrado en la (**Figura IV.3.2 C**) se refiere a los valores de la coordenada b^* , que siempre es positiva, por lo que corresponde al predominio de una coloración amarilla en lugar de azul (que sería para valores negativos de b^*). El qControl presentó un valor de b^* igual a $22,23 \pm 2,69$. Otros autores reportan valores de b^* menores, entre 14 y 16 para requesón y queso de pasta blanda, respectivamente (Guiné y col., 2017; Yasin y Shalaby, 2013). Esto probablemente se deba a las diferencias en el tipo de queso en sí, el tipo de leche utilizada y las operaciones de procesamiento. Aunque la leche utilizada en todos los casos fue de vaca, esta puede variar según la raza, edad o alimentación de los animales. En cuanto a los diferentes RC aplicados en las muestras de quesos, los resultados muestran que los valores de la coordenada b^* son en todos los casos positivos, es decir, predomina la coloración amarilla en detrimento de la azul.

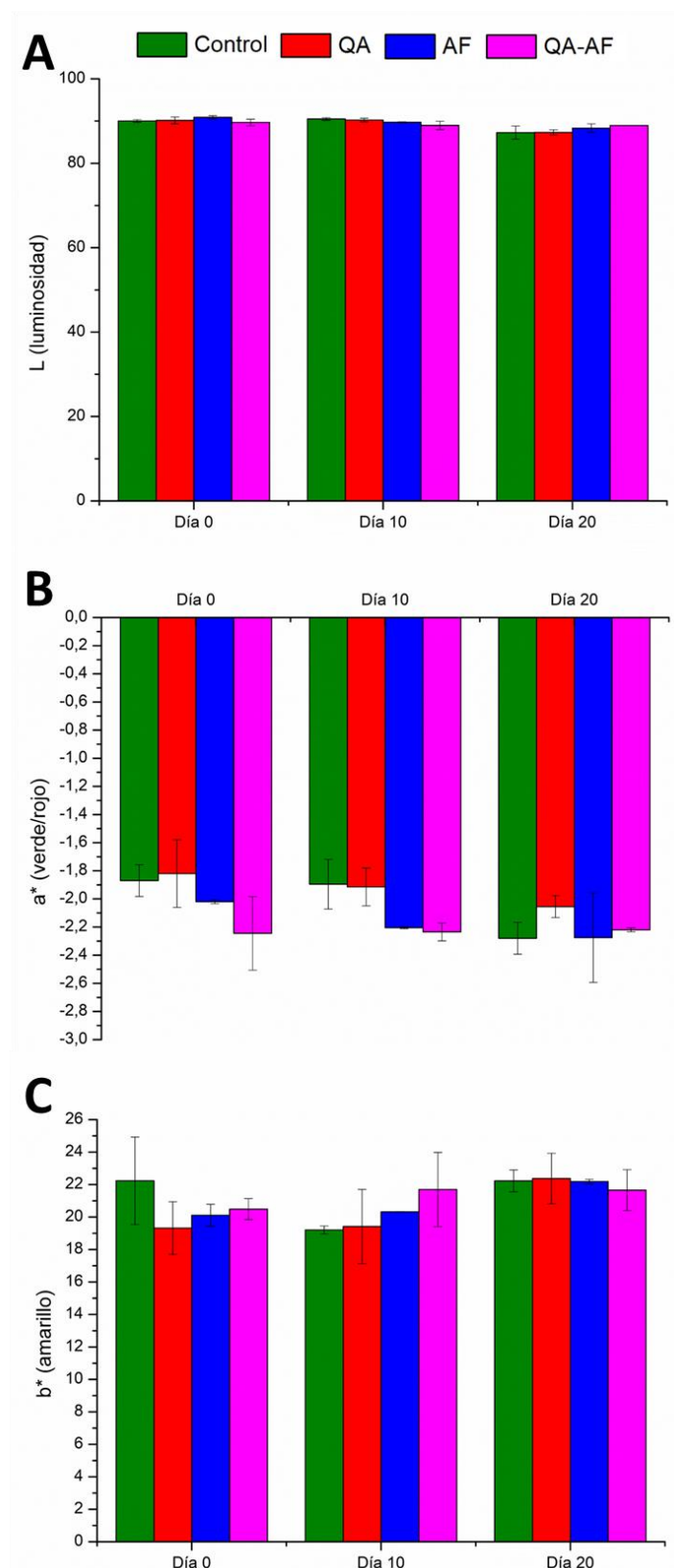


Figura IV.3.2. (A) Coordenada L, **(B)** coordenada a*, **(C)** coordenada b*; para las diferentes muestras de quesos a los tiempos de maduración 0, 10 y 20 días. Se representa la media $\pm$ desvío estándar para n=3.

La **Figura IV.3.3** muestra los valores de la variable croma para todas las muestras evaluadas. Los valores más altos de croma indican una mayor pureza del color, mientras que los valores más bajos (cerca de cero) corresponden a colores más tenues. Los resultados obtenidos indican que la pureza de los colores fue similar en todos los tiempos y en todos los tratamientos, estando de acuerdo con los resultados obtenidos para los parámetros anteriores.

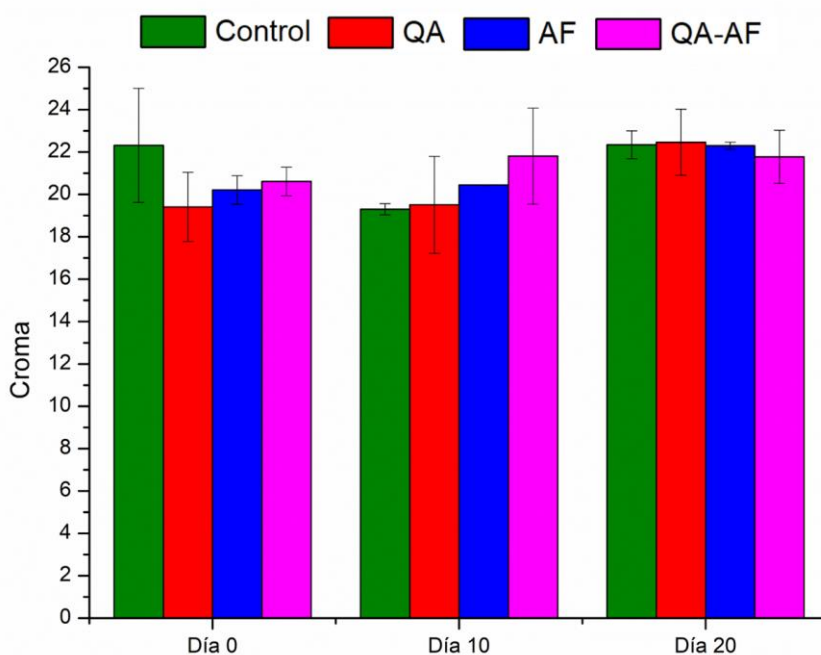


Figura IV.3.3. Variable croma para las diferentes muestras de quesos a los tiempos de maduración 0, 10 y 20 días. Se representa la media $\pm$ desvío estándar para $n=3$.

En lo respectivo al tono de color, el ángulo de tono (h°) varió entre 0° y 360° , denotando colores variables como se indica en la **Figura IV.3.4**. Para valores de tonalidad cercanos a 90° el tono es ámbar, mientras que para ángulos de tonalidad en torno a 120° el tono es amarillo. Los resultados obtenidos para la tonalidad (**Figura IV.3.5**) concuerdan con los observados para b^* , es decir, situándose las muestras en las zonas amarilla/ámbar en todos los casos presentando valores de h° entre 94 y 96° .

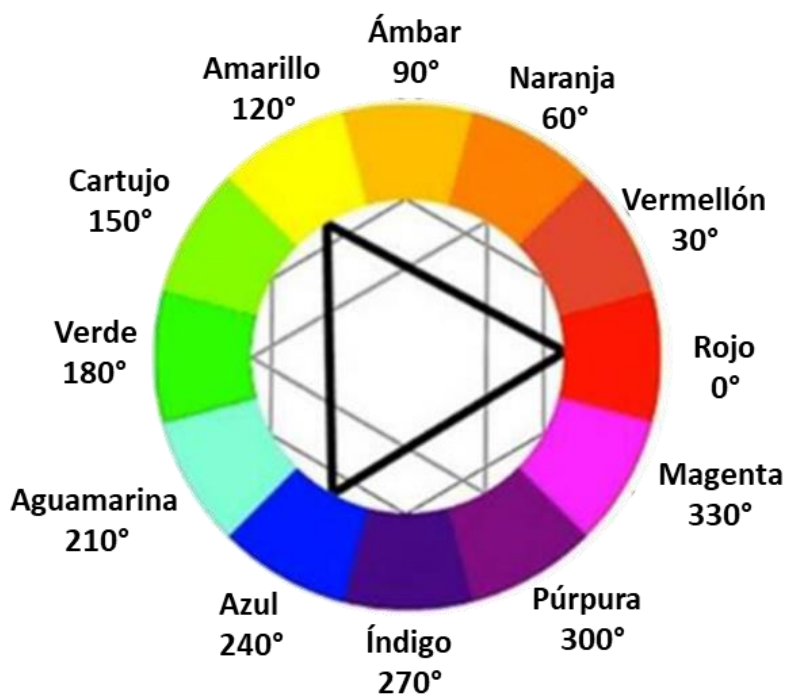


Figura IV.3.4. Carta de colores de ángulo h° . Tomado y modificado de Guiné y col. (2017).

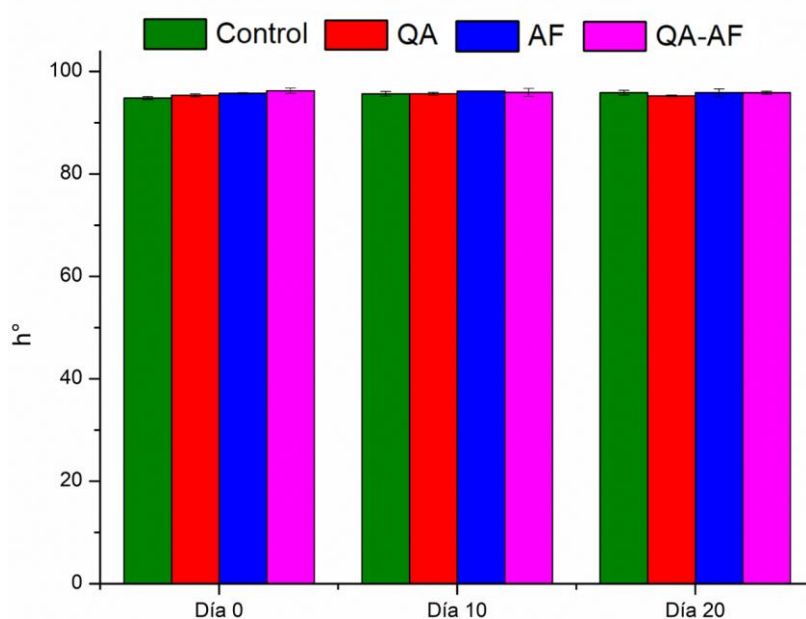


Figura IV.3.5. Ángulo de tono (h°) para las diferentes muestras de quesos a los tiempos de maduración 0, 10 y 20 días. Se representa la media $\pm$ desvío estándar para $n=3$.

En lo que respecta a la diferencia entre muestras con respecto al control en cada uno de los días de maduración estudiados, se representa el valor ΔE para cada muestra en la **Figura IV.3.6**.

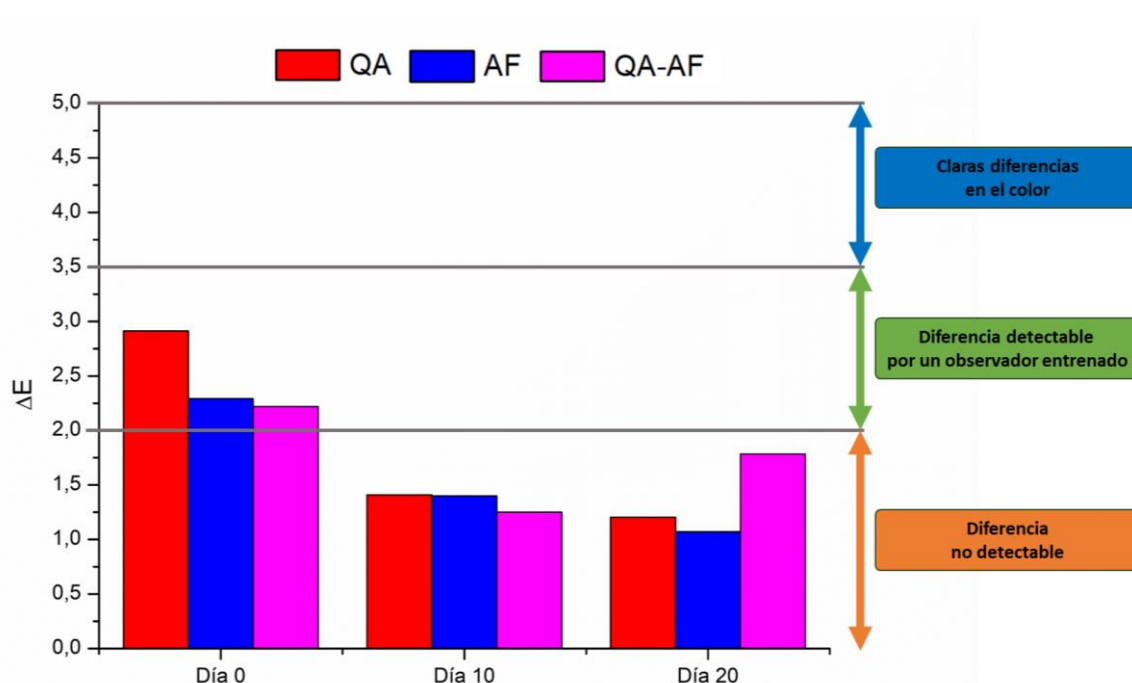


Figura IV.3.6. Diferencia de color total de los quesos con tratamientos con respecto al control para cada día de maduración.

En correspondencia con los vistos en las fotografías tomadas, los quesos tratados en el día 0 presentaron una diferencia en los parámetros de color que pueden ser detectados por un observador entrenado. En los días 10 y 20, no existió una diferencia detectable en lo respectivo al color con respecto al control en ese mismo día de maduración. Estos resultados son prometedores, ya que quienes consuman el queso con RC no detectarían una diferencia en el color y aspecto con respecto al mismo queso tradicional, sin recubrimiento, al momento de la compra para ingesta.

IV.3.3. Cuantificación de BAL en las muestras de quesos de pasta blanda

Las BAL utilizadas como cultivo iniciador juegan un papel importante durante la elaboración y maduración del queso. Estas bacterias convierten la lactosa en ácido

láctico, por lo que se asegura el pH correcto para la coagulación, en el prensado y en la cuajada final, así como también lleva al queso al contenido de humedad final. Además, las BAL producen ácido acético, etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas, exopolisacáridos y varias enzimas. Estos compuestos son importantes para mejorar la vida útil y la seguridad microbiana, mejorar la textura y contribuir al perfil sensorial agradable del producto final (Ustunol, Özer y Akdemir-Evrendilek, 2014). El grupo de BAL utilizadas en cultivos iniciadores o *starters* suele incluir principalmente bacterias de las especies *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc spp.* entre las mesófilas y *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus helveticus*, entre las termófilas (Coelho, Malcata y Silva, 2022). Las BAL presentes en quesos que no provienen de *starters* (NSBAL) son un grupo heterogéneo, que incluye principalmente lactobacilos mesófilos y también enterococos, pediococos y *Leuconostoc* (Gobbetti y col., 2015).

En la **Tabla IV.3.4** se presenta el recuento de BAL en unidades logarítmicas utilizando medio MRS incubado a 30 °C durante 72 h para los diferentes tratamientos y a diferentes días de maduración.

Tabla IV.3.4. Recuento de BAL en medio MRS.

Recuento de BAL en MRS ($\log_{10}$ UFC/g de queso)			
Queso	Día 0	Día 10	Día 20
qControl	4,51 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	4,79 $\pm$ 0,26 ^{a,A}	6,42 $\pm$ 0,02 ^{a,B}
qQA	4,57 $\pm$ 0,10 ^{a,A}	5,50 $\pm$ 0,13 ^{b,B}	6,29 $\pm$ 0,10 ^{ab,C}
qAF	4,35 $\pm$ 0,15 ^{a,A}	4,94 $\pm$ 0,09 ^{a,B}	6,27 $\pm$ 0,11 ^{ab,C}
qQA-AF	4,37 $\pm$ 0,10 ^{a,A}	4,96 $\pm$ 0,17 ^{a,B}	5,80 $\pm$ 0,51 ^{b,C}

* media $\pm$ SD para n=4. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento de RC a un mismo tiempo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en un tratamiento de RC a distintos tiempos (p<0,05).

Las BAL provenientes de *starters* son altas en número, alrededor de 10^8 - 10^9 ufc/g en el queso, al comienzo de la maduración (Franciosi y col., 2008). Los *starters* utilizados en la producción de los quesos estudiados en esta Tesis están compuestos por las siguientes BAL: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*, estos microorganismos son termófilos. Según la técnica oficial para la cuantificación de BAL (ISO 15124:1998), la temperatura de incubación

del medio de cultivo debe ser de 30 °C, por lo tanto, y secundariamente se da el crecimiento de microorganismos mesófilos. Por lo tanto, el recuento obtenido en la **Tabla IV.3.4** correspondería a las NSBAL contenidas en los quesos estudiados. Se puede observar que en el día 0 no hubo diferencia en las unidades logarítmicas de los quesos entre tratamientos. Al día 10 se vio un mayor crecimiento de BAL mesófilas en los quesos con tratamiento con respecto al día 0, sin embargo, no se observaron diferencias significativas del control con respecto a los quesos tratados con AF y QA-AF. Las muestras de quesos tratado con QA tuvo el mayor crecimiento microbiano. Ramos y col. (2012) estudiaron el crecimiento de *Lactobacillus spp.* en MRS incubados a 37 °C en quesos tratados con un recubrimiento de aislado de proteína de suero y observaron que en los primeros 10 días los quesos tratados contuvieron $7,43 \pm 0,34 \log_{10}$ UFC/g de queso, mientras que los quesos control presentaron un recuento menor, de $6,81 \pm 0,20 \log_{10}$ UFC/g de queso. Este comportamiento se mantuvo a lo largo de todo el proceso de maduración y no hubo un cambio significativo en el número de UFC durante esta etapa. Sin embargo, en los quesos estudiados en esta Tesis se observó un incremento de 1 - 1,5 unidades logarítmicas entre el día 10 y 20 de maduración, discrepando de lo informado por otros autores, que indican que las BAL disminuyen regularmente en dos o más ciclos logarítmicos durante la maduración (Franciosi y col., 2008). Pasquali y col. (2022) cuantificaron las BAL mesófilas en muestras de quesos de pasta blanda a los 15 días de maduración y obtuvieron valores de aproximadamente $5,25 \log_{10}$ UFC/g de queso, en concordancia con lo esperado para ese día en los quesos estudiados en esta Tesis por ser un valor intermedio entre los recuentos obtenidos en los días 10 y 20. Al momento de obtener el producto listo para consumir, no existieron diferencias significativas en el número de UFC de BAL mesófilas por g de queso entre los tratamientos estudiados.

IV.3.4. Estudio de la textura en las muestras de los quesos de pasta blanda

Como se mencionó previamente, el proceso de maduración del queso es muy complejo e implica cambios microbiológicos y bioquímicos en la cuajada que dan como resultado el sabor y la textura característicos. Durante la maduración ocurren tres

eventos principales; glucólisis, proteólisis y lipólisis. La proteólisis es el más complejo de los tres eventos primarios durante la maduración del queso y posiblemente el más importante para el desarrollo de la textura. El queso tiene como componentes principales a las proteínas, las grasas y el agua. Cada uno de estos puede influir en la textura final del queso, pero la textura principal del queso es la proteína caseína. La textura del queso cambia durante la maduración debido a la hidrólisis de la micela de caseína por proteólisis y cambios en la capacidad de la cuajada para retener agua y cambios en el pH (Hettinga y Lettink, 2018). Los glóbulos de grasa alteran y debilitan físicamente la matriz de caseína, por lo que un mayor contenido de grasa suaviza la textura del queso (Hill y Kethireddipalli, 2012). Analizar la textura instrumental de los quesos ayuda en parte a entender cómo evoluciona o cambia, o incluso analizar posibles factores externos que pueden afectar a su textura. Tener datos fiables de textura instrumental, que puedan correlacionarse con la textura percibida por los consumidores, es fundamental para el desarrollo y la innovación o detección de problemas industriales (Villalba, 2017).

Parte de las propiedades fundamentales de los alimentos destinados al consumo oral se basan en su comportamiento mecánico cuando se mastica, y en la reología de la matriz para formar un bolo (Selway y Stokes, 2014). Entre los varios métodos disponibles para la caracterización de propiedades específicas de los alimentos, existe el uso de texturómetros para realizar el análisis de perfil de textura o simplemente TPA, por sus siglas en inglés, que se basa en una doble prueba de compresión mecánica en dos tiempos para proporcionar información sobre cómo se comportan las muestras cuando se mastican (Paredes y col., 2022). La principal ventaja del TPA es que se pueden obtener parámetros con un doble ciclo de compresión (Peleg, 2019). La caracterización de la textura en quesos incluye generalmente parámetros como dureza, adhesividad y elasticidad y las combinaciones de ellos podrían dar lugar a información de otras, ya que en conjunto permiten el cálculo de otros parámetros, como la gomosidad y la masticabilidad. Civille y Szczesniak (2007) mencionan que la gomosidad y la masticabilidad son parámetros excluyentes, el primero es para alimentos semisólidos, mientras que el segundo para sólidos; por consiguiente, en función a la naturaleza del queso de pasta blanda se debería considerar la gomosidad.

Los resultados de estos ensayos realizados sobre las muestras de quesos de pasta blanda ya madurados, en el día 20, se muestran en la **Tabla IV.3.5**.

Tabla IV.3.5. Efecto de diferentes RC sobre los parámetros texturales de los quesos de pasta blanda.

Queso	Dureza (N)*	Elasticidad*	Cohesividad*	Resiliencia*	Adhesividad (N.s)*
qControl	15,90 ±2,56 ^a	0,63 ±0,08 ^a	0,54 ±0,06 ^a	0,20 ±0,03 ^a	0,64 ±0,16 ^a
qQA	11,02 ±3,71 ^b	0,60 ±0,02 ^a	0,51 ±0,06 ^a	0,19 ±0,03 ^a	0,70 ±0,32 ^a
qAF	18,43 ±4,93 ^{ac}	0,58 ±0,06 ^a	0,52 ±0,07 ^a	0,18 ±0,04 ^a	0,83 ±0,31 ^a
qQA-AF	20,12 ±3,20 ^c	0,61 ±0,04 ^a	0,53 ±0,06 ^a	0,20 ±0,04 ^a	0,58 ±0,40 ^a

*media ± desvío estándar, n>7.

Las magnitudes de los parámetros texturales obtenidos del TPA son influenciados por variables al momento de las mediciones como la tasa de deformación, es entonces necesario que las mediciones sean realizadas bajo condiciones estandarizadas con el fin de obtener información objetiva (Peleg, 2019). Además, existe una influencia en la geometría de la muestra, sean cubos o cilindros, y el tamaño de la misma (Araujo y col., 2021), por lo tanto puede no ser certera la comparación de los parámetros texturales entre trabajos de investigación. Lo que puede asegurarse como datos objetivos es la comparación frente al queso control, ejecutando las mediciones de los parámetros bajo condiciones estandarizadas ya que son influenciados por variables al momento de las mediciones (Araujo y col., 2021; Peleg, 2019).

El parámetro de dureza obtenido para los quesos estudiados en esta Tesis es el único que presenta diferencias significativas con alguno de los tratamientos de RC aplicados, sin embargo, la desviación estándar es elevada. En términos del modelo de ruta de descomposición, la dureza podría representar el grado de estructura inicial del alimento, sin embargo no se encontraron correlaciones significativas entre la dureza y los parámetros de procesamiento oral (Wee y col., 2018). Araujo y col. (2021) obtuvieron valores de dureza de entre 2 y 4,8 N para quesos de pasta blanda, usando un porcentaje de compresión del 50%, siendo estos valores menores respecto a los obtenidos. Todos los demás parámetros texturales no presentaron una diferencia significativa en los quesos tratados con los RC con respecto al control. La elasticidad, la cohesividad, la gomosis y la resiliencia parecen determinar qué tan rápido se reduce el grado de estructura al plano de la deglución. El contenido de proteínas de los

alimentos se asoció con la elasticidad y la masticabilidad o gomosidad, lo que puede ayudar a reducir aún más las tasas de consumo. El contenido de agua y la adhesividad se asociaron con el nivel de lubricación necesario antes de alcanzar el plano de deglución (Wee y col., 2018). Sakr (2017) estudió los parámetros texturales en quesos de cabra de pasta blanda y obtuvo valores de cohesividad ($0,43 \pm 0,01$), resiliencia ($0,23 \pm 0,004$) y elasticidad ($0,84 \pm 0,02$), similares a los obtenidos en esta Tesis. Estos resultados indican que la aplicación de RC basados en QA y AF no provocan una modificación en los parámetros texturales.

IV.3.5. Estudio de la bioaccesibilidad del AF

El queso es una matriz compleja que consta de altos niveles de nutrientes y proteínas, grasas y minerales digeribles. Las condiciones digestivas orales, gástricas e intestinales humanas *in vivo* tienen un impacto importante en el perfil de hidrólisis de proteínas y grasas. Los perfiles de proteínas y polipéptidos y así como el de grasas y ácidos grasos evolucionan constantemente durante estos procesos digestivos (Žolnere y col., 2019). La bioaccesibilidad se expresa como un porcentaje de la cantidad del constituyente liberado en el tracto intestinal con respecto a su contenido total (Shahidi y Peng, 2018). Los alimentos se digieren a través de una cascada de procesos químicos y físicos, produciendo o liberando componentes potencialmente bioaccesibles (Alegría, García-Llatas y Cilla, 2015).

Se evaluó la bioaccesibilidad del AF en los quesos y se representó como el porcentaje de retención de AF en los digeridos de los quesos con RC (**Figura IV.3.7**). Este porcentaje se calculó como la diferencia entre el contenido inicial de AF aplicado a través de los RC y el contenido de AF en el digerido, referido a la masa de queso. El contenido inicial se correspondió con el 100 % de la ingesta diaria de AF, es decir, 400 µg de AF por porción de queso de 30 g.

Las muestras de quesos blandos madurados pueden contener hasta 100 µg de folatos por cada 100 g de queso (Forssén y col., 2000). En los digeridos: control*, qControl* y qQA* no se detectó AF, posiblemente debido a que el contenido de AF se encontró por debajo del límite de detección de la técnica microbiológica utilizada.

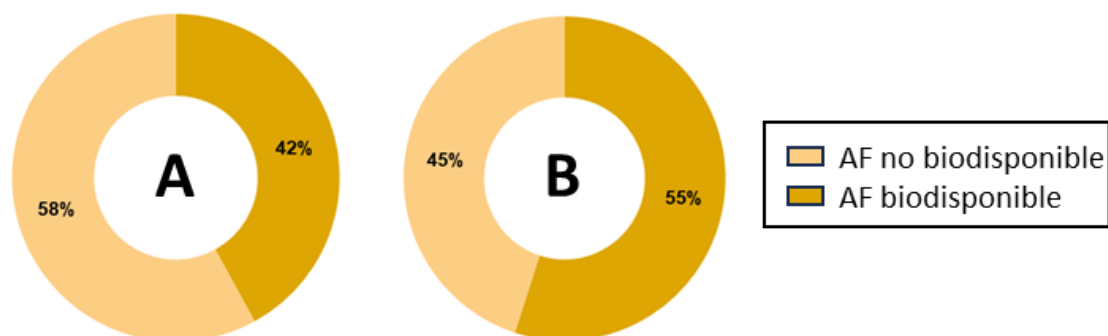


Figura IV.3.7. Porcentaje de retención de AF en digeridos de queso con RC.
(A) qAF* (B) qQA-AF*.

En los digeridos qAF* y qQA-AF* se pudo cuantificar el AF bioaccesible. Se determinó que cuando el AF se encontró protegido por la matriz de QA en el RC, el porcentaje de retención luego de la digestión *in vitro* fue mayor respecto al recubrimiento formulado con AF solo. Corfield y col. (2020) obtuvieron resultados similares en términos del incremento en la bioaccesibilidad del AF cuando este fue protegido con una matriz de aislado de proteínas de suero y luego aplicado en láminas de fruta. No obstante, aunque el QA generó una protección para el AF, esta fue parcial, dado que el 45 % del AF restante probablemente se deterioró durante el proceso de maduración o pudo haber sido utilizado por las BAL como nutriente. Para que un alimento pueda ser definido como “alimento fortificado” debe contener entre un 20 y 100 % de la ingesta diaria de la vitamina hidrosoluble por porción. A este respecto, los quesos con RC de AF y QA-AF podrían ser encuadrados en el grupo de los alimentos fortificados por contener 42 y 55 % de la IDR de AF bioaccesible por porción.

IV.3.6. Evaluación de la actividad antioxidante de los digeridos de quesos

Las propiedades antioxidantes de los digeridos de quesos qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF* y el control* fueron evaluadas por dos diferentes métodos: ABTS^{•+} y FRAP. Estos resultados se muestran en la **Figura IV.3.8**.

Los principales contribuyentes a la capacidad de eliminación de radicales de los quesos son las proteínas (caseínas y proteínas del suero), péptidos y aminoácidos libres liberados durante la maduración (Silva y col., 2012). La capacidad antioxidante de

proteínas y péptidos depende de numerosos factores, incluida la posición de los aminoácidos en la secuencia de proteínas, su estructura física, hidrofobicidad y su peso molecular (Pates y col., 2011). Medina-Navarro y col. (2010) enfatizaron que la integridad molecular estructural es la cuestión más importante para las proteínas si funcionan como antioxidantes. Aunque se encontró que el efecto de los fenoles, los antioxidantes liposolubles y otros componentes menores de la leche es insignificante (Mario Cuchillo y col., 2010), no se puede despreciar su impacto sobre la actividad antioxidante del queso. La mayoría de los estudios realizados en este campo se relacionaron únicamente con las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de los quesos. En estudios previos se demostró que también la capacidad antioxidante de las fracciones insolubles que representan la mayoría de las proteínas del queso (alrededor del 80 % de las proteínas totales) (Barac y col., 2019).

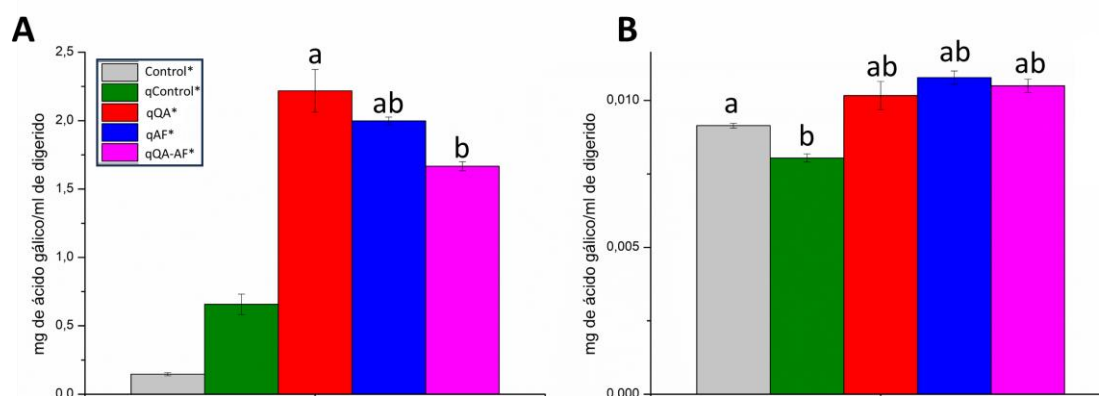


Figura IV.3.8. (A) Actividad antirradicalaria evaluada por ABTS **(B)** Actividad antioxidante evaluada por FRAP para los digeridos de muestras de queso con RC: Control*, qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF*. Media $\pm$ SD. n = 3.

Con respecto a los resultados obtenidos por la técnica del radical ABTS (**Figura IV.3.8. A**), se observó que existe una baja actividad antirradicalaria en los digeridos control* y qControl*. En el caso de los digeridos de las muestras de quesos con RC, el que mayor actividad presentó fue el qQA* mientras que los qAF* y qQA-AF*, presentaron una actividad relativamente menor, no presentaron diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, la actividad antioxidante evaluada por la metodología FRAP indicó que no hubo diferencia entre el Control* y las muestras de los quesos con cualesquiera de los tratamientos de RC, sin embargo, la muestra qControl* presentó una menor

actividad antioxidante. Debido a diferencias metodológicas y datos insuficientes sobre la capacidad de antioxidante en quesos y los digeridos obtenidos de digestiones simuladas *in vitro*, es difícil realizar comparaciones entre estudios con otros tipos de quesos. Los valores de mg de AG obtenidos mediante esta técnica son significativamente menores con respecto a los determinados por ABTS, en concordancia con lo determinado en la **Sección II.3.3** para los sistemas simples y mixtos de QA y AF. Si bien los valores de actividad antioxidante expresada como AG por ml de digerido son diferentes debido a la diferencia en el fundamento de cada una de las técnicas, los resultados son prometedores.

IV.3.7. Evaluación de citotoxicidad de digeridos en Caco-2

Previo a los estudios de absorción de algún bioactivo a través de una monocapa de células del epitelio intestinal, se debe realizar una prueba, mediante el empleo de ensayos de viabilidad celular, que permita evaluar la integridad de la membrana celular. Estos ensayos pueden realizarse por diferentes técnicas, en esta Tesis se realizó el ensayo de reducción de MTT. Si bien lo ideal sería realizar evaluaciones de biocompatibilidad realizados en monocapas polarizadas, muchos estudios prueban rutinariamente los efectos de digeridos con una fracción de bioactivos bioaccesible (**Sección IV.3.5**), en células Caco-2 indiferenciadas en formatos de placas de 96 *wells*. Los datos de viabilidad obtenidos aquí manifiestan la potencialidad de conformar monocapas polarizadas de Caco-2 cultivadas en insertos (Kondrashina y col., 2023) y encarar ensayos *in vitro* de biodisponibilidad en el futuro cercano,.

La dilución de los digeridos de alimentos en medios de cultivo celular conteniendo SFB es una opción para diluir las sales biliares e inactivar las enzimas digestivas, como la tripsina, que pueden tener un efecto tóxico, e incluso provocar la ruptura de la monocapa. Además, la inclusión de un control o blanco de digerido en todos los estudios añade claridad, ya que podría determinar si el efecto observado es debido al alimento o a los reactivos utilizados durante la digestión. Las sales biliares no sólo son necesarias para la digestión gastrointestinal sino también para la absorción de lípidos y componentes lipófilos por lo que deben incluirse en experimentos de absorción de alimentos. Sin embargo, la toxicidad de las sales biliares para las células Caco-2 es bien

conocida. Brayden y Stuetgen (2021) proporcionaron evidencia de que la integridad de la barrera de las monocapas de Caco-2 no se daña con una concentración de glicodesoxicolato inferior a 0,1 mM. Por lo tanto, según la concentración de glicodesoxicolato en la bilis bovina (Hu y col., 2018) y el efecto protector de los fosfolípidos, un punto de partida recomendado es una dilución 1 en 10 del digerido.

En este sentido, se realizó un estudio previo, dosis – respuesta, determinando la viabilidad celular de células Caco-2 con concentraciones de digerido control y agua en medio DMEM 10% SFB y los resultados se muestran en la **Figura IV.3.9**.

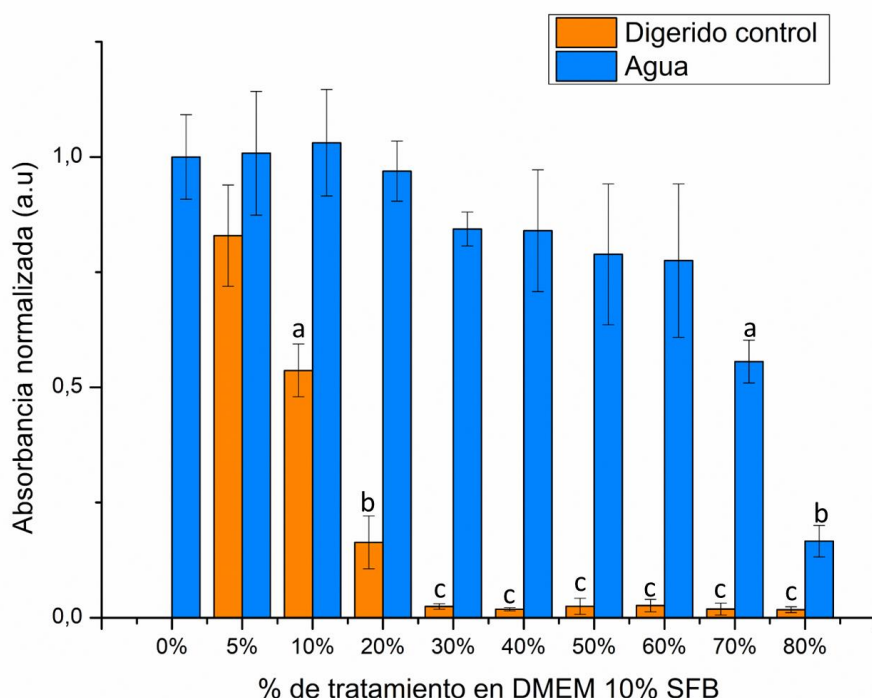


Figura IV.3.9. Curva dosis - respuesta de viabilidad celular en células Caco-2 con porcentajes entre 5 y 80 % de digerido control* y agua estéril, obtenida mediante el ensayo de MTT. Media $\pm$ desvío estándar, n=3.

En primer lugar, se analizó el efecto de la dilución del medio de cultivo utilizando agua estéril en los mismos porcentajes estudiados para digerido control*. No se observó una disminución en la viabilidad celular atribuida a la dilución de los nutrientes que aporta el medio de cultivo a las células, por lo menos hasta una dilución al 70% del medio con agua. En el caso del digerido control*, se determinó que no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular únicamente en la dilución al 5 %,

donde la viabilidad disminuyó hasta aproximadamente un 80%. A partir del 10 % de dilución se observaron diferencias significativas con respecto al control y se vio que el agregado de un 10 % de digerido control* disminuyó la viabilidad en el mismo porcentaje que una dilución del 70 % con agua estéril. A este respecto, Jilani y col. (2020) informaron una disminución menor en la proliferación de células Caco-2 no diferenciadas (3-15%) cuando se trataron con digerido control diluidos 1 en 3, 1 en 4 y 1 en 9 v/v con DMEM más 10% SFB durante 2-24 h. Esto coincide con lo informado por Cilla y col. (2009), quienes observaron una disminución del 12 % en la viabilidad de las células Caco-2 indiferenciadas, al ponerlas en contacto con digerido control diluido al 2, 5 y 7,5 % v/v en Eagles Minimal Essential Media (EMEM) más 10 % SFB, en comparación con células no tratadas en los medios solos.

El criterio para seleccionar una dilución de medio fue el equilibrio entre viabilidad celular de $\geq 85-90\%$ y al mismo tiempo, lograr la detección, e idealmente la cuantificación del componente alimentario/derivado de interés. Las principales desventajas de la dilución con medios no sólo diluye el componente alimentario de interés, lo que dificulta su seguimiento, sino que también añade complejidad al digerido simplemente por su composición nutricional inherente (Kondrashina y col., 2023).

Con el objetivo de determinar si existe un efecto de los digeridos en la viabilidad de las células Caco-2 dado por la aplicación de los RC, se seleccionaron tres diluciones de digerido blanco, con el criterio de que cada uno de estos porcentajes:

1. No provocó una mayor mortalidad con respecto al control ($p < 0,05$), viabilidad $\geq 85-90\%$ (Kondrashina y col., 2023).
2. Provocó una diferencia significativa de mayor mortalidad con respecto al control, presentando una mortalidad leve.
3. Provocó una diferencia significativa de mayor mortalidad con respecto al control, presentando una mortalidad pronunciada.

En este marco, se seleccionaron las diluciones 2, 10 y 30 % que cumplieron con los criterios mencionados y sin un efecto dado por la dilución del medio de cultivo. Se estudiaron los siguientes digeridos: qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF* y el control*. Se

realizó el ensayo de viabilidad celular MTT y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.3.10**.

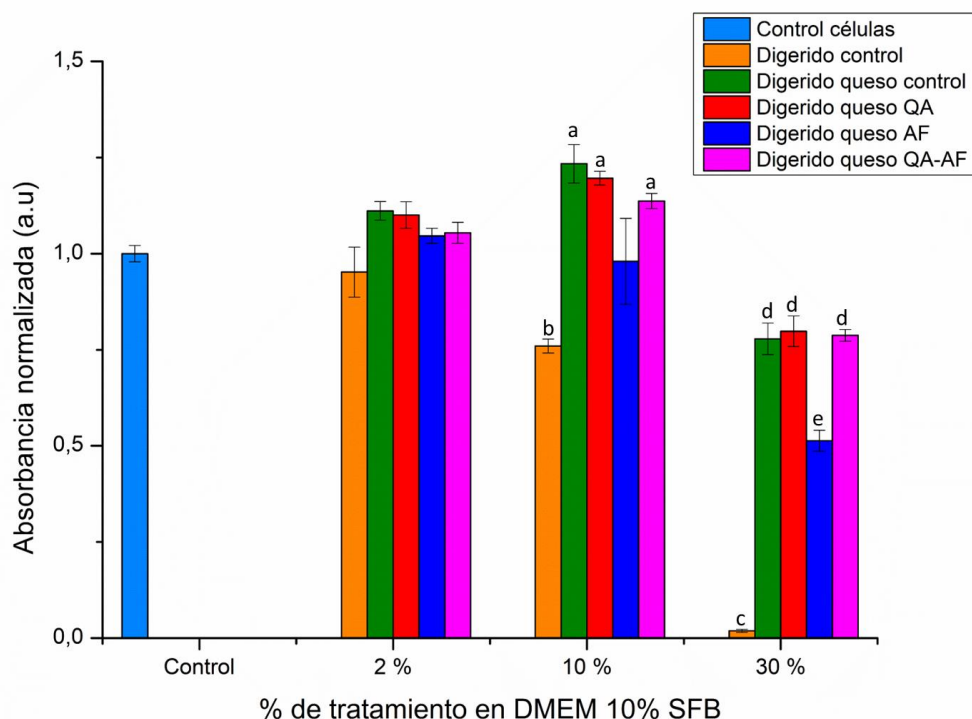


Figura IV.3.10. Viabilidad celular en células Caco-2 con porcentajes de digeridos entre 5 y 80 %, qControl*, qQA*, qAF*, qQA-AF* y el control*, obtenida mediante el ensayo de MTT. Media $\pm$ desvío estándar, n=3.

Se puede observar que cuando se agregó un 2 % de cualesquiera de los digeridos no existieron diferencias significativas con respecto al control de células (0% tratamiento). Por otra parte, con el agregado de un 10 % de tratamiento se obtuvo que el digerido control* disminuyó la viabilidad de las Caco-2 hasta un 75 % mientras que los digeridos de las muestras de quesos con RC mostraron un incremento en la viabilidad celular, siendo este significativo para los qControl*, qQA* y qQA-AF*. El qAF* no presentó diferencias significativas respecto al control de células. Esta mejora en la viabilidad celular puede deberse a que el queso es un alimento con un alto contenido nutricional. Durante la digestión se produce lipólisis y proteólisis, por lo tanto, las proteínas y grasas se vuelven menos complejas y podrían haber sido utilizadas por las células como nutrientes. Para el tratamiento al 30 %, la presencia de queso en los digeridos compensó el efecto citotóxico debido a las sales biliares y enzimas que podrían haber

quedado activas en el digerido. Los alimentos pueden contribuir significativamente a la toxicidad de los digeridos, necesiéndose mayores diluciones al momento de realizar los ensayos de transporte, aunque la viabilidad celular se vio disminuida hasta valores equivalentes al control* al 10 %. Ejemplo en la literatura científica enumeran resultados diversos. Las emulsiones digeridas mediante digestión simulada *in vitro* que contenían 7% de aceite de canola y 5 mg/mL de extracto supercrítico de romero fueron tóxicas para las células Caco-2 no diferenciadas, lo que requirió una dilución sustancial de 1 en 61 con DMEM 10 % SFB antes de proceder a los experimentos de monocapa con Caco-2 (Arranz y col., 2017). En otro estudio se recolectaron micelas ricas en β -caroteno después de la digestión *in vitro* y se trataron monocapas de Caco-2, con 14 días de cultivo, durante 4 h con esta fase micelar acuosa diluida en DMEM 20 % y SFB%. La viabilidad celular fue similar a la del medio de control con un factor de dilución de 1/4 (Corte-Real y col., 2014).

Estos resultados son alentadores, ya que indicarían que para los ensayos de transporte y biodisponibilidad podría agregarse un 10 % de los digeridos, de forma tal que la dilución del bioactivo de interés, en nuestro caso el AF, se diluiría únicamente 10 veces. Por lo tanto, sería posible la cuantificación del bioactivo transportado a través de la monocapa.

IV.4. Conclusiones parciales

- Las características fisicoquímicas y composicionales de las muestras de quesos de pasta blanda no se vieron modificadas por la aplicación de un RC a base de QA y AF a lo largo del proceso de maduración.
- Los RC a base de QA y AF no aportaron diferencias en la textura ni en el color de las muestras de los quesos madurados.
- El comportamiento del crecimiento de las BAL no se vio influenciado por los RC.
- Se realizó la técnica de digestión simulada *in vitro* de las muestras de queso y se obtuvieron los sobrenadantes digeridos para su estudio.
- Fue posible diseñar un recubrimiento comestible a base de QA y AF a los fines de fortificar un queso de pasta blanda tipo cremoso con la vitamina. La bioaccesibilidad de la vitamina fue incrementada con la protección dada por la matriz de QA.
- Los digeridos de las muestras de queso obtenidos por digestión simulada *in vitro* presentaron actividad antioxidante y un efecto positivo en la viabilidad de células del epitelio intestinal (Caco-2), en una concentración del 10 %. Se sienta con esto las bases para encarar los estudios de biodisponibilidad.
- En comparación con los métodos de preservación tradicionales, como el envasado al vacío, el envasado en atmósfera modificada, los recubrimientos *vía coating* a base del biopolímero quitosano, el cual es natural biodegradable y no tóxico, tienen buenas propiedades en cuanto a los principales criterios que podrían impactar en la aceptabilidad del consumidor (texturales, visuales y de color).
- Lo definitorio es someter estas muestras de quesos con RC al escrutinio de un panel entrenado en quesos. Sin embargo, queda por definir que el Q sea incorporado como aditivo en el CAA.
- Este sistema podría ser empleado para entrapar otros compuestos bioactivos que requieran protección de agentes injuriantes, y/o como vehiculizante, a los fines de fortificar/enriquecer quesos.

Conclusiones generales

- Esta Tesis fue desarrollada y fundamentada en tres perspectivas principales. En primer lugar, los resultados de este trabajo pretenden contribuir al conocimiento del potencial tecnológico del Q actualmente desaprovechado, generando alternativas que posibiliten el agregado de valor y reducción de la carga contaminante. En segunda instancia, desde la ciencia básica, el poder aportar al conocimiento de aspectos fisicoquímicos y moleculares del proceso de interacción entre el QA y el AF, para la protección, la vehiculización y la mejora en la bioaccesibilidad de la vitamina. En tercer lugar, el estudio del comportamiento funcional de los sistemas de QA y AF en sistemas dispersos O/W y en recubrimientos comestibles aplicados en una matriz alimentaria, como queso de pasta blanda.
- Desde el punto de vista de la economía circular y aprovechamiento, el gran volumen de carga orgánica obtenida del incipiente sector productivo de pesca de crustáceos ofrece nuevas oportunidades para el análisis de la cadena productiva bajo el enfoque de tecnología limpia. En este marco, la producción de Q a partir de estos desechos, desde el diagnóstico de producción, procesos adoptados y generación de residuos, permite a la vez, contribuir con sugerencias de nuevos productos como los sistemas mixtos aquí generados, con el objetivo de minimizar el impacto ambiental y colaborar para incrementar el interés de los potenciales productores y sus ingresos.
- El Q tiene un gran potencial en la industria alimentaria por presentar propiedades favorables en cuestiones tecno-funcionales, tales como actividad interfacial, función espesante, uso como recubrimiento o *film* comestible, y la potencialidad de actuar como vehículo o *carrier* para compuestos bioactivos. Además, los alimentos que contienen Q como *carrier* de bioactivos podrían tener mejores propiedades vinculadas a su función biológica. Aunque este desecho puede estar altamente integrado en la nutrición humana, son subproductos infravalorados. Justamente, el uso de Q es prometedor porque es un producto seguro para el consumo y biocompatible, pueden utilizarse para generar nuevos productos de aplicación en alimentos, salud, cosmética,

productos farmacéuticos. Sin embargo, resta su aprobación e incorporación en el CCA.

- Además, esta Tesis pretende contribuir al diseño de nuevas matrices alimentarias funcionales que contengan compuestos bioactivos, un tema que está en auge a nivel mundial. La utilización eficaz de compuestos bioactivos puede garantizar que los alimentos funcionales contribuyan positivamente a la salud de los consumidores. Actualmente, los compuestos bioactivos son de gran interés para la investigación científica, los desarrolladores de productos y los consumidores debido a sus destacadas propiedades para la salud humana, como los antioxidantes asociados con el retraso del envejecimiento, la mejora de la actividad física, las propiedades anticancerígenas y los potenciadores de la vitalidad corporal. Sin embargo, muchos compuestos bioactivos presentan baja hidrosolubilidad o lipisolubilidad y son sensibles a la temperatura, el pH, el oxígeno, la luz y la degradación por enzimas en el cuerpo después de la ingestión, lo que resulta en una bioaccesibilidad y biodisponibilidad deficientes, lo cual limita la eficiencia en su utilización. Por ello, proteger compuestos bioactivos como el AF, combinándolo con macromoléculas para garantizar o mejorar su eficiencia ha sido la motivación de este trabajo, ya sea para el diseño de ingredientes, la fortificación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimenticios. En este sentido, un enfoque de uso frecuente para superar las pérdidas mencionadas para el AF es el nanocomplejamiento/ encapsulación/entrampamiento de este con macromoléculas como el Q. Estos sistemas mixtos se han formado mediante interacciones débiles, interacciones electrostáticas y puente de hidrógeno, dadas entre el AF y el Q, que actúa como *carrier*. La existencia de uniones débiles es esencial a la hora de diseñar *carriers* para bioactivos, ya que esta clase de uniones garantiza su liberación en sitios específicos para su absorción. La matriz continente a base de Q puede proteger y asegurar la bioaccesibilidad de los bioactivos, constituyendo ingredientes alimentarios. Más específicamente, en esta Tesis se ha propuesto y diseñado un sistema mixto basado Q y AF, otorgándole estabilidad a la vitamina.

- Basado en los resultados obtenidos, los sistemas mixtos fueron capaces de contener, entrapar y proteger eficientemente al AF. La aplicación de técnicas pertinentes, tanto experimentales como *in silico*, han permitido analizar los sitios de interacción más probables entre la vitamina y el biopolímero. También se ha abordado el uso de diversas técnicas apropiadas para caracterizar los sistemas. Primero, se determinó si la molécula bioactiva se une al Q, evaluado por espectroscopía UV-Vis y se utilizó la técnica de *docking* molecular para predecir dónde se encuentra el compuesto bioactivo que queda atrapado y cómo se une al Q. Segundo, la caracterización estructural de los sistemas mixtos deshidratados fue realizada por FTIR, difracción de rayos X y técnicas de microscopía, como SEM y AFM. Tercero, se determinó el impacto de los sistemas mixtos en actividad antioxidante y la viabilidad celular en células del epitelio intestinal.
- En general, diferentes tipos de compuestos bioactivos pueden ser sensible a las condiciones ambientales, restringiendo en consecuencia su aplicación en desarrollo de alimentos. El desarrollo de estos sistemas mixtos ofrece un método para superar estas desventajas, se ha mencionado que los complejos generados bien podrían ser ingredientes. Las aplicaciones de ingredientes a base de Q como el aquí generado, podría incluir matrices lácteas como postres, yogures y quesos, aderezos basados en emulsiones, bebidas para deportistas y nutritivas, etc. Los resultados plasmados en esta Tesis indican que las Q tienen propiedades inherentes que lo hacen un excelente candidato para la protección y vehiculación de bioactivos diversos. Se requiere mayor investigación para profundizar en la comprensión del sistema de encapsulación a base de Q con AF y otros bioactivos.
- En términos de bioaccesibilidad, las etapas de la digestión simulada *in vitro* ensayadas (oral, estomacal e intestinal) muestran que los sistemas mixtos resisten los diferentes microambientes, los que quedan definidos por su diferente pH (de 3 a 7) y diferentes tipos de enzimas (amilasas, lipasas, pepsina, proteasas). Basado en diferentes compuestos bioactivos y requisitos

funcionales, sería posible idear un sistema inteligente sensible a la boca, sensible a las enzimas y sensible al pH para su liberación. Estudios de estabilidad, vida útil, tanto de los sistemas mixtos QA-AF como de los productos a los que fueran añadidos, deben ser considerados.

- Si el producto alimentario desarrollado con estos sistemas mixtos fuera un sistema disperso, esta Tesis ofrece un verdadero punto de partida. Desde lo básico, se ofrece una perspectiva sobre la formación y estabilidad de las películas superficiales (interfase A/W y O/W). El QA presentó características interfaciales favorables para la estabilización de sistemas nanoemulsionados, siendo usado como estabilizante y como espesante a la vez. Los sistemas mixtos Q-AF resultarían también adecuados para generar nano y microemulsiones estables.
- En cuanto a la utilización de los sistemas mixtos como RC aplicados en matrices lácteas, como el queso de pasta blanda, se demostró que no tienen un impacto en sus características composicionales, fisicoquímicas, microbiológicas ni texturales. Además, se pudo establecer una alternativa para fortificar este tipo de queso con la AF, pudiendo constituir un verdadero alimento funcional. Mediante la digestión simulada *in vitro* se pudo demostrar la mejora en la bioaccesibilidad del AF cuando se encontró en una matriz de QA, así como también sus propiedades antioxidantes y de promoción de la viabilidad celular.
- Como perspectiva futura, los resultados volcados en esta Tesis ofrecen la posibilidad de seguir las investigaciones con aplicaciones de estos sistemas mixtos en otras matrices alimentarias, bien lácteos o de aderezos basados en emulsiones. También sería pertinente determinar la biodisponibilidad de la vitamina en los sistemas mixtos QA-AF y en las matrices continentes mediante protocolos adecuados usando la línea celular Caco-2. Incluso sería adecuado realizar estudios sensoriales y de estabilidad en el almacenamiento.

Bibliografía

- Abd El-Hack, M. E. *et al.* (2020) 'Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review', *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, pp. 2726–2744. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153.
- Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2017) 'Nanoemulsions as edible coatings', *Current Opinion in Food Science*, 15, pp. 43–49. doi: 10.1016/j.cofs.2017.06.002.
- Ahire, J. J. *et al.* (2013) 'Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6', *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), pp. 26–34. doi: 10.1007/s13197-011-0244-0.
- Alam, M. N., Bristi, N. J. and Rafiquzzaman, M. (2013) 'Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity', *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), pp. 143–152. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G. and Cilla, A. (2015) 'The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models', *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, pp. 1–327. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4.
- Almeida, A. C. *et al.* (2020) 'Layer-by-layer films based on catechol-modified polysaccharides produced by dip- and spin-coating onto different substrates', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 108(4), pp. 1412–1427. doi: 10.1002/jbm.b.34489.
- Alvares Delfino, V. D. *et al.* (2007) 'Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients', *Nutrition*, 23(3), pp. 242–247. doi: 10.1016/j.nut.2007.01.002.
- Álvarez Gómez, J. M. and Rodríguez Patino, J. M. (2006) 'Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β -lactoglobulin', *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(22), pp. 7510–7519. doi: 10.1021/ie060924g.
- Alves, A. C. and Tavares, G. M. (2019) 'Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities?', *Food Hydrocolloids*, 97(December 2018), p. 105171. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.06.016.
- Alves, N. M. *et al.* (2010) 'Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces', *Small*, 6(20), pp. 2208–2220. doi: 10.1002/smll.201000233.
- Amiji, M. M. (1995) 'Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution', *Carbohydrate Polymers*, 26(3), pp. 211–213. doi: 10.1016/0144-8617(94)00095-B.
- Anraku, M. *et al.* (2018) 'Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies', *Carbohydrate Polymers*, 199(March), pp. 141–149. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.016.
- Anton, N. and Vandamme, T. F. (2009) 'The universality of low-energy nano-emulsification', *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1–2), pp. 142–147. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.05.014.
- Apak, R. *et al.* (2016) 'Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification,

physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), pp. 997–1027. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739.

Aranaz, I. et al. (2021) 'Chitosan: An overview of its properties and applications', *Polymers*, 13(19). doi: 10.3390/polym13193256.

Araujo, A. P. V. et al. (2021) 'Texture profile analysis of trade mantecoso cheese', *Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology*, 2021-July, pp. 1–9. doi: 10.18687/LACCEI2021.1.1.149.

Arbia, W. et al. (2013) 'Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review Wassila', *Food Technol. Biotechnol*, 51(1), pp. 12–25.

Ariyaprakai, S., Hu, X. and Tran, M. T. (2019) 'Spontaneous Formation of Flavor Oil Emulsions by Using Sucrose Esters and Emulsion Stability Study', *Food Biophysics*, 14(1), pp. 41–48. doi: 10.1007/s11483-018-9555-2.

Árnadóttir, Þ. Ý. (2013) *Nano-laminated Fish Oil Droplets : Influence of Chitosan Charge Density on Emulsion Stability Nano-laminated Fish Oil Droplets : Influence of Chitosan Charge Density on Emulsion Stability*.

Assadpour, E. and Jafari, S. M. (2018) *Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications, Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-814130-4.00003-8.

Assadpour, E., Jafari, S. M. and Maghsoudlou, Y. (2017) 'Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules', *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, pp. 238–247. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023.

Assanelli, D. et al. (2004) 'Folic acid and Vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial-infarction patients', *Pharmacological Research*, 49(1), pp. 79–84. doi: 10.1016/j.phrs.2003.07.009.

Assis, O. B. G. et al. (2002) 'AFM characterization of chitosan self-assembled films', *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 51(7), pp. 633–638. doi: 10.1080/714975800.

Babak, V. et al. (1999) 'Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 147(1–2), pp. 139–148. doi: 10.1016/S0927-7757(98)00752-3.

Babak, V. G., Auzely, R. and Rinaudo, M. (2007) 'Effect of electrolyte concentration on the dynamic surface tension and dilational viscoelasticity of adsorption layers of chitosan and dodecyl chitosan', *Journal of Physical Chemistry B*, 111(32), pp. 9519–9529. doi: 10.1021/jp0718653.

Baeza, R. et al. (2005) 'Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface', *Food Hydrocolloids*, 19(2), pp. 239–248. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.002.

- Baibarac, M. *et al.* (2019) 'Optical properties of folic acid in phosphate buffer solutions: the influence of pH and UV irradiation on the UV-VIS absorption spectra and photoluminescence', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-50721-z.
- Barac, M. *et al.* (2019) 'The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses', *Foods*, 8(3), pp. 1–18. doi: 10.3390/foods8030094.
- Barraza-Garza, G. *et al.* (2013) 'La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos', *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), pp. 125–148.
- Beagan, A. M. *et al.* (2016) 'Poly(2-hydroxyethylmethacrylate-graft-folic acid), synthesis, solubility enhancement, and release dynamic of folic acid', *Designed Monomers and Polymers*, 19(6), pp. 479–495. doi: 10.1080/15685551.2016.1169376.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) 'The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of " Antioxidant Power "': The FRAP Assay', 76, pp. 70–76.
- Biviano, M. D. *et al.* (2020) 'Interfacial Properties of Chitosan in Interfacial Shear and Capsule Compression', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(42), pp. 48084–48092. doi: 10.1021/acsami.0c11781.
- Del Blanco, L. F. *et al.* (1999) 'Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties', *Colloid and Polymer Science*, 277(11), pp. 1087–1092. doi: 10.1007/s003960050495.
- Bottegoni, G., Cavalli, A. and Recanatini, M. (2006) 'A comparative study on the application of hierarchical-agglomerative clustering approaches to organize outputs of reiterated docking runs', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(2), pp. 852–862. doi: 10.1021/ci050141q.
- Bourassa, P., Hasni, I. and Tajmir-Riahi, H. A. (2011a) 'Folic acid complexes with human and bovine serum albumins', *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.094.
- Bourassa, P., Hasni, I. and Tajmir-Riahi, H. A. (2011b) 'Folic acid complexes with human and bovine serum albumins', *Food Chemistry*, 129(3), pp. 1148–1155. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.094.
- Brodkorb, A. *et al.* (2019) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14(4), pp. 991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- Buosi, F. S. *et al.* (2020) 'Resveratrol encapsulation in high molecular weight chitosan-based nanogels for applications in ocular treatments: Impact on human ARPE-19 culture cells', *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, pp. 804–821. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.234.
- Bustos, L. F. *et al.* (2022) 'Molecular interactions involved in the complexation process between buffalo whey proteins concentrate and folic acid', *Food Chemistry*, 396(September 2021). doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133734.
- Butnaru, E. *et al.* (2019) 'Chitosan-based bionanocomposite films prepared by

emulsion technique for food preservation', *Materials*, 12(3), pp. 1–17. doi: 10.3390/ma12030373.

CAA (2006) 'Código Alimentario Argentino', in. Argentina.

Camino, N. A. *et al.* (2009) 'Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air-water and oil-water interfaces', *Food Hydrocolloids*, 23(8), pp. 2359–2368. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.06.013.

Camino, N. A., Pérez, O. E. and Pilosof, A. M. R. (2009) 'Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound', *Food Hydrocolloids*, 23(4), pp. 1089–1095. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.08.015.

Cano Embuena, A. I. *et al.* (2017) 'Quality of goat's milk cheese as affected by coating with edible chitosan-essential oil films', *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), pp. 68–76. doi: 10.1111/1471-0307.12306.

Carbonaro, M. and Nucara, A. (2010) 'Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region', *Amino Acids*, 38(3), pp. 679–690. doi: 10.1007/s00726-009-0274-3.

Carbonell-Capella, J. M. *et al.* (2014) 'Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), pp. 155–171. doi: 10.1111/1541-4337.12049.

Carpineti, L. *et al.* (2014) 'β-Lactoglobulin-carboxymethylcellulose core-shell microparticles: Construction, characterization and isolation', *Journal of Food Engineering*, 131, pp. 65–74. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.01.018.

Carrasco-Sandoval, J. *et al.* (2023) 'Impact of molecular weight and deacetylation degree of chitosan on the bioaccessibility of quercetin encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles', *International Journal of Biological Macromolecules*, 242(May). doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124876.

Carrera, C. *et al.* (2023) 'Effect of deacetylation degree and molecular weight on surface properties of chitosan obtained from biowastes', *Food Hydrocolloids*, 137(June 2022), p. 108383. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108383.

Chakrabarti, G., Zhou, X. and McClane, B. A. (2003) 'Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin', *Infection and Immunity*, 71(8), pp. 4260–4270. doi: 10.1128/IAI.71.8.4260-4270.2003.

Chang, M. *et al.* (2008) 'Empirical Entropic Contributions in Computational Docking: Evaluation in APS Reductase Complexes', *J Comput Chem*, 29(11), pp. 1753–1761. doi: 10.1002/jcc.20936.

Chang, S. H. *et al.* (2015) 'pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan', *Carbohydrate Polymers*, 134, pp. 74–81. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.072.

Chanphai, P., Konka, V. and Tajmir-Riahi, H. A. (2017) 'Folic acid–chitosan conjugation: A new drug delivery tool', *Journal of Molecular Liquids*, 238, pp. 155–159. doi:

10.1016/j.molliq.2017.04.132.

Chen, R. H. *et al.* (2009) 'Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths', *Carbohydrate Polymers*, 78(4), pp. 902–907. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.07.027.

Chen, X. *et al.* (2017) 'Base-catalysed, one-step mechanochemical conversion of chitin and shrimp shells into low molecular weight chitosan', *Green Chemistry*, 19(12), pp. 2783–2792. doi: 10.1039/c7gc00089h.

Cho, J. *et al.* (2006) 'Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength', *Journal of Food Engineering*, 74(4), pp. 500–515. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047.

Chudy, S. *et al.* (2020) 'Colour of milk and milk products in CIE Lab space', *Medycyna Weterynaryjna*, 76(2), pp. 77–81. doi: 10.21521/mw.6327.

Cicuta, P. (2007) 'Compression and shear surface rheology in spread layers of β -casein and β -lactoglobulin', *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(1), pp. 93–99. doi: 10.1016/j.jcis.2006.12.056.

Civille, G. . and Szczesniak, A. . (2007) 'Guidelines To Training a Texture Profile Panel', *Journal of Texture Studies*, 4(2), pp. 204–223. doi: 10.1111/j.1745-4603.1973.tb00665.x.

Coelho, M. C., Malcata, F. X. and Silva, C. C. G. (2022) *Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions*, *Foods*. doi: 10.3390/foods11152276.

Consortio Regional de Experimentación Agrícola (2022) *Informe Lácteo N°33*. Argentina.

Corfield, R. *et al.* (2020) 'Whey proteins-folic acid complexes: Formation, isolation and bioavailability in a *Lactobacillus casei* model', *Food Structure*, 26(October). doi: 10.1016/j.foostr.2020.100162.

Corfield, R. *et al.* (2023) 'Experimental and modeling approaches applied to the whey proteins and vitamin B9 complexes study', *Food Hydrocolloids*, 142(May). doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108834.

Cosconati, S. *et al.* (2010) 'Virtual screening with AutoDock: Theory and practice', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(6), pp. 597–607. doi: 10.1517/17460441.2010.484460.

Costa, M. J. *et al.* (2018) 'Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges', *Food Research International*, 107(November 2017), pp. 84–92. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.013.

Cui, H. Y. *et al.* (2016) 'Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese', *Journal of Dairy Science*, 99(11), pp. 8598–8606. doi: 10.3168/jds.2016-11658.

D Antonio, P. *et al.* (2012) 'Scale-independent roughness value of cell membranes

studied by means of AFM technique', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(12), pp. 3141–3148. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.08.001.

Debeaufort, F. and Voilley, A. (2009) *Edible Films and Coatings for Food Applications*, *Edible Films and Coatings for Food Applications*. doi: 10.1007/978-0-387-92824-1.

Dettori, A., Floris, M. and Dessì, C. (2020) 'Customer-perceived quality, innovation and tradition: some empirical evidence', *TQM Journal*, 32(6), pp. 1467–1486. doi: 10.1108/TQM-11-2019-0273.

Devezeaux de Lavergne, M., Van de Velde, F. and Stieger, M. (2017) 'Bolus matters: the influence of food oral breakdown on dynamic texture perception', *Food and Function*, 8(2), pp. 464–480. doi: 10.1039/c6fo01005a.

Devi, R. and Dhamodharan, R. (2018) 'Pretreatment in Hot Glycerol for Facile and Green Separation of Chitin from Prawn Shell Waste', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(1), pp. 846–853. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b03195.

Díaz-Montes, E. and Castro-Muñoz, R. (2021) 'Edible films and coatings as food-quality preservers: An overview', *Foods*, 10(2), pp. 1–26. doi: 10.3390/foods10020249.

Dickinson, E. (1998) 'Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions', *Trends in Food Science and Technology*, 9(10), pp. 347–354. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00057-0).

Dickinson, E. (2003) 'Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems', *Food Hydrocolloids*, 17, p. 25. Available at: www.elsevier.com/locate/foodhyd.

Dickinson, E. (2009) 'Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers', *Food Hydrocolloids*, 23(6), pp. 1473–1482. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.08.005.

Disalvo, E. A. *et al.* (2014) 'Structural and thermodynamic properties of water-membrane interphases: Significance for peptide/membrane interactions', *Advances in Colloid and Interface Science*, 211, pp. 17–33. doi: 10.1016/j.cis.2014.05.002.

Dou, T. *et al.* (2019) 'Cellular uptake and transport characteristics of chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers', *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, pp. 791–799. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.168.

Duan, C. *et al.* (2019) 'Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties', *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 4(1), pp. 11–21. doi: 10.21967/jbb.v4i1.189.

Duran, M. *et al.* (2016) *Potential of antimicrobial active packaging 'containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating' to extend shelf life of fresh strawberry*, *Food and Bioproducts Processing*. doi: 10.1016/j.fbp.2016.01.007.

Ebara, S. (2017) 'Nutritional role of folate', *Congenital Anomalies*, 57(5), pp. 138–141. doi: 10.1111/cga.12233.

Elsabee, M. Z. and Abdou, E. S. (2013) 'Chitosan based edible films and coatings: A review', *Materials Science and Engineering C*, 33(4), pp. 1819–1841. doi:

10.1016/j.msec.2013.01.010.

Elsayed, E. A., Sharaf-Eldin, M. A. and Wadaan, M. (2015) 'In vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(11), pp. 4671–4675. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.11.4671.

Ertekin, M. *et al.* (2023) 'Effects of milk types used in Antep cheese production on some cheese organoleptic quality parameters and brine composition during 5-month ripening', *Journal of Food Science*, 88(4), pp. 1445–1465. doi: 10.1111/1750-3841.16519.

Fathima, E. *et al.* (2022) 'Enhanced cellular uptake, transport and oral bioavailability of optimized folic acid-loaded chitosan nanoparticles', *International Journal of Biological Macromolecules*, 208(February), pp. 596–610. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.042.

Felix, M. *et al.* (2019) 'Modelling the non-linear interfacial shear rheology behaviour of chickpea protein-adsorbed complex oil/water layers', *Applied Surface Science*, 469(November 2018), pp. 792–803. doi: 10.1016/j.apsusc.2018.11.074.

Ferraretto, A. *et al.* (2007) 'New methodological approach to induce a differentiation phenotype in Caco-2 cells prior to post-confluence stage', *Anticancer Research*, 27(6 B), pp. 3919–3925.

Fitzpatrick, T. B. *et al.* (2012) 'Vitamin deficiencies in humans: Can plant science help?', *Plant Cell*, 24(2), pp. 395–414. doi: 10.1105/tpc.111.093120.

Franca, E. F. *et al.* (2008) 'Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution', *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(12), pp. 2141–2149. doi: 10.1021/ct8002964.

Franca, E. F., Freitas, L. C. G. and Lins, R. D. (2011) 'Chitosan molecular structure as a function of N-acetylation', *Biopolymers*, 95(7), pp. 448–460. doi: 10.1002/bip.21602.

Frommherz, L. *et al.* (2014) 'Degradation of folic acid in fortified vitamin juices during long term storage', *FOOD CHEMISTRY*, 159, pp. 122–127. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.156.

Ganzevles, R. A. *et al.* (2007) 'Manipulation of adsorption behaviour at liquid interfaces by changing protein– polysaccharide electrostatic interactions', *Food Hydrocolloids*, 21, pp. 195–208.

Gao, H. *et al.* (2021) 'Review of recent advances in the preparation, properties, and applications of high internal phase emulsions', *Trends in Food Science and Technology*, 112(March), pp. 36–49. doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.041.

Gazzali, A. M. *et al.* (2016) 'Stability of folic acid under several parameters', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, pp. 419–430. doi: 10.1016/j.ejps.2016.08.045.

Geng, X., Kwon, O. H. and Jang, J. (2005) 'Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution', *Biomaterials*, 26(27), pp. 5427–5432. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.066.

Gonçalves, C., Ferreira, N. and Lourenço, L. (2021) 'Production of low molecular weight

chitosan and chitooligosaccharides (COS): A review', *Polymers*, 13(15), pp. 1–23. doi: 10.3390/polym13152466.

Gottarelli, G. *et al.* (1994) 'Self-Recognition and Self-Assembly of Folic Acid Salts: Columnar Liquid Crystalline Polymorphism and the Column Growth Process', *Journal of the American Chemical Society*, 116(16), pp. 7064–7071. doi: 10.1021/ja00095a008.

Graham, D. E. and Phillips, M. C. (1979) 'Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation', *Journal of Colloid And Interface Science*, 70(3), pp. 403–414. doi: 10.1016/0021-9797(79)90048-1.

Gribova, V., Auzely-Velty, R. and Picart, C. (2012) 'Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering', *Chemistry of Materials*, 24(5), pp. 854–869. doi: 10.1021/cm2032459.

Griffiths, K. *et al.* (2016) 'Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention', *Diseases*, 4(4), p. 28. doi: 10.3390/diseases4030028.

Guiné, R. P. F. *et al.* (2017) 'Evaluation of Colour in a Newly Developed Food Product: Fresh Cheese with Red Fruits', *Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(7), pp. 108–115. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/319109733>.

Guiné, R. P. F. *et al.* (2021) 'The duality of innovation and food development versus purely traditional foods', *Trends in Food Science and Technology*, 109(January), pp. 16–24. doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.010.

Guinee, T. P. (2007) 'How does NaCl affect cheese composition?', in McSweeney, P. (ed.) *Cheese problems solved*. Abington, Cambridge CB21 6AH, England.

Gulcin, İ. (2020) *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview*, *Archives of Toxicology*. doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.

Gutiérrez-Grijalva, E. P. *et al.* (2016) 'Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility', *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(2), pp. 87–100.

Gutiérrez-Méndez, N. N., Trancoso-Reyes, N. and Leal-Ramos, M. Y. (2013) 'Texture profile analysis of Fresh cheese and Chihuahua cheese using miniature cheese models', *Tecnociencia Chihuahua*, 7(2), pp. 65–74.

Hau Fung Cheung, R. *et al.* (2008) 'Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography', *Journal of Chromatography A*, 1213(1), pp. 93–99. doi: 10.1016/j.chroma.2008.09.098.

Hettinga, K. and Lettink, F. (2018) 'The influence of lactic acid bacteria on the cheese texture during ripening', (September 2018).

Hill, A. R. (2010) 'Section E: Manufacture, Ripening, Process control and Yield Efficiency', in F. S. o. U. o. Guelph (ed.). Guelph, Ontario, Canadá: University of Guelph.

Hill, A. R. and Kethireddipalli, P. (2012) *Dairy Products: Cheese and Yogurt*. Third Edit, *Biochemistry of Foods*. Third Edit. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-091809-9.00008-X.

- Hindsley, P. R. and Ashton Morgan, O. (2022) 'The Role of Cultural Worldviews in Willingness to Pay for Environmental Policy', *Environmental and Resource Economics*, 81(2), pp. 243–269. doi: 10.1007/s10640-021-00622-5.
- Huang, P. *et al.* (2021) 'Effect of pH on the mechanical, interfacial, and emulsification properties of chitosan microgels', *Food Hydrocolloids*, 121(February), p. 106972. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106972.
- Huang, X. N. *et al.* (2019) 'Fabrication and characterization of Pickering High Internal Phase Emulsions (HIPEs) stabilized by chitosan-caseinophosphopeptides nanocomplexes as oral delivery vehicles', *Food Hydrocolloids*, 93(October 2018), pp. 34–45. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.02.005.
- Huq, T. *et al.* (2022) 'Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review', *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 7(2), pp. 85–98. doi: 10.1016/j.jobab.2022.01.002.
- Issahaku, I., Tetteh, I. K. and Tetteh, A. Y. (2023) 'Chitosan and chitosan derivatives: Recent advancements in production and applications in environmental remediation', *Environmental Advances*, 11(November 2022), p. 100351. doi: 10.1016/j.envadv.2023.100351.
- Jafari, S. M. and McClements, D. J. (2017) *Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability*. 1st edn, *Advances in Food and Nutrition Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.12.008.
- Jafarizadeh Malmiri, H. *et al.* (2011) 'Development of an edible coating based on kitosan-glycerol to delay "Berangan" banana (*Musa sapientum* cv. Berangan) ripening process. *International Food Research Journal*.' , 18(3), pp. 989–997.
- Jahn, K. A., Biazik, J. M. and Braet, F. (2011) 'GM1 expression in caco-2 cells: characterisation of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line', *J. Pharmacol. Sci.*, 100, pp. 3751–3762. doi: <https://doi.org/10.1002/jps.22418>.
- Je, H. J. *et al.* (2017) 'Release Properties and Cellular Uptake in Caco-2 Cells of Size-Controlled Chitosan Nanoparticles', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50), pp. 10899–10906. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03627.
- Jiao, Z. *et al.* (2018) 'Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid', *Journal of Microencapsulation*, 35(3), pp. 272–280. doi: 10.1080/02652048.2018.1467509.
- Joergensen, L. *et al.* (2011) 'New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR', *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1–2), pp. 162–168. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.001.
- Johnston, D. E. and Murphy, R. J. (1984) 'Effects of fat content on properties of rennet-induced milk-gels', *Milchwissenschaft*, (39), pp. 585–58.
- Jones, O. G., Decker, E. A. and McClements, D. J. (2010) 'Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation', *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(1), pp. 21–29. doi: 10.1016/j.jcis.2009.12.017.

- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J. and Madura, J. D. (1983) 'Liquid water', *J. Chem. Phys.*, 79, pp. 926–935. doi: <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- Joshi, R. *et al.* (2001) 'Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity.', *Free radical biology & medicine*, 30(12), pp. 1390–9. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00543-3.
- Kaewklin, P. *et al.* (2018) 'Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit', *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, pp. 523–529. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.124.
- Kalaydzhiev, H. *et al.* (2019) 'Stability of sunflower and rapeseed oil-in-water emulsions supplemented with ethanol-treated rapeseed meal protein isolate', *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), pp. 3090–3098. doi: 10.1007/s13197-019-03806-6.
- Kanwal, S. *et al.* (2021) 'Development of chitosan based microencapsulated spray dried powder of tuna fish oil: oil load impact and oxidative stability', *Brazilian Journal of Biology*, 84, pp. 1–8. doi: 10.1590/1519-6984.254010.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N. and Anandharamakrishnan, C. (2017) 'Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), pp. 1435–1450. doi: 10.1080/10408398.2015.1006767.
- Kenawy, E. *et al.* (2019) 'Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications', *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, pp. 440–448. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.191.
- Klinkesorn, U. (2013) 'The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization', *Food Reviews International*, 29(4), pp. 371–393. doi: 10.1080/87559129.2013.818013.
- Knidri, H. El *et al.* (2018) 'International Journal of Biological Macromolecules Extraction , chemical modification and characterization of chitin and chitosan', *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, pp. 1181–1189. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139.
- Kocun, M., Grandbois, M. and Cuccia, L. A. (2011) 'Single molecule atomic force microscopy and force spectroscopy of chitosan', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), pp. 470–476. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.004.
- Kondrashina, A. *et al.* (2023) 'Coupling in vitro food digestion with in vitro epithelial absorption; recommendations for biocompatibility', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), pp. 1–19. doi: 10.1080/10408398.2023.2214628.
- Kongo, J. M. and Malcata, F. X. (2016) 'Cheese: Processing and Sensory Properties', *Food Science Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier.
- Koppolu, B. prasanth *et al.* (2014) 'Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery', *Biomaterials*, 35(14), pp. 4382–4389. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.078.
- Korchagina, E. V. and Philippova, O. E. (2010) 'Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain

length of individual macromolecules', *Biomacromolecules*, 11(12), pp. 3457–3466. doi: 10.1021/bm100990u.

Kotta, S. *et al.* (2012) 'Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs', *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(5), pp. 585–598. doi: 10.1517/17425247.2012.668523.

Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M. and Mucalo, M. R. (2021) 'Chitosan: A review of sources and preparation methods', *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, pp. 85–94. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005.

Kowapradit, J. *et al.* (2010) 'In vitro Permeability Enhancement in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2) Monolayer of Water Soluble Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives', 11(2). doi: 10.1208/s12249-010-9399-7.

Kumar, D. S. (2015) 'Herbal Bioactives and Food Fortification', *Herbal Bioactives and Food Fortification*, (September 2015). doi: 10.1201/b19275.

Lakehal, I. *et al.* (2019) 'Prilling and characterization of hydrogels and derived porous spheres from chitosan solutions with various organic acids', *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, pp. 68–77. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.216.

Leceta, I. *et al.* (2013) 'Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films', *Journal of Food Engineering*, 116(4), pp. 889–899. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022.

Lewandowska, K. (2015) 'Influence of molecular weight on structure and rheological properties of microcrystalline chitosan mixtures', *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, pp. 583–586. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.026.

Li, G. *et al.* (2017) 'Insight into the interaction between chitosan and bovine serum albumin', *Carbohydrate Polymers*, 176(August), pp. 75–82. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.068.

Li, J. M. and Nie, S. P. (2016) 'The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods', *Food Hydrocolloids*, 53(2016), pp. 46–61. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.035.

Li, T. *et al.* (2013) 'Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives', *Food Chemistry*, 138(2–3), pp. 821–826. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.092.

Liao, W. *et al.* (2023) 'Food Hydrocolloids The formation mechanism of multilayer emulsions studied by isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering', *Food Hydrocolloids*, 136(PA), p. 108275. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108275.

Liping, L. *et al.* (2020) 'Study on Preparation of a Chitosan/Vitamin C Complex and Its Properties in Cosmetics', *Natural Product Communications*, 15(10). doi: 10.1177/1934578X20946876.

Loh, J. W., Saunders, M. and Lim, L. Y. (2012) 'Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262(3), pp. 273–282. doi: 10.1016/j.taap.2012.04.037.

Lopera, S. *et al.* (2009) 'Secado Por Aspersión , Utilizando Goma Arábica Y', *Revista De*

La Facultad De Química Farmacéutica, 16, pp. 55–65.

Lopes, I. S. *et al.* (2019) 'Effect of chitosan size on destabilization of oil/water emulsions stabilized by whey protein', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 574(April), pp. 207–214. doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.04.072.

Lotito, V. and Zambelli, T. (2017) 'Approaches to self-assembly of colloidal monolayers: A guide for nanotechnologists', *Advances in Colloid and Interface Science*, 246(April), pp. 217–274. doi: 10.1016/j.cis.2017.04.003.

Lu, J., Xu, X. and Zhao, X. (2022) 'Interfacial rheology of alkali pH-shifted myofibrillar protein at O/W interface and impact of Tween 20 displacement', *Food Hydrocolloids*, 124(PA), p. 107275. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107275.

Lu, Y. *et al.* (2022) 'AFM measurement of roughness, adhesive force and wettability in various rank coal samples from Qinshui and Junggar basin, China', *Fuel*, 317(February). doi: 10.1016/j.fuel.2022.123556.

Luo, Q. *et al.* (2019) 'Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects', *Carbohydrate Polymers*, 209(January), pp. 266–275. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.030.

Luo, S. *et al.* (2017) 'Quantification of total folate, folate species and polyglutamyl folate distribution in winged beans (*Psophocarus tetragonolobus* (L) DC) from different cultivars and growth stages by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry', *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 63(1), pp. 69–80. doi: 10.3177/jnsv.63.69.

Luo, Y. *et al.* (2021) 'Adsorption kinetics and dilatational rheological properties of recombinant Pea Albumin-2 at the oil-water interface', *Food Hydrocolloids*, 120(April), p. 106866. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106866.

MacRitchie, F. (1990) *Chemistry at interfaces*. Edited by A. Press. San Diego.

Madalena, D. *et al.* (2022) 'Emerging challenges in assessing bio-based nanosystems' behaviour under in vitro digestion focused on food applications – A critical view and future perspectives', *Food Research International*, 157(May). doi: 10.1016/j.foodres.2022.111417.

Madziva, H., Kailasapathy, K. and Phillips, M. (2006) 'Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid', *LWT - Food Science and Technology*, 39(2), pp. 146–151. doi: 10.1016/j.lwt.2004.12.015.

Maestro, A. and Gutfreund, P. (2021) 'In situ determination of the structure and composition of Langmuir monolayers at the air/water interface by neutron and X-ray reflectivity and ellipsometry', *Advances in Colloid and Interface Science*, 293, p. 102434. doi: 10.1016/j.cis.2021.102434.

Maleki, G., Woltering, E. J. and Mozafari, M. R. (2022) 'Applications of chitosan-based carrier as an encapsulating agent in food industry', *Trends in Food Science and Technology*, 120(June 2021), pp. 88–99. doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.001.

Manigandan, V. and Karthik, R. (2018) *Chapter 15 - Chitosan Applications in Food*

Industry, Biopolymers for Food Design. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811449-0/00015-3.

March, G. C. and Napper, D. H. (1977) 'The thermodynamic limit to the flocculation stability of sterically stabilized emulsions', *Journal of Colloid And Interface Science*, 61(2), pp. 383–387. doi: 10.1016/0021-9797(77)90402-7.

Marcos, A. (1993) 'Water Activity in Cheese in Relation to Composition, Stability and Safety', *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 439–469. doi: 10.1007/978-1-4615-2650-6_11.

Margoutidis, G. *et al.* (2018) 'Mechanochemical Amorphization of α -Chitin and Conversion into Oligomers of N-Acetyl- d -glucosamine', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(2), pp. 1662–1669. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b02870.

Mario Cuchillo, H. *et al.* (2010) 'Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing', *Journal of Dairy Research*, 77(1), pp. 20–26. doi: 10.1017/S0022029909990161.

Marken, E., Maurstad, G. and Stokke, B. T. (2008) 'Quantitative analysis of atomic force microscopy topographs of biopolymer multilayers: Surface structure and polymer assembly modes', *Thin Solid Films*, 516(21), pp. 7770–7776. doi: 10.1016/j.tsf.2008.05.054.

Martegani, H. (2006) *Elaboración general de quesos: Defectos de los quesos*. Colombia.

Martin, C. *et al.* (2023) 'Acceptability of a sustainable technological innovation applied to traditional soft cheese: Information concerning the benefits for health and the environment can compensate for a lower hedonic appreciation', *Food Quality and Preference*, 104(October 2022). doi: 10.1016/j.foodqual.2022.104753.

Martin, H. *et al.* (2010) 'Quantification of folate in fruits and vegetables: A fluorescence-based homogeneous assay', *Analytical Biochemistry*, 402(2), pp. 137–145. doi: 10.1016/j.ab.2010.03.032.

Martínez-Gallegos, J. F. *et al.* (2011) 'Polyoxyethylene alkyl and nonyl phenol ethers complexation with potato starch', *Food Hydrocolloids*, 25(6), pp. 1563–1571. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.01.010.

Martínez, J. H. *et al.* (2019) 'Food Hydrocolloids Betanin loaded nanocarriers based on quinoa seed 11S globulin . Impact on the protein structure and antioxidant activity', *Food Hydrocolloids*, 87(September 2018), pp. 880–890. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.09.016.

Martinez, M. J. *et al.* (2009) 'Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP)', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(2), pp. 230–237. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.02.006.

Marudova, M. *et al.* (2016) 'Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for buccal administration', *Bulgarian Chemical Communications*, 48, pp. 468–474.

Mason, T. G. *et al.* (2006) 'Nanoemulsions: Formation, structure, and physical

properties', *Journal of Physics Condensed Matter*, 18(41). doi: 10.1088/0953-8984/18/41/R01.

Mastropaolo, D., Camerman, A. and Camerman, N. (1980) 'Folic acid: Crystal structure and implications for enzyme binding', *Science*, 210(4467), pp. 334–336. doi: 10.1126/science.7423195.

Matias, R. *et al.* (2014) 'A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests', *Analytical Methods*, 6(9), pp. 3065–3071. doi: 10.1039/c3ay41874j.

Mayer, S., Weiss, J. and McClements, D. J. (2013) 'Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability', *Journal of Colloid and Interface Science*, 402, pp. 122–130. doi: 10.1016/j.jcis.2013.04.016.

Mazeau, K., Winter, W. T. and Chanzy, H. (1994) 'Molecular and Crystal Structure of a High-Temperature Polymorph of Chitosan from Electron Diffraction Data', *Macromolecules*, 27(26), pp. 7606–7612. doi: 10.1021/ma00104a015.

McClements, D. J. (2007) 'Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), pp. 611–649. doi: 10.1080/10408390701289292.

McClements, D. J. and Gumus, C. E. (2016) 'Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance', *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, pp. 3–26. doi: 10.1016/j.cis.2016.03.002.

McClements, D. J. and Jafari, S. M. (2018) 'Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review', *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, pp. 55–79. doi: 10.1016/j.cis.2017.12.001.

McClements, D. J. and Rao, J. (2011) 'Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), pp. 285–330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558.

McSweeney, P. L. . (2007) *Cheese problems solved*. Edited by P. L. . McSweeney. Abington, Cambridge CB21 6AH, England: Woodhead Publishing Limited.

Medina-Navarro, R. *et al.* (2010) 'Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function', *PLoS ONE*, 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008971.

Mędrzycka, K. and Zwierzykowski, W. (2000) 'Adsorption of alkyl- trimethylammonium bromides at the various interfaces', *Journal of Colloid and Interface Science*, 230, pp. 67–72.

Meng, X. *et al.* (2022) 'A soft Pickering emulsifier made from chitosan and peptides endows stimuli-responsiveness, bioactivity and biocompatibility to emulsion', *Carbohydrate Polymers*, 277(June 2021), p. 118768. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118768.

- Milesi, M. M., Candioti, M. and Hynes, E. (2007) 'Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening', *Lwt*, 40(8), pp. 1427–1433. doi: 10.1016/j.lwt.2006.08.003.
- Miller, R. and Fainerman, V. B. (2001) 'Surfactant Adsorption Layers At Liquid-Fluid Interfaces', *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*, 1, pp. 383–421. doi: 10.1016/b978-012513910-6/50013-x.
- Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus', *Food and Function*, 5(6), pp. 1113–1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.
- Ministerio de Relaciones Exteriores Comercio Internacional y Culto (2023) *Informe sectorial para inversores internacionales. Agro/Industrial Láctea*. Argentina.
- Misra, C. *et al.* (2022) 'Chapter 8 - Biodegradable self-assembled nanocarriers as the drug delivery vehicles', in rashant Kesharwani, K. K. S. (ed.) *Nanoparticle Therapeutics*. Academic Press, pp. 293–325. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820757-4.00007-7>.
- Mitidieri, F. and Wagner, J. (2002) 'Coalescence of O/W emulsiones stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption', *Food Research International*, (35), pp. 547–557.
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M. and El-Sakhawy, M. A. M. (2020) 'Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review', *Carbohydrate Polymers*, 238(March), p. 116178. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116178.
- Mohammed, A. S. Y. *et al.* (2021) 'Encapsulation of folic acid (vitamin B9) into sporopollenin microcapsules: Physico-chemical characterisation, in vitro controlled release and photoprotection study', *Materials Science and Engineering C*, 128(March), p. 112271. doi: 10.1016/j.msec.2021.112271.
- Mohebi, E. and Shahbazi, Y. (2017) 'Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design', *Lwt*, 76, pp. 108–116. doi: 10.1016/j.lwt.2016.10.062.
- Morris, G. M. *et al.* (1998) 'Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function', *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), pp. 1639–1662. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B.
- Motaghian, M. *et al.* (2022) 'Interfacial instabilities in Marangoni-driven spreading of polymer solutions on soap films', *Journal of Colloid and Interface Science*, 612, pp. 261–266. doi: 10.1016/j.jcis.2021.12.168.
- Motkar, G. *et al.* (2012) 'PVAm–PIP/PS composite membrane with high performance for CO₂/N₂ separation', *AIChE Journal*, 59(4), pp. 215–228. doi: 10.1002/aic.
- Mou, J. *et al.* (2020) 'Overview of Waste Valorisation Concepts from a Circular Economy Perspective', *Waste Valorisation*, pp. 1–11. doi: 10.1002/9781119502753.ch1.

- Muhamad Nor, N. *et al.* (2010) 'Improvement of folate biosynthesis by lactic acid bacteria using response surface methodology', *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), pp. 243–250.
- Mukhopadhyay, P. *et al.* (2013) 'Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model', *Materials Science and Engineering C*, 33(1), pp. 376–382. doi: 10.1016/j.msec.2012.09.001.
- Muñoz-Tebar, N. *et al.* (2023) 'Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review', *Polymers*, 15(2). doi: 10.3390/polym15020396.
- Muñoz Ruiz, G. A. and Zuluaga Corrales, H. F. (2017) 'Chitosan, Chitosan Derivatives and their Biomedical Applications', *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, (January). doi: 10.5772/66527.
- Mushtaq, M. *et al.* (2015) 'Himalayan cheese (Kalari/kradi): Effect of different storage temperatures on its physicochemical, microbiological and antioxidant properties', *Lwt*, 63(2), pp. 837–845. doi: 10.1016/j.lwt.2015.04.054.
- National Institute of Health. (2023) *Folate Fact Sheet for Health Professionals*. Available at: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/#en1>.
- Nguyen, C. N. *et al.* (2019) 'Physical absorption of folic acid and chitosan on dihydroartemisinin-loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles via electrostatic interaction for their enhanced uptake and anticancer effect', *Journal of Nanomaterials*, 2019. doi: 10.1155/2019/6808530.
- Nilsen-Nygaard, J. *et al.* (2015) 'Chitosan: Gels and interfacial properties', *Polymers*, 7(3), pp. 552–579. doi: 10.3390/polym7030552.
- Niu, H. *et al.* (2023) 'Multiscale combined techniques for evaluating emulsion stability: A critical review', *Advances in Colloid and Interface Science*, 311(October 2022), p. 102813. doi: 10.1016/j.cis.2022.102813.
- Nosal, W. H. *et al.* (2005) 'Infrared optical properties and AFM of spin-cast chitosan films chemically modified with 1,2 Epoxy-3-phenoxy-propane', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46(1), pp. 26–31. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.08.006.
- Nottagh, S. *et al.* (2020) 'Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese', *Biologia*, 75(4), pp. 605–611. doi: 10.2478/s11756-019-00378-w.
- Ochnio, M. E. *et al.* (2018) 'Proteins as nano-carriers for bioactive compounds. The case of 7S and 11S soy globulins and folic acid complexation', *Polymers*, 10(2), pp. 1–21. doi: 10.3390/polym10020149.
- Olivares, A. *et al.* (2004) 'Folatos y su disponibilidad en alimentos evaluados por cromatografía líquida (HPLC). Validación y aplicaciones en calida nutricional de alimentos', *Anales de Veterinaria de Murcia*, 20(0), pp. 59–74.
- Ottøy, M. H. *et al.* (1996) 'Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans', *Carbohydrate Polymers*, 31(4), pp. 253–261. doi: 10.1016/S0144-

8617(96)00096-3.

Padmaja, P. and Bhatt, R. (2020) 'Environmental applications of chitosan and its derivatives', *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, pp. 1065–1081. doi: 10.1002/9781119143802.ch42.

Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A. and 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(3), pp. 595–604. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.10.022.

Pamunuwa, G. *et al.* (2020) 'Tailoring of release properties of folic acid encapsulated nanoparticles via changing alginate and pectin composition in the matrix', *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 1, p. 100008. doi: 10.1016/j.carpta.2020.100008.

Paredes, J. *et al.* (2022) 'Application of texture analysis methods for the characterization of cultured meat', *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-022-07785-1.

Pasquali, F. *et al.* (2022) 'Occurrence of foodborne pathogens in Italian soft artisanal cheeses displaying different intra- and inter-batch variability of physicochemical and microbiological parameters', *Frontiers in Microbiology*, 13(August), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2022.959648.

Pates, G. O. *et al.* (2011) 'Reactivity and selectivity of charged phenyl radicals toward amino acids in a fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer', *Journal of the American Chemical Society*, 133(24), pp. 9331–9342. doi: 10.1021/ja111280t.

Patring, J. D. M., Lanina, S. A. and Jastrebova, J. A. (2006) 'Applicability of alkyl-bonded ultra-pure silica stationary phases for gradient reversed-phase HPLC of folates with conventional and volatile buffers under highly aqueous conditions', *Journal of Separation Science*, 29(6), pp. 889–904. doi: 10.1002/jssc.200500481.

Payet, L. and Terentjev, E. M. (2008) 'Emulsification and stabilization mechanisms of O/W emulsions in the presence of chitosan', *Langmuir*, 24(21), pp. 12247–12252. doi: 10.1021/la8019217.

Peleg, M. (2019) 'The instrumental texture profile analysis revisited', *Journal of Texture Studies*, 50(5), pp. 362–368. doi: 10.1111/jtxs.12392.

Pepić, I., Filipović-Grčić, J. and Jalšenjak, I. (2008) 'Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 327(1–3), pp. 95–102. doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.06.009.

Pérez, O. E. *et al.* (2007) 'Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface', *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), pp. 794–803. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.11.013.

Pérez, O. E. *et al.* (2009) 'Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface', *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(2), pp. 485–496. doi: 10.1016/j.jcis.2009.04.011.

- Pérez, O. E. *et al.* (2014a) 'Milk protein-vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis', *Food Hydrocolloids*, 38, pp. 40–47. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.010.
- Pérez, O. E. *et al.* (2014b) 'Milk protein-vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis', *Food Hydrocolloids*, 38, pp. 40–47. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.010.
- Pérez, O. E. *et al.* (2015) 'Impact of hydroxypropylmethylcellulose on whey protein concentrate spread film at the air-water interface: Structural and surface dilatational characteristics', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.09.030.
- Picciotti, U. *et al.* (2022) 'Cheese Fortification: Review and Possible Improvements', *Food Reviews International*, 38(S1), pp. 474–500. doi: 10.1080/87559129.2021.1874411.
- Pigaleva, M. A. *et al.* (2014) 'Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid', *Macromolecules*, 47(16), pp. 5749–5758. doi: 10.1021/ma501169c.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P. (2009) 'Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), pp. 641–678. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
- Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. *et al.* (2014) 'Mixed soy globulins and β -lactoglobulin systems behaviour in aqueous solutions and at the air–water interface', *Food Hydrocolloids*, 35, pp. 106–114. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.021>.
- Pletnev, M. Y. (2001) *Chemistry of surfactants, Studies in Interface Science*. Edited by V. B. Fainerman, D. Mobius, and R. Miller. Elsevier.
- Prudkin-Silva, C. *et al.* (2020) 'High molecular weight chitosan based particles for insulin encapsulation obtained via nanospray technology', *Drying Technology*, 0(0), pp. 1–16. doi: 10.1080/07373937.2020.1806863.
- Prudkin Silva, C. *et al.* (2018) 'Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 537, pp. 425–434. doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.10.040.
- Qiao, C. *et al.* (2021a) 'Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid', *Lwt*, 135(August 2020), p. 109984. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109984.
- Qiao, C. *et al.* (2021b) 'Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid', *Lwt*, 135, p. 109984. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109984.
- Qun, G. and Ajun, W. (2006) 'Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution', *Carbohydrate Polymers*, 64(1), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.10.026.
- Rabadán, A. (2021) 'Consumer attitudes towards technological innovation in a

- traditional food product: The case of wine', *Foods*, 10(6). doi: 10.3390/foods10061363.
- Ramos, O. L. *et al.* (2019) 'Nanostructures of whey proteins for encapsulation of food ingredients', in In S. M. Jafari (ed.) *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*. Academic Press, pp. 69–100.
- Ramos, Ó. L. *et al.* (2012) 'Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese', *Journal of Dairy Science*, 95(11), pp. 6282–6292. doi: 10.3168/jds.2012-5478.
- Raouf, A. L. M., KafaKhalaf, H. and Mohammed, J. M. (2014) 'INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN Qualitative and Quantitative Determination of Folic acid in Tablets by FTIR Spectroscopy', 3(3), pp. 773–780.
- Re, R. *et al.* (1999) 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), pp. 1231–1237. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Reichert, C. L. *et al.* (2018) 'Concentration effect of Quillaja saponin – Co-surfactant mixtures on emulsifying properties', *Journal of Colloid and Interface Science*, 519, pp. 71–80. doi: 10.1016/j.jcis.2018.01.105.
- Rezaei, N. *et al.* (2020) 'Encapsulation of an endostatin peptide in liposomes: Stability, release, and cytotoxicity study', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185(October 2019), p. 110552. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110552.
- Rinaudo, M. (2006) 'Chitin and chitosan: Properties and applications', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), pp. 603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- Robertson, G. L. (2013) *Edible, biobased and biodegradable food packaging materials. Food packaging principles and practice*. 3rd edn, *Food Packaging*. 3rd edn. Edited by T. and F. Group. London, New York. doi: 10.1201/b21347-27.
- Rodrigues Costa, A. L., Gomes, A. and Lopes Cunha, R. (2018) 'One-step ultrasound producing O/W emulsions stabilized by chitosan particles', *Food Research International*, 107(February), pp. 717–725. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.057.
- Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C. and Rodríguez Niño, M. R. (2008) 'Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations', *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), pp. 95–113. doi: 10.1016/j.cis.2007.12.007.
- Rodríguez Patino, J. M. and Rodríguez Niño, M. R. (1999) 'Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air-water interface', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15(3–4), pp. 235–252. doi: 10.1016/S0927-7757(99)00012-6.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. and Carrera Sánchez, C. (1999) 'Dynamic interfacial rheology as a tool for the characterization of whey protein isolates gelation at the oil-water interface', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), pp. 3640–3648. doi: 10.1021/jf981164q.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. and Carrera Sánchez, C. (2007) 'Physico-

chemical properties of surfactant and protein films', *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), pp. 187–195. doi: 10.1016/j.cocis.2007.06.003.

Román-Doval, R. *et al.* (2023) 'Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight', *Polymers*, 15(13), pp. 1–26. doi: 10.3390/polym15132867.

Rosales-Martínez, P. *et al.* (2019) 'Chitosan Micro- and Nanoparticles for Vitamin Encapsulation', *Nanotechnology Applications in the Food Industry*, (January), pp. 427–440. doi: 10.1201/9780429488870-19.

Ross, A. C. *et al.* (2012) *Modern nutrition in health and disease*. 11th edn. Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins.

Rotureau, E. *et al.* (2004) 'Amphiphilic derivatives of dextran: Adsorption at air/water and oil/water interfaces', *Journal of Colloid and Interface Science*, 279(1), pp. 68–77. doi: 10.1016/j.jcis.2004.06.040.

Roy, J. C. *et al.* (2017) 'Surface behavior and bulk properties of aqueous chitosan and type-B gelatin solutions for effective emulsion formulation', *Carbohydrate Polymers*, 173, pp. 202–214. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.001.

Rubina, M., Elmanovich, I. and Vasil'kov, A. (2020) 'AFM Studies of Chitosan, Gold-Chitosan, and Silver-Chitosan Films Morphology', *Macromolecular Symposia*, 389(1), pp. 4–7. doi: 10.1002/masy.201900068.

Ruiz-Rico, M. *et al.* (2017) 'Protection of folic acid through encapsulation in mesoporous silica particles included in fruit juices', *Food Chemistry*, 218, pp. 471–478. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.097.

Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. and Berendsen, H. J. C. (1977) 'Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes', *Journal of Computational Physics*, 23(3), pp. 327–341. doi: 10.1016/0021-9991(77)90098-5.

Sagis, L. M. C. and Fischer, P. (2014) 'Nonlinear rheology of complex fluid-fluid interfaces', *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(6), pp. 520–529. doi: 10.1016/j.cocis.2014.09.003.

Sagis, L. M. C. and Yang, J. (2022) 'Protein-stabilized interfaces in multiphase food: comparing structure-function relations of plant-based and animal-based proteins', *Current Opinion in Food Science*, 43, pp. 53–60. doi: 10.1016/j.cofs.2021.11.003.

Sakr, S. (2017) 'Reducing Goat milk Flavor by Beta – Cyclodextrin (β -CD) and its Effect on Texture and Microstructure in Soft Goat Cheese', *Journal of Food and Dairy Sciences*, 8(4), pp. 179–183. doi: 10.21608/jfds.2017.38197.

Salles, C. *et al.* (1995) 'Production of a cheese model for sensory evaluation of flavour compounds', *Le Lait*, 75(6), pp. 535–549. doi: 10.1016/0023-7302(96)83003-X.

Salvia-Trujillo, L. *et al.* (2017) 'Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review', *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, pp. 439–466. doi: 10.1146/annurev-food-030216-025908.

- Samaniego-Vaesken, M. L., Alonso-Aperte, E. and Varela-Moreiras, G. (2010) 'Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market', *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, pp. 419–423.
- Santagapita, P. R., Mazzobre, M. F. and Buera, M. del P. (2012) 'Invertase stability in alginate beads. Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods.', *Food Research International*, 47(2), pp. 321–330. doi: 10.1016/j.foodres.2011.07.042.
- Di Santo, M. C. *et al.* (2020) 'Biocompatibility analysis of high molecular weight chitosan obtained from *Pleoticus muelleri* shrimps. Evaluation in prokaryotic and eukaryotic cells', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100842.
- Selway, N. and Stokes, J. R. (2014) 'Soft materials deformation, flow, and lubrication between compliant substrates: Impact on flow behavior, mouthfeel, stability, and flavor', *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), pp. 373–393. doi: 10.1146/annurev-food-030212-182657.
- Shahidi, F. and Peng, H. (2018) 'Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds', *Journal of Food Bioactives*, 4, pp. 11–68. doi: 10.31665/jfb.2018.4162.
- Shakoor, I. F., Pamunuwa, G. K. and Karunaratne, D. N. (2022) 'Effect of matrix composition on stability, release and bioaccessibility of encapsulated folic acid', *Ceylon Journal of Science*, 51(2), p. 165. doi: 10.4038/cjs.v51i2.8011.
- Shao, P. *et al.* (2020) 'Recent advances in improving stability of food emulsion by plant polysaccharides', *Food Research International*, 137(May), p. 109376. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109376.
- Sharkawy, A., Barreiro, M. F. and Rodrigues, A. E. (2020) 'Chitosan-based Pickering emulsions and their applications: A review', *Carbohydrate Polymers*, 250(April), p. 116885. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116885.
- Shrivastava, A. (2018) *Introduction to Plastics Engineering, Microwave-Assisted Organic Synthesis: A Green Chemical Approach*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2>.
- Siegrist, M. and Hartmann, C. (2020) 'Consumer acceptance of novel food technologies', *Nature Food*, 1(6), pp. 343–350. doi: 10.1038/s43016-020-0094-x.
- Sijlmasi, O. (2019) 'Folic acid deficiency and vision: a review', *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257(8), pp. 1573–1580. doi: 10.1007/s00417-019-04304-3.
- Silva, R. A. *et al.* (2012) 'Can artisanal "coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?', *Food Chemistry*, 135(3), pp. 1533–1538. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.058.
- Skorik, Y. A. *et al.* (2016) 'Characterization of Clusters and Unimers in Associating Solutions of Chitosan by Dynamic and Static Light Scattering', *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(14), pp. 1636–1644. doi: 10.1002/macp.201600146.
- Soares, L. de S. *et al.* (2019) 'Insights on physicochemical aspects of chitosan dispersion

in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid', *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, pp. 140–148. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.106.

Society, A. C. (1989) *THE MERCK INDEX Eleventh Edition*.

Solans, C. *et al.* (2005) 'Nano-emulsions', *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(3–4), pp. 102–110. doi: 10.1016/j.cocis.2005.06.004.

Song, Q. H. and Hwang, K. C. (2007) 'Direct observation for photophysical and photochemical processes of folic acid in DMSO solution', *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185(1), pp. 51–56. doi: 10.1016/j.jphotochem.2006.05.009.

Sonwai, S., Podchong, P. and Rousseau, D. (2017) 'Crystallization kinetics of cocoa butter in the presence of sorbitan esters', *Food Chemistry*, 214, pp. 497–506. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.092.

Stavrou, I. J., Christou, A. and Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018) 'Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact', *Food Chemistry*, 269(June), pp. 355–374. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.152.

Stuart, B. H. (2005) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. doi: 10.1002/0470011149.

Subramani, S. and Devarajan, M. (2019) 'Structural and surface analysis of chemical vapor deposited boron doped aluminum nitride thin film on aluminum substrates', *Materials Science- Poland*. doi: 10.2478/msp-2019-0056.

Subsecretaría de Planificación Federal y Proyectos Prioritarios, . (2022) *INFORMES DE CADENAS DE VALOR Lácteos AÑO 7 - N° 65*. Argentina.

Summo, C. and De Angelis, D. (2022) 'The Importance of Edible Films and Coatings for Sustainable Food Development', *Foods*, 11(20), pp. 10–12. doi: 10.3390/foods11203221.

Sun, T. *et al.* (2007) 'Preparation of low-molecular-weight carboxymethyl chitosan and their superoxide anion scavenging activity', *European Polymer Journal*, 43(2), pp. 652–656. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.11.014.

Sun, T. *et al.* (2008) 'Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(21), pp. 5774–5776. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.09.072.

Sun, T. *et al.* (2011) 'Antioxidant activity of N-acyl chitosan oligosaccharide with same substituting degree', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(2), pp. 798–800. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.11.097.

Tadros, T. *et al.* (2004) 'Formation and stability of nano-emulsions', *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, pp. 303–318. doi: 10.1016/j.cis.2003.10.023.

Taketa, T. B. and Beppu, M. M. (2014) 'Layer-by-layer thin films of alginate/chitosan and hyaluronic acid/chitosan with tunable thickness and surface roughness', *Materials Science Forum*, 783–786, pp. 1226–1231. doi: 10.4028/www.scientific.net/msf.783-

786.1226.

Tang, C. H. (2020) 'Nanocomplexation of proteins with curcumin: From interaction to nanoencapsulation (A review)', *Food Hydrocolloids*, 109(June), p. 106106. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106106.

Thambiliyagodage, C. *et al.* (2023) 'Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review'. doi: <https://doi.org/10.3390/ma16052073>.

Tian, Y. *et al.* (2022) 'Pickering emulsions stabilized by β -cyclodextrin and cinnamaldehyde essential oil/ β -cyclodextrin composite: A comparison study', *Food Chemistry*, 377(December 2021). doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131995.

Tie, Y., Calonder, C. and Van Tassel, P. R. (2003) 'Protein adsorption: Kinetics and history dependence', *Journal of Colloid and Interface Science*, 268(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/S0021-9797(03)00516-2.

Tuszyńska, M. (2012) 'Folic acid - The occurrence and the role in human nutrition', *Vegetable Crops Research Bulletin*, 76(1), pp. 43–54. doi: 10.2478/v10032-012-0003-4.

Tyagi, A. and Penzkofer, A. (2010) 'Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid', *Chemical Physics*, 367(2–3), pp. 83–92. doi: 10.1016/j.chemphys.2009.10.026.

Ustunol, Z., Özer, B. and Akdemir-Evrendilek, G. (2014) 'Dairy starter cultures', in *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*. Boca Raton, FL, USA.

Vanhonacker, F. *et al.* (2013) 'Innovations in traditional foods: Impact on perceived traditional character and consumer acceptance', *Food Research International*, 54(2), pp. 1828–1835. doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.027.

Villalba, D. E. N. (2017) 'Efecto De La Forma Y Dimensión De Muestras De Queso Fresco Y Velocidad De Prueba Sobre El Análisis De Perfil De Textura Instrumental', *Universidad Nacional de Chimborazo*, p. 112. Available at: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1381/1/UNACH-EC-AGR-2016-0002.pdf>.

Visentini, F. F., Perez, A. A. and Santiago, L. G. (2019) 'Self-assembled nanoparticles from heat treated ovalbumin as nanocarriers for polyunsaturated fatty acids', *Food Hydrocolloids*, 93(November 2018), pp. 242–252. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.02.016.

Vora, A. *et al.* (2002) 'Thermal stability of folic acid', *Thermochimica Acta*, 392–393, pp. 209–220. doi: 10.1016/S0040-6031(02)00103-X.

Wang, X. Y. and Heuzey, M. C. (2016) 'Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability', *Langmuir*, 32(4), pp. 929–936. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b03556.

Wani, T. U., Pandith, A. H. and Sheikh, F. A. (2021) 'Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 65(June), p. 102730. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102730.

Ward, A. F. H. and Tordai, L. (1946) 'Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects', *The Journal of Chemical Physics*, 14(7), pp. 453–461.

- Wee, M. S. M. *et al.* (2018) 'Correlation of instrumental texture properties from textural profile analysis (TPA) with eating behaviours and macronutrient composition for a wide range of solid foods', *Food and Function*, 9(10), pp. 5301–5312. doi: 10.1039/c8fo00791h.
- Weißpflog, J. *et al.* (2021) 'Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods', *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, pp. 242–261. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.010.
- Wongwanakul, R. *et al.* (2017) 'Biocompatibility study of quaternized chitosan on the proliferation and differentiation of Caco-2 cells as an in vitro model of the intestinal barrier', *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 32(1), pp. 92–107. doi: 10.1177/0883911516658780.
- Wusigale *et al.* (2021) 'Partition and stability of folic acid and caffeic acid in hollow zein particles coated with chitosan', *International Journal of Biological Macromolecules*, 183(May), pp. 2282–2292. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.216.
- Wüstneck, R., Moser, B. and Muschiolik, G. (1999) 'Interfacial dilational behaviour of adsorbed β -lactoglobulin layers at the different fluid interfaces', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15(3–4), pp. 263–273. doi: 10.1016/S0927-7765(99)00093-4.
- Xie, H. *et al.* (2023) 'Enhancing the interfacial stability of O/W emulsion by adjusting interactions of chitosan and rice protein hydrolysate', *Food Hydrocolloids*, 137(July 2022), p. 108406. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108406.
- Xiong, W. *et al.* (2018) 'Emulsion stability and dilatational viscoelasticity of ovalbumin/chitosan complexes at the oil-in-water interface', *Food Chemistry*, 252(November 2017), pp. 181–188. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.067.
- Xu, S. and Damodaran, S. (1994) 'Kinetics of Adsorption of Proteins at the Air-Water Interface from a Binary Mixture', *Langmuir*, 10, pp. 472–480. doi: 10.1006/jcis.1995.0008.
- Yakubu, S. and Muazu, J. (2010) 'Effects of variables on degradation of folic acid', 1(3), pp. 55–58.
- Yang, H. *et al.* (2019) 'Toward the Shell Biorefinery: Processing Crustacean Shell Waste Using Hot Water and Carbonic Acid', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(5), pp. 5532–5542. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b06853.
- Yang, Y. *et al.* (2017) 'An overview of pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications', *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAY), pp. 1–20. doi: 10.3389/fphar.2017.00287.
- Yang, Y. and Hobbs, J. E. (2020) 'How Do Cultural Worldviews Shape Food Technology Perceptions? Evidence from a Discrete Choice Experiment', *Journal of Agricultural Economics*, 71(2), pp. 465–492. doi: 10.1111/1477-9552.12364.
- Yasin, N. M. N. and Shalaby, S. M. (2013) 'Physiochemical and sensory properties of functional low fat cheesecake manufactured using cottage cheese', *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), pp. 61–67. doi: 10.1016/j.aoas.2013.01.009.

- Yilmaz, F. and Dagdemir, E. (2012) 'The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening', *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), pp. 2582–2589. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03137.x.
- Younes, I. and Rinaudo, M. (2015) 'Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications', *Marine Drugs*, 13(3), pp. 1133–1174. doi: 10.3390/md13031133.
- Yu, Y. B. *et al.* (2021) 'Emulsifying properties of a ferulic acid-grafted curdian conjugate and its contribution to the chemical stability of β -carotene', *Food Chemistry*, 339(May 2020), p. 128053. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128053.
- Yuceer, M. and Caner, C. (2014) 'Antimicrobial lysozyme-chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), pp. 153–162. doi: 10.1002/jsfa.6322.
- Zema, P. and Pilosof, A. M. R. (2018) 'On the binding of folic acid to food proteins performing as vitamin micro/nanocarriers', *Food Hydrocolloids*, 79, pp. 509–517. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.01.021.
- Zhang, L. *et al.* (2019) 'Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability', *Food Hydrocolloids*, 90(December 2018), pp. 313–320. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.12.042.
- Zhang, R. *et al.* (2020) 'Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: A review', *Carbohydrate Polymers*, 242(May). doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116388.
- Zhang, X. *et al.* (2021) 'Impact of pH on the interaction between soybean protein isolate and oxidized bacterial cellulose at oil-water interface: Dilatational rheological and emulsifying properties', *Food Hydrocolloids*, 115(December 2020), p. 106609. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106609.
- Zhao, M. *et al.* (2018) 'Folic acid promotes wound healing in diabetic mice by suppression of oxidative stress', *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), pp. 26–33. doi: 10.3177/jnsv.64.26.
- Zhong, Y., Song, X. and Li, Y. (2011) 'Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types', *Carbohydrate Polymers*, 84(1), pp. 335–342. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.11.041.
- Zhou, X., Sala, G. and Sagis, L. M. C. (2022) 'Structure and rheological properties of oil-water and air-water interfaces stabilized with micellar casein isolate and whey protein isolate mixtures', *Food Hydrocolloids*, 133(July), p. 107946. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107946.
- Zinoviadou, K. G. *et al.* (2011) 'Impact of emulsifier-polysaccharide interactions on the stability and rheology of stabilised oil-in-water emulsions', *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), pp. 57–61. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.010.
- Žolnere, K. *et al.* (2019) 'Cheese proteolysis and matrix disintegration during in vitro digestion', *Food Structure*, 21, p. 100114. doi: 10.1016/j.foostr.2019.100114.

