

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“MICROENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROBIÓTICOS CON PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE
MAILLARD (PRM) DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO Y
DEXTRANOS”**

Lic. Paula Andrea, Loyeau

Director de Tesis: Dr. Carlos R. Carrara

Co-director de Tesis: Dr. Gabriel C. Vinderola

Lugar de realización: Área de Análisis Físicoquímicos de Alimentos- Instituto de
Tecnología de Alimentos- Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral.

2020

Agradecimientos

A mis directores Dr. Carlos R. Carrara y Dr. Gabriel Vinderola por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral haciéndome partícipe de sus laboratorios, proyectos e ideas. Por su orientación a cada paso, por sus consejos, su paciencia y enseñanzas que llevaré conmigo siempre, tanto a nivel profesional como personal.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por haberme permitido desarrollar la presente Tesis a través de la beca de posgrado que me fue otorgada.

Agradezco especialmente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo. Y al Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química, por haber sido mi lugar de trabajo durante este período.

A la Dra. M. Julia Spotti, por haber sido mi guía en la síntesis y caracterización de conjugados de Maillard, por su supervisión, por sus enseñanzas, por tenerme más de la paciencia merecida y por ayudarme en todo, siempre con la mejor predisposición.

A la Dra. Silvana Fioramonti, quien no solo fue un sostén a nivel profesional, sino también espiritual y humanamente, gracias por escucharme tanto y enseñarme que “donde no hay amor, debemos colocar amor”. Gracias Sil, por nunca dejarme sola y por las charlas catárticas.

A mis compañeros de laboratorio, Virginia, M. Laura, Juan Pablo, Carolina y Flavia quienes mediante mate de por medio o tereré me ayudaron día a día a seguirle el ritmo al estudio de posgrado. Gracias por ser personas cálidas, excelentes compañeros y sobretodo amigos.

A mis compañeros del INLAIN: Desi, Sofi, Meli, Diego, Manqui, Patricia, Luján, Guille y Eli, les agradezco por estar siempre dispuestos a darme una mano en todo lo que sea que necesitaba, por sus sonrisas cálidas, sus matecitos de pasillo y buenas vibras.

A todos mis compañeros del ITA, quienes más de uno son hoy en día grandes amigos. Porque llegar al lugar de trabajo y verlos, charlar un ratito y saber que podía contar con ellos, era algo invaluable para mí.

A Marcelo Schmidt, quien incansablemente y siempre con una sonrisa y buen humor, me ha ayudado en absolutamente todo lo que he necesitado, tanto dentro como fuera del LAMOFIQ, durante o no el horario laboral, así como a nivel personal.

A Romina y Anabella, amigas que mediante cursos de posgrado, con una sonrisa supieron enseñarme que todo desafío vale la pena si disfrutamos del camino, sin importar qué tan difícil y exigente sea.

A Noelia, Yanina y Mariana, por haberme dado la posibilidad de conocer otro ámbito de trabajo, el Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad de Villa María; gracias por abrirme las puertas no sólo de su laboratorio sino también de sus hogares. Gracias por lo aprendido a nivel profesional con respecto a Capacidad Antioxidante y por las cálidas y extensas horas de trabajo matecito de por medio.

Quiero agradecer especialmente, a mis padres, quienes no solo me dieron la vida, sino también la posibilidad de formarme como profesional y como persona, lo cual es un mayor desafío. A mis hermanos, por su apoyo constante. A mi hermana Anita, por acompañarme siempre, sin importar, cuándo, dónde y por qué. A María, quien supo enseñarme una faceta de la vida que yo desconocía. Por último, pero no menos importante, a quien desde una estrella me cuida desde siempre y me ha enseñado en vida muchas de las cosas, principios, valores y conductas que rigen mis días.

A mis abuelos, a cada uno de ellos, quienes nunca perdieron la fe en mí, quienes son ladrillos firmes e indispensables en mi vida, y quienes incansablemente siempre me motivaron a seguir.

A mis padrinos, mis primas y mejores amigos: Jaz, Ailén, Flor, Carin, Cami, Delfi, Lucha, Mati y Fran, sin ellos estos cinco años hubiesen sido muy difíciles de atravesar.

A Dios, que si bien tiene modos extraños de hacerme ver, entender, valorar y amar la vida, nunca me dejó sola y me ayudó a avanzar cuando todo se me hizo cuesta arriba.

*A Mis padres,
Mi familia*

PUBLICACIONES

PA Loyeau, MJ Spotti, NL Vanden Braber, YE Rossi, MA Montenegro, GC Vinderola, CR Carrara, (2018). "Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials", *Food Hydrocolloids*, 85:129-135.

MJ Spotti, PA Loyeau, A Marangón, H Noir, AC Rubiolo, CR Carrara, (2019). "Influence of Maillard reaction extent on acid induced gels of whey proteins and dextrans", *Food Hydrocolloids*, 91:224-231.

INDICE

PUBLICACIONES	5
INDICE	6
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	11
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	17
Alimentos e Ingredientes Funcionales.....	18
Microorganismos probióticos	19
a. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	22
Caracterización tecnológica preliminar de las cepas para su utilización en productos lácteos	24
Ensayos en animales	26
b. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 73a.....	27
Encapsulación de componentes bioactivos	29
Estrategias de producción de cápsulas	29
a. Secado por aspersion	30
Materiales de pared utilizados en la presente tesis	30
Proteínas de interés	31
Suero de la industria quesera	32
Concentrado de suero.....	32
Proteínas de suero lácteo	32
Inulina	34
Dextranos.....	36
Goma Xántica.....	37
Reacción de Maillard.....	38
Desarrollo de la RM.....	38
Productos de la RM y Propiedades Funcionales.....	40
b. Emulsiones	42
Aceite de canola	43
c. Gelificación iónica, ionótrópica o complejación de polielectrolitos.....	45
Alginato	46
OBJETIVOS	48
CAPÍTULO 1	50

OBJETIVOS	51
1. INTRODUCCIÓN.....	52
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
2.1. Síntesis de productos de la reacción de Maillard (PRM).....	53
2.2. Caracterización de PRM.....	53
2.2.1. Determinación de Absorbancia a 284, 304 y 420nm	53
2.2.2. Determinación del color sobre los productos de la Reacción de Maillard	54
2.2.3. Determinación de Fluorescencia a 295 y 365nm	55
2.2.4. Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)	55
2.2.5. Determinación de Grupos Aminos Libres (GAL)	56
2.2.6. Determinación de Grupos Sulfhidrilos Libres (GSL)	56
2.2.7. Determinación de la Hidrofobicidad superficial (H_0).....	57
2.2.8. Determinación de la capacidad antioxidante.....	58
2.2.8.1. Desactivación de radical ABTS ^{•+}	58
2.2.8.2. Desactivación de radical hidroxilo (HO [•]).....	58
2.3. Análisis estadístico	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1. Caracterización de PRM.....	61
3.1.1. Determinación de Absorbancia a 284, 304 y 420nm	61
3.1.2. Determinación de color sobre los Productos de la Reacción de Maillard	64
3.1.3. Fluorescencia a 295 y 365nm	65
3.1.4. Contenido de Humedad (% H) y Actividad de agua (a_w)	67
3.1.5. Grupos Aminos Libres (GAL)	68
3.1.6. Grupos sulfhidrilos libres.....	69
3.1.7. Hidrofobicidad Superficial (H_0)	70
3.1.8. Capacidad Antioxidante	71
4. CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	72
CAPÍTULO 2	73
OBJETIVOS	74
1. INTRODUCCIÓN.....	75
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
2.1. Proceso de síntesis y recuento microbiano basal de los conjugados WPI/DX	76
2.2. Caracterización de encapsulados.....	76
2.2.1. Porcentaje de Humedad y Actividad de agua	76
2.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	77

2.2.3.	Determinación de la capacidad antioxidante frente radical ABTS ^{•+} , radical hidroxilo (HO [•]) y radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	77
2.2.4.	Sobrevida al secado spray	77
2.2.5.	Sobrevida a la conservación a 4 y 25 °C.....	78
2.2.6.	Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	78
2.3.	Análisis estadístico	78
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.1.	Proceso de síntesis y determinación de la carga bacteriana basal de los conjugados WPI/DX	79
3.2.	Caracterización de encapsulados.....	79
3.2.1.	Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a _w)	79
3.2.2.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	80
3.2.3.	Capacidad antioxidante frente radical ABTS ^{•+} , radical hidroxilo (HO [•]) y radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	81
3.2.4.	Sobrevida al secado spray	82
3.2.5.	Sobrevida durante la conservación a 4 y 25 °C.....	83
3.2.6.	Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	84
4.	CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	85
CAPÍTULO 3		86
Encapsulados de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 mediante emulsión en aceite de canola y gelificación iónica con alginato de calcio (Serie 2)		86
OBJETIVOS		87
1.	INTRODUCCIÓN.....	88
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	89
2.1.	Proceso de síntesis	89
2.2.	Caracterización de emulsiones.....	90
2.2.1.	Índices de cremado (IC).....	90
2.2.2.	Microscopía óptica	91
2.3.	Caracterización de las partículas.....	91
2.3.1.	Eficiencia de encapsulación de aceite (EE)	91
2.3.2.	Microscopia óptica y tamaño de partículas	91
2.4.	Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis	91
2.5.	Análisis estadístico	92
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
3.1.	Caracterización de las emulsiones.....	93
3.1.1.	Índices de cremado (IC).....	93

3.1.2. Microscopía óptica	93
3.2. Caracterización de las milipartículas	94
3.2.1 Eficiencia de encapsulación (EE)	94
3.2.2. Microscopía óptica y tamaño de partículas	94
3.3. Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis	95
4. CONCLUSIONES	97
CAPÍTULO 4	98
OBJETIVOS	99
1. INTRODUCCIÓN	100
2. MATERIALES Y MÉTODOS	101
2.1. Proceso de síntesis	101
2.1.1. Liofilizado de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 73a	101
2.1.2. Síntesis de emulsiones y obtención de polvos	101
2.2. Caracterización de las emulsiones	102
2.2.1. Índice de cremado (IC %)	102
2.2.2. Determinación del Índice de Actividad Emulsionante (IAE)	102
2.2.3. Microscopía óptica	102
2.3. Caracterización de encapsulados	102
2.3.1. Porcentaje de Humedad y Actividad de agua	102
2.3.2. Eficiencia de encapsulación de aceite de canola (EE %)	103
2.3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	103
2.4. Evaluación de la viabilidad celular durante el proceso de síntesis	103
2.5. Evaluación de la viabilidad celular durante el almacenamiento a diferentes temperaturas	103
2.6. Capacidad antibacteriana del aceite de canola (AC)	103
2.6.1. Ensayo en medio agarizado	103
2.6.2. Ensayo en medio líquido	104
2.7. Análisis estadístico	104
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
3.1. Caracterización de emulsiones	105
3.1.1. Índices de cremado	105
3.1.2. Determinación del Índice de Actividad emulsificante (IAE)	106
3.1.3. Microscopía óptica	106
3.2. Caracterización de encapsulados	109
3.1.1. Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)	109

3.1.2. Eficiencia de encapsulación de aceite (EE %)	109
3.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	110
3.2. Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis	111
3.3. Viabilidad celular durante el almacenamiento a diferentes temperaturas	113
3.4. Capacidad antibacteriana del aceite de canola	115
3.4.1. Ensayo en medio agar	115
3.4.2. Ensayo en medio líquido	116
4. CONCLUSIONES PRELIMINARES	118
CONCLUSIONES GENERALES	119
BIBLIOGRAFÍA	120

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AF	Alimento Funcional
AGEs	<i>Advanced Glycation End products</i>
AGMI	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AGS	Ácidos Grasos Saturados
PCA	Medio de cultivo, <i>Plate count agar</i>
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ASB	Albúmina Sérica Bovina
a_w	Actividad de agua
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
DS	Desviación Standard
DX	Dextranos
DX100	Dextrano de 100 kDa
DX450	Dextrano de 450 kDa
DX6	Dextrano de 6 kDa
DX70	Dextrano de 70 kDa
GAL	Grupos Aminos Libres
HMOs	Oligosacáridos Humanos
IF	Ingrediente Funcional
INL1	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1
L73a	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73a
LM	Leche materna
MRS	Medio de cultivo Man-Rogosa y Sharpe
PBS	Solución de Buffer Fosfato
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso molecular
PRM	Productos de la Reacción de Maillard
RM	Reacción de Maillard
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WPI	Aislado de Proteínas de suero lácteo

WPC	Concentrado de Proteínas de suero lácteo
α -la	α -lactoalbumina
β -lg	β -lactoglobulina

RESUMEN

La tendencia mundial de mejorar el bienestar humano ha impactado no solo en nuevos tratamientos médicos, fármacos y programas fitness, sino también en el área de los alimentos. En la cual, además de suplir la necesidad de nutrición se busca reducir los riesgos de padecer ciertas enfermedades que el último siglo se han acentuado en la población a nivel mundial, como por ejemplo el cáncer de colon, diabetes y cardiopatías. Surgiendo así los llamados Alimentos e Ingredientes Funcionales (IF), los cuales contienen agentes bioactivos capaces de generar beneficios en la salud del consumidor.

Dada la demanda, el mercado requiere del desarrollo de procesos para obtener IF seguros, estables y rentables, siendo una de las técnicas más empleadas el secado por aspersion, más conocido como secado spray y la emulsificación. Para dichas técnicas, además del agente bioactivo son necesarios ciertos compuestos con cualidades específicas. Es así que la presente tesis propone el uso de proteínas de suero lácteo (WPI) y polisacáridos de distinto peso molecular (PM), denominados Dextranos (DX), para sintetizar Productos de la Reacción de Maillard (PRM), que puedan ser utilizados como material de pared en el secado spray y/o como agentes emulsionantes; y el empleo de cepas potencialmente probióticas autóctonas aisladas en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (INL1) y *Lactobacillus rhamnosus* 73a (L73a), como agentes bioactivos.

La presente tesis plantea la síntesis de PRM mediante el método seco a humedad controlada y una serie de ensayos destinados a caracterizarlos en cuanto al grado de avance de la reacción y la determinación de sus propiedades fisicoquímicas. Utilizando distintas estrategias de encapsulación, los PRM fueron parte del material de pared para producir macropartículas mediante secado spray; o bien como agentes emulsionantes para la generación de milipartículas emulsionadas y gelificadas iónicamente con alginato de calcio y microcápsulas obtenidas al secar emulsiones mediante un secador spray. Los dos últimos sistemas involucraban emulsiones, las cuales fueron analizadas en cuanto a parámetros de estabilidad y observadas mediante microscopía óptica; además se determinó la eficiencia de encapsulación de aceite de canola (AC) en los encapsulados finales. Los tres sistemas generados fueron caracterizados en cuanto a morfología mediante microscopía óptica o microscopía electrónica de barrido, viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis y durante el almacenamiento; en función de la viabilidad frente al proceso de síntesis, se sometieron las muestras al análisis de su resistencia frente simulación

gastrointestinal simulada *in vitro* y se muestran los resultados pertinentes. Obtenidos algunos resultados, finalmente se optó por determinar la posible capacidad antibacteriana del AC.

La caracterización de los WPI/DX determinó que existe una relación entre el aumento del PM del DX conjugado y la disminución del grado de avance de la reacción; se determinó que los WPI/DX de mayor PM serían mejores agentes emulsionantes luego de analizar los índices de hidrofobicidad superficial y se mejoró la capacidad antioxidante de todos los WPI/DX en comparación a los compuestos de partida.

Las primeras microcápsulas, que contenían INL1 como compuesto bioactivo y PRM como materiales de pared, morfológicamente resultaron ser similares a las encontradas en la bibliografía; en cuanto a viabilidad celular, si bien el secado spray no tuvo efecto negativo considerable, la viabilidad a lo largo del tiempo a temperatura ambiente fue menor respecto a la viabilidad mantenida bajo refrigeración. En cuanto a la resistencia frente a la digestión gastrointestinal *in vitro*, los sistemas que contenían WPI/DX mostraron una leve mejoría frente a sistema control (WPI incubado).

Las milipartículas gelificadas iónicamente, que contenían la cepa INL1, presentaron eficiencias de encapsulación del AC muy elevadas, pero la viabilidad celular al cabo de tres semanas disminuyó considerablemente.

Por último, los ensayos llevados a cabo sobre las microcápsulas generadas mediante emulsificación y secado spray no permitieron correlacionar los valores de índice de cremado e índices de actividad emulsionante ensayados sobre las emulsiones con la eficiencia de encapsulación de AC determinados sobre las microcápsulas. En cuanto a la viabilidad celular de las dos cepas ensayadas, INL1 y L73a, el proceso de síntesis tuvo un efecto negativo y la estabilidad a lo largo del almacenamiento a 22 °C no logró mejorar las ensayadas a temperatura de refrigeración, lo cual hubiera sido una potencial ventaja.

En conclusión, se lograron obtener y caracterizar los PRM, mejorando las propiedades funcionales en comparación a los compuestos de partida y utilizarlos en tres sistemas distintos de encapsulación con potenciales probióticos autóctonos. Se obtuvieron sistemas a escala micro y milimétrica que podrían ser mejorados optimizando las variables (como ser el reemplazo del AC por uno con nula o menor capacidad antibacteriana), con el objetivo de mejorar la viabilidad de las cepas o estabilidad de las emulsiones y finalmente desarrollar ingredientes funcionales que puedan producirse a nivel industrial.

ABSTRACT

The global trend to improve the human well-being has impacted not only on novel medical treatments, drugs and fitness programs, but also in the food area. In which, in addition to supply the need for nutrition, it seeks to reduce the risks of suffering certain diseases that have increased in the worldwide population the last century, such as colon cancer, diabetes and heart disease. In this context, emerged the so-called Functional Foods and Ingredients (IF), which contain bioactive agents capable of generating benefits in the health of consumers.

Given the demand, the market requires the development of processes to obtain safe, stable and profitable IF, being one of the most used techniques spray drying and emulsification followed by this process. For these techniques, in addition to the bioactive agent, certain compounds with specific qualities are needed to use them as wall material or emulsifying agents. Thus, the present thesis proposes the use of whey proteins (WPI), polysaccharides of different types including Dextrans (DX) to synthesize Maillard Reaction Products (PRM) and be used as wall material in spray drying or as emulsifying agents; and the use of isolated native probiotic strains at the Institute of Industrial Lactology (INLAIN), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (INL1) and *Lactobacillus rhamnosus* 73a (L73a), as bioactive agents.

This thesis proposes the synthesis of PRM by means of the dry method at controlled humidity and a series of tests aimed at characterizing them in terms of the degree of progress of the reaction and the determination of its physicochemical properties. Using different strategies in the encapsulation process, the PRMs were part of the wall material to produce microparticles by spray drying; or as emulsifying agents for the generation of ionically emulsified and gelled microparticles with calcium alginate and microcapsules obtained by drying emulsions by means of a spray dryer. The last two systems, which involved emulsions, were analyzed by stability parameters and observed by optical microscopy, in addition was determined the encapsulation efficiency of canola oil (CO). All the systems generated were characterized in terms of morphology using optic microscopy or scanning electron microscopy, cell viability throughout the synthesis process and during storage. When cell viabilities were satisfactory, was evaluated the resistance to in vitro gastrointestinal digestion of each system. Obtained some results, finally was necessary to determine the antimicrobial capacity of CO.

The characterization of the PRMs determined that there is a relationship between the molecular weight (PM) of dextran (DX) and the degree of progress of the reaction; it was determined which conjugates would be the best emulsifying agents and the antioxidant capacity was potentiated against the starting compounds.

The microcapsules charged with INL1 as bioactive compound and in which PRM were used as wall material, morphologically proved to be similar to those found in the literature. As for cell viability, although spray drying had no significant negative effect, the viability over time at room temperature was lower compared to the viability maintained under refrigeration. While resistance against in vitro gastrointestinal digestion of the conjugates (WPI / DX) showed a slight improvement over the control system (WPIc, incubated WPI).

The ionically gelled milliparticles showed very high CO encapsulation efficiencies, but the cell viability after 3 weeks decreased considerably.

Lastly, the tests carried out on the microcapsules generated by emulsification and spray drying did not allow correlating the values of the creaming index and the emulsifying activity index tested on the emulsions with the AC encapsulation efficiency determined on the microcapsules. Regarding the cell viability of the two strains tested, INL1 and L73a, the synthesis process had a negative effect and the stability throughout storage at 22 ° C failed to improve those tested at refrigeration temperature, which would have been a potential advantage.

In conclusion, it was able to obtain and characterize PRM, improving the functional properties in comparison with the original compounds, and use them in three different systems of encapsulation of native probiotics. Were obtained systems at micro and millimeter scale that should be improved optimizing variables (for example, the replacement of the CO by one with no or less antibacterial capacity), with the objective of enhancing probiotic viability or emulsion stability and finally developing functional ingredients that can be applied at industrial level and commercial.

INTRODUCCIÓN

Alimentos e Ingredientes Funcionales

Luego de la Segunda Guerra Mundial Japón alcanzó un notable desarrollo económico, lo cual favoreció un aumento considerable en la expectativa de vida. Esto reflejó una población más longeva, que presentó un incremento de patologías crónicas no transmisibles a nivel cardiovascular, y enfermedades tales como cáncer, hipertensión, osteoporosis, diabetes y obesidad. Esa situación implicaba elevados costos para el sistema de salud, por lo que en la década de los años ´80 comenzaron a llevarse a cabo distintas investigaciones bajo un proyecto gubernamental; el propósito del mismo consistió en indagar y dilucidar posibles funciones de los alimentos más allá de la función principal nutricional. Fue así, que bajo ese contexto nació el concepto de Alimentos Funcionales (AF), los cuales son considerados “alimentos que contienen ingredientes con funciones específicas para la salud y cuyo mensaje o alegación saludable ha sido aprobada acerca de sus efectos fisiológicos en el cuerpo humano”[1].

Por otro lado, tanto en América como en Europa, la continua aparición de evidencias científicas acerca del rol de la dieta y/o sus componentes sobre la salud y el bienestar humano, ha impulsado la expansión del concepto de nutrición durante las últimas décadas. Lo cual llevó a retomar la idea de no solo considerar el valor nutricional de los alimentos, sino también la capacidad de prevenir diversos tipos de enfermedades. Esta tendencia asociada al consumo de una dieta más adecuada, ha favorecido la aparición de nuevos productos impulsando el desarrollo tanto de nuevos AF como ingredientes funcionales (IF). Estas novedosas formulaciones se han convertido en un nicho de mercado para las compañías de alimentos, las cuales deben responder a las crecientes demandas. Algunos ejemplos de AF son los *smoothies* y yogures[2], [3] que contienen bacterias probióticas; mientras que algunos IF contienen aceites con alto contenido en Omega-3[4], compuestos antioxidantes [5] y vitaminas entre otros, y con los cuales pueden formularse distintos alimentos.

Cabe destacar, que en castellano el concepto de “alimento” suele ser empleado técnicamente de forma incorrecta, ya que según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [6]un “alimento” es una sustancia comestible que aporta energía y/o nutrientes a la dieta de los animales; mientras que la “comida” se considera una sustancia elaborada, semi elaborada o cruda destinada al consumo humano; incluye bebidas, goma de mascar y cualquier sustancia que se use en su producción, preparación o tratamiento; no incluye cosméticos, tabaco ni sustancias utilizadas sólo como medicinas. Por lo tanto, el concepto de “alimento” debería de utilizarse para referirse al consumo animal y no humano. Sin embargo pareciera que el concepto de AF, hace referencia a ambos tecnicismos, ya que no solo existen investigaciones y desarrollos de AF destinados a seres humanos, sino también hacia animales [7].

Por otro lado, a modo de marco teórico también resulta necesario definir el concepto de “ingrediente alimentario” como uno de los componentes o el constituyente principal de cualquier

mezcla o combinación que constituye un alimento comercial [6]. En este caso, también surge la controversia de tecnicismos, ya que solo se estaría haciendo referencia a ingredientes que forman parte de la alimentación animal y no humana.

En esta tesis resulta indispensable aclarar que los “alimentos” e “ingredientes”, enmarcados dentro de los productos funcionales, tendrían como principal consumidor al ser humano y no a los animales, a pesar de los tecnicismos previamente presentados.

Dado que los IF pueden ser considerados *carriers* de agentes bioactivos, en la presente tesis propone estudiar la encapsulación de dos cepas distintas de bacterias potencialmente probióticas, aceite de canola y conjugados de Maillard como compuestos de interés para lograr distintas presentaciones de IF.

Microorganismos probióticos

La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) definieron en el año 2002 a los probióticos como *“microorganismos vivos que cuando son administrados en dosis adecuadas producen un efecto benéfico en el consumidor más allá de la nutrición”* [8].

Según Saarelay col.[9] los microorganismos deben tener características específicas para ser considerados probióticos, siendo tres los aspectos más relevantes que definen las especificaciones a considerar. Es así que se definen los ejes de 1) Seguridad, 2) Funcionalidad y 3) Aspectos tecnológicos.

En cuanto a la seguridad, dado que los potenciales consumidores son los seres humanos, las especificaciones los toman como prioridad, estableciendo que:

- i. Las cepas aisladas deben de ser preferiblemente de origen humano, y extraídas del tracto gastrointestinal de un individuo sano, si fueran a usarse en el tracto intestinal. Sin embargo, Rodríguez, Rojas y Rodríguez [10] también plantean que pueden de aislarse de la saliva o vagina de mujeres en buenas condiciones de salud.
- ii. No deben ser microorganismos patógenos.
- iii. No deben estar asociados a enfermedades tales como trastornos gastrointestinales o endocarditis infecciosa.
- iv. No deben desconjugar ni deshidrogenar las sales biliares, cuyos efectos son indeseables en el intestino delgado.
- v. Las cepas aisladas no deben tener genes de resistencia a antibióticos transmisibles.

En segundo lugar, varios son los requerimientos que se deben observar en microorganismos posibles candidatos a probióticos respecto a la funcionalidad:

- i. Deben ser tolerantes a ácidos y jugos gástricos estomacales humanos.

- ii. Deben de tolerar las sales biliares.
- iii. Deben de poder adherirse a células intestinales de origen humano y poder colonizar temporalmente el intestino.
- iv. Deberían de ser inmunoestimulantes, pero sin generar efectos proinflamatorios.
- v. Deben presentar actividad antagonista frente a patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- vi. Presentar propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.

Si bien el listado anterior es una serie de efectos deseables, técnicamente el único requisito que se le debe solicitar a un probiótico es que ejerza un efecto benéfico demostrado en un estudio clínico de eficacia.

Por último, pero sumamente importante ya que de estos aspectos depende la incorporación del microorganismo de interés en la matriz alimentaria y su posterior estabilidad, se presentan a continuación los aspectos tecnológicos:

- i. La cepa aislada no debe modificar las propiedades sensoriales finales en el producto en el cual se incorporan, y si lo hacen, esas modificaciones deberían de ser aceptables por el consumidor.
- ii. Los posibles probióticos deben ser resistentes a fagos.
- iii. Deben mantenerse viables durante el procesamiento.
- iv. Ser estables en el producto final y durante el almacenamiento del mismo.

Estas características no hacen a su carácter probiótico, sino a su potencial de aplicación en alimentos o suplementos alimenticios.

Habiéndose planteado las especificaciones de los ejes más relevantes para que un microorganismo pueda considerarse probiótico, es que las investigaciones en distintos centros de investigación en el mundo comenzaron a centralizarse en el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas candidatas a dicha clasificación. Fue así, que entre los microorganismos probióticos, ya estudiados y ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, se encuentran principalmente cepas específicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, algunas cepas de especies de *Bacillus*, y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *S. boulardii*, entre otros [10].

Como se mencionó previamente, se recomienda aislar cepas potencialmente probióticas del tracto gastrointestinal o de la saliva de un individuo sano; o bien de la vagina de mujeres que gozan de buena salud. Sin embargo hace más de una década, la leche materna (LM) se convirtió en una fuente interesante de microorganismos potencialmente probióticos.

Lessen y Kavanagh,[11]plantean que muchas son las investigaciones que demuestran los efectos positivos de la LM humana no solo sobre el consumo de los infantes (niños de hasta dos años de edad), sino también sobre la salud de la madre lactante. Los beneficios se deben a que la

LM se considera un fluido biológico vivo con muchísimas cualidades difíciles de replicar por parte de los sustitutos comerciales que existen hoy en día.

Muchas son las evidencias que demuestran que la LM humana contiene agentes bioactivos en gran cantidad. Parte de éstos agentes consisten en células inmunes, otros son proteínas, carbohidratos, grasas, minerales, vitaminas, enzimas y hormonas; y por último, compuestos derivados de lípidos, proteínas o hidratos de carbono [12]. Los oligosacáridos de LM constituyen el tercer grupo de componentes bioactivos de mayor importancia en la misma.

Los derivados de hidratos de carbono, se conocen como oligosacáridos humanos (HMOs, por sus siglas en inglés), y presentan capacidad anti infecciosa contra patógenos del sistema gastrointestinal, como por ejemplo *Salmonella*, *Listeria* y *Campylobacter* [13]. Los HMOs juegan un rol importante en el desarrollo de una microbiota infantil equilibrada y diversa, como también en la colonización de hasta el 90% del intestino, esencial para una apropiada respuesta inmune adaptativa e innata [14]. Esto se debe a que los HMOs ejercen una presión selectiva sobre el nicho microbiano del intestino del infante, promoviendo la proliferación de cepas bacterias específicas, incluyendo las bacterias ácido lácticas (BAL), entre ellas los géneros *Lactobacillus* y otras bacterias no clasificadas como BAL, del género *Bifidobacterium*. Por lo tanto la LM, es una fuente de bacterias viables procedentes del intestino materno, las cuales son llevadas por las células dendríticas y macrófagos vía el sistema linfático hasta las glándulas mamarias [15].

A modo de resumen la LM humana, debido a su composición, presenta propiedades prebióticas¹ y probióticas que pueden modular dos de las fuerzas más importantes que controlan el ensamblaje de la comunidad microbiana del intestino del infante, como ser la selección de especies y la disposición en dicho nicho [16]. Además puede afirmarse que los agentes bioactivos previamente nombrados contenidos en la LM humana, modifican la funcionalidad del tracto gastrointestinal y el sistema inmune, influyen en el desarrollo del cerebro, convirtiéndola en un alimento sumamente necesario para el crecimiento y desarrollo óptimo de los infantes [12]. Incluso, recientemente Moosavi y col.[17], reportaron que la LM mitiga la programación de enfermedades metabólicas tardías infantiles, otorgando protección particularmente frente a la obesidad y la diabetes tipo II.

Dada la importancia que recibió la LM, dos grupos de investigadores, uno de origen finlandés [18] y otro español [19], lograron aislar bacterias a partir de dicha matriz, simultánea e independientemente en el año 2003. Estudios posteriores, evaluaron que las cepas aisladas tenían potenciales probióticos similares a los que presentaban las cepas probióticas que se utilizaban en los productos comerciales [20].

¹Prebiótico: es un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios, tanto en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios en el bienestar y la salud del consumidor[61].

En el año 2008 en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET-UNL) comenzaron los intentos por aislar bacterias potencialmente probióticas a partir de LM humana. Es en este contexto que se logró aislar y caracterizar la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (INL1). En el año 2016, también a partir de LM humana lograron aislar la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 73a (73a), cuyos potenciales probióticos y tecnológicos fueron plasmados en un trabajo científico que está siendo evaluado por una revista internacional para su publicación. Las cepas nombradas forman parte de los estudios de la presente tesis.

a. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1

La cepa probiótica INL1 pertenece al género de bacterias Gram-positivas (cuya envoltura celular comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano), presenta morfología de bastón de largo variable y sección relativamente constante. Se consideran bacterias no móviles y suelen presentar una estructura característica de “horqueta” o “Y” que permite reconocerla fácilmente al microscopio (Figura 1).

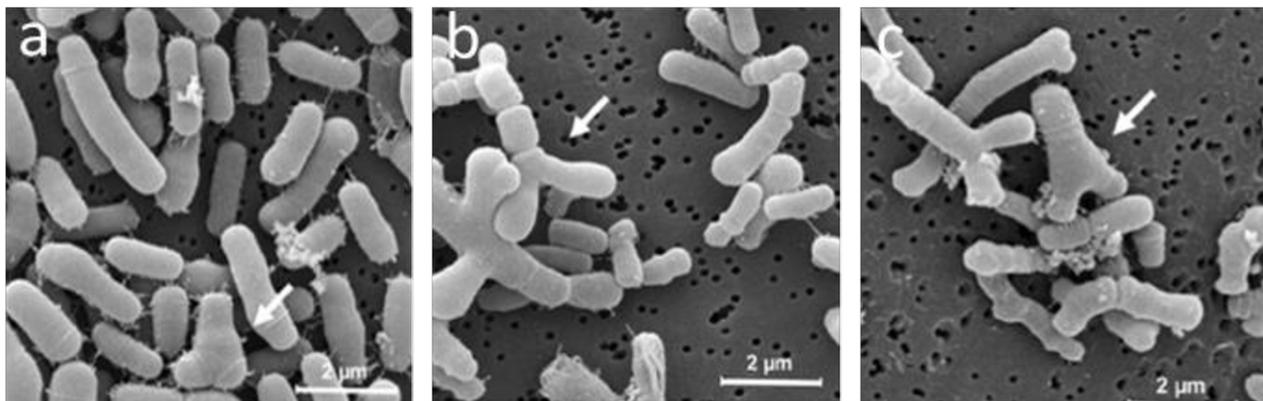


Figura 1. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 cultivadas durante 22 hs a pH no controlado (a) o a un pH controlado de 5 (b) y 6.5 (c). Las flechas blancas indican una morfología típica de las células del género *Bifidobacterium*. (Micrografías obtenidas de Vinderola y col. 2012[21]).

Aislamiento

La cepa INL1 se aisló en la ciudad de Santa Fe, Argentina, a partir de muestras de LM que fueron donadas voluntariamente por madres en buenas condiciones de salud y que declararon no haber consumido ningún tipo de probiótico durante el embarazo o después del parto.

Una vez obtenidas las muestras de LM se conservaron a 5 °C, procesaron, diluyeron y sembraron en MRS-C agar (medio Man- Rogosa y Sharpe, con cisteína; Biokar Diagnostic; Francia), medio de cultivo selectivo para el aislamiento de bifidobacterias y lactobacilos. Las placas fueron incubadas y aquellas colonias que presentaron morfologías típicas del género *Bifidobacterium* fueron examinadas mediante microscopía de contraste, aisladas y purificadas

mediante la reacción de tinción de Gram, ensayos de movilidad y la actividad de la enzima catalasa. Se almacenaron congeladas hasta su posterior uso seis presuntas colonias de bifidobacterias [22].

Identificación del género taxonómico

Los ADN totales de las presuntas bifidobacterias se obtuvieron utilizando el kit *Gen Elute Bacterial Genomic DNA*. Para definir la identidad de los aislados se utilizaron las muestras de AND purificadas previamente, se amplificaron, secuenciaron y compararon fragmentos de 1.500 pares de bases con el gen 16S de ARNr (ARN ribosomal), los cuales se conocen para distintas especies del género *Bifidobacterium* y se encuentran registrados en bases de datos. Las amplificaciones se realizaron mediante PCR (Reacción en cadena de la Polimersa) *Gene Amp*, utilizando la enzima Taq ADN polimerasa. Los productos de PCR obtenidos se separaron en geles de agarosa, se tiñeron y se visualizaron bajo luz UV. Posteriormente las ampliaciones se purificaron con columnas *MicroSpin* y las secuencias de nucleótidos se determinaron a partir de la extensión de un cebador en el Servicio de secuenciación de ADN de *MacroGen*. La identidad de los aislados fueron verificadas nucleótido por nucleótido utilizando el servicio BLAST de la base de datos NCBI.

Los seis aislados fueron identificados como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, según la comparación con el gen 16S del ARNr; sin embargo, dos aislados perdieron gradualmente la capacidad de crecer en el medio MRS-C y fueron desestimados para los posteriores ensayos[22].

Diversidad genotípica

La diversidad genotípica de los cuatro aislados restantes se analizó mediante la técnica RAPD-PCR (Amplificación Aleatoria de AND Polimórfico mediante PCR), utilizando cuatro primers arbitrarios y reacciones independientes. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando nuevamente la Taq Polymerase; se utilizaron primers específicos de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) y un tubo sin plantilla alguna como controles positivos y negativos, respectivamente. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa siguiendo el protocolo estándar.

Uno de los primers evidenció que al menos tres de las cuatro especies aisladas eran diferentes, pudiendo ser las cepas INL1, INL2 e INL4 o INL5; por otro lado, las distintas cepas pudieron detectarse en cantidades 1 a 4 Log UFC (unidades formadoras de colonias) [22].

Caracterización tecnológica preliminar de las cepas para su utilización en productos lácteos

Cepas potencialmente probióticas con poca tolerancia a los parámetros tecnológicos son de limitado interés para la industria alimentaria si no pueden superar los obstáculos del procesamiento de alimentos [23]. Por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares con la intención de seleccionar el aislado que presente el mejor rendimiento para luego conducir los ensayos con animales, respetando el principio de las 3 R's (reemplazar los métodos existentes, reducir al mínimo número de animales necesarios y refinar las metodologías para hacerlas menos estresantes).

Dado que la congelación es una técnica ampliamente utilizada para preservar la viabilidad y las propiedades tecnológicas de los cultivos comúnmente utilizados en la industria láctea, el grupo de trabajo del INLAIN determinó la capacidad de almacenamiento de las bifidobacterias como cultivos congelados concentrados. El recuento celular de las suspensiones celulares en el momento 0, antes de la congelación, varió de 9,2 a 9,8 Log UFC/mL. Después de 6 meses de almacenamiento congelado a -20°C o -70°C , no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la viabilidad celular, variando el recuento celular de los 4 aislamientos evaluados de 8,9 a 9,7 Log UFC/mL y de 9,6 a 9,9 Log UFC/mL, respectivamente.

Para prevenir las condiciones estresantes involucradas en procesos industriales que podrían afectar la funcionalidad de las bacterias probióticas, normalmente suelen utilizarse como cultivos adjuntos para la producción de leche fermentada o quesos. Fue así que se inocularon bifidobacterias en leche o leche acidificada (pH 4,5) en niveles que fueron de 9,1 a 9,4 Log UFC/mL. Luego de 4 semanas de almacenamiento refrigerado a dos pH distintos (6,5 y 4,5), pérdidas insignificantes en la viabilidad celular se observaron en relación con los recuentos en el tiempo 0. Se ha informado que la estabilidad de las bifidobacterias en leches fermentadas es variable y altamente dependiente de la cepa [24].

El uso de cepas probióticas como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos ha despertado interés en los tecnólogos alimentarios ya que no solo la cepa podría presentar propiedades funcionales sino también funciones tecnológicas permitiendo reducir el tamaño del inóculo iniciador. Otro ensayo llevado a cabo con las cepas aisladas en el INLAIN consistió en determinar la capacidad de crecimiento en leche, ya que muchas cepas probióticas carecen de habilidad proteolítica suficiente para obtener nitrógeno a partir de la leche o de las proteínas de suero. Para lo cual, la capacidad de crecimiento de las cuatro cepas de bifidobacteria se evaluó en leche desnatada al 10% junto a diferentes cantidades de extractos de levaduras como fuente externa de nitrógeno. Los cuatro aislados fueron capaces de crecer a partir del agregado de 0,05% (p/v) de extracto de levadura alcanzando cada aislado un recuento de 9 Log UFC/mL. A su vez, dado que los valores de pH fueron descendiendo a medida que la concentración de levaduras se incrementaba, resultó de interés determinar los contenidos de ácido láctico y acético mediante

HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance) a partir de los sobrenadantes celulares. La relación de ácido acético/ácido láctico para las cepas en leche con 0,05% (p/v) de extracto de levadura, resultaron ser significativamente menores que la producción de los cultivos iniciadores habituales de *S. thermophilus* Jo1 y *L. helveticus* 209 bajo las mismas condiciones; hay que destacar, que el agregado del extracto de levadura, suele conferir un sabor amargo a la matriz, pero que dependiendo de la concentración del extracto las características sensoriales del producto podrían no afectarse. Por otro lado, investigaciones previas demostraron que debido a la gran capacidad de crecimiento de las bifidobacterias en leche es prometedor su utilización como cultivos iniciadores, aunque algunos desarrollos deben de llevarse a cabo para enmascarar el posible sabor indeseable que se percibiría en la leche debido a la producción de ácido acético. Motivo por el cual, distintas estrategias como por ejemplo el agregado de agentes de flavours sintéticos o naturales podría ser una opción para minimizar el posible sabor a vinagre debido a la presencia de dicho ácido.

El secado por aspersión, o también conocido como secador spray es una herramienta tecnológica ampliamente utilizada en la industria láctea para deshidratar leche, la cual es una potencial alternativa más económica y versátil de escalar a planta industrial, que la liofilización o *freeze-drying* para la producción de cultivos probióticos. Dado que los polvos obtenidos por secador spray contienen altos niveles de bacterias probióticas viables son una presentación conveniente para el almacenamiento y transporte de estos cultivos [23]. Es así, que en el INLAIN se evaluó la resistencia al secado spray de cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Los cuatro aislados, presentaron una resistencia satisfactoria al proceso de deshidratación obteniéndose polvos con contenidos de humedad cercanos al 3,7% y células viables en el orden de 9,1 a 9,5 Log UFC/g. También evaluaron la viabilidad a lo largo del tiempo durante el almacenamiento, y no encontraron diferencias significativas a lo largo de seis meses conservados a 5 °C; sin embargo, a temperatura ambiente los recuentos disminuyeron de 4 a 5 órdenes logarítmicos, según la cepa en particular. Por lo tanto, los cultivos de las *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* resultan ser potenciales candidatos al secado spray, aunque se debe trabajar para mejorar la sobrevida al almacenamiento.

Además, los cultivos en polvo obtenidos por secado spray, se sometieron a rehidratación y se analizaron las estabilidades en agua caliente a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C), para simularla preparación de mamaderas o de comida caliente. A 40 y 50 °C, no encontraron pérdidas significativas de la viabilidad en las suspensiones celulares ensayadas, no así a 60 °C, donde las pérdidas fueron de 2 a 5 órdenes logarítmicos, dependiendo de la cepa. A esta temperatura se observó un comportamiento particular de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 cuando se llevaron a cabo los recuentos bacterianos a 60 min: un aumento en los recuentos bacterianos se observó con respecto a los recuentos llevados a cabo a los 30 min[22]. Ese comportamiento indicó un recuperamiento parcial de las células luego de ser sometidas al factor de

stress de la temperatura, lo cual podría de considerarse como una ventaja de la cepa utilizada a lo largo de esta tesis.

Ensayos en animales

Si se pretende desarrollar un alimento funcional los ensayos en vivo en animales sobre la funcionalidad y la seguridad de los nuevos aislados bacterianos cuyo consumo se destinaría a seres humanos es un prerrequisito [8]. El hecho de que las cepas se hayan aislado de LM, la cual es administrada por las madres hacia los recién nacidos durante los primeros días de vida, sugiere que las cepas serían seguras y potencialmente reguladoras de la función inmune [25], [26]. Además, la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* es una de las especies comúnmente incorporadas en AF por sus diversos efectos benéficos tales como la reducción del riesgo de contraer diarrea por parte de los niños y aliviar trastornos alérgicos.

Dado que *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, fue la cepa de mejor resistencia a la rehidratación en agua caliente, fue la elegida para llevar a cabo los ensayos in vivo en ratones BALB/c. El ensayo consistió en una administración oral de una dosis constante de la cepa (2×10^8 UFC/ratón) en leche desnatada al 10% por 3, 6 y 10 días consecutivos, teniendo un grupo control al cual de lo administraba la misma matriz pero sin la cepa.

La administración oral no provocó efectos secundarios indeseables en cuanto a la translocación de enterobacterias al hígado. El análisis de la estructura del intestino no mostró infiltraciones de linfocitos, atrofia de las mucosas o síntomas de inflamación intestinal; como tampoco cambios en la estructura de los intestinos delgado y grueso.

En cuanto a las propiedades probióticas, se observó un aumento significativo en el número de células productoras de IgA en la lámina propia tanto en el intestino delgado como grueso, en particular en el grupo donde se administró durante 10 días, el cual evidenció un aumento del 71 % del parámetro evaluado. La relevancia de dicho estudio se centra en que las moléculas de IgA en el intestino tienen la función de excluir del sistema inmune a patógenos y proteínas extrañas junto a la cooperación de los mecanismos de defensa innatos y específicos [22].

Posteriormente, se realizaron ensayos de mortalidad y translocación para determinar el efecto protector de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 frente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Los resultados fueron prometedores, ya que con 10 días de administración de la cepa se redujo tanto la prevalencia como la severidad de la infección con *Salmonella*. Los efectos observados son consecuencia de diversos mecanismos del sistema inmune: inducción de IgA secretoria en el intestino, como también un incremento de la interleucina 10 (IL-10), con capacidad anti inflamatoria [27].

En el año 2017, Burns y col. [28] publicaron los resultados de un estudio llevado a cabo con la cepa INL1 secada por aspersión y sus efectos sobre la colitis crónica y aguda en ratones BALB/c. En cuanto al secado spray, y al igual que Loyeau y col. [29], se evidenció una satisfactoria

capacidad de resistencia al secado por aspersión, con una tasa de supervivencia cercana al 97 %. Tanto la cepa INL1 como cultivo fresco o secado por spray en leche reconstituida al 20%, mantuvieron la capacidad anti inflamatoria en el modelo de colitis.

Por lo tanto, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, en poder actualmente de la empresa francesa Pileje mediante un acuerdo de transferencia de material biológico (208-2020) para profundizar los estudios de su capacidad probiótica y propiedades tecnológicas, se considera un agente bioactivo de interés para diversificar los estudios de deshidratación mediante la técnica de encapsulación y sus variantes, convirtiéndose en uno de los objetivos de la presente tesis.

b. *Lactobacillus rhamnosus* 73a

El género *Lactobacillus* está constituido por bacterias con morfología de bastón, no móviles, no formadoras de esporas, Gram-positivas, que comprenden una parte importante de la microbiota bacteriana humana y los alimentos fermentados.

En la Figura 2 se muestra una fotografía de la especie a modo representativo.

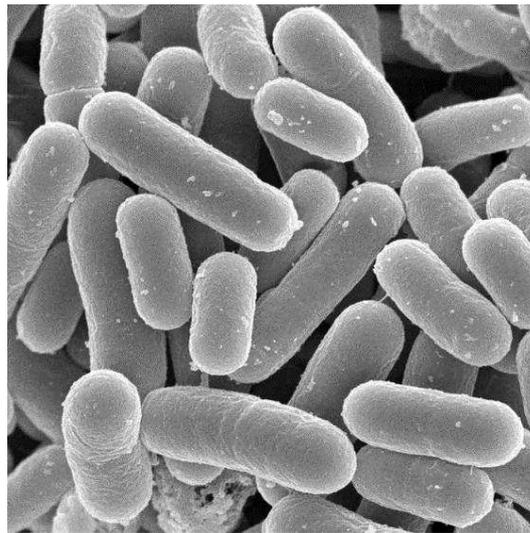


Figura 2. Imagen de *Lactobacillus rhamnosus* obtenida de: <http://shopblob.blob.core.windows.net/1115-produtoimagem/zoom-ramos.png>

Muchas de las especies de este género son anaerobias facultativas en cuanto al requerimiento de oxígeno. Durante la fermentación de la glucosa (fuente de carbono) el producto principal metabólico es el ácido láctico, mientras que los ácidos acético y succínico se producen en menores cantidades.

Las especies más comunes aisladas a partir del sistema gastrointestinal humano son *Lactobacillus rhamnosus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. salivarius*. Sin embargo se han aislado otras especies a partir de placas dentales, saliva, el tracto

vaginal de mujeres e incluso otros mamíferos. A modo de información, más de 200 especies diferentes de *Lactobacillus* han sido descritas[30] y este género será próximamente reclasificado taxonómicamente[31].

La cepa utilizada en la presente tesis ha sido aislada y caracterizada recientemente, por lo que aún no se han publicado los resultados obtenidos. Sin embargo hay características compartidas por cepas de *Lactobacillus rhamnosus* que permiten suponer que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 73a (73a) sea un potencial probiótico de interés[32].

La cepa 73a pertenece a la misma especie del reconocido probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, el cual es objeto de estudio hace más de tres décadas[33]. Recientemente, Szajewskay col. [34] han demostrado que la utilización de *L. rhamnosus* GG para el tratamiento de diarrea crónica en niños reduce la duración del trastorno gastrointestinal y el tiempo de hospitalización de los pacientes; como también que aumenta la resistencia frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias.

Esta cepa es capaz de inhibir la adhesión a las células del intestino de agentes patógenos como *Clostridium histolyticum* y *C. difficile* como también *Salmonella enterica*; por otro lado la combinación de la cepa *L. rhamnosus* GG con la cepa LC705 inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *S. enterica*, mientras que la combinación *L. rhamnosus* GG, *P. freudenreichii* y *L. plantarum* inhiben clostridiosis *Listeria monocytogenes*. Puntualmente la cepa *L. rhamnosus* LC705 suprime el crecimiento de algunas levaduras y mohos[35].

Debido a las propiedades probióticas de muchas cepas de la especie *L. rhamnosus*, esta especie se transformó no solo en un compuesto bioactivo de interés para la industria de alimentos sino también en un cultivo protector, por proporcionar protección eficaz frente a microorganismos patógenos en productos lácteos fermentados como no fermentados, bebidas listas para su consumo, embutidos secos y ensaladas[35].

En cuanto a la utilización de la especie como componente activo para formular IF, numerosos estudios de investigación y desarrollo se han llevado a cabo con el objetivo de protegerla e incorporarla a diversas matrices. Doherty y col. [36] han desarrollado y caracterizado miniesferas utilizando como material de pared proteínas de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés *whey protein isolate*) con el objetivo de mantener la viabilidad de la cepa frente a estudios de simulación gastrointestinal in vitro. Además, Liu y col. [37] han implementado el uso de los Productos de la Reacción de Maillard (PRM) entre WPI e isomaltooligosacáridos para generar emulsiones y la técnica de gelificación en frío con el mismo objetivo de promover la sobrevivencia durante el almacenamiento.

En países desarrollados, más del 60% del mercado alimentario de AF está formado por productos que contienen microorganismos probióticos. Sin embargo, la incorporación de estos compuestos bioactivos a productos alimenticios a menudo está limitada no solo por la baja

sobrevida de las bacterias a los procesos que intentan incorporarlas a los productos sino también, por el/los impacto/s que generan en las propiedades organolépticas; es así que estos factores plantean nuevos desafíos tecnológicos [38] y re-direccionan el enfoque al desarrollo de IF que otorguen protección y puedan ser incorporados sin efectos indeseables en los alimentos a lo largo de sus procesos productivos.

Encapsulación de componentes bioactivos

Los microorganismos probióticos en general han sido propuestos para modular la actividad de la microbiota del intestino y la inmunidad local o sistémica, para prevenir infecciones entéricas o ejercer efectos antiinflamatorios; lo cual contribuye al buen funcionamiento y protección del tracto gastrointestinal en animales y humanos. Sin embargo, se ha observado que la influencia de diversos factores de estrés tales como la acidez gástrica y las sales biliares; las enzimas digestivas, niveles de oxígeno y el pH; la presencia de inhibidores; la temperatura de almacenamiento y la composición de matrices de alimentos pueden traducirse en pérdidas de la viabilidad y capacidad de supervivencia de los mismos[39] o alteran su funcionalidad sin necesariamente modificar el número de células viables. Dados estos factores condicionantes, diversos trabajos se han enfocado en desarrollar y mejorar estrategias para estabilizar probióticos, siendo una de ellas la encapsulación. Dicha técnica podría mejorar la supervivencia de los probióticos durante su permanencia en alimentos y/o su paso por el sistema digestivo.

La encapsulación de componentes de interés, sean moléculas como vitaminas, antioxidantes ó microorganismos, consiste en retenerlos en cápsulas de determinado tamaño; dentro de las cuales los ingredientes sensibles puedan ser físicamente envueltos por una matriz denominada “material de pared” [40] que pretende protegerlos de reacciones adversas, oxidación u otros cambios químicos durante el almacenamiento[41]; hacerlos compatibles con algún otro componente de la formulación, modificar sus propiedades y/o enmascarar caracteres organolépticos, entre otros[42]. Según el tamaño de las cápsulas obtenidas, las técnicas se nombran de distinta manera, siendo las más empleadas las conocidas como microencapsulación (escala micrométrica) y nanoencapsulación (escala nanométrica). En la presente tesis, se aplicaron distintas técnicas, procesos y equipamientos para dar lugar a microcápsulas, obtenidas por secado por aspersión (Capítulos 2 y 4); y milicápsulas (escala milimétrica, Capítulo 3) obtenidas mediante aspersión y gelificación iónica.

Estrategias de producción de cápsulas

Diversas estrategias han sido desarrolladas para la producción de cápsulas. A modo general pueden ser clasificadas en tres categorías según la naturaleza que rige el proceso:

- ✓ Métodos físicos: abarcan las técnicas de secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión.

- ✓ Métodos fisicoquímicos: comprenden la coacervación simple o compleja e inclusión en liposomal.
- ✓ Métodos químicos: hacen referencia a la polimerización interfacial e inclusión molecular.

En la selección del método de encapsulación debe considerarse el tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y del compuesto de interés a encapsular, la posterior aplicación para el encapsulado a obtener, los mecanismos de liberación del compuesto y los costos. En el caso de sabores y aromas, en la industria de alimentos, el secado por aspersión es la técnica más empleada[43].

a. Secado por aspersión

Dentro de los métodos físicos, el secado por aspersión o secador spray de una suspensión de componente bioactivo, es el más utilizado para producir microcápsulas, donde el componente de interés queda recubierto por el material de pared [44]. Los polvos generados suelen ser de buena calidad, tener baja actividad de agua (a_w), ser de fácil manejo y disposición para el almacenamiento. Por otro lado, de todos los métodos de encapsulación existentes, el secado spray se encuentra desarrollado tecnológicamente desde escala laboratorio, pasando por la escala piloto y hasta el nivel industrial, lo que aumenta la factibilidad del escalado de algún desarrollo y su transferencia al sector productivo.

El equipamiento necesario para el secado spray se encuentra disponible en nuestro país y es de uso ampliamente utilizado en la cuenca lechera Argentina. La producción de leche en nuestro país se concentra en las provincias de Córdoba (37%), Santa Fe (32%) y Buenos Aires (25%), en menor medida en Entre Ríos(3%), Santiago del Estero (1%) y La Pampa (1%) y existe un cierto aporte marginal del resto de las provincias no pampeanas. En el año 2017 había 11.326 tambos, de los cuales el 35,1% se encuentran en la provincia de Santa Fe, 30,0% en Córdoba, 22,1% en Buenos Aires y 7,6% en Entre Ríos [45].

Materiales de pared utilizados en la presente tesis

Los biopolímeros, como proteínas y polisacáridos, han sido usados no solo como materiales emulsionantes y estabilizadores, sino también como materiales de pared para la producción de microcápsulas obtenidas por secado spray[44]. Sin embargo, el material de pared compuesto por un solo constituyente no suele tener las propiedades funcionales deseadas para esta aplicación [46]. Con el objeto de superar este problema y ofrecer versatilidad, diversos estudios han sugerido una combinación de proteínas y polisacáridos, concretamente conjugados mediante la Reacción de Maillard (RM), como material de pared para la encapsulación de compuestos [47]. Se ha demostrado que los Productos de la RM (PRM) tienen propiedades funcionales satisfactorias como solubilidad y funcionalidad interfacial [48]; además presentan la ventaja de combinar las

características emulsionantes de las proteínas con las características de solvatación de los azúcares [49].

Dado que Argentina tiene una larga tradición en la producción y el consumo de productos lácteos, la investigación y desarrollo para abordar problemáticas relacionadas con la industria lechera mediante el aprovechamiento del suero de quesería (considerado un subproducto, y por lo tanto desechado en la mayoría de los casos), brindaría proyecciones económicas interesantes al sector y relevantes en el mercado interno de nuestro país. La microencapsulación, mediante el secado spray ha demostrado potencial para producir cultivos bacterianos deshidratados y con elevado nivel de células viables [50], utilizando leche [51]ó suero de quesería [52] como matriz de encapsulación; sin embargo, actualmente los trabajos de obtención de microcápsulas, donde se utilizan los PRM, como matrices o bien como agentes emulsificantes, y el secado spray son escasos.

Proteínas de interés

Para el desarrollo de AF e IF muchos son los compuestos que se necesitan usar para la formulación y desarrollo, siendo las proteínas unas de las moléculas ampliamente empleadas, no sólo por su valor nutricional sino también por sus diversas propiedades que las convierten en componentes de interés para alcanzar los objetivos deseados.

La leche es producida por las glándulas mamarias de mamíferos hembras y está destinada a la alimentación del recién nacido desde su nacimiento hasta el destete. Se considera un alimento altamente nutritivo y de rápida digestión, rico en proteínas, minerales y energía, todo presente en una solución acuosa. Además aporta al recién nacido compuestos esenciales como agentes protectores, microorganismos y factores de crecimiento. La leche es un fluido altamente perecedero y es producida naturalmente para rápido consumo luego de su generación. Sin embargo, el ser humano ha utilizado durante siglos la leche de otros mamíferos y sus productos lácteos derivados, para complementar su dieta. A nivel internacional, la mayoría de la leche procesada es de origen vacuna, sin embargo, cantidades significativas de leche de búfala, cabra y oveja también son utilizadas para la producción de productos lácteos.

Durante el último siglo, el procesamiento de la leche y derivados se ha ido transformando de arte a ciencia. Los productos tradicionales tales como quesos y yogures combinan conocimientos ancestrales con ciencia moderna, tecnología y nuevas técnicas de procesamiento; dando así nuevos productos como la leche secada por atomización o secador spray, concentrados de proteínas de leche y aislados o concentrados de proteínas de suero de leche (WPIo WPC, por sus siglas en inglés “*whey protein concentrates*”) [53].

Suero de la industria quesera

Durante la elaboración de quesos, se separa un líquido remanente del cuajo llamado suero, el cual está siendo cada vez más utilizado como alimentación animal o como fuente de proteínas para la nutrición humana. El suero puede ser de dos tipos:

- 1) Suero dulce, el cual proviene de la coagulación enzimática de la leche por el cuajo a pH 6,6 (ejemplo: queso *cheddar*).
- 2) Suero ácido, obtenido de la producción de quesos frescos de pasta blanda (ejemplos: quesos cremas y Camembert entre otros), luego de la coagulación ácida de la leche; y, en el caso del queso *Cottage*, seguido el calentamiento de la cuajada.

Comercialmente el suero se presenta tanto líquido como en polvo, con diferentes composiciones que pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de diferentes presentaciones de concentrados suero vacuno. (Adaptada de Cayot y Lorient, 1997 [54]).

Concentrado de suero	Composición (% (p/p))						
	Agua	Lactosa	Lípidos	Minerales	Nitrógeno	β -lg	α -la
Líquido	93,5	4,5	0,3	0,6 – 0,8	1,0	0,45	0,2
Polvo	4,0	70,0	-	9,0– 12,0	13,0	-	-
Cuajado	42,0	36,0	-	8,0	9,0	-	-
Concentrados UF	4,0	9,5	6,0	3,0	75,0	32,0	15,0

Proteínas de suero lácteo

Las proteínas del suero lácteo vacuno, siempre dependiente de la raza productora de la leche, son una mezcla de proteínas con numerosas y diversas propiedades y por lo tanto, pueden tener diversos usos potenciales. La mayoría de las proteínas son β -lactoglobulinas (β -lg) y α -lactoalbuminas (α -la). Representan aproximadamente el 70% del total de las proteínas del suero y son las responsables de la hidratación, gelificación y propiedades tensoactivas (emulsificación y propiedades espumantes) de las presentaciones de WPC y WPI. Estos últimos, presentan diversas aplicaciones industriales y usos en la industria de alimentos, algunos de los cuales consisten en la manufactura de panes y galletas, cereales, pastas, helados y hasta chocolates. Se consideran ingredientes proteicos los cuales a menudo son utilizados por sus propiedades nutricionales y terapéuticas en dietas de bajas calorías y en la nutrición enteral de pacientes que se encuentran bajo cuidados intensivos.

La β -lg se encuentra en concentraciones de 2 a 4g/L suero y posee un peso molecular (PM) de 18,3 kDa. Su estructura proteica primaria se compone de 162 aminoácidos; presentando un grupo tiol y dos puentes disulfuro. Existen 7 variantes genéticas, siendo las más abundantes las llamadas Ay B que difieren en los aminoácidos 64 y 118, donde una asparagina y una valina se

reemplazan por glicina y alanina, respectivamente. Se separan por cromatografía de intercambio iónico, ya que al pH de la leche (cercano a 6,6) la variante A posee más carga electrostática negativa.

Se conocen las estructuras primarias de β -lg de varias especies de rumiantes, mientras que las estructuras secundarias y terciarias muestran un elevado grado de organización como puede observarse en la Figura 3.A. Presentan estructuras del tipo β -láminas en un 43-50% de aminoácidos (representadas por flechas), hélices α en un 10 a un 15% de aminoácidos (espirales) y Giros β (15-20% de aminoácidos).

El monómero de β -lg se asemeja a un cono o cáliz con un bolsillo hidrofóbico capaz de unir vitamina A (retinol) y ácidos grasos. Su estructura compacta se debe al “apilamiento” de 9 láminas- β y a los dos puentes disulfuro; esta estructura es resistente a la proteólisis por proteasas digestivas. Al pH de la leche, la β -lg existe como dímero constituido por una estructura que se asemeja a dos conos apilados.

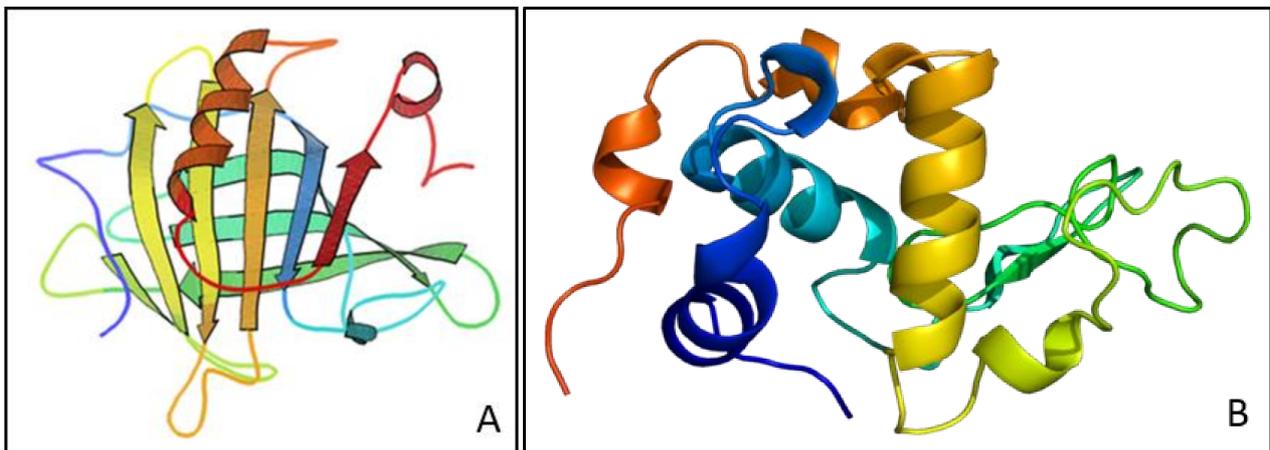


Figura 3. A) Estructura terciaria de la β -lactoglobulina, extraída del Protein Data Bank. **B)** Estructura terciaria de la α -lactoalbúmina, extraída de: <http://bioagroin.blogspot.com/2011/05/lactoalbumina.html>.

La segunda proteína más abundante en el suero de leche es la α -la, presente en una concentración de 1,5g/L de suero, con un PM de 14,2kDa. Es una molécula pequeña de 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuros. Existen dos variantes genéticas: A (Gln) y B (Arg), diferentes en su décimo aminoácido. Forma parte de la enzima Galactosil Transferasa y participan de la biosíntesis de lactosa.

En cuanto a sus estructuras secundarias y terciarias, como puede observarse en la Figura 3.B, son poco organizadas: el 30 % presenta hélices- α y 9% láminas- β ; por lo tanto posee una estructura flexible. Sin embargo, debido a la presencia de un enlace a Ca^{+2} y los puentes disulfuros mantiene una estructura compacta elipsoidal, con un pequeño bolsillo hidrofóbico.

El suero también contiene otras proteínas en menor proporción con relevancia biológica, a nivel inmunológico y enzimático. La albúmina sérica bovina (ASB) es una proteína de 582

aminoácidos que funciona como proteína *carrier* de moléculas no polares en fluidos biológicos. Es una proteína compacta en su extremo C-terminal y puede ser reversiblemente desnaturada con calor, o por adición de ácido o base a 40-50 °C. Por otro lado, el suero contiene Inmunoglobulinas, las que conforman una gran familia con propiedades de anticuerpo, de tipo glicoproteínas de PM variable, de 148 a 1000kDa. Poseen temperaturas de desnaturación mayores que la β -lg α -la y son muy sensibles al calor en presencia de ASB. También existen metalo-proteína del tipo Lactoferrina, cuyo PM varía de 80 a 92kDa, posee 703 aminoácidos y 16 puentes disulfuros. Cada mol de lactoferrina puede unir un mol de Fe^{+3} . Posee un elevado punto isoeléctrico (pI), por lo que forma complejos con ASB y β -lg. Debido a la unión al hierro, presenta alta resistencia a la desnaturación por calor y propiedades antibacterianas similares a las de las lisozimas y lactoperoxidasas. En menores proporciones, se encuentran lactoperoxidasas; fosfatasas alcalinas; catalasas; sulfhidril-oxidases; plasminas; proteasa-peptonas[54], [55].

Inulina

El consumo de fibras dietéticas fermentables puede inducir el crecimiento y/o favorecer la actividad de poblaciones de microorganismos que se consideran beneficiosas y que residen en el sistema digestivo del ser humano, principalmente en el intestino grueso. Dentro de las fibras dietéticas fermentables más estudiadas al momento se encuentran los fructo-oligosacáridos y la inulina, los cuales sugieren una estrategia prometedora para modular la microbiota intestinal, y promover la salud de los individuos que padecen enfermedades relacionadas a la composición y función de la microbiota [56].

Un sustrato incorporado mediante la dieta que atraviesa, sin ser digerido, el tracto digestivo superior, de bajo pH y alta carga enzimática, y que tenga efectos beneficiosos en el tracto digestivo inferior, puede considerarse potencialmente prebiótico. Un prebiótico es “todo aquel sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud”[57]. Por lo tanto, la inulina ha pasado a ser un compuesto de interés ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica, no sólo por su potencial prebiótico, ya que la microbiota del colon es capaz de descomponerla, sino también por sus propiedades fisicoquímicas como ser sustituto parcial de grasas o por su capacidad de formar geles para la liberación selectiva de fármacos en el colon.

La inulina pertenece a la familia química de los fructanos, los cuales son polímeros lineales de moléculas de fructosa ligadas mediante enlaces glucosídicos β -2,1, con una molécula de glucosa terminal. Se encuentra generalmente en raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas como sustancia de reservas [58]; también en vegetales como la cebolla, puerro, ajo, plátano y trigo; también en semillas del tipo centeno y cebada.

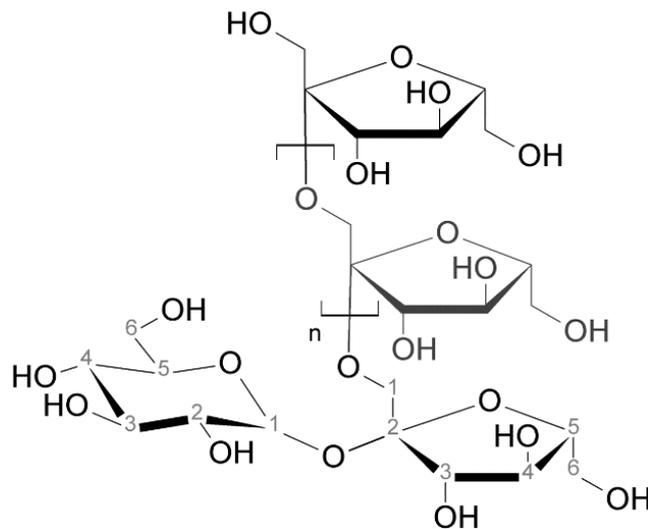


Figura 4. Estructura química de la Inulina (Imagen extraída de: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Inulina>; 09/2019).

Las fracciones de inulina con elevado grado de polimerización (factor que indica cuántas unidades repetitivas se encuentran en un polímero) son menos solubles en agua, poseen temperaturas de fusión más altas si son cristalinas o temperaturas de transición vítrea si son anómalas, son químicamente más estables (menos sensibles a hidrólisis), forman geles más fuertes y son más viscosos cuando se disuelven.

La inulina se usa para modificar la textura o reemplazar la grasa en algunos alimentos debido a que su capacidad de formar geles y su comportamiento viscoso dependiente del grado de polimerización lo hacen adecuado para ese propósito. Además, los enlaces β -2,1 que unen unidades de fructosilo no se hidrolizan por las enzimas digestivas humanas, lo que permite el reemplazo de grasas con bajo contenido calórico. La forma parcialmente hidrolizada de inulina, oligofructosa, tiene esta misma característica y es más dulce, y por lo tanto se usa como un sustituto de azúcar bajo en calorías. Su indigestibilidad hace que tanto la inulina como la oligofructosa sean adecuadas como fibras dietéticas.

La columna vertebral de la inulina es relativamente flexible en comparación con otros polisacáridos, ya que no incorpora el anillo de azúcar. Esto se combina con una temperatura de transición vítrea (la temperatura, por debajo de la cual las propiedades físicas de los sistemas plásticos cambian a las de un estado vítreo o cristalino) relativamente alta [59], haciendo que la inulina sea un estabilizador adecuado de proteínas en estado seco para todo tipo de aplicaciones. Por ejemplo, en el área de la farmacéutica tiene usos específicos como agente de diagnóstico para la función renal y como adyuvante en vacunas [60].

Diversos estudios e investigaciones se han llevado a cabo en sistemas conteniendo inulina y probióticos, demostrando que existe un efecto simbiótico [58]. Existen ensayos donde los

prebióticos sugieren tener efectos inhibitorios frente algunas bacterias patógenas; sin embargo quedan pendientes estudios para corroboraren animales como en el ser humano, los efectos comprobados *in vitro*[61].

Dextranos

Los Dextranos (DX) son polisacáridos de origen bacteriano formados esencialmente por residuos de D-glucopiranosos unidos mediante un enlace glucosídico del tipo α -1,6 con diversas ramificaciones de enlaces α -1,2; α -1,3 o bien α -1,4 [62]. Debido al alto porcentaje de enlaces glucosídicos α -1,6, los DX son polisacáridos muy flexibles, con elevada solubilidad y baja viscosidad en solución. Como reactivos, los DX sin carga electrostática neta evitan lo que en algunas ocasiones se convierte en un problema: la formación de complejos electrostáticos, los cuales suelen generarse en mezclas que contienen proteínas y polisacáridos aniónicos (polisacáridos de carga electrostática neta negativa). Además, los DX se consideran buenos agentes macromoleculares con capacidad aglutinante y son incapaces de formar geles por sí solos [63].

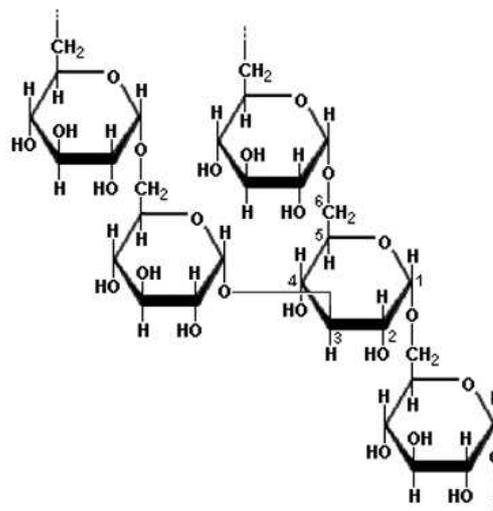


Figura 5. Estructura química base de los dextranos (Imagen extraída de: <http://www.scientificpsychic.com>; 09/2019)

Actualmente los DX son de interés en aplicaciones biológicas debido a su buena biocompatibilidad por ser de baja toxicidad tisular y elevada degradabilidad enzimática. Es así que muchas investigaciones se centran en utilizarlos como *carriers* poliméricos en novedosos sistemas de liberación de agentes bioactivos, como también en la formulación de hidrogeles, los cuales se han vuelto sumamente importantes en las áreas de la biomédica, farmacéutica, biotecnología e incluso en el área del medioambiente [62], [64].

Goma Xántica

La goma Xántica fue el primer biopolímero producido industrialmente, el más ampliamente estudiado y comercialmente aceptado como polímero de fuente microbiana [65].

Es un exopolisacárido producido y secretado por *Xanthomonas spp.* La estructura química aceptada consiste en un esqueleto celulósico con cadenas laterales de trisacáridos unidos a unidades de glucosa. Las cadenas laterales consisten en unidades de manosa unidas mediante enlace glucosídico β -1,4 a un ácido glucurónico, el cual se une mediante enlace β -1,2 a una manosa; la manosa ligada a la glucosa (enlace α -1,3) están sustituidas con un grupo acetilo y la manosa externa por un cetal de ácido pirúvico. Sin embargo, el grado exacto de sustitución varía según las condiciones de fermentación y la cepa de *Xanthomonas* utilizada para su producción; en función del genotipo de la cepa *Xanthomonas* se conocen seis pentámeros diferentes de unidades repetitivas [66].

La goma xántica se usa en una amplia gama de industrias, como alimentos, artículos de tocador, cosméticos, pinturas a base de agua, etc., debido a sus buenas propiedades reológicas; también se usa como agente de control reológico en sistemas acuosos y como estabilizador de emulsiones y suspensiones.

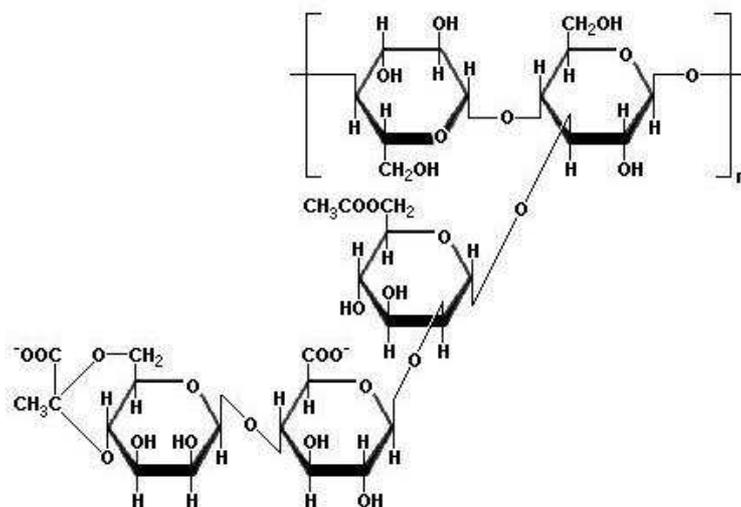


Figura 6. Estructura química de la Goma Xántica (Imagen extraída de internet: <https://todosobrecarbohidratos.wordpress.com/2013/08/07/estructura-de-carbohidratos-2/>; 09/2019)

Una de las propiedades más importantes de la goma xántica es la capacidad de formar soluciones de alta viscosidad a bajas concentraciones; en la industria de alimentos esto es una ventaja, ya que puede agregarse en pocas cantidades a diversos productos, sin afectar el sabor del producto final [67].

Muchas investigaciones se vienen desarrollando para aprovechar sus propiedades. Tal es el caso de Boonlao y col. [68], quienes estudiaron la influencia de WPI y goma Xántica para estabilizar

emulsiones que contenían astaxantina, para luego evaluarlas frente a la digestión in vitro. De igual modo Benichou y col.[69], sintetizaron conjugados de WPI y goma xántica con la intención de obtener compuestos anfifílicos que potencien la actividad superficial de los compuestos de partida.

Reacción de Maillard

La RM o también conocida como reacción de pardeamiento no enzimático, implica una red compleja de reacciones de gran relevancia en el área de las ciencias alimentarias y medicinales. Consiste en la reacción entre compuestos que contienen grupos carbonilos, tales como azúcares reductores, con compuestos que contengan grupos aminos, como por ejemplo los aminoácidos lisina de las proteínas. Esta compleja red de reacciones genera no solo agregados proteicos de elevado peso molecular (PM) sino también productos de bajo PM, que son considerados los que aportan aroma, flavor y color a los productos finales[70]. En la Figura 4 se esquematizan resumidamente las etapas más relevantes de la RM.

Desarrollo de la RM

La descripción de las distintas etapas de la RM se describe de acuerdo a una bibliografía reciente de O'Mahony y col. [71], la cual puede tener algunas diferencias con bibliografías más antiguas.

La etapa temprana de la RM involucra una serie de reacciones individuales que se inician cuando el grupo ϵ -amino del aminoácido lisina; o en menor extensión, los grupos imidazol e indol pertenecientes a los aminoácidos histidina y triptofano respectivamente o bien, el grupo α -amino de los aminoácidos terminales de proteínas o péptidos se condensan con el grupo carbonilo de azúcares reductores para dar lugar a una base de Schiff, con la liberación de una molécula de agua. Dado que la base de Schiff es termodinámicamente inestable se lleva a cabo un reordenamiento molecular espontáneo para formar compuestos de Amadori (en el caso de las aldosas) o de Heyn's (en el caso de las cetosas).

La etapa intermedia de la RM involucra la degradación de los productos de reordenamiento de Amadori y Heyn's mediante distintas reacciones, incluyendo: reacciones de ciclación, deshidratación, retroaldolizaciones, isomerizaciones y varias condensaciones, que provocan la degradación de aminoácidos y carbohidratos. Los productos obtenidos en esta etapa, como puede observarse en la Figura 4, depende en gran parte de las condiciones de pH del medio de reacción.

Las etapas avanzadas son complejas y diversas, dependientes de las condiciones de reacción (como por ejemplo; condiciones ambientales prevalentes durante el tratamiento térmico y el almacenamiento de las mezclas de proteínas y carbohidratos), e involucra la deshidratación y descomposición de los productos intermedios dando como resultados muchos Productos Avanzados de la RM (AMPs o AGEs (*Advanced Glycation End Products*) por sus siglas en inglés) y polímeros y co-polímeros nitrogenados, conocidos colectivamente como Melanoidinas. Éstos

compuestos son los altamente responsables de aquellas consecuencias poco deseables de la RM que genera pérdida de valor nutricional, entrecruzamiento de proteínas y tanto sabores como coloraciones indeseables [72].

En comparación la conjugación de proteínas con monosacáridos o disacáridos, la conjugación de polisacáridos impulsó una mejora considerable en las propiedades química y físicas de las proteínas [73], tales como la estabilidad térmica [74], capacidad de emulsificación, efectos bactericidas[75]y propiedades antioxidantes[76].

La conjugación entre proteínas y polisacáridos generalmente se lleva a cabo mediante el método de calentamiento a humedad controlada. El proceso de calentamiento en seco involucra ambos materiales deshidratados, tanto proteínas como polisacáridos, para luego hacerlos reaccionar manteniéndolos a una temperatura constante bajo una determinada humedad relativa. El proceso suele llevarse a cabo a largo plazo, desde días a semanas a 60 °C; pero si la temperatura se eleva a 80 °C puede reducirse solo a 2 horas. No es sencillo controlar la extensión de la reacción desarrollada de este modo, siendo usualmente los productos obtenidos una mezcla de PRM de las etapas intermedias y/o avanzadas, los cuales tienden a colores amarillos o pardos [63].

En el área de los alimentos, estos efectos pueden resultar tanto deseables como indeseables en cuanto a la percepción del consumidor [77].

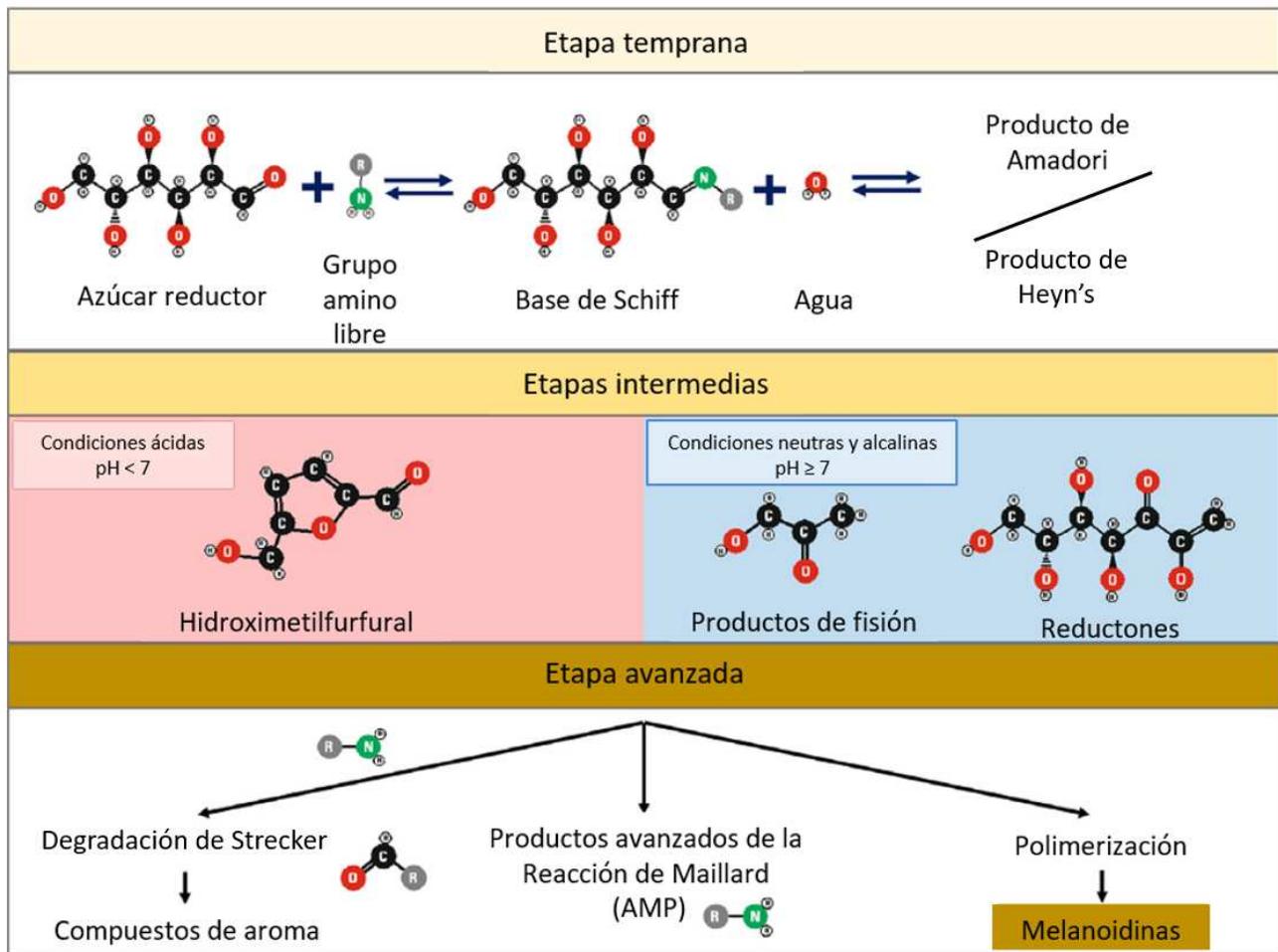


Figura 7. Esquema resumido de las etapas de la Reacción de Maillard. (Imagen extraída y adaptada de O'Mahony y col. 2018[71][71][71][71][71][71][71][71][71][71]).

Productos de la RM y Propiedades Funcionales

Como puede concluirse de lo presentado anteriormente, los productos de la reacción de Maillard (PRM, también conocidos como: AMPs, AGEs, conjugados o glicosilados) se corresponden a un amplio grupo de compuestos químicos, cuya diversidad no sólo depende de la naturaleza de las moléculas proteicas y grupos reductores conjugados, sino también de las condiciones bajo las cuales la RM se desarrolla. Estudios de caracterización de PRM han demostrado que esos compuestos, los cuales a veces suelen purificarse según los objetivos de cada investigación [63], presentan distintas propiedades físico-químicas en comparación a los compuestos de partida, dando lugar a nuevas y/o mejores propiedades funcionales.

La funcionalidad de las proteínas y polisacáridos, concepto también aplicable a los PRM, puede definirse como “aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento del compuesto en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo”[78]. Para Morr y Ha [55] el concepto varía un poco, ya que consideran que las propiedades funcionales son “aquellas propiedades fisicoquímicas que influyen en la estructura,

aparición, textura, viscosidad, sensación en boca o retención del flavor (término que describe dos percepciones diferentes, aunque simultáneas: el olor y el sabor y, en menor medida, el efecto producido sobre los receptores bucales del tacto y el dolor) del producto". Una lista de propiedades funcionales según los últimos autores se presenta a continuación:

- Hidratación y solvatación.
- Dispersión y disociación.
- Despliegue molecular y desnaturalización.
- Difusión.
- Adsorción y actividad interfacial.
- Interacciones proteína-proteína. Modificaciones en la viscosidad por polimerización y/o agregación.
- Interacciones proteínas-carbohidratos; uniones de ligandos.

Las propiedades funcionales previamente nombradas son el resultado de las propiedades hidrodinámicas y de aquellas propiedades relacionadas a la superficie molecular. Las propiedades hidrodinámicas se ven afectadas en gran parte no solo por la forma sino también por el tamaño de la macromolécula y los complejos moleculares posibles de formarse. Por el contrario, las propiedades tensoactivas de la superficie molecular, más que nada de proteínas, son más influenciadas por la secuencia de aminoácidos y la relación de aquellos de carácter hidrofóbico e hidrofílico y por la flexibilidad de la molécula; la unión de agua, dispersabilidad, solubilidad, viscosidad y gelificación son ejemplos de propiedades tensoactivas [55].

Los conceptos previamente nombrados, no sólo suelen aplicarse y analizarse sobre sistemas netamente proteicos, sino también sobre PRM. Existen diversos trabajos, como por ejemplo los de Figueroa y col. [7] y grupo de trabajo de FAO y WHO [8], quienes han estudiado algunas propiedades funcionales de distintos PRM, entre las cuales se destacan la capacidad emulsificante, de gelificación, espumado y de mejorar textura, las cuales pueden considerarse propiedades funcionales incluidas dentro de las interacciones entre proteína o entre proteínas y carbohidratos. Por otro lado, los PRM pueden disminuir la alergenicidad de ciertas proteínas [81] e incluso presentar capacidad antioxidante [82], las cuales pueden ser consideradas nuevas funcionalidades desde el punto de vista inmunológico y fisiológico.

A consecuencia de todo lo previamente nombrado, los PRM comenzaron a caracterizarse y a utilizarse para el desarrollo de sistemas que dieran lugar en primera instancia a IF. Dos de las grandes líneas de investigación consistieron en utilizar los PRM como materiales de pared para encapsular probióticos [68] y aceite de pescado, de alto contenido de ácidos grasos Omega 3 [41], haciendo uso de secadores por aspersion, generando microcápsulas que potencien la viabilidad o

estabilidad del compuesto de interés. Sobre las presentaciones en polvo obtenidos no solo se evaluó la estabilidad durante el almacenamiento sino también frente a ensayos gastrointestinales simulados in vitro; también se analizó estabilidad oxidativa y parámetros colorimétricos.

b. Emulsiones

Una estrategia que suele combinarse con pasos posteriores de deshidratación mediante liofilización o secadorspray, es la emulsificación. Dicha técnica es ampliamente utilizada para producir productos farmacológicos o ingredientes alimenticios con la intención de proteger compuestos de interés.

Básicamente, una emulsión consiste en al menos 2 líquidos inmiscibles, generalmente una fase oleosa y una fase acuosa, dispersándose uno de las fases como pequeñas gotas esféricas en la otra. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión de aceite en agua (O/W, *oil/water emulsion*, por sus siglas en inglés); mientras que un sistema que consiste en gotas de fase acuosa dispersas en una fase oleosa se llama emulsión de agua en aceite (W/O). También existen emulsiones de más de dos fases, conocidas como emulsiones múltiples. Ejemplos de estos sistemas comprenden emulsiones de aceite en agua en aceite (O/W/O) o también del tipo emulsiones de agua en aceite en agua (W/O/W)[85]. Recientemente, se ha propuesto como enfoque novedoso, una emulsión múltiple del tipo (S/O/W), donde una fase sólida (S) se dispersa en una fase oleosa (O) y ambas, presentes en gotas más pequeñas igualmente dispersas en una fase acuosa (W).

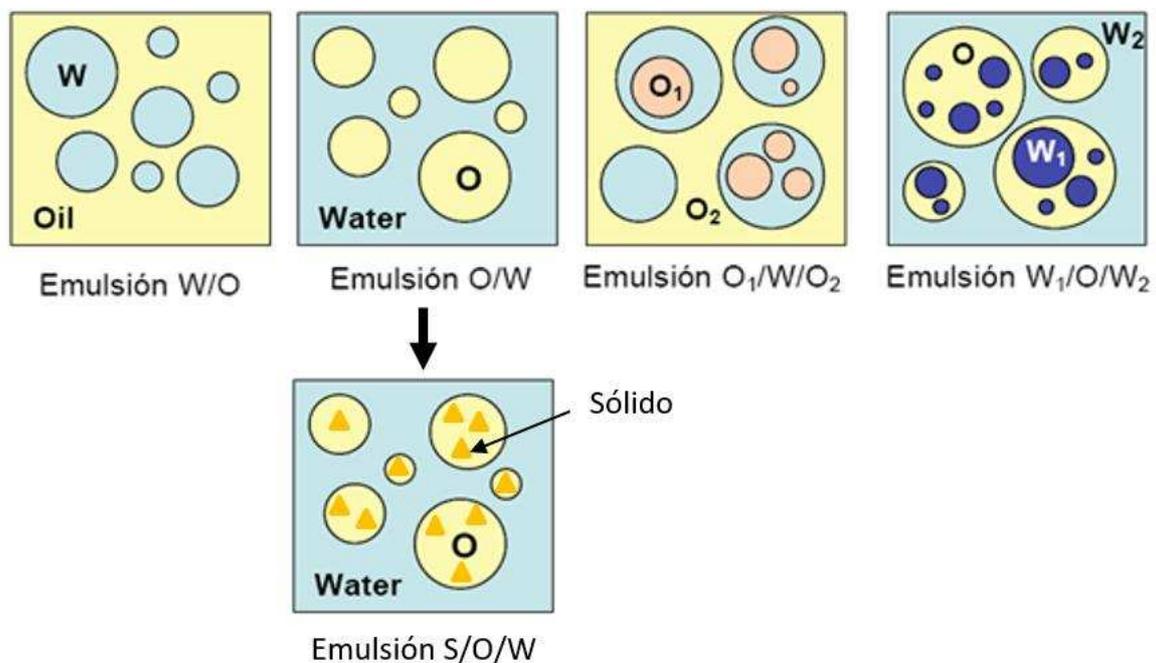


Figura 8. Tipos de emulsiones. (Imagen extraída y adaptada de: <https://www.dynadrill.com.ec/wp-content/uploads/2018/05/Emulsión.png>; 09/2019).

Sistemas S/O/W se han ensayado para proteger una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, probiótico considerado como de fase sólida, de la acción del jugo gástrico [86] y de los ácidos biliares [87]. De igual modo se ha monitoreado la viabilidad de una cepa de *L. rhamnosus*, en emulsiones múltiples, evaluando el efecto protector durante su paso simulado por el tracto gastrointestinal [88], como también Zhang, Lin y Zhong [89], quienes encapsularon *L. salivarius* y realizaron ensayos caracterizando el sistema emulsionante previo al secado por spray.

En la presente tesis, en los Capítulos 3 y 4, se desarrollaron sistemas emulsionados del tipo S/O/W, encapsulando la cepa INL1 (Capítulo 3) y además la L73a (Capítulo 4), utilizando aceite de canola (AC) como fase oleosa y los PRM obtenidos de la conjugación entre WPI y DX como agentes emulsionantes.

En el Capítulo 3, la fase acuosa contenía además alginato de sodio para dar lugar a la gelificación iónica luego de la atomización de las emulsiones en cloruro de calcio. Mientras que en el Capítulo 4, además de incorporar la cepa L73a en sistemas independientes a aquellos que contenían la INL1, se incorporó en la fase oleosa de todos los sistemas inulina como prebiótico y material de pared, y los sistemas emulsionados fueron deshidratados mediante un secador spray.

Aceite de canola

Junto al aceite de oliva y de soja, el aceite de canola es uno de los cultivos oleaginosos más importantes y difundidos a nivel mundial.

El aceite de canola (cuyas siglas hacen referencia a “CANadian Oilseed Low Acid”- AC), fue empleado en el año 1979 en Canadá cuando los fitomejoradores de las semillas de colza utilizaron técnicas de mejoramiento convencionales para eliminar gran parte del ácido erúxico y glucosinolatos de las flores de dicho cultivo. Por un lado, el ácido erúxico es un ácido graso inadecuado para el consumo humano debido a que en grandes cantidades resulta tóxico y se asocia con lesiones cardíacas fibróticas. Por otro lado, los glucosinolatos son un grupo de glucósidos que contienen azufre, se encuentran en las plantas del género *Brassica*, y algunos de sus productos de degradación se han relacionado con efectos negativos para la salud debido a la actividad bociogénica, aunque la evidencia científica en humanos aún permanece incierta.

Actualmente el nombre “Canola” se usa para indicar tres especies del género *Brassica* que producen aceite con bajo nivel de ácido erúxico (menos de 2%) y de glucosinolatos (menos de 30 $\mu\text{mol/g}$): *Brassica rapa*, *Brassica napus* y *Brassica juncea*. La implementación de técnicas agrícolas capaces de reducir las sustancias indeseables y mejorar las propiedades funcionales ha sido un paso fundamental para introducir este aceite al mercado de consumo tanto humano como animal [90]. Sin embargo, es necesario considerar que las modificaciones genéticas de la semilla de colza conducen a la producción de aceites de canola con composiciones de ácidos grasos variables que

pueden afectar la calidad, funcionalidad y estabilidad oxidativa del aceite. Aceites de canola de alto contenido de ácido láurico y esteárico no se encuentran actualmente bajo producción comercial pero tienen potencial para su uso en recubrimientos de confitería, como blanqueadores de café, coberturas batidas y productos horneados como también sustitutos de aceites hidrogenados [91].

El AC, es un buen candidato para la fritura de alimentos, debido a su sabor neutro y resistencia frente a las altas temperaturas, por lo cual no fuma ni quema, siendo mejor que muchos otros aceites.

Algunos estudios clínicos mostraron que altas ingestas de ácidos grasos saturados dietéticos específicos (AGS) y bajas ingestas de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (respectivamente, AGMI y AGPI) están asociados a riesgos tales como presentarse niveles de colesterol sérico y cardiopatías coronarias. El AC contiene alrededor de un 32% de AGPI y altos niveles de ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado. Éste último demostró reducir las lipoproteínas de baja densidad (LDL), sin afectar las lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo cual es sumamente relevante a nivel salud, ya que los altos niveles de LDL están asociados a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, un alto nivel de HDL tiene efectos opuestos, protegiendo al individuo de enfermedades tales como la aterosclerosis. Entre los ácidos grasos poliinsaturados, el aceite de canola contiene un alto nivel de ácido linoleico (ω -6, 21%) y un valor apreciable cantidad de ácido α -linolénico (ω -3, 11%). Específicamente, el ácido α -linolénico es eficaz en reducir los niveles de triglicéridos y la agregación de plaquetas séricas, aumentando el tiempo de coagulación sanguínea. Estos efectos anticoagulantes son considerados propiedades muy importantes del AC, ya que podrían prevenir enfermedades coronarias.

Varios estudios muestran que el AC también contiene sustancias antioxidantes como por ejemplo vitamina E, cuya variabilidad en contenido y composición depende de la variedad de colza analizada; también contiene carotenoides y compuestos fenólicos. La vitamina E es uno de los antioxidantes naturales más importantes, capaces de captar radicales y de mantener la integridad de las células y promover la prevención y el tratamiento del cáncer, la aterosclerosis y enfermedades neurológicas. El compuesto fenólico más abundante es el 2,6-Dimetoxoy-4-vinilfenol, conocido como Canolol, considerado el componente más activo, capaz de eliminar no solo radicales peróxidos sino también peroxinitrito, un agente oxidante y nitrante altamente potente. Sin embargo el Canolol se pierde casi por completo durante el refinado de aceite, especialmente durante el blanqueo y desodorización: por esta razón, se desarrollaron algunas técnicas para preservarlo.

Los componentes antioxidantes le otorgan al AC un papel importante en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama y cáncer de colon. Los componentes del aceite parecen ser capaces de modular el crecimiento y la muerte de las células tumorales, actuando sobre los procesos de oxidación. El AC contribuye a proteger las células del daño oxidativo causado por el

peróxido y radicales libres reduciendo el nivel de peroxidación lipídica y, por lo tanto impidiendo el desarrollo de estados degenerativos.

El AC parece mostrar actividad antihipertensiva mediante pruebas recientes en animales que demuestran que el aceite tiene un mejor efecto sobre la presión sanguínea, en comparación con otros aceites vegetales. Por otra parte, ha demostrado que la incorporación de AC en la dieta, mejora el control de la glucemia en pacientes diabéticos con presión arterial sistólica alta.

Este aceite también es importante también por su actividad antiinflamatoria y antimutagénica. La primer propiedad ha sido informada por un estudio finlandés en el que dos de sus compuestos, vinilsiringol y ácido sinápico, inhiben la formación de óxido nítrico y prostaglandina E2[90].

c. Gelificación iónica, ionótrópica o complejación de polielectrolitos

La gelificación ionótrópica es una técnica fisicoquímica ampliamente utilizada para encapsular compuestos de interés que implica la interacción de un catión (o un anión) con un polímero iónico de carga opuesta para generar una estructura altamente reticulada debido a las interacciones electrostáticas que se establecen

A diferencia de los iones monoméricos, la interacción del polianión con cationes (o polianión con polication) no puede explicarse completamente por el principio de electro-neutralidad. La estructura tridimensional y la presencia de otros grupos influyen en la capacidad de los cationes (o aniones) para conjugarse con funcionalidades aniónicas (o catiónicas) y suelen encontrarse algunos tipo de selectividad[92]. Por ejemplo, el alginato suele interactuar con cationes divalentes excepto el Mg^{+2} [93].

Hay dos métodos por los cuales se pueden generar cápsulas, perlas o esferas portadoras de compuestos de interés utilizando la técnica de gelificación ionótrópica. Estos métodos difieren entre sí en cómo se administra el ion reticulante, y se conocen como I) Gelificación ionótrópica externa y II) Emulsificación y gelificación interna. En el método I, la solución que contiene el polímero a entrecruzar se pone en contacto con otra solución que contiene el ión reticulante; mientras que en segundo método, el ion reticulante en forma insoluble se incorpora dentro de la solución del polímero, luego se provoca su solubilización y se activa modificando generalmente las condiciones del pH del medio.

El método de gelificación ionótrópica externa produce cápsulas de películas más delgadas, superficies más lisas, mayor resistencia de matrices cuando se permite la difusión del ión reticulante, rigidez y permeabilidad que las películas reticuladas internamente. Las presentaciones reticuladas externamente también demostraron mayor eficacia de encapsulación de fármacos [94] y una tasa de liberación de los mismos más lenta[92]; además se ha implementado para encapsular distintos aceites, como ser de girasol[93] como también microorganismos probióticos del género *Bifidobacterium bifidum* [95].

Existe una variedad de sistemas poliméricos naturales y sintéticos que han sido investigados para su implementación en dichas aplicaciones. Los carbohidratos poliónicos hidrofílicos, como el alginato y el quitosano, han recibido mucha atención en los últimos años, dado que la implementación de estos materiales implica el uso de disolventes acuosos, se minimizan los problemas ambientales asociados con los disolventes orgánicos. En comparación con otros polímeros naturales, muestran grandes aumentos de viscosidad frente pequeños incrementos de masa y, por lo tanto, producen una estructura de gel más uniforme que forma una estructura reticulada más fuerte y una mayor carga de material atrapado[92].

Alginato

El alginato es un biopolímero natural que se obtiene de distintas especies de algas de coloración marrón; está compuesto de cadenas lineales de residuos de ácido α -L-gulurónico y ácido β -D-manurónico unidos por enlaces glucosídicos 1-4 [93].

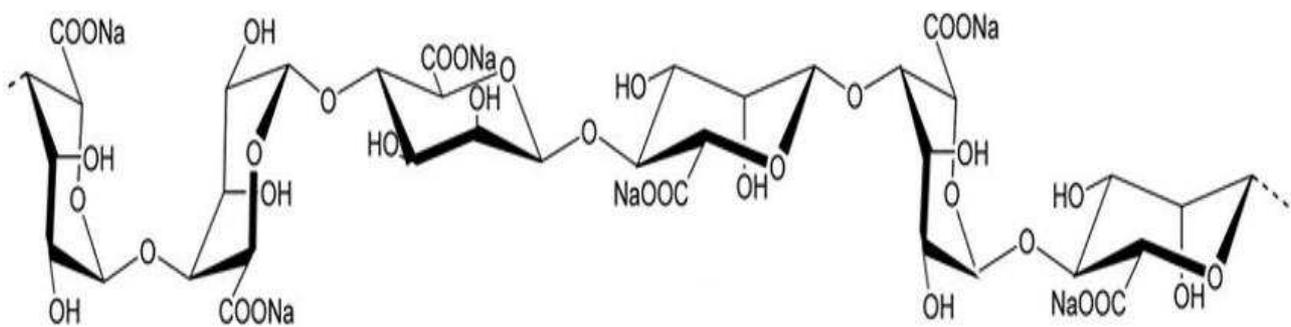


Figura 9. Estructura del alginato de sodio (Imagen extraída de internet:

https://www.researchgate.net/publication/305277999_Utilizacion_de_las_macroalgas_marinas_de_la_costa_argentina_y_sus_hidrocoloides/figures?lo=1; 09/2019).

El alginato es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y en la biotecnología como agente espesante, gelificante y estabilizador coloidal. Además, durante los últimos años se lo ha utilizado para generar cápsulas o perlas cuyos objetivos se enfocan a actuar como *carriers* de diversos compuestos de interés. Para lo cual, existe un método estandarizado en el cual el compuesto de interés (pudiendo ser probióticos, prebióticos y/o aceites) se suspenden en la matriz que se desee (por ejemplo: jugo de fruta, soluciones de prebióticos o proteicas) a la cual también se le agrega alginato en una concentración de 1 a 3 % y se atomiza en una solución de cloruro de calcio para formar las cápsulas, cuyos tamaños varían acorde al método empleado[96].

El método previamente nombrado presenta las ventajas de permitir fácilmente la formación de un gel, el cual resulta seguro y biocompatible para el ser humano, además de sumamente económico comparado con otros agentes utilizados para el mismo fin[93]. Sin embargo, los geles de Alginato de calcio suelen ser susceptibles a la acidez del medio que los rodea, suelen presentar pérdida de la estabilidad mecánica y pueden desestabilizarse estructuralmente en la presencia de

ciertos iones como por ejemplo el citrato, que actúa como agente quelante removiendo los iones de Ca^{+2} de la estructura del gel [96].

Diversos desarrollos se han llevado a cabo los últimos años utilizando el alginato como material polimérico y el catión divalente Ca^{+2} , mediante gelificación ionotrópica externa. Muchos compuestos de interés, como aceite de linaza [97], probióticos del género *Bifidobacterium bifidum*[95] y hasta levaduras de interés industrial del género *Saccharomyces boulardii* [98] han sido encapsulados y caracterizados mediante distintas técnicas de resistencia mecánica, capacidad de hidratación, resistencia gastrointestinal simulada in vitro y determinación de topografías superficiales entre otras.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar distintas estrategias de encapsulación de microorganismos probióticos con productos de la reacción de Maillard (PRM) de proteínas de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés) y dextranos (DX) de distintos pesos moleculares.

Objetivos específicos:

- ✚ Generar y caracterizar PRM entre aislado de WPI y DX de distintos pesos moleculares.
- ✚ Aplicar los PRM a la encapsulación de microorganismos potencialmente probióticos, empleando métodos basados en suspensión y emulsión con el posterior secado por aspersion en un secadero spray.
- ✚ Determinación de la viabilidad de los microorganismos potencialmente probióticos, luego del tratamiento de microencapsulación y a lo largo del almacenamiento.
- ✚ Determinación de la resistencia de los microorganismos potencialmente probióticos a la digestión gastrointestinal simulada.

CAPÍTULO 1

Productos de reacción de Maillard:

Síntesis y Caracterización

OBJETIVOS

Sintetizar conjugados a partir de WPI y DX de distintos PM, mediante la RM, utilizando el método seco a humedad controlada [99].

Analizar cada sistema obtenido, mediante distintas determinaciones:

- Absorbancia 284, 304 y 420 nm, para analizar los productos tempranos, intermedios y tardíos respectivamente; estas determinaciones pueden correlacionarse con las de colorimetría mediante el sistema CIELab, y así, entre ambas se puede determinar el grado de avance de la RM.
- También, pueden predecir los niveles de productos tempranos y tardíos mediante determinaciones de Fluorescencia a 295 y 365 nm.
- Porcentaje de Humedad y Actividad de agua para definir sus posibles aplicaciones como matrices en sistemas encapsulantes (Capítulo 2).
- Cuantificación de grupos aminos libres y grupos sulfhidrilos para obtener información acerca de qué tan reactivos resultan ser los DX empleados.
- Hidrofobicidad superficial de cada sistema, aporta información de la disponibilidad de grupos hidrofóbicos expuestos, que podrían generar una mejoría de la capacidad emulsionante.
- Capacidad antioxidante, considerada una propiedad relevante en alimentos o ingredientes funcionales.

1. INTRODUCCIÓN

La reacción de Maillard (RM) es una reacción que comúnmente se produce durante el procesamiento de cocción de algunos alimentos. Sus productos (PRM o conjugados) resultantes de la condensación entre proteínas e hidratos de carbono, le otorgan una coloración parda característica a los alimentos en los cuales se presentan. Los ejemplos más típicos del desarrollo de la RM los podemos encontrar en la corteza del pan, superficies de carnes cocidas, dulce de leche, etc.

En este primer capítulo se detallará el método de obtención de conjugados de Maillard a partir de proteínas de suero lácteo (WPI) y polisacáridos del tipo dextranos (DX) de distintos pesos moleculares, los cuales se utilizaron con distintos fines a lo largo de la presente tesis. Se presentarán las distintas técnicas utilizadas para determinar el grado de avance de la RM, la caracterización de los polvos obtenidos, los resultados hallados, discusiones pertinentes y conclusiones preliminares.

Los PRM, los cuales se obtuvieron en dos series, se utilizaron como materiales de pared en el Capítulo 2 y como agentes emulsificantes en los Capítulos 3 y 4.

Al elegir trabajar con dextranos de la marca Sigma-Aldrich Co. se estimó que podría generar un costo significativo en el producto final y que podría ser una limitante para un escalado de la tecnología estudiada, más allá de los resultados; pero no se encontró otro carbohidrato que se comercialice estandarizado en distintos PM.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés: *Whey Protein Isolate*) provisto por Davisco Foods Internacional Inc. (Minnesota, Estados Unidos), siendo su composición centesimal: 0,4 % de grasa, 2,0 % de cenizas, 4,8 % de humedad y menos del 0,5 % de Lactosa. Según ensayo de Kjeldhal, el contenido de proteínas resultó ser de 97,9 % en base seca. Este aislado considerado WPI nativo, se referenciará a lo largo de la tesis como: WPI_n. Los dextranos (DX) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, quienes declararon los pesos moleculares (PM) de 6, 70, 100 y 450-650 kDa.

Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2.1. Síntesis de productos de la reacción de Maillard (PRM)

Los conjugados de WPI y DX de 6, 70, 100 y 450 kDa se prepararon a partir de una disolución acuosa al 12% (p/p) de proteínas y 7,2% (p/p) de DX (relación de concentración WPI:DX de 1:0,6), las cuales fueron deshidratadas en un secador spray de escala laboratorio (Yamato ADL311S, Japón), siendo las temperaturas de entrada y salida, T_e 130°C y T_s 71 ± 1°C, para no alterar las muestras. Posteriormente, los distintos polvos obtenidos se colocaron en una estufa a 60°C durante 5 días con una actividad de agua (a_w) de 0,65 [99] para permitir el desarrollo de la reacción de Maillard mediante el método seco a humedad controlada. A los sistemas conjugados de WPI/DX se los denominó: WPI/DX6, WPI/DX70, WPI/DX100 y WPI/DX450, acorde al PM del DX utilizado. Además, se utilizó un sistema control, denominado WPI_c; para lo cual el WPI_n al 12 % (p/p) de proteínas fue disuelto en agua destilada, la solución fue deshidratada en el secador spray y el polvo obtenido incubado al igual que las muestras de WPI/DX.

2.2. Caracterización de PRM

2.2.1. Determinación de Absorbancia a 284, 304 y 420nm

Los productos tempranos de la reacción de Maillard absorben a 284 nm [100], y las bases de Schiff y compuestos de Amadori lo hacen a 304 nm [63], [101].

Los compuestos tardíos de la reacción de Maillard *AGEs* (“*advanced glycation end products*”) son aquellos que se forman en las etapas avanzadas y son los que producen su característico pardeamiento [100], [102], [103]. La intensidad de los *AGEs* puede ser determinada mediante medidas puntuales de absorbancia a 420 nm [104], [105]. Estas medidas se relacionan directamente con el alcance final que tiene la reacción de Maillard en los sistemas de estudio.

Para las determinaciones de absorbancias puntuales a 284, 304 y 420 nm, se diluyeron todos los sistemas (WPI_n, WPI_c, WPI/DX6, WPI/DX70, WPI/DX100 y WPI/DX450) en agua

desmineralizada a una concentración de proteínas del 0,5 % (p/p), y una concentración de DX del 0,30 % (p/p). Luego se determinó la absorbancia a 420nm en un espectrofotómetro UV/Vis (JENWAY, 7305; Reino Unido) cuyo ancho de slit fue de 2 nm, y el paso de luz de la cubeta 1 cm.

2.2.2. Determinación del color sobre los productos de la Reacción de Maillard

El color es uno de los parámetros más importantes en la reacción de Maillard, ya que es una característica de la misma. Existen diferentes métodos para la evaluación del color, pero uno de los más difundidos universalmente es el de la CIE (*Comission Internationale de l'Eclairage, 1979*), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios virtuales. El valor de Y indica la luminosidad de color (representado por L*, L*= 100% para una muestra blanca o transparente incolora y 0% para el negro); X se relaciona con la posición de la muestra entre los colores rojo y verde (representado por a*: valores negativos (-) indican cercanía al verde mientras valores positivos (+) al rojo); por último, el valor de Z que se relaciona con la suposición entre amarillo y azul (representado por b*: valores negativos (-) indican azul y valores positivos (+) indican amarillo), como se representa en la Figura 6. En consecuencia, el color de la muestra queda determinado por un punto en un espacio tridimensional, dado por las coordenadas triestímulo X, Y, Z.

Para la determinación de color de los polvos conjugados se utilizó un colorímetro triestímulo Minolta modelo 508D/8° 8 mm, que aplica el sistema CIE Lab, definido en coordenadas rectangulares (L*, a*, b*). Se utilizó un iluminante de 65º, y un ángulo de observador de 10º. Los polvos conjugados obtenidos en la sección 2.1 fueron evaluados frente a los parámetros: L* (luminosidad), a* (+ rojo, - verde) y b* (+ amarillo, - azul), con los cuales se calculó el E index según [100]:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$$\Delta L^* = L^* \text{ muestra} - L^* \text{ control}$$

$$\Delta a^* = a^* \text{ muestra} - a^* \text{ control}$$

$$\Delta b^* = b^* \text{ muestra} - b^* \text{ control}$$

Se utilizó WPIc (WPI incubado).

/

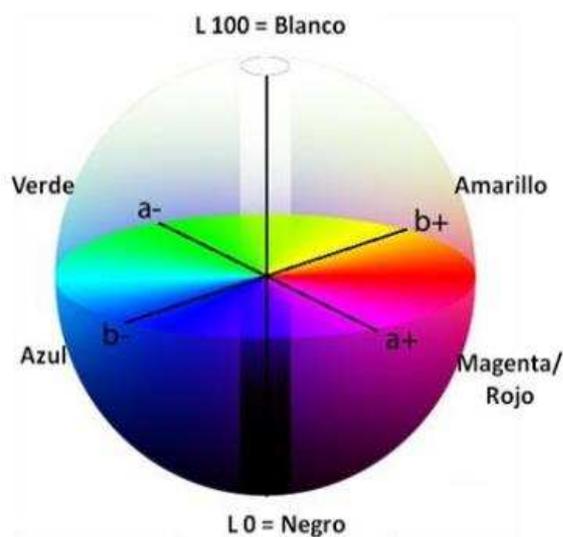


Figura 6. Escala de color (a, b, L) CIE Lab 1979 (imagen extraída y adaptada de internet: <http://sobrecolores.blogspot.com.ar>; 09/2019).

2.2.3. Determinación de Fluorescencia a 295 y 365nm

Los AGEs, formados durante las etapas avanzadas de la RM, también presentan una fluorescencia característica, distinguible de la del triptófano en proteínas, con un máximo de excitación y de emisión a longitudes de onda entre 340 y 370 nm y entre 420 y 450 nm, respectivamente. Dicha determinación es ampliamente utilizada como indicador de las etapas avanzadas de la RM, tanto en sistemas modelo como en muestras biológicas [106], [107], [108].

Los estudios de fluorescencia intrínseca basados en la emisión del triptófano, se realizaron utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 295 nm [109], [110], [111], obteniendo los espectros en el rango de las longitudes de onda de emisión (λ_{em}) de 300 a 450 nm.

El espectro de fluorescencia de los AGEs, se midió en un espectrofluorímetro (Hitachi, F2000; Japón) y a una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 365 nm y en un rango de emisión (λ_{em}) de 400 a 500 nm [100]. Las medidas fueron realizadas sobre las muestras de WPI_n, WPI_c y conjugados WPI/DX. Para lo cual se disolvieron en agua desmineralizada al 0,5% (p/p) de proteína y fueron mantenidas a 4°C por 24 hs antes de las determinaciones. Las determinaciones se llevaron a cabo con una potencia de la lámpara de 400 V y a una velocidad de barrido de 240 nm/min.

2.2.4. Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)

El % H de los encapsulados se determinó mediante gravimetría, registrando la pérdida de peso a 105°C en estufa (Dalvo Instrumentos, Ci343, Argentina) hasta peso constante.

Las determinaciones de la actividad de agua (a_w) de cada muestra se llevaron a cabo con un equipo Aqualab Systems (USA).

2.2.5. Determinación de Grupos Aminos Libres (GAL)

El grado de modificación de los grupos amino fue determinado indirectamente por la reacción específica entre o-ftaladialdehído (OPA) y los grupos amino libres (GAL) de las proteínas. El OPA es un reactivo fluorogénico que se utiliza para determinar grupos amino, principalmente de aminoácidos lisina [112].

Las muestras control (WPI incubado) y conjugados WPI/DX (Sección 2.1.) fueron solubilizados al 4 % (p/p) de proteína. A 200 μ l de estas soluciones se les adicionó: 800 μ l de buffer tetraborato 0,1M, 100 μ l de SDS 20% (w/v) y 100 μ l 2-mercaptoetanol. Luego, las muestras fueron inmersas en un baño de agua a 90°C por 5 min.

El reactivo OPA fue preparado de la siguiente manera: se disolvieron 7,62 g de disodiotetraboratodecahidratado con 200 mg de SDS en 150 ml de agua destilada. Luego se agregó 160 mg de OPA disuelto en 4 ml de etanol y 400 μ l de β -mercaptoetanol, se enrasó a 200 ml y se protegió la solución de la luz. Como solución patrón se utilizó una de L-serina (26,2mg/25ml; $9,94 \cdot 10^{-4}$ meq/lit). A 400 μ l del patrón de L-serina (diluido 1/10) o de la muestra se le adicionaron 3 ml del reactivo OPA, se agitó en vórtex y se midió su absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (JENWAY, 7305; Reino Unido) [113], [114]. A cada muestra se le hizo un blanco de reactivo, agregando para la determinación 400 μ l de muestra y 3ml de agua. Ese valor se restó al valor de absorbancia de la muestra más el reactivo.

Se trazó en cada serie de medidas una curva de calibrado de L-serina entre 0,0 y 0,003 meq/ml. Cada reacción se realizó por duplicado y se utilizó el promedio de la absorbancia. Para calcular la disminución en los GAL de las muestras conjugadas, el WPI_n fue usado como control y referencia (100%), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ GAL} = A_M / A_{WPI_n} * 100 \text{ (Ec. 2)}$$

Donde A_M es la absorbancia de la muestra y A_{WPI_n} la absorbancia del WPI nativo.

2.2.6. Determinación de Grupos Sulfhidrilos Libres (GSL)

La concentración de los grupos sulfhidrilos libres se determinó según el método de Ellman [115]. Para lo cual, 220 mL de cada muestra al 9% (p/p) en agua destilada fueron disueltas en 1.000 mL de buffer que contenía 0,1M de fosfato de sodio, 8,0M de úrea y 1,0mM de EDTA (pH 8,0). Luego de la centrifugación a 15000 g durante 30 min (a temperatura ambiente, 20 °C), el sobrenadante fue filtrado mediante un filtro de jeringa de 0,45 μ m (Millipore MF, Millipore Corp., Billerica, MA). 250 μ L de cada solución filtrada (concentración aproximada 20 mg/mL) y 25 μ L de la solución del reactivo de Ellman, 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoc) (DTNB) 1,0mM fueron pipeteados en

1,125 mL de buffer de reacción. La mezcla de reacción fue incubada en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente, y luego la absorbancia fue medida a 412 nm contra el blanco de muestra de 1,125 mL conteniendo 50 μ L del reactivo DTNB 1,0 mM y 250 μ L de agua ultrapura. Se utilizaron los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{412}=14,290\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el TNB (producto coloreado de la reacción entre los grupos sulfhidrilos(-SH) y el DTNB) [116]. La concentración final de grupos sulfhidrilos libres (μ mol) fue normalizada frente a la cantidad total de proteína (mg) contenida en cada muestra. Para lo cual se utilizó una curva de calibrado de WPI en el buffer de ensayo y se midió la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro UV/Vis (JENWAY, 7305; Reino Unido). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

2.2.7. Determinación de la Hidrofobicidad superficial (H_0)

Algunos compuestos varían su rendimiento cuántico de fluorescencia y longitud de onda de máxima emisión de acuerdo a la polaridad del medio y se pueden utilizar como sondas para evaluar la naturaleza hidrofóbica o apolar de las proteínas. El tipo más popular incluye las sondas aniónicas como el ácido sulfónico aromático, tal como 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS) y ácido cis-parinarico (CPA).

Para llevar a cabo la determinación de la hidrofobicidad superficial de las muestras de la Serie 2 (utilizadas en los Capítulos 3 y 4 como agentes emulsionantes) se siguió la técnica planteada por [117]. Acorde a lo descrito en la técnica, todos los sistemas (WPI_n, WPI_c y conjugados WPI/DX) se disolvieron en buffer fosfato de potasio 0,1M pH 7,0 a una concentración de 4 mg prot./ml. Luego de mantener las muestras 24hs a 4 °C para favorecer la completa disolución de las mismas, se realizaron diluciones seriadas en el mismo buffer de disolución en concentraciones comprendidas entre 0,05 – 0,4 mg/ml. (0,005-0,04 % (p/v)). Posteriormente se tomaron 2 ml de cada dilución, se midieron los valores de la intensidad de fluorescencia excitando con una longitud de onda de 390 nm y midiendo a 468 nm con un espectrofluorómetro (Hitachi, F-7000; Japón). El voltaje de la lámpara fue de 400 V y la velocidad de medición de 240 nm/min. Luego se adicionaron 10 μ l de ANS (8,0 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7) y se volvió a leer la intensidad de fluorescencia como se mencionó anteriormente.

La RFI neta para cada concentración de proteína se registró como la diferencia entre las RFI medidas para cada solución con y sin sonda (Ec. 3). La pendiente inicial (S_0) de la gráfica de la RFI neta en función de la concentración de la proteína (% (p/v)) se calcula por análisis de regresión lineal y se utiliza como un índice de la hidrofobicidad superficial de la proteína.

$$RFI_{NETA} = IF_{ANS} - IF_{sinANS} \quad (\text{Ec. 3})$$

2.2.8. Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante fue evaluada como la eficiencia de desactivación del radical estable coloreado ABTS^{•+}, así como también del radical hidroxilo (HO[•]).

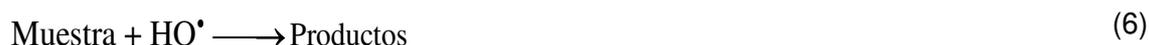
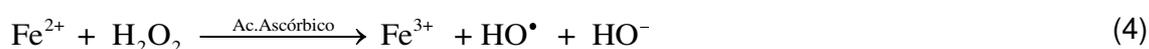
Se determinaron los porcentajes de desactivación (%D) de cada radical para cada sistema, incluyendo el WPI_n (WPI comercial, sin tratamiento alguno) y WPI_c. Los %D se expresaron en función de distintos contenidos de proteína (mg/mL), calculado en función de la determinación indirecta de proteínas mediante la cuantificación de nitrógeno total, utilizando la metodología de análisis elemental (CHONS), con equipo LECO(CHN628, Alemania).

2.2.8.1. Desactivación de radical ABTS^{•+}

Se trabajó acorde a Sarkis y col.[118], empleando una solución 7mM de ABTS^{•+}y una solución 140 mM de K₂S₂O₈. La relación de equivalentes fue de 1/0,35 (por ejemplo, 1ml de la solución de ABTS reaccionó con 17,6 µl de la solución de K₂S₂O₈). Se dejó reaccionar de 12 a16 horas para la formación completa del radical. Se preparó por dilución una solución del radical en agua de absorbancia aproximada igual a 1. Se registró el consumo de la absorbancia del ABTS^{•+}a 734nm durante30 min en ausencia (x_1 : 1ml ABTS^{•+}+ x_2 : 1 ml agua bidestilada) y presencia de las muestras (donde x_2 : x µL muestra + x_i µL agua bidestilada, tal que volumen total sea igual a 1ml). Se realizaron blancos espectrofotométricos conteniendo agua más solución de conjugados, para reducir el *scattering* aportado por las mismas.

2.2.8.2. Desactivación de radical hidroxilo (HO[•])

El radical HO[•] se generó conforme a Boiero y col. [119], por la reacción de *Fenton* (Ec. 4) dando lugar a la formación de malondialdehido (MDA) por oxidación de la 2-Desoxi-D-ribosa (Ec. 5). El MDA en presencia de TBA forma un aducto ($\lambda_{\text{máx}}$ 532 nm) cuya inhibición por competición se traduce a comportamiento antioxidante de las muestras (Ec. 6-7).



El medio de reacción fue provisto por amortiguador fosfato 50 mM pH 7,4 (400 µL), se añadieron 2-Desoxi-D-ribosa 10 mM (560 µL), H₂O₂ 100 mM (50 µL), FeCl₃ 1 mM (50 µL), EDTA 5 mM (40 µL), ácido ascórbico 5 mM (40 µL), completando con la solución de antioxidante (muestras) y/o agua hasta volumen final de 2 mL. Luego de un período de incubación de 1 hora a 37 °C, se

adicionó ácido tiobarbitúrico (TBA) 1 % (p/v) (1 mL) y ácido tricloroacético (TCA) 5,6 % (p/v) (1 mL) y se mantuvieron las muestras a 100 °C durante 20 min. A continuación para evitar el *scattering* generado por algunas muestras que evidenciaban turbidez se llevó a cabo una centrifugación durante 2min a 1000 rpm (luego de verificar que distintas condiciones de centrifugación no daban lugar a diferencias significativas en las absorbancias leídas posteriormente). Por último, se midieron las absorbancias de las muestras a 532 nm.

Los porcentajes de desactivación (% D) para ambas técnicas fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% D = 100 \times \frac{A_0 - A_x}{A_0} \quad (\text{Ec. 8})$$

De los gráficos % D vs Concentración (mg prot./ml) se calcularon las pendientes de las porciones lineales y a partir de ellas se determinaron las concentraciones efectivas de las muestras capaces de desactivar el 50% del radical oxidante presente en el ensayo, expresándose este valor como EC₅₀. Dichas concentraciones se expresan en unidades de mg proteína/ml de solución, y su interpretación permite determinar que la muestra con mejor capacidad antioxidante es aquella de la cual se requiere en menor cantidad (mg de proteína cada mililitro de solución) para desactivar el 50% de la cantidad del agente antioxidante presente en el medio.

La EC₅₀, *half maximal effective concentration*, es un concepto ampliamente utilizado en el área de la determinación de la capacidad antioxidante. La EC₅₀ permite comparar la capacidad antioxidante de una muestra frente a diferentes compuestos oxidantes, como también diferentes muestras frente al mismo compuesto oxidante. Muchos son los métodos y compuestos, tanto sintéticos como naturales que suelen utilizarse para estos ensayos. Algunos ampliamente utilizados suelen ser el ensayo frente al radical DPPH[•] (radical 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl), el de capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC), la estimación electroquímica de la capacidad reductora total y la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)[120], además de los compuestos utilizados en esta tesis.

2.3. Análisis estadístico

Las determinaciones en general corresponden a tres ensayos independientes y los resultados se presentan como valor medio ± error estándar (a menos que en la descripción de la técnica diga “Desviación Estándar” (DS)). En los casos que se aplicó análisis de varianza entre medias (ANOVA), para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos, se aplicó el test LSD (por sus siglas en inglés “*least significant differences*”) con una p <

0,05 y se indica con letras minúsculas diferentes como superíndice; los análisis llevados a cabo se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es necesario aclarar que no todas las técnicas de caracterización se presentan para las dos Series de conjugados obtenidos, ya que se seleccionó aquellos resultados que se encuentran relacionados al ulterior uso otorgado a cada Serie en los Capítulos posteriores de la presente tesis. Por otro lado, los resultados de aquellas técnicas que sí son presentadas para ambas Series, suelen presentar diferencias de valores, debido a que los ensayos no se realizaron de manera simultánea; en esos casos, será relevante la tendencia que sigan los distintos parámetros para el desarrollo de las secciones de Discusión y Conclusiones preliminares.

Para ambas Series, se logró obtener sistemas conjugados de WPI/DX en polvo al aplicar condiciones determinadas en ensayos previos [2]. Los polvos obtenidos presentaron distintas intensidades de colores, evidenciando de manera visual el desarrollo de la reacción de Maillard.

3.1. Caracterización de PRM

El trabajo experimental del primer capítulo de ésta tesis se llevó a cabo acorde al desarrollo de los distintos sistemas de encapsulación a ser sintetizados y presentados en los capítulos posteriores. Es así que la síntesis de los conjugados se planificó en dos "series" distintas. La primera serie, Serie 1, consistió en las muestras: WPI_n, WPI_c, WPI/DX6, WPI/DX70 y WPI/DX450. Dado que los resultados obtenidos en cuanto al avance de la reacción de Maillard en los sistemas conjugados de PM 70 y 450 kDa no presentaban diferencias significativas entre ellos, en una segunda serie, Serie 2, se decidió trabajar un DX de PM intermedio entre ambos. Por lo que la Serie 2 consistió en las muestras: WPI_n, WPI_c, WPI/DX 6 y WPI/DX100, ya que comercialmente se pudo obtener el DX de 100 kDa.

A continuación se presentan los resultados de las distintas técnicas ensayadas sobre las series planteadas. Cabe aclarar que algunos resultados sólo se muestran para una de las dos series, ya que los resultados de la otra siguieron la misma tendencia y no fueron necesarios en función de la utilidad que se les otorgó en los capítulos posteriores.

3.1.1. Determinación de Absorbancia a 284, 304 y 420nm

Se registraron las medidas puntuales de absorbancia a 284, 304 y 420 nm; las dos primeras absorbancias corresponden a los productos tempranos e intermedios [63], [100] de la reacción de Maillard y la última, a los compuestos tardíos o también conocidos como AGE's (*advanced glycation end products*) [100], [103].

En la Figura 7.A se observa la absorbancia a 284 nm mientras que en la Figura 7.B se presenta la absorbancia a 304 nm de la Serie 1. En ambas, la absorbancia para el sistema WPI/DX6 resultó ser mayor que para los demás sistemas destacándose la mayor diferencia a 304 nm, indicando que

este DX, el de menor PM, es mucho más reactivo que los de mayor PM. La diferencia entre la reactividad de los DXs según sus PM, puede deberse a la mayor disponibilidad en cantidad de grupos carboxilo terminales del DX6, debido a que a igualdad de masa en comparación con el resto de los DX, es mayor la concentración molar a menor PM.

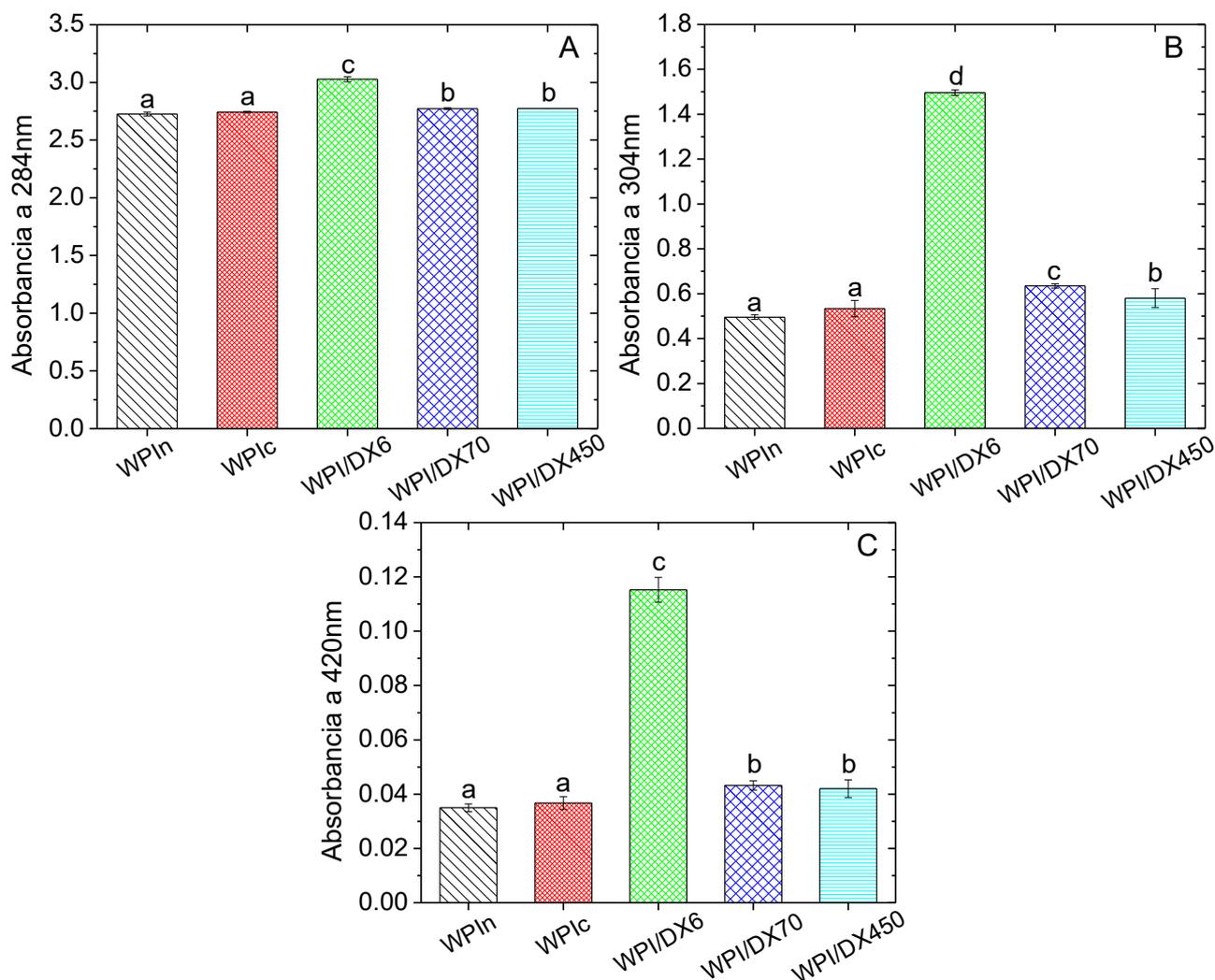


Figura 11. Absorbancia a 284 (A), 304 (B) y 420 nm (C) de las muestras: WPIin (▨), WPIc (▩), WPI/DX6 (▧), WPI/DX70 (▦) y WPI/DX450 (▥) (Serie 1). Las letras minúsculas indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

En la Figura 11.C se observa la absorbancia a 420 nm de todos los sistemas de la Serie 1. La medida de absorbancia a 420 nm es indicativa del pardeamiento que sufren las muestras cuando se produce la reacción de Maillard en las etapas más avanzadas de la misma [100], [103], [118], [121], [122]. La absorbancia de las muestras varía en función del peso molecular de los DX, la cual aumenta a medida que disminuyen los PM. Resultados similares fueron encontrados por Jiménez-Castaño, Villamiel y López-Fandiño [123], quienes estudiaron β -lg, α -la y ASB conjugadas a DX de 10 y 20 kDa.

En las tres figuras, los sistemas WPI y WPIc presentan absorbancias muy cercanas, siendo levemente mayores la del sistema WPIc, en el cual las proteínas pudieron haberse conjugado con el contenido de Lactosa, el cual es un azúcar reductor contenido naturalmente en el aislado de proteína de suero utilizado [124]; sin embargo no se consideran diferentes acorde al análisis ANOVA realizado. El sistema WPI/DX6 presenta las mayores absorbancias de todos los sistemas en las tres figuras. En cambio, los sistemas WPI/DX70 y WPI/DX450, presentaron absorbancias menores y semejantes, siendo levemente inferiores las del sistema de mayor PM, a pesar de que la diferencia no sea significativa según el test estadístico aplicado.

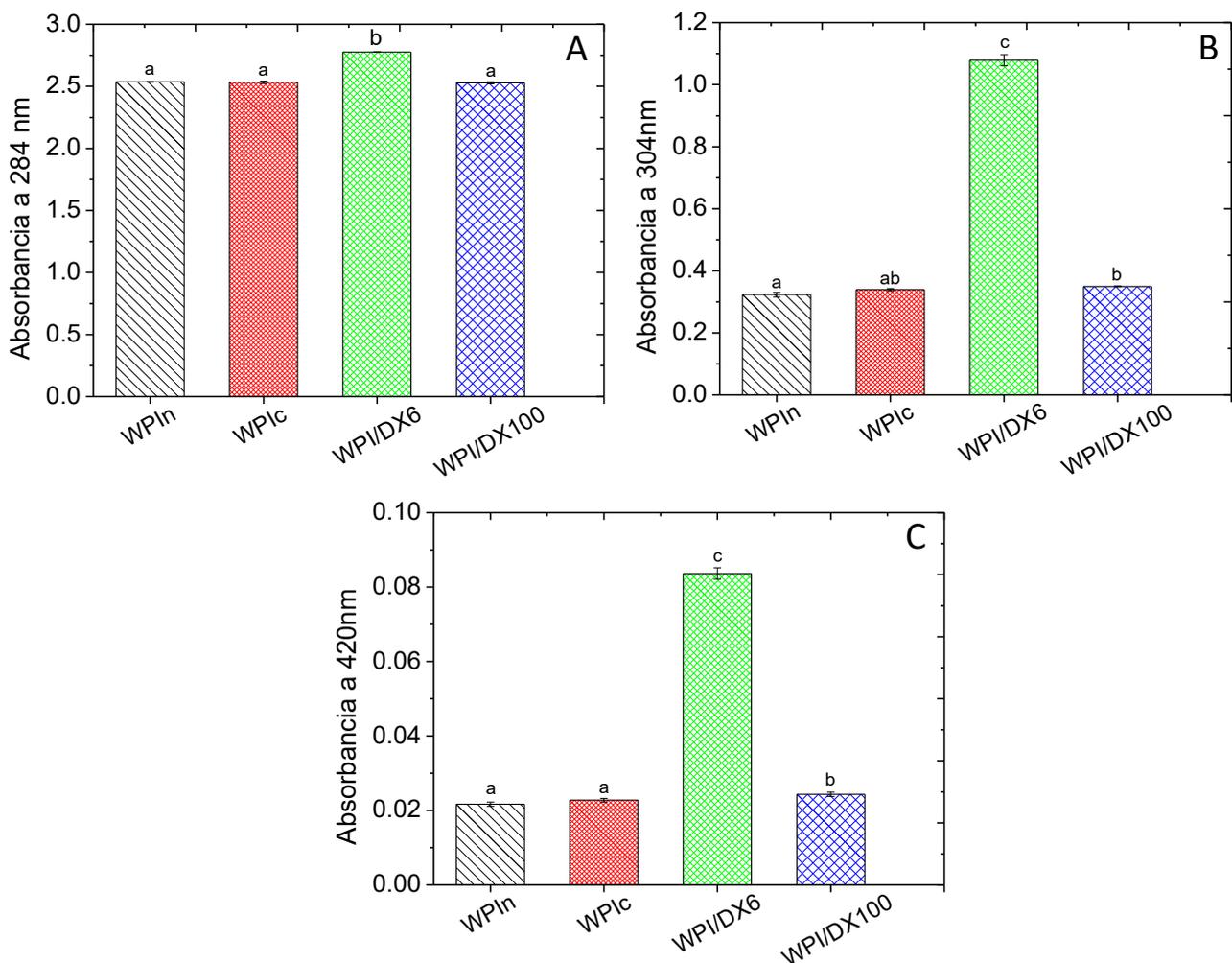


Figura 12. Absorbancia a 284(A), 304 (B) y 420(C) nm de las muestras: WPIIn (▨), WPIc (▤), WPI/DX6 (▥) y WPI/DX100 (▧) (Serie 2). Las letras minúsculas indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

Al igual que en la Serie 1, los valores de absorbancia a 284 nm (Figura 12.A) y 304 nm (Figura 12.B) evidenciaron que el conjugado de menor PM presenta las mayores absorbancias a ambas longitudes de onda. Siendo notablemente mayor al resto de las muestras tanto en la Figura 12.B como 12.C.

Al comparar la Serie 1 con la Serie 2, si bien ambas se corresponden a la misma tendencia, puede evidenciarse que los valores de la Serie 1 presentan valores levemente mayores a los de la Serie 2; esto se debe a que las muestras no fueron analizadas de manera simultánea y a que toda determinación espectrofotométrica también depende de algunas variables del equipamiento, como ser por ejemplo, la vida útil de la lámpara utilizada.

3.1.2. Determinación de color sobre los Productos de la Reacción de Maillard

Objetivamente el desarrollo de color de los conjugados obtenidos fue medido mediante los parámetros CIE Lab (Tabla 2). Si observamos el WPI_n con respecto al WPI_c (WPI incubado) podemos ver que existen diferencias significativas en los parámetros a^* , b^* y L^* .

En cuanto a los sistemas WPI/DX, si bien existen diferencias significativas en todos los parámetros para los 3 sistemas, el WPI/DX6 presenta los mayores valores positivos de a^* y b^* , indicando los mayores corrimientos hacia los colores rojo y amarillo, respectivamente. Como se dijo anteriormente, esto probablemente sea debido a un menor impedimento estérico para interactuar con las moléculas de proteínas, así como a un mayor número de grupos carbonilos disponibles para reaccionar a una misma concentración de DX; lo que hace que la reacción se produzca en mayor extensión.

Con respecto al parámetro L^* , que indica luminosidad, todos los sistemas presentan valores mayores a 87 %, lo cual indica que las muestras presentan colores en la gama del tono manteca y blancos.

Tabla 2. Parámetros CIELab de los polvos conjugados obtenidos en la Serie 1: WPI_n, WPI_c (WPI_n incubado) y conjugados: WPI/DX6, WPI/DX70 y WPI/DX450.

Sistema	a^*	b^*	L^*
WPI _n	0,46 ± 0,08 ^d	9,07 ± 0,27 ^d	90,00 ± 0,05 ^b
WPI _c	0,02 ± 0,04 ^a	6,62 ± 0,09 ^a	92,41 ± 0,14 ^d
WPI/DX6	2,38 ± 0,04 ^e	17,12 ± 0,10 ^e	87,83 ± 0,06 ^a
WPI/DX70	0,26 ± 0,02 ^c	7,90 ± 0,15 ^c	92,32 ± 0,07 ^d
WPI/DX450	0,13 ± 0,01 ^b	7,14 ± 0,03 ^b	91,77 ± 0,05 ^c

Diferentes letras superíndices en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

El cambio de color ΔE para los sistemas WPI/DX medidos con respecto al WPI_c pueden observarse en la Figura 9. El cambio de color ΔE es muy marcado para el DX de menor PM, lo que estarían indicando que se produce un mayor avance de la RM a menor PM del DX. Este resultado coincide con los obtenidos previamente mediante las técnicas de Absorbancia. Para los DX de 70 y 450 kDa el ΔE no es tan marcado, aunque es mayor significativamente para el DX de 70 en comparación con el de 450 kDa. Xu y col. [125] combinaron aislado de proteínas de soja con

glucosa (monosacárido) y con quitosano (oligosacárido) para producir PRM; y utilizaron como control el aislado de proteínas de soja incubado bajo las mismas condiciones en la que se sintetizaron los PRM. Ellos publicaron que el conjugado con glucosa presento el mayor ΔE al cabo de todo los tiempos de reacción evaluados, siendo notablemente menor el ΔE correspondiente al conjugado con quitosano.

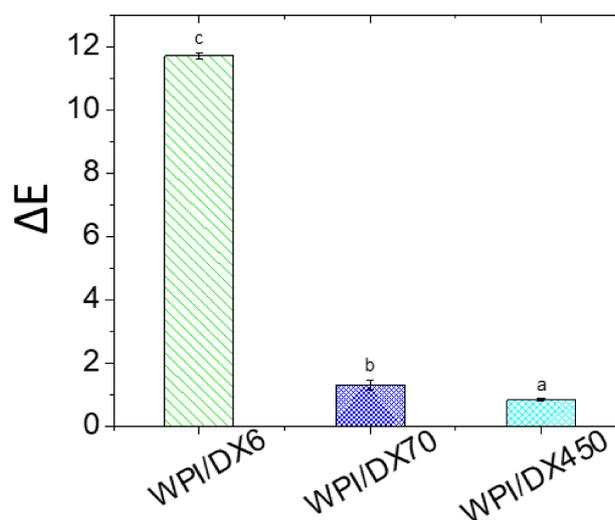


Figura 13. Delta E (ΔE) de polvos conjugados WPI/DX con DX 6 (■), 70 (■) y 450 (■) kDa.

3.1.3. Fluorescencia a 295 y 365nm

Las muestras de ambas series fueron excitadas con un haz de luz a $\lambda_{ex}=295\text{nm}$ y $\lambda_{ex}=365\text{nm}$ y se realizó la detección de las intensidades de emisión de fluorescencia (λ_{em}) de 310 a 440 nm y de 400a 500 nm respectivamente. Las emisiones correspondientes a λ_{ex} de 295 nm reflejan la fluorescencia intrínseca de las proteínas, correspondiente al aminoácido triptófano. Mientras que al excitar a λ_{ex} de 365nm, las intensidades de fluorescencia pertenecen a la emisión característica de los AGEs [107]. Los resultados obtenidos para ambas series, se muestran en las Figuras 14 y 15, A para fluorescencia intrínseca y B para la fluorescencia de AGEs.

Al analizar los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del WPI_n y WPI_c (Figura 14.A y 15.A) de las Series 1 y 2 utilizando una $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$, puede observarse que la intensidad de fluorescencia (InF) aumenta ligeramente en las proteínas incubadas en ausencia de DX (WPI_c), lo que podría indicar cambios estructurales al aplicar el método de conjugación de humedad controlada. Si bien la fluorescencia intrínseca de la proteína está originada por aminoácidos aromáticos, como triptófano (Trp), tirosina (Tir) y fenilalanina (Phe), la emisión de fluorescencia del aminoácido Trp en particular, es altamente sensible al ambiente local, por lo que es ampliamente utilizado como grupo indicador de cambios conformacionales en las estructuras de las proteínas. De este modo, el máximo de emisión de las proteínas podría reflejar el promedio de los residuos

triptófano expuestos a la fase acuosa [107], y se puede inferir por comparación si existieron o no cambios en la estructura terciaria de la proteína original[126]. Dado que el proceso de obtención de los PRM requiere del calentamiento de las mezclas de proteínas de suero lácteo y DX a temperatura y a_w controlados, dicho tratamiento aumenta la InF, comportamiento que se asocia con una desnaturalización parcial de las mismas [104], ya que los aminoácidos Trp quedarían más expuestos emitiendo mayor fluorescencia.

En cambio, la InF de los sistemas conjugados WPI/DX es menor que para el WPI o WPIc. Esto puede ser debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, que podrían estar bloqueando la detección de la emisión de la fluorescencia por un fenómeno de apantallamiento o bien, debido al gran tamaño de los polisacáridos de mayor PM que actúan como agentes protectores haciendo que las proteínas no se desnaturalicen en exceso y no expongan los grupos responsables de la InF [63]. Se sabe que luego de la condensación entre el grupo amino de las proteínas y carboxilo del polisacárido se producen derivados que luego polimerizan. Estas macromoléculas podrían ser los responsables de la falta de detección de la emisión de fluorescencia. Hattori y col.[73] encontraron que la InF de conjugados de β -lg con carboximetilciclodextrina era menor que la InF de las proteínas nativas. Estudios posteriores, atribuyeron dicha observación a un efecto de movimiento de la cadena del polisacárido que se unía a la β -lg. Resultados similares fueron encontrados por Jiménez-Castaño, Villamiel y López-Fandiño [123] quienes trabajaron con β -lg y DX.

Por otro lado, las Figura 14.B y 15.B presentan las InF correspondientes a los AGEs [127]. Debido a que la reacción de Maillard no se desarrolla en las muestras de WPI_n, éste sistema en ambas gráficas presenta las menores InF. Sin embargo, la IF del WPIc supera las del WPI_n, probablemente debido a que las proteínas se han conjugado con la lactosa [124].

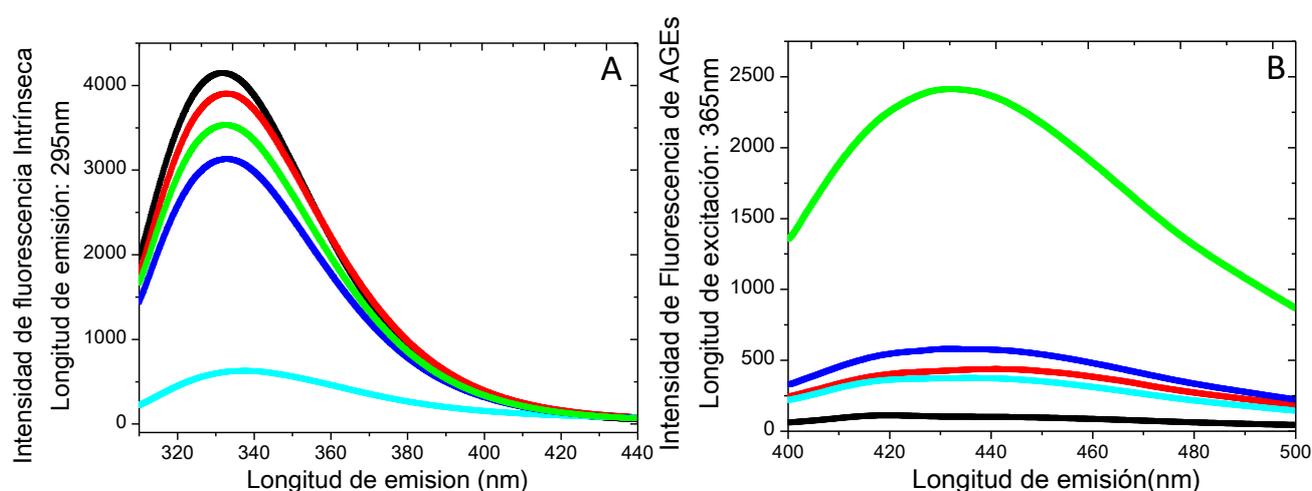


Figura 14. Intensidad de Fluorescencia Intrínseca (A) e Intensidad de Fluorescencia de los productos tardíos de reacción de Maillard (B) de sistemas: WPI_n (■), WPIc (■) y sistemas conjugados: WPI/DX6 (■), WPI/DX70 (■) y WPI/DX450 (■) (Serie 1).

Comparando los resultados de las Figuras 14 y 15, entre A y B, es evidente que la incubación permite el desarrollo de los conjugados entre las proteínas contenidas en el aislado proteico y los DX. En los gráficos B, la InF disminuye cuando se incrementan los PM de los DX. Mientras que los conjugados WPI/DX450 y WPI/DX100 (correspondientes a las Series1 y 2, respectivamente) emiten entre los valores de emisión de WPI_n y WPI_c. Éstos cambios de tendencia entre las Figura 14.B y 15.B podrían ser consecuencia del gran tamaño de los conjugados obtenidos, que podrían estar enmascarando la detección de la InF de los PRM sintetizados[75].

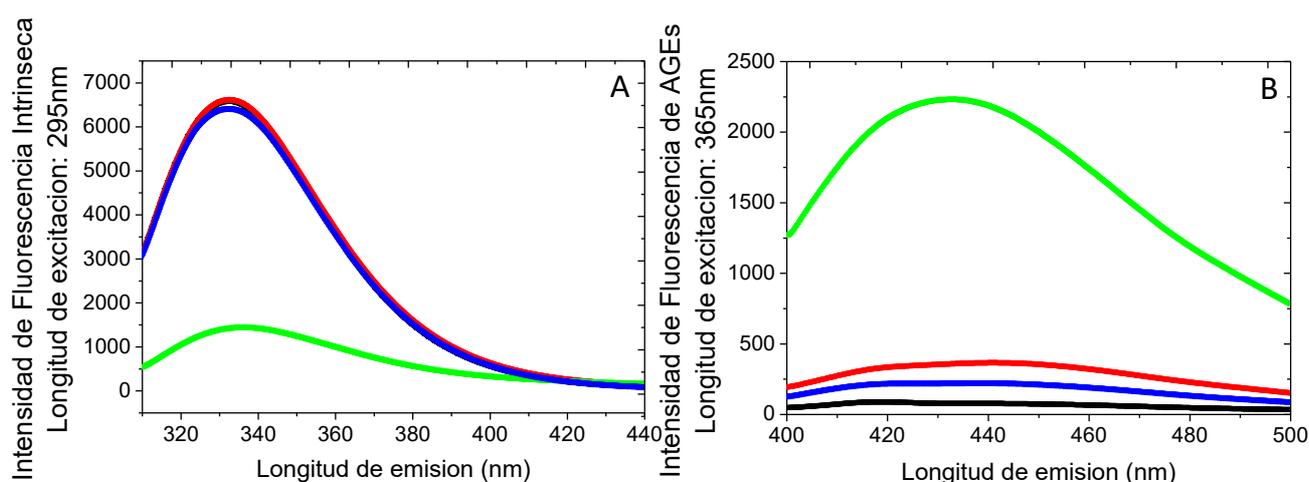


Figura 15. Intensidad de Fluorescencia Intrínseca (A) e Intensidad de Fluorescencia de los productos tardíos de reacción de Maillard (B) de sistemas: WPI_n (■), WPI_c (■) y sistemas conjugados: WPI/DX6 (■) y WPI/DX100 (■) (Serie 2).

3.1.4. Contenido de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)

Los valores de %H oscilaron entre 4,84% y 10,71% y se corresponden con los valores de a_w de 0,300 a 0,473 para la Serie 1 como puede observarse en la Tabla 3; mientras que para la segunda Serie los % H varían de 5,05% a 10,26%, que se corresponden a valores de a_w de 0,471 a 0,499 tal como lo indica la Tabla 4.

Tabla 3. Contenido de Humedad (% H) y Actividad de agua (a_w) para los sistemas WPI_n, WPI_c, WPI/DX6, WPI/DX70 y WPI/DX450 (Serie 1) presentados juntos a sus Desviaciones Estándares.

Sistema	% H \pm SD	a_w \pm SD
WPI _n	4,84 \pm 0,20 ^a	0,473 \pm 0,002 ^a
WPI _c	9,42 \pm 0,37 ^b	0,470 \pm 0,004 ^a
WPI/DX6	9,90 \pm 0,18 ^b	0,414 \pm 0,004 ^b
WPI/DX70	10,39 \pm 0,63 ^b	0,414 \pm 0,002 ^b
WPI/DX450	10,71 \pm 0,52 ^b	0,300 \pm 0,007 ^c

Diferentes letras superíndices indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

Tabla 4. Contenido de Humedad (% H) y Actividad de agua (a_w) para los sistemas WPI_n, WPI_c, WPI/DX6, y WPI/DX100 (Serie 2) presentados juntos a sus Desviaciones Estándares.

Sistema	% H \pm SD	a_w \pm SD
WPI _n	5,05 \pm 0,36 ^a	0,499 \pm 0,002 ^a
WPI _c	9,57 \pm 0,01 ^b	0,497 \pm 0,010 ^c
WPI/DX6	9,42 \pm 0,04 ^b	0,471 \pm 0,011 ^c
WPI/DX100	10,26 \pm 0,50 ^b	0,498 \pm 0,007 ^b

Diferentes letras superíndices indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

En ambas series, existen diferencias significativas en cuanto a los % entre el WPI_n y los WPI_c y conjugados mediante secado por aspersión y luego sometidos al método de conjugación bajo humedad controlada. Estos procesos tienen efectos contrarios, ya que el secado spray tiene como objetivo deshidratar la muestra y la conjugación se lleva a cabo bajo un valor de a_w fijo. Dados los resultados podría considerarse que ambos fenómenos se combinan para determinar en las muestras conjugadas los valores de % H y a_w obtenidos.

3.1.5. Grupos Aminos Libres (GAL)

La cuantificación de los GAL nos proporciona una idea del progreso que tuvo la reacción de Maillard. Según se observa en la Figura 12, hay una disminución de los grupos amino libres para todos los sistemas incubados en comparación con el WPI_n. Los porcentajes obtenidos de GAL de acuerdo al PM del DX conjugado, muestran una tendencia pero las diferencias entre las medias no son significativas dado que la técnica presenta alta variabilidad dentro de una misma muestra, generando rangos de DS muy amplios tal como se observa en el gráfico de barras. El DX6, de menor PM, no solo es el que más reacciona (Secciones 2.4.1 y 2.4.3. del Capítulo 1) por presentar la mayor cantidad de grupos carboxilo a igual masa, por ende el de menos GAL; sino que también debe considerarse que a menor tamaño del DX, menor es el impedimento estérico, pudiendo acceder de manera más fácil a los grupos aminos de las proteínas para reaccionar y desarrollar la RM. Las estructuras más voluminosas del DX de 70 y 450 kDa pueden restringir el acceso a los sitios reactivos de los grupos amino de las proteínas y viceversa. Wooster y Augustin[38], obtuvieron reducciones en un rango de 93% a 62% de GAL trabajando con conjugados de WPI/DX de 5,9, 29,4 y 42,4 kDa incubados a 5 y 10 días.

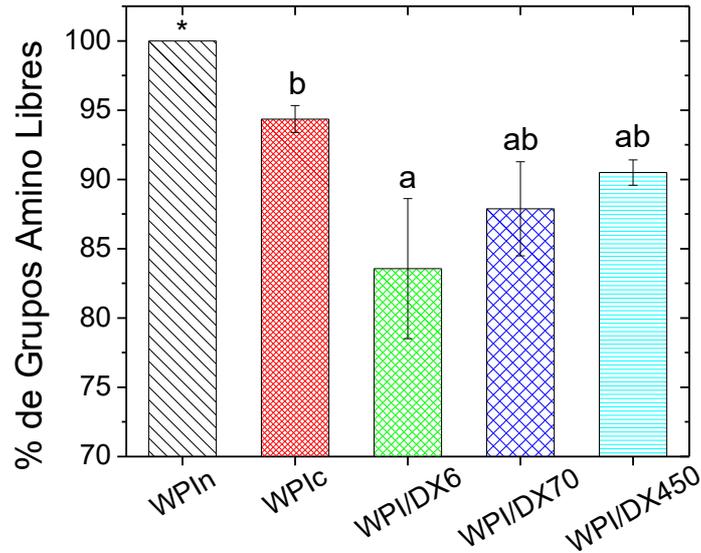


Figura 16. Porcentaje de Grupos Amino Libres (GAL) en las muestras: WPIIn (▨), WPIc (▤), WPI/DX6 (▥), WPI/DX70 (▦) y WPI/DX450 (▧) (Serie 1). Las letras minúsculas indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

3.1.6. Grupos sulfhidrilos libres

Los resultados de la técnica de Ellman que indican la cantidad de grupos sulfhidrilos libres para los sistemas analizados en la Serie 1 se muestran en el gráfico de barras de la Figura 13.

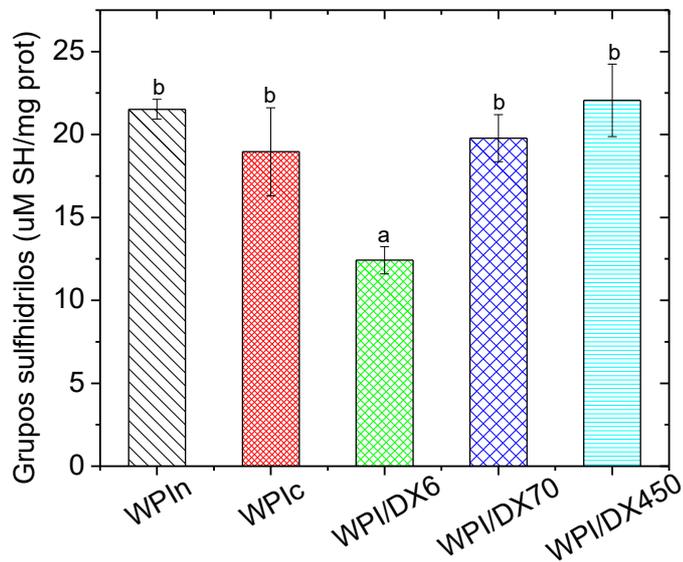


Figura 17. μM de grupos sulfhidrilos (-SH) libres cada mg de proteína, en las muestras: WPIIn (▨), WPIc (▤), WPI/DX6 (▥), WPI/DX70 (▦) y WPI/DX450 (▧) (Serie 1). Las letras minúsculas indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

Como puede observarse el sistema WPI/DX6 es el que significativamente disminuye los μM de grupos sulfhidrilos por mg de proteína en comparación con todos los demás sistemas. Spotti y

col. [128], trabajaron WPI conjugado a DX de 6 y 40 kDa a distintas relaciones WPI:DX, y mostraron resultados que siguen la misma tendencia, y justifican que la disminución en el conjugado de menor PM podría deberse a dos razones principales:

- i) La formación de estados oxidados distintos de los disulfuros, que pueden desarrollarse durante el procesamiento y almacenamiento de dicho productos.
- ii) La formación de enlaces disulfuro intra e intermoleculares durante la incubación que implica la RM.

3.1.7. Hidrofobicidad Superficial (H_0)

En la Tabla 5 pueden observarse los Índices de Hidrofobicidad Superficial junto a sus desviaciones estándares obtenidos para la Serie 2 de conjugados; cabe aclarar que los parámetros de las regresiones lineales realizadas a partir de las curvas de concentración variable presentaron parámetros de R^2 iguales o mayores a 0,984. La Serie 2 fue utilizada en los Capítulos 3 y 4 con la intención de analizar los sistemas en cuanto a su capacidad emulsionante.

Dado que la desnaturalización de las proteínas de suero lácteo ocurre alrededor de los 70°C [53] y provoca el desplegamiento de las moléculas exponiendo fracciones hidrofóbicas, era esperable que el WPI_n (no incubado) presente el menor H_0 . De los sistemas incubados, el WPI_c presentó mayor H_0 que los sistemas conjugados con DX. Feng y col. [129] informaron que el conjugado de β -conglucina-DX presentaba mayor H_0 que la proteína nativa, del mismo modo nuestros sistemas WPI/DX presentan mayor H_0 que el WPI_n.

Tabla 5. Valores de Índices de Hidrofobicidad Superficial (H_0) \pm DS para la Serie 2.

Sistema	Índice de Hidrofobicidad Superficial (H_0)
WPI _n	34.893 \pm 1.577 ^a
WPI _c	45.804 \pm 1.887 ^d
WPI/DX6	38.587 \pm 1.888 ^{bc}
WPI/DX100	42.015 \pm 1.841 ^c

Diferentes letras superíndices indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

Estos resultados podrían ser consecuencia de la combinación de dos factores: por un lado, del grado de desnaturalización parcial que sufren las proteínas cuando son conjugadas tiende a incrementar H_0 [130]; por otro, se sabe que la conjugación tiende a disminuir el H_0 , debido a que los polisacáridos son altamente hidrofílicos [129].

3.1.8. Capacidad Antioxidante

La EC₅₀ permite realizar la comparación entre agentes antioxidantes, siendo el más efectivo el que presenta el menor valor de EC₅₀. En la Tabla 6 se observa que ninguno de los sistemas generados mejora la actividad antioxidante del WPI frente al radical OH[•]. Mientras que todos los conjugados, mejoran la capacidad antioxidante frente a ABTS^{•+}, en relación al WPI; siendo el WPI/DX6 el de mayor capacidad antioxidante, encontrándose al mismo nivel el WPIc y el WPI/DX70, y por último el WPI/DX450.

Tabla 6. Valores de EC₅₀ ± DS para la desactivación OH[•] y ABTS^{•+} para la Serie 1.

Muestras	EC ₅₀ (mg de proteína/mL)	
	OH [•]	ABTS ^{•+}
WPI	1,26 ± 0,01 ^a	1,17 ± 0,01 ^d
WPIc	1,30 ± 0,02 ^a	1,00 ± 0,00 ^b
WPI/DX 6	1,53 ± 0,03 ^a	0,89 ± 0,02 ^a
WPI/DX 70	1,34 ± 0,16 ^a	1,00 ± 0,03 ^b
WPI/DX 450	1,46 ± 0,25 ^a	1,05 ± 0,02 ^c

Diferentes letras superíndices por columna indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (p < 0,05).

Que la tendencia no sea la misma en las técnicas empleadas se debe a las diferencias entre los mecanismos de desactivación de los radicales OH[•] y ABTS^{•+} [131]. Liu y col. [76], encontraron que los PRM de WPI/glucosa aumentan los %D de ABTS^{•+} en comparación al WPI tratado térmicamente, tanto al aumentar el tiempo de reacción entre el WPI y la glucosa (evaluado a 1, 4 y 7 días de reacción), como frente al aumento en la concentración de proteínas (analizado a 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL). Por otro lado, Jia y col. [132] sintetizaron conjugados a partir de WPI y xilooligosacáridos, determinaron que los conjugados presentaban mejor capacidad antioxidante frente al radical OH[•] en comparación con el WPI utilizado. Esa mejoría contra el agente oxidante OH[•] con respecto a nuestros sistemas WPI/DX, seguramente se atribuye a la naturaleza del polisacárido conjugado o a los diferentes PRM obtenidos.

4. CONCLUSIONES PRELIMINARES

Se lograron obtener los conjugados WPI/DX y se verificó por las técnicas de absorbancia, colorimetría, fluorescencia, determinación de grupos aminos libres y grupos sulfhidrilos que el PM del DX conjugado influye en el grado de avance de la reacción. Siendo que a menor PM del polisacárido, mayor es el avance de la RM, por lo tanto: mayor presencia de compuestos tempranos, intermedios y tardíos; mayor fluorescencia a 365nm, menor cantidad de grupos aminos libres y disponibilidad de grupos sulfhidrilos. La diferencia de reactividad entre los DX ensayados no sólo puede considerarse consecuencia de sus características químicas, sino también de las estructuras terciarias y cuaternarias que presentan las proteínas de suero durante el método de conjugación a humedad controlada que se empleó en la síntesis de los WPI/DX.

Por otro lado, se determinaron los Índices de hidrofobicidad superficial los cuales aumentan al aumentar el PM del DX conjugado; estos parámetros de suma relevancia en cuanto a la utilización de los conjugados WPI/DX como agentes emulsionantes serán nuevamente evaluados en las discusiones de los Capítulos 3 y 4.

Por último, la determinación de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}, evidenció que todos los sistemas WPI/DX resultaron tener mejor capacidad antioxidante que el sistema WPI_n. Si bien el agente ABTS^{•+} es un oxidante sintético, sería de interés ampliar el espectro de reactividad frente a otros agentes oxidantes naturales como por ejemplo aquellos reactivos al oxígeno (ROS), ya que actualmente se encuentra en auge el desarrollo y la incorporación de compuestos que tengan la capacidad de prevenir el envejecimiento celular y el deterioro por radicales, consecuencias de los compuestos oxidantes que se generan naturalmente de modo fisiológico en el organismo del ser humano.

CAPÍTULO 2

Encapsulados de *Bifidobacterium*
animalissubsp. lactis INL1 utilizando PRM
(Serie 1)

OBJETIVOS

Encapsular la cepa probiótica INL1 utilizando los conjugados WPI/DX de la Serie 1 como matriz de pared en un equipo de secado spray como medio tecnológico para obtener cultivos deshidratados.

Caracterizar los encapsulados obtenidos mediante distintas técnicas:

- Porcentajes de Humedad y Actividad de agua, para analizar si los polvos podrán mantener las propiedades del probiótico encapsulado y si pueden conservarse a lo largo del tiempo en condiciones óptimas.
- Observación mediante Microscopía Óptica de Barrido (SEM) para observar las morfologías de cada sistema.
- Determinación de la capacidad antioxidante tanto de los encapsulados frente a los radicales: ABTS•+ y radical hidroxilo (HO•); ensayar también frente al radical superóxido (O₂^{•-}) la cepa probiótica INL1.
- Determinación la viabilidad celular antes y después del secado spray, para analizar el efecto del proceso de síntesis sobre la sobrevida de la cepa.
- Determinación de la viabilidad de la cepa probiótica a lo largo de doce meses de conservación a 4 y 25 °C.
- Simulación gastrointestinal *in vitro* para determinar el grado de sobrevida al tránsito gastrointestinal en función del sistema utilizado.

1. INTRODUCCIÓN

Se ha comprobado que las bacterias probióticas puedan conferir efectos benéficos sobre la salud humana al ser consumidas en dosis adecuadas y con cierta regularidad [8]. Comercialmente y a nivel mundial, se las puede encontrar bajo distintas presentaciones como por ejemplo: cápsulas (Urosedac Probiotic, EUROlab/Argentina; PROBIOLAC, Aava Labs/Finlandia), perlas de liberación controlada (PURE CULTURES, Nutravita/Reino Unido), bebidas fermentadas lista para consumo (Bebida Probiótica, VITA BIOSA/Colombia; Kefir, Margui/Europa), *smoothies* (Felices las vacas/Argentina); también pueden encontrarse probióticos en productos tales como yogures (Actimel y Activia de DANONE/Francia) o quesos (SanBIOS, Santa Clara/Brasil) o polvos listos para su consumo sin necesidad de hidratación (Probi® Fast Melt/Escandinavia). En este último caso las preparaciones pueden obtenerse a través de distintos procedimientos, los dos más utilizados consisten mayormente en la liofilización o, en gran medida a escala industrial, el secado spray. Este último implica la remoción del agua mediante evaporación y por consiguiente la deshidratación y concentración del sistema. Debido a su gran versatilidad y bajo costo, es un procedimiento muy aplicado a nivel industrial. Sin embargo el secado spray aplicado sobre sistemas que contienen cultivos bacterianos genera una situación de stress sobre los mismos debido al uso de elevadas temperaturas y fuerzas de corte empleadas, haciendo necesaria la incorporación de agentes que otorguen protección para preservarlas bacterias durante la deshidratación. Esos compuestos, llamados termoprotectores, ayudan a mantener la integridad de las membranas celulares, las actividades enzimática y las funcionalidades de las proteínas que forman parte de la célula [133].

Diversos agentes han sido empleados en el secado spray para generar encapsulados y preservar la viabilidad y por ende la funcionalidad de diversos probióticos. Ejemplos ampliamente utilizados abarcan leche descremada, alginato de sodio [134], solo o combinado con almidón, glicerol y/o quitosano; mezclas de goma xantán, gellan y/o goma acacia [23]; quitosano y carragenina [96]. Incluso suelen emplearse proteínas de diversa naturaleza, como las proteínas de suero lácteo [135], proteína de soja o gelatina [136].

El efecto protector de los azúcares (dos de los más empleados son la sacarosa y trehalosa [23]) sobre la integridad de las membranas y proteínas en bacterias deshidratadas ha sido atribuido a su capacidad de unirse a residuos polares de las proteínas y formar un estado vítreo, amorfo, en el estado seco; lo cual resulta importante para preservar la función de los componentes biológicos durante y luego de la deshidratación [133].

Dado que los PRM suelen mejorar las propiedades de los compuestos de partida, en este segundo capítulo de la tesis los conjugados WPI/DX se utilizaron como material de pared para encapsular mediante secador spray la cepa probiótica autóctona INL1.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cultivos autóctonos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, una cepa aislada de leche materna por el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), las cuales demostraron potencial probiótico en estudios sobre animales de laboratorio. Algunos de los efectos comprobados comprenden la estimulación de la función inmune en ratones frente a una infección de *Salmonella*[27] y capacidad antiinflamatoria en ratones frente a colitis aguda y crónica[28]. Para los ensayos presentados en éste capítulo se utilizaron los conjugados de la Serie 1.

2.1. Proceso de síntesis y recuento microbiano basal de los conjugados WPI/DX

Las bacterias probióticas se cosecharon por centrifugación (6.000 rpm, 10min, 8°C) a partir de un cultivo *over night* (ON) en caldo MRS-C, en el cual se encontraban en fase de crecimiento estacionaria tardía. Se lavaron 2 veces con buffer PBS y se resuspendieron en distintas soluciones que contenían los materiales de pared: WPIc, WPI/DX6, WPI/DX70 y WPI/DX450 kDa al 10% (p/v). Luego las suspensiones se deshidrataron en un secadero spray de escala laboratorio (Yamato ADL311S, Japón)utilizando una $T_e = 170^\circ\text{C}$ y $T_s = 81 \pm 1^\circ\text{C}$, condiciones determinadas previamente por Zacarías y col.[22]. Los encapsulados en presentación de polvo obtenidos se denominaron: E-WPIc, E-WPI/DX6, E-WPI/DX70 y E-WPI/DX450, y fueron conservados a -18°C hasta el momento de su uso.

Previo al encapsulado de las bacterias, se realizó un recuento microbiano total de los polvos WPI/DX, con el objetivo de determinar la carga microbiana inicial de cada matriz encapsulante. Para lo cual, se solubilizaron 0,5 g de cada matriz en 4,5 ml de agua de peptona, (dilución 10^{-1}). A partir de ésta se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona, las cuales se sembraron en profundidad en placas de petri con medio APC (*Plate Count Agar*) e incubadas a 30°C durante 24hs, en aerobiosis.

2.2. Caracterización de encapsulados

2.2.1. Porcentaje de Humedad y Actividad de agua

El porcentaje de humedad (% H) de los encapsulados se determinó por gravimetría en estufa hasta peso constante a 105°C y la actividad de agua (a_w) con un equipo Aqualab Systems (EE.UU.).

2.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los sistemas encapsulados se observó directamente, sin preparación previa, mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) (PhenomWorldProX).

2.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante frente radical ABTS^{•+}, radical hidroxilo (HO[•]) y radical superóxido(O₂^{•-})

La actividad antioxidante se evaluó sobre los sistemas encapsulados, del mismo modo en que se evaluaron sobre los conjugados WPI/DX de la Serie 1 en el inciso 2.2.8. del Capítulo 1. Además de la cepa probiótica, se determinó este parámetro en el sobrenadante del cultivo, sobrenadante de lisado y pellet del lisado, en un volumen de 1 ml (equivalente a una carga bacteriana de 1×10^9 UFC) con las técnicas de los radicales HO[•] y ABTS^{•+}(sección 2.2.8. del Capítulo 1). Y además se evaluó en la desactivación del anión superóxido (O₂^{•-}), generado por la autooxidación del H₃NO-HCl [119]; el estudio se basó en la inhibición por competición de la formación de monoformazan (MF⁺) ($\lambda_{\text{máx}}$ 560 nm) por reducción del azul de nitrotetrazolium(NBT²⁺).

Para la obtención del sobrenadante y pellet de lisado, se procedió de acuerdo a Shen, Shang y Li[137]: se centrifugaron 2 ml de cultivo celular durante 10 min a 4.400 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500µl de buffer SET (25 mM EDTA; 20 mM TRIS; 75 mM NaCl; pH 7). Luego se realizaron tres ciclos: calentamiento en baño en ebullición durante 5 min - 5 min en freezer (-18°C). Luego del tratamiento térmico se agregaron 5µl de solución de lisozima (10mg/ml), se agitó en vortex y se dejó incubar 1 hora a 37 °C. Por último, se llevó a volumen inicial con agua destilada estéril y luego de someter a homogenización por unos segundos, se centrifugó durante 10min a 7.500rpm para obtener el sobrenadante y el pellet del lisado.

2.2.4. Sobrevida al secado spray

La viabilidad bacteriana fue determinada realizando recuentos celulares en las suspensiones de INL1 en las distintas soluciones de WPI_n, WPI_c y WPI/DX, como también sobre los encapsulados obtenidos por secador spray.

Diluciones seriadas en agua de peptona estéril al 0,1% (p/v) de las suspensiones bacterianas fueron sembradas en agar MRS-C. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 hs en anaerobiosis (Anaero Pack-Anaero, Japón) y los recuentos fueron expresados en unidades de Log UFC/ml de suspensión.

En cuanto a los encapsulados obtenidos, fueron suspendidos al 10 % (p/v)(concentración de sólidos totales) en agua de peptona estéril, sembradas e incubadas como se menciona en el párrafo anterior. Los recuentos fueron expresados en unidades de Log UFC/g de encapsulados.

2.2.5. Sobrevida a la conservación a 4 y 25 °C

Para evaluar la estabilidad de los encapsulados se llevó a cabo un ensayo de viabilidad a lo largo de un total de 12 meses de almacenamiento a 4°C y 25°C. Para ello los encapsulados se fraccionaron en crioviales de vidrio de 10mL, se cerraron al vacío y se conservaron al resguardo de la luz en dos lotes, uno a cada temperatura de ensayo. Se realizaron recuentos al inicio (post-secado), y a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de conservación, y se expresaron en unidades de Log UFC/g de encapsulados.

2.2.6. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*

En los encapsulados obtenidos se determinó su estabilidad frente a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* según Saito y col. [138]. Los encapsulados se disolvieron al 10 % (p/p) en agua destilada estéril, luego se adicionó un volumen igual de una solución estéril que simulaba ser saliva y se adicionó pepsina bovina al 0,03 % (p/p) (Merck, Alemania). La solución saliva contenía 0,22 g/L de CaCl₂, 16,2 g/L de NaCl, 2,2 g/L de KCl y 1,2 g/L de NaHCO₃. Una vez homogeneizada la solución resultante, se realizó un recuento celular (t_0) y posteriormente el pH fue llevado rápidamente a 2,5 con HCl 0,5 N, para luego colocarlas muestras a 37 °C en un baño de agua termostatzado durante 90 min. Los recuentos celulares a partir de entonces se realizaron cada 30 minutos, etapas denominadas DG t30; DG t60 y DG t90, haciendo referencia a la Digestión Gástrica (DG) y el tiempo de toma de muestra. Después de 90 minutos de digestión gástrica simulada, las muestras se centrifugaron (6.200 × g, 5 min, 8 °C); los pellets se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4), y se resuspendieron al volumen original en una solución de bilis bovina al 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich, Alemania) a pH 8,0. Las suspensiones celulares se incubaron en un baño de agua durante 10 min a 37 °C para simular un "Shock duodenal de bilis" (etapa SDB); al cabo de dichos minutos se recolectaron dos fracciones de muestras: una para evaluar la viabilidad celular luego de la etapa SDB; y otra, fue centrifugada bajo las mismas condiciones. Los pellets obtenidos se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4) y se resuspendieron al volumen original en una solución de bilis bovina 0,3% (p/v) (Sigma-Aldrich, Alemania) y pancreatina 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich, Alemania) a pH 8,0. Los recuentos celulares se realizaron después de 90 min a 37°C (t_{final}).

El ensayo se realizó por duplicado para cada encapsulado y la viabilidad se expresó en unidades de Log UFC/g polvo.

2.3. Análisis estadístico

Idem a la sección 2.3. del Capítulo 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Proceso de síntesis y determinación de la carga bacteriana basal de los conjugados WPI/DX

Se obtuvieron cuatro sistemas en presentación polvo denominados: E-WPIc, E-WPI/DX6, E-WPI/DX70 y E-WPI/450, donde E indica “Encapsulados”, seguido de los materiales de pared empleados.

Los recuentos microbianos totales (en medio PCA), constituyen un ensayo de rutina utilizado para determinar la calidad bacteriológica de los sistemas ensayados. Los recuentos bacterianos de los materiales de pared utilizados en los encapsulados variaron de $4,49 \pm 0,44$ a $5,45 \pm 0,18$ Log UFC/g de sistema. Esta carga microbiana basal puede considerarse normal para medios de cultivo en base a proteínas de suero, y no interfiere con los recuentos de bifidobacterias al ser agregadas estas últimas en varios órdenes de magnitud mayor que la carga microbiana inicial total de los sistemas conjugados.

3.2. Caracterización de encapsulados

3.2.1. Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)

Puede observarse que los valores de %H oscilaron entre 7,97% y 10,93% para todos los sistemas encapsulados, cuyos materiales de pared corresponden a la Serie 1. Los valores y sus desviaciones estándares se presentan en la Tabla 7, junto a los valores de a_w , los cuales variaron de 0,300 a 0,470. Según Gardiner y col. [139] para obtener encapsulados en presentación polvo que sean estables son necesarios valores de humedad de aproximadamente 4 %; y Passot y col.[140], sugieren un a_w menor o igual al valor 0,24 para que la viabilidad bacteriana no se vea afectada. Acorde a estos parámetros, tanto los % de Humedad como los valores de a_w de los sistemas encapsulados fueron elevados a comparación a los sugeridos para garantizar la estabilidad durante el almacenamiento.

Tabla 7. Contenido de Humedad (% H) y Actividad de agua (a_w) para los sistemas WPIIn, WPIc, WPI/DX6, WPI/DX70 y WPI/DX450 (Serie 1).

Sistema	% H \pm DS	$a_w \pm$ DS
E-WPIc	$9,55 \pm 0,45^{ab}$	$0,470 \pm 0,002^a$
E-WPI/DX6	$9,96 \pm 0,00^b$	$0,414 \pm 0,004^b$
E-WPI/DX70	$10,93 \pm 1,41^b$	$0,414 \pm 0,002^b$
E-WPI/DX450	$7,97 \pm 0,20^c$	$0,300 \pm 0,007^c$

Diferentes superíndices indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las microfotografías de SEM de los sistemas encapsulados se muestran en la Figura 14. Las cápsulas presentaron morfología esférica, sin fisuras ni poros, sin embargo muchas partículas exhibieron concavidades típicas consecuentes del proceso de deshidratación mediante secado spray [141], [51]. Puede observarse en la microfotografía A, que las partículas del sistema E-WPIc se presentan de distintos tamaños menores a $10\mu\text{m}$. Mientras que en los sistemas WPI/DX (B, C y D) las partículas presentan más concavidades y tienen diámetros aproximados entre 10 y $15\mu\text{m}$. Slavutsky y col.[142], reportaron tamaños similares, utilizando condiciones operativas similares y encapsulando probióticos con pectina de bajo metoxilo, maltodextrina y leche en polvo como materiales de pared. En cuanto a la morfología de las partículas puede verse que algunas presentan superficies más lisas mientras que otras presentan superficies con depresiones propias provocadas durante el secado por aspersión. Kem y col.[143] encapsularon una cepa de *Lactobacillus* mediante secado spray utilizando WPI a distintas concentraciones y obtuvieron partículas de morfologías muy similares; además, determinaron que el tamaño de las partículas aumentaba de 10 a $30\mu\text{m}$ a medida que se aumentaba la concentración de WPI de 10 al 30 %. Esto último no se podría aplicar a nuestros sistemas, ya que los sistemas WPI/DX presentaron menor concentración de WPI y mayor tamaño de partícula; sin embargo, los conjugados contienen DX a diferencia del sistema WPIc.

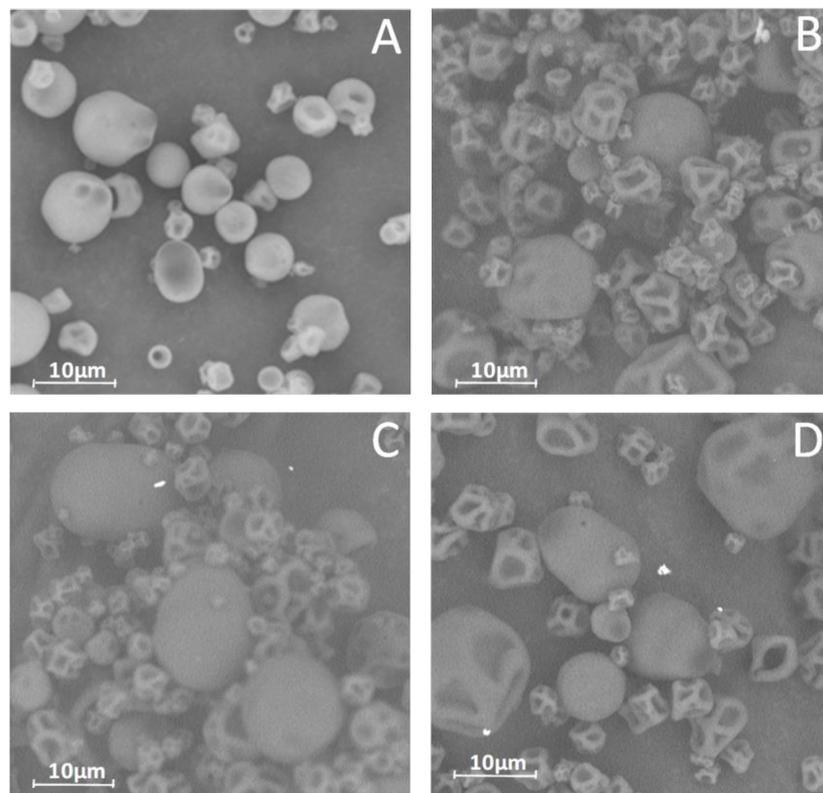


Figura 18. Fotomicrografías (5600x) de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los encapsulados: E-WPIc (A), E-WPI/DX6 (B), E-WPI/DX70 (C) y E-WPI/DX450 (D).

Teniendo como referencia las barras de tamaño en las imágenes, se observó que las partículas obtenidas para cada sistema presentaron tamaños similares a pesar de los distintos PM de los DX conjugados en sus matrices. Ramakrishnan y col. [144], analizaron el efecto de materiales de pared de distintos PM sobre las propiedades de los polvos obtenidos al encapsular mediante secador spray compuestos bioactivos del jugo de tamarillo; igual que nuestro análisis, mostraron que no es posible afirmar que exista una relación entre el PM del material de pared con el tamaño de la partícula y el aspecto de la superficie de las mismas.

3.2.3. Capacidad antioxidante frente radical ABTS^{•+}, radical hidroxilo (HO[•]) y radical superóxido (O₂^{•-})

Si se observa la Tabla 8, pueden observarse los valores de EC₅₀ para el WPI_n y los encapsulados generados con los conjugados de la Serie 1, para las técnicas de desactivación de los radicales ABTS^{•+} y radical hidroxilo (HO[•]). En cuanto al radical ABTS^{•+}, todos los encapsulados mejoran la capacidad antioxidante del WPI_n, ya que se requieren menores cantidades de cada compuesto para desactivar el 50 % de los radicales presentes. Siendo el E-WPI/DX6 el encapsulado de mejor actividad antioxidante, seguidos de los E-WPI/DX450 y WPI/DX70, que si bien sus valores presentan diferencias significativas son muy próximos entre sí.

Si bien se ha encontrado en la bibliografía que los PRM presentan capacidad antioxidante (ver Capítulo 1), no se ha encontrado en la bibliografía revisada al momento que exista alguna relación directa que potencie dicha capacidad al combinar matrices con capacidad antioxidante para encapsular compuestos bioactivos que también la presenten.

Si se analizan los valores de EC₅₀ para la desactivación del radical HO[•], dado que todos los encapsulados poseen valores mayores a 1,26mg/mL correspondiente al WPI_n, ninguno supera la capacidad antioxidante de dicho compuesto, ya que se requieren mayores cantidades de cada compuesto para desactivar el 50 % de dicho radical.

Tabla 8. Valores de EC₅₀ ± DS para la desactivación OH[•] y ABTS^{•+} para el WPI_n y los encapsulados generados con los conjugados de la Serie 1: E-WPI/DX6, E-WPI/DX70 y E-WPI/DX450.

Sistemas	EC ₅₀ (mg proteína/mL)	
	OH [•]	ABTS ^{•+}
WPI _n	1,26 ± 0,16 ^a	1,17 ± 0,01 ^d
E-WPI/DX6	1,29 ± 0,02 ^{ab}	0,72 ± 0,01 ^a
E-WPI/DX70	1,38 ± 0,03 ^b	1,10 ± 0,02 ^c
E-WPI/DX450	1,65 ± 0,09 ^c	1,04 ± 0,01 ^b

Diferentes superíndices indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (p < 0,05).

De acuerdo a los valores de la Tabla 9, se observó que todas las fracciones analizadas de la cepa INL1, presentaron capacidad antioxidante. En cuanto al sobrenadante celular la capacidad

antioxidante podría deberse a la existencia de alguna/s molécula/s producida/s y liberada/s al medio por la cepa, tal como un exopolisacárido (EPS). La existencia de ensayos como los de Xuycol.[145], han dejado en evidencia que algunas cepas de la especie *Bifidobacterium animalis*, producen EPS con actividad antioxidante frente a los radicales hidroxilo y superóxido. Las diferentes tendencias de los resultados provenientes de las distintas técnicas, son consecuencia de los diferentes mecanismos de desactivación de los distintos radicales empleados en cada una de ellas[146], [147].

Tabla 9. Porcentaje de desactivación (%D) de los radicales ABTS^{•+}, HO[•] y O₂^{•-} de 1mL de las distintas fracciones analizadas del cultivo de la cepa probiótica INL1.

Muestras	%D ABTS ^{•+}	%D HO [•]	% D O ₂ ^{•-}
Sobrenadante célula	79,26 ± 20,74	88,42 ± 4,47	26,33 ± 8,35
Célula	12,31 ± 1,43	37,38 ± 6,61	14,51 ± 5,59
Sobrenadante lisado	98,90 ± 0,09	65,89 ± 3,30	83,87 ± 0,00
Pellet Lisado	22,32 ± 7,35	57,01 ± 22,47	79,03 ± 0,00

3.2.4. Sobrevida al secado spray

Los recuentos bacterianos fueron realizados antes y después del secado spray debido a que la exposición de la cepa al calor podría afectar su supervivencia, y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Recuentos de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL 1*, expresados en Log UFC/ml ± DS.

Sistema	Pre-secado	Post-secado
E-WPIc	9,55 ± 0,03 ^a	8,75 ± 0,09 ^b
E-WPI/DX 6	9,18 ± 0,14 ^a	8,15 ± 0,11 ^b
E-WPI/DX 70	9,06 ± 0,1 ^a	8,69 ± 0,03 ^b
E-WPI/DX 450	8,94 ± 0,17 ^a	8,67 ± 0,20 ^a

Diferente letras superíndices por columna indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

Si consideramos los recuentos bacterianos iniciales de todas las suspensiones probióticas antes del secado spray, las diferencias entre esos valores y los recuentos posteriores al secado spray resultaron ser: 1,00; 0,80; 0,50 y 0,01 órdenes Log para los sistemas: E-WPI/DX6, E-WPIc, E-WPI/DX70 y E-WPI/DX450, respectivamente. El sistema WPI/DX 450, fue el único que no mostró diferencia significativa entre los recuentos realizados antes y después del secado spray, resultando ser el sistema que otorgó mayor protección a la cepa. Estos resultados podrían indicar que los

conjugados que contengan DX de mayor PM mantienen mejor la viabilidad celular frente a la deshidratación. Ramakrishnany col. [144], publicaron que materiales de pared de alto PM aportan gran viscosidad a la solución a deshidratar, lo cual permitiría el desarrollo de una superficie semipermeables más estable durante el secado, y así se protegería el compuesto bioactivo de mejor modo.

3.2.5. Sobrevida durante la conservación a 4 y 25 °C

La viabilidad bacteriana de los encapsulados a lo largo de un año de almacenamiento a 4 y 25°C se presenta en la Figura 15. Todos los sistemas mostraron una estabilidad satisfactoria a 4°C (Fig. 15.A), siendo E-WPIc el sistema menos estable.

En cambio a 25°C (Fig. 15.B), la pérdida de viabilidad de los encapsulados fue pronunciada, siendo los sistemas E-WPI/DX 6 y E-WPIc los más estables, con una disminución total de 4,0 Log CFU/g y 4,2 Log CFU/g, respectivamente. La viabilidad bacteriana a 25°C fue más favorable a menor PM del DX conjugado. Si bien se conoce que la supervivencia de células deshidratadas a lo largo del almacenamiento es una capacidad intrínseca de la cepa en estudio, Broeckx y col.[148], sugieren que existen otros dos factores claves para mantener elevados niveles de células viables a temperatura ambiente: la baja humedad y la baja actividad de agua. En nuestros sistemas ambos factores (inciso 3.2.1. del presente capítulo) fueron más elevados que lo recomendado.

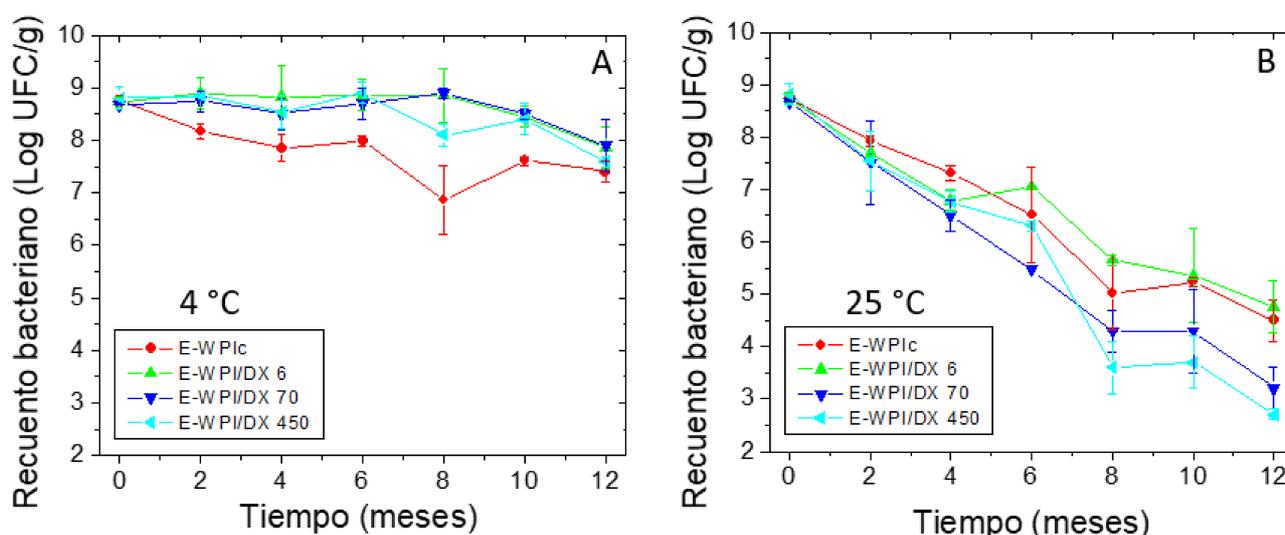


Figura 19. Viabilidad (Log CFU/g) de los encapsulados: E-WPIc (●), E-WPI/DX6 (▲), E-WPI/DX70 (▼) y E-WPI/DX450 (◄), a 4°C (A) y 25°C (B) durante 12 meses.

Ross y col., [23] sugieren que cuando el secado por aspersión se utiliza con la intención de preservar potenciales cultivos probióticos, la mayor parte de la actividad bacteriana se pierde a las semanas de almacenamientos a temperatura ambiente. Este descenso se asocia al stress que suele aplicarse sobre el cultivo debido a los cambios de temperatura, cambios de fase física

(líquida a sólida) y aire insuflado durante la deshidratación, una combinación de factores que tienden a dañar las membranas celulares y proteínas.

3.2.6. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*

La viabilidad de los sistemas encapsulados luego de cada etapa del ensayo de digestión gastrointestinal *in vitro* se muestra en la Figura 16. Se observó una pérdida de viabilidad de todos los sistemas luego de cada etapa, siendo el sistema E-WPIc el que menos protección aportó a la cepa. Probablemente, el proceso de secado spray pudo haber dañado a la cepa, sensibilizándola a la digestión gastrointestinal. Vinderola y col. [21], encontraron resultados similares al ensayar la misma cepa probiótica utilizando leche descremada como matriz de pared.

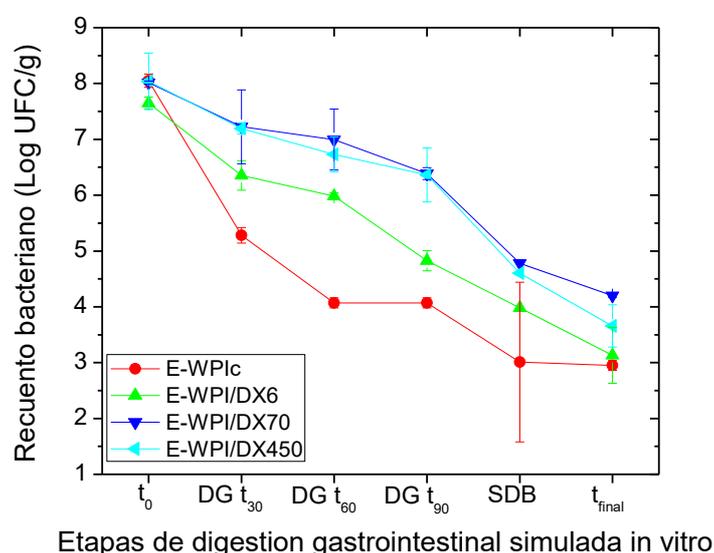


Figura 20. Viabilidad bacteriana de los encapsulados al tiempo inicial (t_0), luego de 30, 60 y 90min de digestión gástrica (DG t_{30} , DG t_{60} y DG t_{90} , respectivamente), luego del Shock Duodenal de Bilis (SDB) y al finalizar el ensayo (t_{final}). Los sistemas ensayados fueron: E-WPIc (●), E-WPI/DX6 (▲), E-WPI/DX70 (▼) y E-WPI/DX450 (◄).

4. CONCLUSIONES PRELIMINARES

Los sistemas estudiados en este capítulo, presentaron valores de porcentajes de humedad y actividad de agua (inciso 3.2.1. de éste capítulo) mayores a lo recomendado por la bibliografía, para que la cepa preserve su viabilidad durante la conservación.

Con respecto a la morfología de las cápsulas obtenidas, se pudo confirmar que los sistemas producidos resultaron ser similares a otros reportados en la bibliografía disponible.

En cuanto a la capacidad antioxidante, en el inciso 2.4.8. del Capítulo 1 se determinó que todas las matrices tenían menores EC_{50} para el radical sintético ABTS^{•+} contra el WPI_n, y en este capítulo, el E-WPI/DX6 mejoró el EC_{50} de su respectivo material de pared; además la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 también posee capacidad antioxidante propia frente a los radicales ensayados.

Con respecto a los recuentos celulares de resistencia frente a la digestión gastrointestinal simulada in vitro, el sistema E-WPI/DX 70 presentó la mayor resistencia a tiempo final, mejorando al sistema E-WPI_c, el cual no mantuvo diferencia significativa con los sistemas WPI/DX 6 y WPI/DX450. En cuanto a la viabilidad durante el almacenamiento a lo largo del tiempo, los sistemas mantenidos a temperatura de refrigeración de 4 °C solo perdieron 1 orden logarítmico de recuento bacteriano en 12 meses, mientras que a 25 °C, lo hicieron en más de 4.

CAPÍTULO 3

Encapsulados de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 mediante emulsión en aceite de canola y gelificación iónica con alginato de calcio(Serie 2)

OBJETIVOS

Emplear las técnicas de emulsificación, atomización por goteo y gelificación iónica para producir partículas cargadas con la cepa probiótica INL1 y aceite de canola, utilizando los conjugado WPI/DX (sintetizados en el Capítulo 1) como agentes emulsificantes.

Caracterizar las emulsiones obtenidas mediante:

- Índice de cremado (IC %) como medida de estabilidad.
- Microscopía óptica, para observar el tamaño de las gotas de aceite en cada sistema.

Sobre las partículas obtenidas determinar:

- La Eficiencia de encapsulación del aceite de canola (EE %).
- Microscopía óptica para observar la morfología de las partículas tanto hidratadas como deshidratadas, y determinar los diámetros medios de cada sistema.
- Viabilidad de la cepa INL1 a lo largo del proceso.

1. INTRODUCCIÓN

Los desarrollos tecnológicos en el área de alimentos son impulsados por la necesidad de innovación. Es así, que los avances se dirigen hacia el desarrollo de distintas técnicas de encapsulación y entrapamiento de compuestos bioactivos de interés para producir IF.

Uno de los procesos últimamente empleados para innovar consiste en un método que combina emulsificación y gelificación iónica, para dar lugar a partículas de diversos tamaños que en su interior contengan compuestos de interés, como ser vitaminas[149], probióticos [150]y aceites [97].

En este capítulo, se presentará el proceso de síntesis de lo que podría considerarse un IF: partículas generadas a partir de emulsiones del tipo sólido/aceite/agua (S/O/W) y gelificadas externamente por iones, las cuales además de contener bacterias probióticas (S), tienen aceite de canola (O). También se especificarán las técnicas utilizadas para caracterizar los sucesivos sistemas generados en cada etapa de síntesis: liofilizado bacteriano, emulsiones, partículas hidratadas y deshidratadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el aislado de proteína de suero nativo (WPI_n) y los conjugados entre WPI y DX de 6 y 100kDa (WPI/DX6 y WPI/DX100, Serie 2) como agentes emulsionantes. Los cuales disueltos en solución acuosa se utilizaron para generar sistemas emulsionados con aceite de canola (AC). El compuesto bioactivo, al igual que en el Capítulo 2 fue la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (INL1). El AC fue de calidad comercial, marca Krol.

Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2.1. Proceso de síntesis

La cepa probiótica INL1 se repicó a partir de un criovial stock de reserva (mantenidos a - 80 °C y conteniendo glicerol al 10 %) en 10 ml de caldo MRS-C y se dejó incubar a 37 °C, durante 18hs en condiciones de anaerobiosis. Luego del segundo repique bajo las mismas condiciones, se escaló el cultivo a 1L para luego ser centrifugados (6000 rpm, 10 min, 8 °C). Los pellets obtenidos se lavaron con PBS, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 22 ml de inulina estéril al 20%. Luego de hacer un recuento para conocer la carga bacteriana de las suspensiones, se alicuotaron 2 ml por vial de vidrio para ser luego acondicionados a - 80 °C durante 24hs para su posterior liofilización en un equipo CHRIST (Alpha 1-4 LD Plus, España). Se utilizó la cepa liofilizada debido por un lado, a que muchos cultivos bacterianos se comercializan de dicha manera; por otro, a escala laboratorio ensayos previos nos han demostrado que los rendimientos de la deshidratación mediante liofilización son del 100 %, superando ampliamente al del secado spray, el cual ronda el 75 % y para pequeños volúmenes no podría considerarse práctico.

La cepa INL1 liofilizada se mezcló con AC comercial al 10%(p/p), para generar una emulsión con soluciones acuosas de WPI_n o conjugados (WPI/DX) al 3%(p/p) por medio de un homogeneizador de eje rotatorio Ultra-Turrax (IKA T25) a 9000rpm durante 4min a temperatura ambiente. Luego, el pH se ajustó a 5,0 con HCl 1M y 5M, y se adicionó una solución de alginato de sodio (Na-Alg) al 0,8 %(p/v). Por último, se homogenizó a 9000rpm durante 1min, para obtener las emulsiones finales: Em-WPI_n, Em-WPI/DX6 y Em-WPI/DX100.

Las emulsiones se atomizaron sobre una solución de CaCl₂ al 2,5%(p/v) bajo agitación continua y moderada, y se mantuvieron por 30min para permitir la gelificación del alginato por el Ca⁺². Las cápsulas producidas se recuperaron de la solución de maduración y se lavaron dos veces con agua destilada, para luego deshidratarlas en un liofilizador(CHRIST, ALPHA 1-4 LD, Alemania)durante 22 h, a 0,0010 mBar de presión y -55 °C, previa congelación a -80 °C. Al finalizarla deshidratación, se obtuvieron sistemas de partículas milimétricas, llamados: m-WPI_n, m-WPI/DX6 y m-WPI/DX100, acorde a los emulsionantes utilizados en cada sistema. El proceso completo de síntesis se esquematiza en la Figura 17.

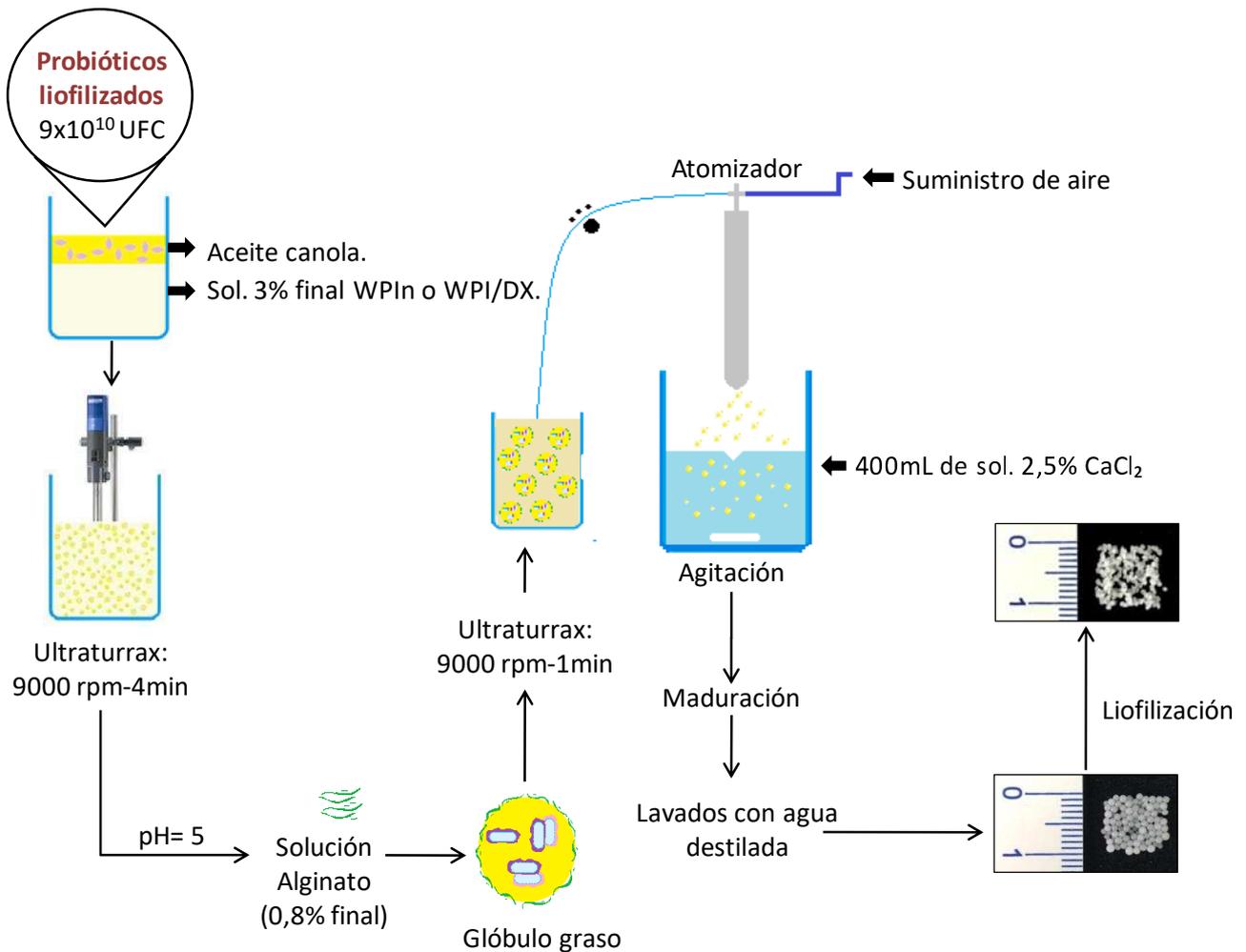


Figura 21. Diagrama de síntesis de partículas de alginato de calcio conteniendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, utilizando aceite de canola y WPI no conjugados WPI/DX como emulsionantes.

2.2. Caracterización de emulsiones

2.2.1. Índices de cremado (IC)

El cremado es un fenómeno que suele desarrollarse en emulsiones inestables, se caracteriza por el ascenso de las gotas de aceite a la superficie debido a la diferencia de densidad entre las fases inmiscibles. Dicho fenómeno puede cuantificarse mediante un Índice de Cremado (IC), el cual se expresa como porcentaje. Para su determinación se colocaron 10 ml de cada sistema emulsionado en un tubo graduado, teniendo la precaución de no tomar espuma. Posteriormente los tubos se mantuvieron en reposo y a temperatura ambiente durante una semana.

Para calcular el IC se utilizó una fórmula (Ec. 9) planteada por Ferreira y col. [151], en la cual se definen dos parámetros: H_0 , como la altura inicial de la emulsión y H_C a la altura del pico de la fase de cremado a tiempo final.

$$IC(\%) = \frac{Hc}{H_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

2.2.2. Microscopía óptica

Una vez generadas las emulsiones, inmediatamente se observaron mediante microscopía óptica (Leica DME, EC 3) y se tomaron registros fotográficos.

2.3. Caracterización de las partículas

2.3.1. Eficiencia de encapsulación de aceite (EE)

Se evaluó el Aceite Libre (o *Free Oil*), para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) acorde a Carneiro y col. [152]:

$$EE = \left(\frac{T_0 - S_0}{T_0} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde: T_0 es el contenido total de aceite considerado en la síntesis de cada sistema y S_0 , el aceite libre determinado mediante la técnica detallada a continuación.

La determinación de Aceite Libre fue llevada a cabo según Klinkesorn y col.[153], para estimar el porcentaje del aceite no encapsulado que permanece adherido a las partículas de manera superficial por sobre el exterior de las mismas.

Se mezclaron 1g de partículas con 6ml de hexano y se agitó por inversión manual suavemente durante 2 min; se filtró y posteriormente se evaporó el hexano mediante un rotavapor con baño termo-estabilizado (Buchi, modelo R-124; Suiza) a 60°C durante 3 min. Se colocaron los balones a 105°C por 20 min en estufa y a posteriori en desecador para pesarlos cuando alcanzaran temperatura ambiente. Para asegurar la evaporación del solvente se colocaron nuevamente a 105°C por otros 20 min, y se volvieron a pesar.

La cantidad de aceite libre no encapsulado se calculó mediante gravimetría.

2.3.2. Microscopía óptica y tamaño de partículas

Las partículas, tanto hidratadas como liofilizadas, se observaron con un microscopio óptico (Leica DME, EC 3). Se determinaron los diámetros mediante el software Leica Application Suite EZ (3.4.0, Suiza).

2.4. Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis

Para evaluar el efecto del proceso de síntesis sobre la viabilidad de la cepa probiótica, se llevaron a cabo recuentos microbiológicos en las distintas etapas del proceso: i) liofilizados de INL1 en inulina, ii) emulsiones con y sin alginato; iii) partículas hidratadas y liofilizadas.

- i) y ii) Los liofilizados y las emulsiones con y sin alginato se suspendieron en agua de peptona regenerando la concentración original de sólidos y permanecieron unos 15 min a 37 °C para favorecer la hidratación del cultivo. Se plaquearon diluciones seriadas en agua de peptona en agar MRS-C. Las placas se incubaron durante 48hs a 37°C en anaerobiosis y los recuentos se expresaron en unidades de Log UFC/g para los liofilizados y Log UFC/ml para las emulsiones.
- iii) Para realizar los recuentos sobre las partículas hidratadas se realizó una ruptura química similar a lo realizado por [2], utilizando una solución de NaCl 0,85% (p/p) y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1,0% (p/p). Las mezclas de muestras y solución de ruptura se sometieron a un homogenizador de alimentos tipo Stomacher en tres ciclos de un minuto a máxima potencia para favorecer una ruptura física, con la intención de asegurar la completa liberación de las bacterias. Para las partículas deshidratadas, el proceso de ruptura fue más agresivo, no sólo se suspendieron las muestras a la solución de ruptura química, sino que la ruptura física se alcanzó al tratar las suspensiones en un Ultraturrax (IKA, T8, China) durante 1 minuto por 10.000rpm; luego, las soluciones obtenidas se diluyeron serialmente y plaquearon como se mencionó previamente.

El cambio de procedimiento para las milipartículas deshidratadas fue consecuencia de la integridad estructural que presentaban, lo que no permitía que sean desintegradas con un homogenizador de alimentos tipo Stomacher, siendo necesaria una fuerza de corte mayor.

2.5. Análisis estadístico

Idem a la sección 2.3. del Capítulo 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las emulsiones

3.1.1. Índices de cremado (IC)

Los IC observados al cabo de una semana de generadas las emulsiones fueron: $35,0 \pm 0,7^a$; $30,0 \pm 0,0^a$ y $25,0 \pm 0,7^a$ para los sistemas de WPI_n, WPI/DX6 y WPI/DX100 respectivamente. El análisis ANOVA indica que no existen diferencias significativas, sin embargo existe una tendencia donde los WPI/DX no aportan mayor estabilidad.

3.1.2. Microscopía óptica

Las micrografías de las emulsiones se presentan en la Figura 18.

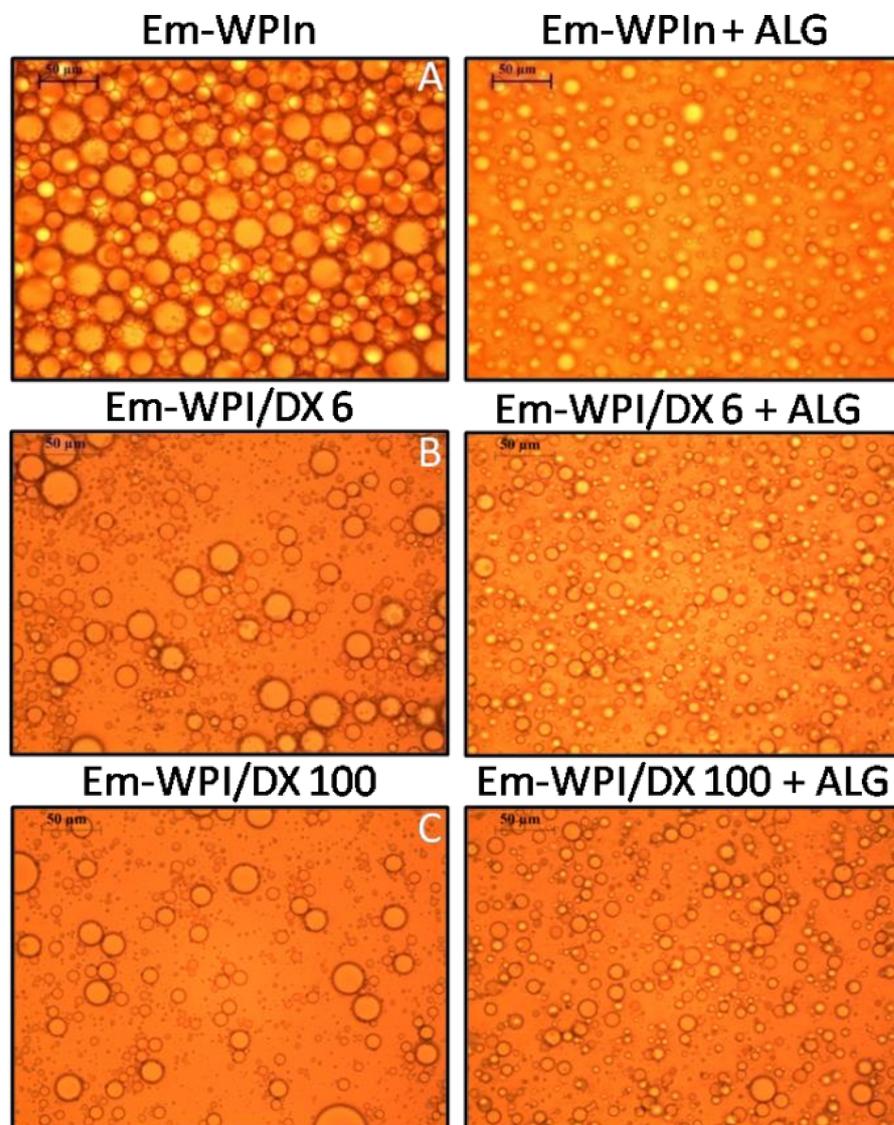


Figura 22. Micrografías de microscopio óptico (40x) de las emulsiones antes (1° columna) y después de agregar Alg. (2° columna), de las emulsiones de WPI(A); WPI/DX6 (B) y WPI/DX100 (C).

Los sistemas WPI/DX presentaron menor tamaño de gota de aceite en comparación con el de WPI_n, lo cual coincide con Benichou y col.[69], quienes verificaron que emulsiones estabilizadas con WPI/goma xántica muestran mejores propiedades emulsionantes, evidenciado en menores tamaños de gotas que los sistemas estabilizadas solo con WPI.

A simple vista, todos los sistemas disminuyeron el tamaño de gotas luego de la incorporación del alginato, consecuencia del aumento de viscosidad que produce este polisacárido de alto PM en la fase continua.

3.2. Caracterización de las milipartículas

3.2.1 Eficiencia de encapsulación (EE)

Las %EE se muestran en la Tabla 11. El % de EE de AC entre las miniesferas analizadas fue significativamente diferente entre los sistemas que contenían WPI_n y WPI/DX100 como emulsionantes, y el WPI/DX6, el cual resultó ser el más efectivo al encapsular el 94,20 % del aceite total incorporado en el proceso de síntesis. Al igual que O'Regan y Mulvihill[154], quienes trabajaron con caseinato de sodio y conjugados de dicha proteína y maltodextrina, los sistemas conjugados mejoraron la EE de aceite comparados con el sistema control, conteniendo solo la proteína.

Tabla 11. Valores de Eficiencias de Encapsulación (EE) del aceite de canola(AC) de las miniesferas liofilizadas.

Sistemas	EE de miniesferas liofilizadas (%)
WPI _n	86,63 ± 1,15 ^a
WPI/DX6	94,20 ± 0,07 ^b
WPI/DX100	87,02 ± 4,08 ^a

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar el test de LSD (p<0,05).

3.2.2. Microscopía óptica y tamaño de partículas

Los sistemas hidratados, antes de la liofilización, presentaban partículas de morfologías esféricas; mientras que los sistemas liofilizados evidenciaron pérdida de simetría y tamaños más pequeños (Figura 19 y Tabla 20), con una contracción de la estructura de aproximadamente del 20 al 22%. Tasch y col. [95], obtuvieron simetrías de partículas similares, pero con tamaños más pequeños cuando desarrollaron microcápsulas con *Bifidobacterium* utilizando una metodología similar. Las topografías de las superficies de las partículas podrían considerarse rugosas [36].

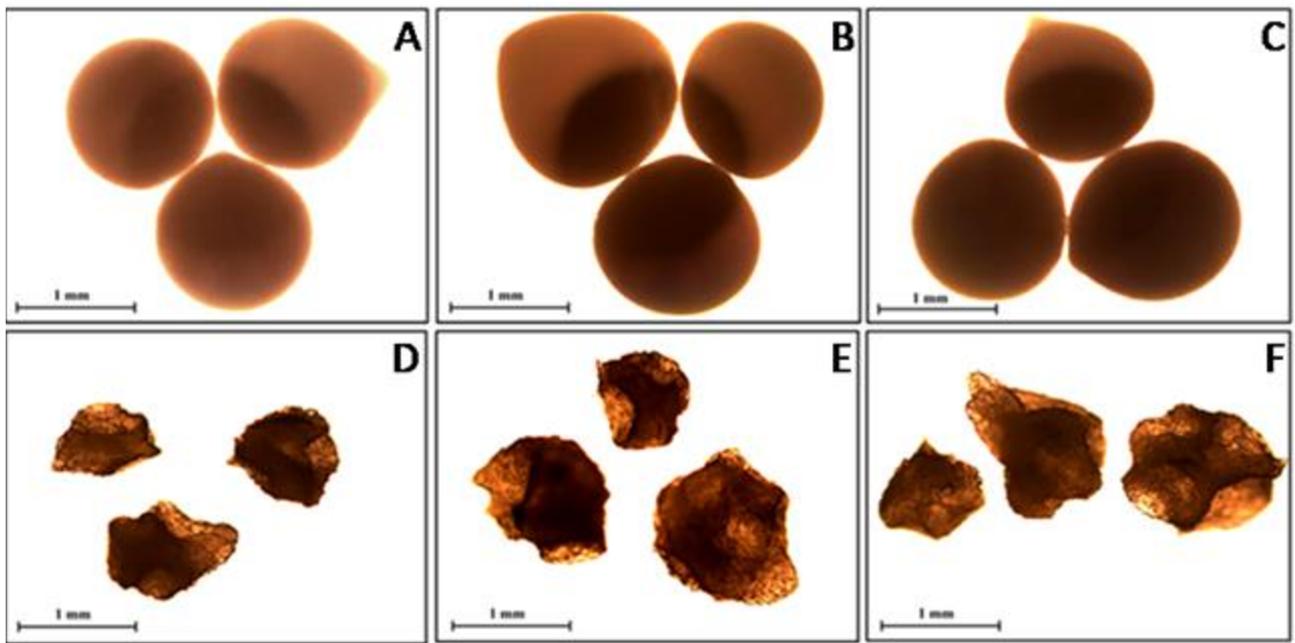


Figura 23. Fotografías de las milipartículas, hidratadas (A, B y C) y liofilizadas (D, E y F). Las columnas de izquierda a derecha corresponden a los sistemas: m-WPIIn, m-WPI/DX6 y m-WPI/DX100.

Los diámetros promedio y la desviación estándar de las milipartículas obtenidas se muestran en la Tabla 12. Analizando partículas hidratadas, m-WPI/DX6 y 100 kDa no presentaron diferencias significativas, pero presentan diferencias con el sistema m-WPIIn, cuyo diámetro medio es menor.

Table 12. Diámetros medios junto a sus desviaciones estándares (mm) para todos los sistemas de milipartículas hidratadas y liofilizadas.

Estado	Diámetro medio ± DS (mm)		
	m-WPIIn	m-WPI/DX6	m-WPI/DX70
Hidratadas	1,41 ± 0,15 ^{aA}	1,53 ± 0,18 ^{bA}	1,58 ± 0,19 ^{bA}
Liofilizadas	1,12 ± 0,14 ^{aB}	1,24 ± 0,22 ^{bB}	1,24 ± 0,20 ^{bB}

^{a, b} Indican diferencias significativas entre las muestras al aplicar la prueba de diferencias menos significativas (LSD) ($p < 0.05$) entre sistemas hidratados y liofilizados (misma fila).

^{A, B} Indican diferencias significativas entre las muestras al aplicar la prueba de diferencias menos significativas (LSD) ($p < 0.05$) entre los mismos sistemas hidratados y liofilizados (misma columna).

3.3. Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis

Los recuentos iniciales de los liofilizados de INL1 en In fueron de $11,74 \pm 0,09$ Log UFC/g. La viabilidad bacteriana de las emulsiones antes y después del agregado de Alg, luego de la gelificación iónica (milipartículas hidratadas) y posteriormente a la liofilización se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Recuentos bacterianos de la cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (Log UFC/g) en las emulsiones sin y con alginato, y en las milipartículas tanto hidratadas como deshidratadas.

Agente emulsionante	Recuentos bacterianos (Log UFC/g ± DS)			
	Emulsiones sin Alg	Emulsiones con Alg	Milipartículas Hidratadas	Milipartículas Liofilizadas
WPI_n	9,53 ± 0,15 ^{aA}	9,22 ± 0,10 ^{aA}	9,49 ± 0,16 ^{aA}	3,08 ± 0,01 ^{bA}
WPI/DX6	9,23 ± 0,09 ^{abAB}	8,90 ± 0,02 ^{aB}	9,22 ± 0,21 ^{bA}	3,56 ± 0,14 ^{cB}
WPI/DX100	9,02 ± 0,15 ^{aB}	8,98 ± 0,12 ^{aB}	9,37 ± 0,10 ^{bA}	3,81 ± 0,09 ^{cC}

^{a,c}, ^bValores contenidos en las filas que presentan diferentes superíndices, son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

^{A,B,C} Valores contenidos en las columnas que presentan diferentes superíndices, son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La diferencia de recuentos bacterianos entre las emulsiones sin y con Alg pueden considerarse no significativas. Luego de producidas las milipartículas, los recuentos bacterianos se incrementaron; lo cual podría ser consecuencia de una recuperación bacteriana luego del stress generado por el proceso de emulsificación. Este tipo de comportamiento, en el cual se observan mayores recuentos luego de cesar un factor de stress fue reportado por Burns y col. [155],[156].

Una vez que las milipartículas fueron liofilizadas, se almacenaron a 4 °C durante 3 semanas. Luego de ese tiempo de almacenamiento, los recuentos bacterianos disminuyeron entre 5,55 y 6,41 Log UFC/g, siendo el sistema WPI/DX100 el que evidenció el menor descenso. Dados los valores obtenidos de viabilidad celular de los sistemas liofilizados, los cuales se consideraron bajos según el objetivo de obtener sistemas de recuentos cercanos a 8 o 9 x10 UFC/g, se decidió no realizar los ensayos de viabilidad celular a los largo del almacenamiento ni la digestión gastrointestinal in vitro.

El AC es un aceite refinado derivado del aceite de colza [90]. El refinamiento eliminaría compuestos que podrían ser antibacterianos, sin embargo según Ghazani y Marangoni [91] el AC podría contener compuestos de tipo fenólicos que presentan capacidades antibacterianas. Éstos compuestos podrían ser los responsables de los descensos en los recuentos bacterianos, ya que todos los liofilizados tienen en común que se encuentran suspendidos en el AC.

4. CONCLUSIONES

La cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 fue eficientemente encapsulada en las milipartículas sintetizadas a partir de una emulsión del tipo sólido en aceite en agua (S/O/W), las cuales gelificaron iónicamente a partir de alginato de sodio y cloruro de calcio.

Las emulsiones con los sistemas conjugados WPI/DX presentaron menor tamaño de gota que el sistema WPI_n; el agregado de alginato también favoreció la disminución del tamaño de las mismas. A pesar de que los IC no presentaban diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia en la cual al aumentar el PM de DX utilizado, disminuían los IC para sus respectivas emulsiones, insinuando que podrían tener mejor capacidad emulsificante. Por otro lado, el sistema de Em-WPI/DX6 presentó la mejor EE cercana al 94 %, en comparación con los otros dos sistemas.

Si bien la metodología empleada preservó adecuadamente la viabilidad celular de todos los sistemas, una vez liofilizados, los recuentos disminuyeron notablemente en pocas semanas.

CAPÍTULO 4

Encapsulados generados mediante emulsión en aceite de canola y secado spray de *B. animalis* subsp. *Lactis* INL1 y *Lactobacillus rhamnosus* 73a (Serie 2)

OBJETIVOS

Encapsular dos cepas probióticas, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 y *Lactobacillus rhamnosus* 73a, mediante la técnicas de emulsificación utilizando aceite de canola, conjugados WPI/DX de la Serie 2 (sintetizados en el Capítulo 1) como agentes emulsionantes y otros polisacáridos, y posterior secado por aspersión de las emulsiones generadas para producir microcápsulas.

Caracterizar las emulsiones obtenidas mediante las técnicas:

- Índice de cremado (IC %) como medida de estabilidad.
- Índice de Actividad Emulsionante (IAE %).
- Microscopía óptica, para observar el tamaño de las gotas de aceite en cada sistema.

Caracterizar los polvos obtenidos mediante:

- Determinación de la Eficiencia de encapsulación del aceite de canola (EE %).
- Observación mediante Microscopía óptica de barrido (SEM) para registrar la morfología de los polvos.
- Determinación de la viabilidad probiótica de ambas cepas a lo largo del proceso de síntesis de los encapsulados y durante de 4 meses de almacenamiento a dos temperaturas diferentes: 4 y 25 °C.
- Determinación de la capacidad antibacteriana del aceite de canola.

1. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es un proceso en el cual se genera una barrera funcional entre el núcleo y el material de pared para evitar reacciones químicas y físicas que puedan deteriorar o modificar las propiedades biológicas y fisicoquímicas de los materiales de interés que se ubican en el núcleo [83].

Varias son las técnicas utilizadas para generar microcápsulas para contener los microorganismos probióticos, una de la más ampliamente utilizada consiste en el secado spray como se estudió en el Capítulo 2; otra técnica actualmente en desarrollo es el empleo de un secador spray luego de generar emulsiones del tipo S/O/W (sólido en aceite en agua), donde la fase sólida pueden ser compuestos bioactivos o bacterias; la naturaleza de la fase oleosa suele elegirse por presentar algunas ventajas para el consumidor; y por último la fase acuosa, la cual es deshidratada, y contiene los agentes emulsificantes y sólidos para obtener emulsiones estables. Zhang y col. [89], han formulado emulsiones S/O/W con aceite de soja y solución de pectina de remolacha, para potenciar la viabilidad de la cepa *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514; y Crittenden y col. [84], han formulado capsulas simbióticas, es decir con probióticos y prebióticos, para potenciar la viabilidad de *Bifidobacterium infantis* Bb-02 frente al almacenamiento no refrigerado y el tránsito gastrointestinal. En esta tesis se emplearon AC y como prebiótico fructo-oligosacáridos.

Además de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, también se ensayó la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* 73a, aislada y caracterizada en el INLAIN y cuyos resultados de distintos ensayos están siendo evaluados para su publicación en una revista internacional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de este capítulo de la tesis involucró el uso del aislado de proteína de suero nativo (WPI_n), un sistema control (WPI_c) y los conjugados entre WPI y dextranos de 6 y 100kDa (WPI/DX6 y WPI/DX100, citados en el Capítulo 1 como Serie 2) como agentes emulsificantes para generar sistemas emulsionados con aceite de canola (AC) que luego fueron deshidratados mediante el secador spray. En esta oportunidad, no solo se utilizó la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, sino también un *Lactobacillus rhamnosus* 73a, ambos aislados a partir de leche materna en el INLAIN.

Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2.1. Proceso de síntesis

2.1.1. Liofilizado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 y *Lactobacillus rhamnosus* 73a

Ambas cepas se reactivaron a partir de stocks congelados (mantenidos a -80°C y conteniendo glicerol al 10 %) en 10 ml de caldo MRS-C a 37°C , durante 18hs en anaerobiosis. Luego del segundo repique bajo las mismas condiciones, se cultivaron en 200ml de caldo MRS para luego ser centrifugados a 5000 rpm, durante 10 min a 8°C . Los pellets obtenidos se lavaron con PBS, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 20ml de solución de Inulina estéril al 20% (p/v). Luego de hacer un recuento para conocer la carga bacteriana de las suspensiones, se alicuotaron a razón de 2 ml por vial de vidrio para ser luego congelados a -80°C durante 24hs para su posterior liofilización en un equipo CHRIST (Alpha 1-4 LD Plus, Alemania) durante 22 h, a 0,0010 mBar de presión y -55°C .

2.1.2. Síntesis de emulsiones y obtención de polvos

La preparación de los sistemas emulsionados a ser secados por spray comenzó con la disgregación física de 200 mg de liofilizados y sus suspensiones en 20 g de aceite de canola(AC). Posteriormente se utilizó un homogeneizador para agitar la suspensión y luego, se agregaron: 15 g de una solución acuosa del emulsionante al 1% (p/p); 40 g de una solución de goma xántica al 0,5% (p/p) para aumentar la viscosidad de la fase acuosa y así mejorar el rendimiento del secado, efecto determinado en experiencias previas; y por último se adicionaron 125 g de una solución de inulina al 20% (p/p) la cual no solo podría ejercer un efecto prebiótico, sino también aporta al contenido de sólidos totales. Obteniendo una masa de 200 g de cada sistema, se procedió a emulsionarlos utilizando un homogenizador de eje rotatorio Ultra-turrax (IKA T25) a 9000 rpm durante 5 min. De las emulsiones obtenidas se tomaron muestras para llevar a cabo su caracterización y el volumen restante se deshidrató mediante un secador spray escala laboratorio (Yamato ADL311S, Japón) utilizando una $T_e = 170^{\circ}\text{C}$ y $T_s = 81 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. Caracterización de las emulsiones

2.2.1. Índice de cremado (IC %)

El Índice de Cremado (IC %) se calculó según el inciso 2.1. del Capítulo 3.

2.2.2. Determinación del Índice de Actividad Emulsionante (IAE)

Los Índices de Actividad Emulsionante (IAE) se determinarán por medio de la técnica turbidimétrica de Pearce y Kinsella [157] corregida por Cameron y col. [158]. Dicha técnica se basa en la teoría de dispersión de luz de Mie en la que la turbidez de una suspensión diluida de partículas esféricas se relaciona con su área interfacial, haciendo posible determinar el área interfacial de las partículas por unidad de masa de emulsificante.

La técnica consiste en pesar 0,2 g de la emulsión y llevar a 50 g con SDS al 0,1 % (Dilución 1/250), homogeneizar y medir la absorbancia a 500 nm. El IAE se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \cdot 2,303 \cdot Abs.500 \text{ nm}}{L \cdot C \cdot (1 - \Phi)} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

Abs. 500 nm: Absorbancia de la muestra a 500 nm.

L: longitud del camino óptico de la cubeta (1 cm).

C: concentración de proteína (g/m³).

Φ: Fracción de aceite (volumen de aceite/volumen de emulsión).

2.2.3. Microscopía óptica

Una vez generadas las emulsiones, inmediatamente se observaron sus morfologías con un microscopio óptico (Leica DME, EC 3) y se tomaron registros fotográficos.

2.3. Caracterización de encapsulados

2.3.1. Porcentaje de Humedad y Actividad de agua

El porcentaje de humedad (% H) de los encapsulados se determinó por gravimetría en estufa hasta peso constante a 105 °C y la actividad de agua (a_w) con un equipo Aqualab Systems (EE. UU.).

2.3.2. Eficiencia de encapsulación de aceite de canola (EE %)

La técnica y la fórmula empleadas en la determinación del porcentaje de Eficiencia de Encapsulación del AC fueron las descritas en el inciso 2.3.1. del Capítulo 3.

2.3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los polvos obtenidos a partir de las emulsiones y el secado spray se observaron directamente, sin preparación previa, mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Phenom World ProX).

2.4. Evaluación de la viabilidad celular durante el proceso de síntesis

La viabilidad de las cepas se evaluó en tres instancias a lo largo del proceso de síntesis: sobre los liofilizados en inulina, sobre las emulsiones generadas y sobre los polvos obtenidos mediante secador spray.

2.5. Evaluación de la viabilidad celular durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

Una vez obtenidos los polvos, los sistemas se fraccionaron en viales de vidrio, se sellaron al vacío y se conservaron a: 21, 4 y -18 °C, al resguardo de la luz. Sobre dichos polvos se llevaron a cabo recuentos bacterianos para analizar la viabilidad de ambas cepas a 1, 2 y 2 semanas de obtenidos; al mes, a los 2 y 4 meses.

2.6. Capacidad antibacteriana del aceite de canola (AC)

Dados los resultados de la viabilidad bacteriana a lo largo del proceso de síntesis tanto del presente capítulo, como del capítulo previo, surgió la necesidad de evaluar si el AC utilizado contendría compuestos potencialmente antibacterianos. Para lo cual se ensayaron dos técnicas.

2.6.1. Ensayo en medio agarizado

El ensayo se siguió acorde a Dang Xuan y col. [159]. Se prepararon 80 mL de MRS agar y se alicuotaron de a 20 mL en tubos de vidrio con tapa, se esterilizaron y una vez que alcanzaron una temperatura de 40 °C: a dos de los tubos se les adicionó 400 µL de cultivo ON de la cepa INL1 y 200 µL de cisteína; y a los otros dos tubos, 400 µL de cultivo ON de la cepa L73a. Se homogeneizaron y el contenido de cada tubo se volcó en placas de Petri estériles. Sobre la superficie del medio de cultivo solidificado se colocaron 4 filtros estériles (Whatmann, 8 µm de poro) de 6 mm de diámetro. Disponiendo de 4 filtros para cada cepa, se colocaron de manera independiente 13 µL de las siguientes soluciones:

1. Gentamicina, antibiótico; empleado como control positivo del ensayo.
2. Agua estéril; control negativo.

3. Metanol 50 % (v/v) en agua estéril; segundo control negativo.
4. Se colocó el AC 50 % (v/v) en metanol.

Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. Se determinaron los halos de inhibición en el césped bacteriano, detectados como zonas translúcidas.

Dados los resultados obtenidos del ensayo previo, también se optó por modificar la técnica y en lugar de colocar filtros, se realizaron perforaciones o “pocillos” en el agar colocando en ellos la solución de aceite diluida para favorecer la difusión en el medio.

2.6.2. Ensayo en medio líquido

Se utilizó el método de Bachir y col.[160], para el cual se realizó un ensayo preliminar en el cual se determinó si el etanol, solvente empleado en la técnica, afecta la viabilidad de las cepas en estudio.

Se preparó una solución de 1 mL de ACy 9 mL de etanol y a partir de ella, las diluciones seriadas en etanol 10^{-2} y 10^{-3} ; se preparó un tubo control de agua estéril al 10% en etanol. Posteriormente, 1 mL de cada solución se mezclaron en 8 mL de caldo MRS-C y 0,5 mL de un cultivo ON de las cepas INL1 y L73a. Las suspensiones celulares preparadas se mantuvieron en baño maría a 37 °C, durante 24hs. Diluciones seriadas de las suspensiones se sembraron en agar MRS-C (37 °C, 18 h, anaerobiosos). Los recuentos bacterianos se expresaron en Log UFC/ml. Se consideraron también blancos de reactivo. |

[O1]

2.7. Análisis estadístico

Idem a la sección 2.3. del Capítulo 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de emulsiones

3.1.1. Índices de cremado

Los Índices de cremado (IC) obtenidos se muestran en la Tabla 14. A la semana de análisis, las emulsiones que contenían WPI_n presentaron IC significativamente mayores al resto de los sistemas, indicando que los sistemas formulados con la proteína nativa resultaron ser los más inestables. Zhang y col. [161], evaluaron los IC de emulsiones donde los agentes emulsificantes eran proteína β -conglucina, conjugados de dicha proteína con DX e hidrolizados al 2,2 y 6,5 % de éstos últimos, informaron que los conjugados, e incluso los hidrolizados mejoraban la estabilidad de las emulsiones respecto a la proteína nativa, con valores muy bajos de IC. Cabe destacar que si bien los IC fueron definidos de manera distinta, la interpretación del fenómeno sigue siendo la misma: a menor IC, mayor estabilidad del sistema.

Tabla 14. Porcentajes de Índices de Cremado (% IC) e Índices de Actividad Emulsificante (IAE), para las emulsiones que contienen las cepas INL1 y L73a, con los agentes emulsionantes: WPI_n, WPI_c, WPI/DX6 y WPI/DX100 (Serie 2).

Emulsión	IC (%)	IAE (m ² /g)
Em-WPI _n -INL1	60,50 ± 0,70 ^d	ND
Em-WPI _c -INL1	24,00 ± 0,00 ^b	9,77 ± 0,62 ^a
Em-WPI/DX6-INL1	21,00 ± 1,41 ^a	10,36 ± 0,09 ^a
Em-WPI/DX100-INL1	No se observó fase crema	12,83 ± 0,14 ^b
Em-WPI _n -L73a	59,00 ± 0,00 ^c	ND
Em-WPI _c -L73a	24,00 ± 0,00 ^b	10,52 ± 0,50 ^a
Em-WPI/DX6-L73a	20,00 ± 0,00 ^a	10,47 ± 1,12 ^a
Em-WPI/DX100-L73a	No se observó fase crema	12,33 ± 0,14 ^b

Diferentes letras superíndices en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar el test de LSD ($p < 0,05$).

ND: no determinado por inconvenientes al solubilizar la muestra.

Al sistema WPI/DX100 en las condiciones ensayadas con ambas cepas y al cabo de una semana no se detectó una fase crema por lo cual los sistemas resultaron muy estables. Akhtar y col. [162], analizaron las propiedades emulsionantes de WPI_n y conjugados WPI/DX488 y sus resultados mostraron que la emulsión generada con el conjugado presentó mejor capacidad emulsionante que aquella preparada con la proteína sola. Éstos resultados serían un ejemplo de lo mencionado en la sección introductoria de la presente tesis, donde se plantea que los PRM pueden mejorar las propiedades de los compuestos de partida; los PRM suponen la combinación de las propiedades hidrofóbicas propias de las proteínas, las cuales permiten que la proteína interaccione

en la interfase aceite/agua y el polisacárido se oriente hacia la fase acuosa. La combinación de dichas propiedades, daría lugar a moléculas capaces de situarse en la interface de las fases inmiscibles y mejorar la estabilidad de sistema emulsionados [162].

3.1.2. Determinación del Índice de Actividad emulsificante (IAE)

En la Tabla 14 se muestran los valores de IAE para las emulsiones generadas con los sistemas incubados: WPIc, WPI/DX6 y WPI/DX100, con ambas cepas. Los sistemas generados con el WPI/DX100 son aquellos sistemas significativamente diferentes y de valores mayores; lo cual indicaría que es mayor el área interfacial generada y por ende presentan menores tamaños promedios de gotas de aceite. Xu y col. [125], caracterizaron conjugados entre aislado de proteínas de soja con glucosa y quitosano, producidos a distintos tiempos de reacción; y demostraron que a partir de las 24 hs de reacción, si bien los valores de IAE no presentan diferencias significativas, a mayor tiempo los conjugados de mayor PM presentan mayores valores de IAE, aumentando la diferencia con respecto a los conjugados de menor PM.

En el caso de los sistemas WPI_n, al diluir las muestras los valores de absorbancia determinados eran muy aleatorios y no se informan.

3.1.3. Microscopía óptica

En las Figuras 20y 21 se muestran las micrográficas tomadas mediante microscopía óptica de todas las emulsiones conteniendo las cepas INL1 y L73a, respectivamente. Las mismas muestran que todas las emulsiones presentaron tamaños de gotas polidispersas.

En ambas figuras, observando las columnas de magnificación 40x, puede notarse que las emulsiones que contienen los sistemas incubados presentan gotas de aceite de menor tamaño en comparación con los generados con WPI_n, el cual presenta sus componentes con estructuras nativas. Esta conclusión coincide con los resultados de Akhtar y col. [162], quienes conjugaron WPI con DX de 488 kDa, y demostraron mediante el análisis de la distribución de tamaño de gota de aceite (utilizando un equipo Analizador de dispersión de luz láser estático, Malvern Mastersizer, MS2000) de emulsiones generadas a partir de conjugados WPI/DX488 y WPI, que la presencia de los conjugados da lugar a emulsiones de menores tamaño de gota de fase oleosa.

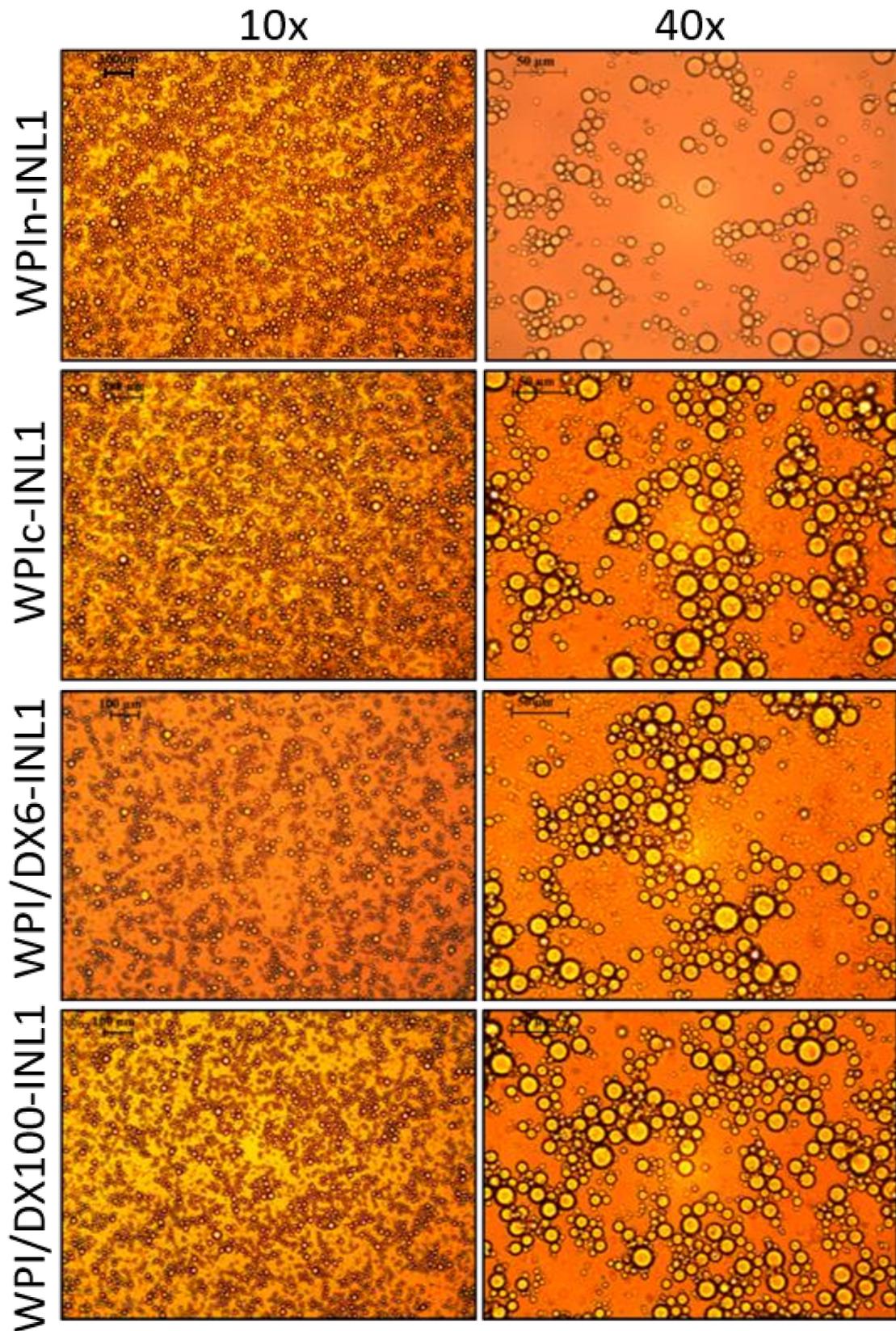


Figura 24. Micrografías de microscopio óptico (10x y 40x) de las emulsiones conteniendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, con WPI_n, WPI_c, WPI/DX6 y WPI/DX100 como emulsionantes.

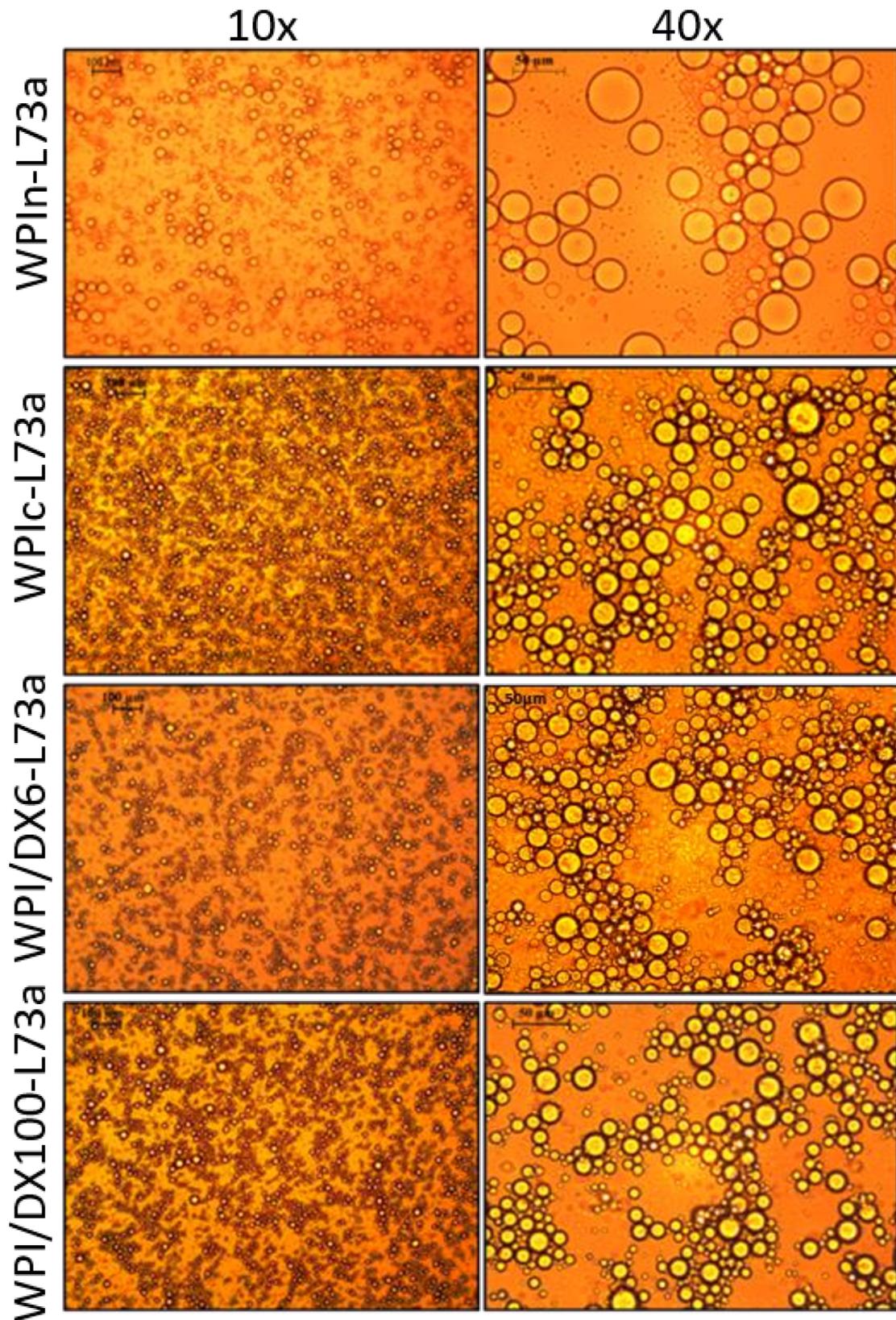


Figura 25. Micrografías de microscopio óptico (10x y 40x) de las emulsiones conteniendo *Lactobacillus rhamnosus* 73a, con WPIIn, WPIc, WPI/DX6 y WPI/DX100 como emulsionantes.

3.2. Caracterización de encapsulados

3.1.1. Porcentaje de Humedad (%H) y Actividad de agua (a_w)

Puede observarse que los valores de % H oscilaron entre 2,91 % y 4,91% para los sistemas encapsulados, cuyos materiales de pared corresponden a la Serie 2. Los valores y sus desviaciones estándares se presentan en la Tabla 15, junto a los valores de a_w , los cuales variaron de 0,277 a 0,366. Estos valores de %H y de a_w serían más adecuados para que la viabilidad bacteriana no se vea afectada [138] [139] y garantizar la estabilidad durante el almacenamiento.

Tabla 15. Contenido de Humedad (% H) y Actividad de agua (a_w) para los sistemas cuyos agentes emulsionantes fueron: WPI_n, WPI_c, WPI/DX6 y WPI/DX100 (Serie 2), para las cepas INL1 y L73a.

Sistema	% H \pm DS	$a_w \pm$ DS
WPI _n -INL1	2,92 \pm 0,22 ^a	0,310 \pm 0,003 ^b
WPI _c -INL1	3,13 \pm 0,12 ^a	0,326 \pm 0,019 ^{bc}
WPI/DX6-INL1	3,50 \pm 0,04 ^{ab}	0,345 \pm 0,003 ^d
WPI/DX100-INL1	3,59 \pm 0,30 ^{ab}	0,336 \pm 0,005 ^{cd}
WPI _n -L73a	2,91 \pm 0,41 ^a	0,277 \pm 0,007 ^a
WPI _c -L73a	4,43 \pm 0,54 ^{bc}	0,366 \pm 0,004 ^e
WPI/DX6-L73a	3,55 \pm 0,54 ^{ab}	0,332 \pm 0,002 ^{cd}
WPI/DX100-L73a	4,91 \pm 0,54 ^c	0,362 \pm 0,003 ^e

Diferentes superíndices por columna indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

3.1.2. Eficiencia de encapsulación de aceite (EE %)

Las Eficiencias de Encapsulación para los encapsulados obtenidos se presentan en la Tabla 16. Como puede observarse los valores de EE varían en el rango de 54 a 73 %, siendo el sistema WPI_c-INL1 el de mayor EE. A diferencia de los resultados obtenidos y de la discusión planteada en el Capítulo 2, para estos sistemas no se observa una tendencia definida entre la capacidad de encapsular el AC y la naturaleza del agente emulsionante.

Dados los valores de IC, IEA y los de EE no se puede compartir el razonamiento de Barbosa y col. [163] y Jafari y col. [164], quienes aseguran que a mayor estabilidad de la emulsión o menor tamaño de gota, mayor EE de los compuestos bioactivos, en este caso considerado el AC.

Tabla 16. Eficiencias de encapsulación de aceite de canola expresadas en porcentajes para los cuatro sistemas sintetizados para cada cepa probiótica.

Sistema	EE (%) \pm DS
WPI _n -INL1	58,30 \pm 5,50 ^{ab}
WPI _c -INL1	73,79 \pm 5,23 ^c
WPI/DX6-INL1	60,85 \pm 0,91 ^{ab}

WPI/DX100-INL1	54,35 ± 2,84 ^a
WPI _n -L73a	67,91 ± 3,34 ^{bc}
WPI _c -L73a	63,79 ± 12,7 ^{abc}
WPI/DX6-L73a	58,94 ± 4,90 ^{ab}
WPI/DX100-L73a	59,30 ± 5,30 ^{ab}

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al aplicar el test de LSD ($p < 0,05$).

3.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las Figuras 22 y 23, se pueden observar las micrográficas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) tomadas para todos los encapsulados que contienen la cepa INL1 y L73a, respectivamente.

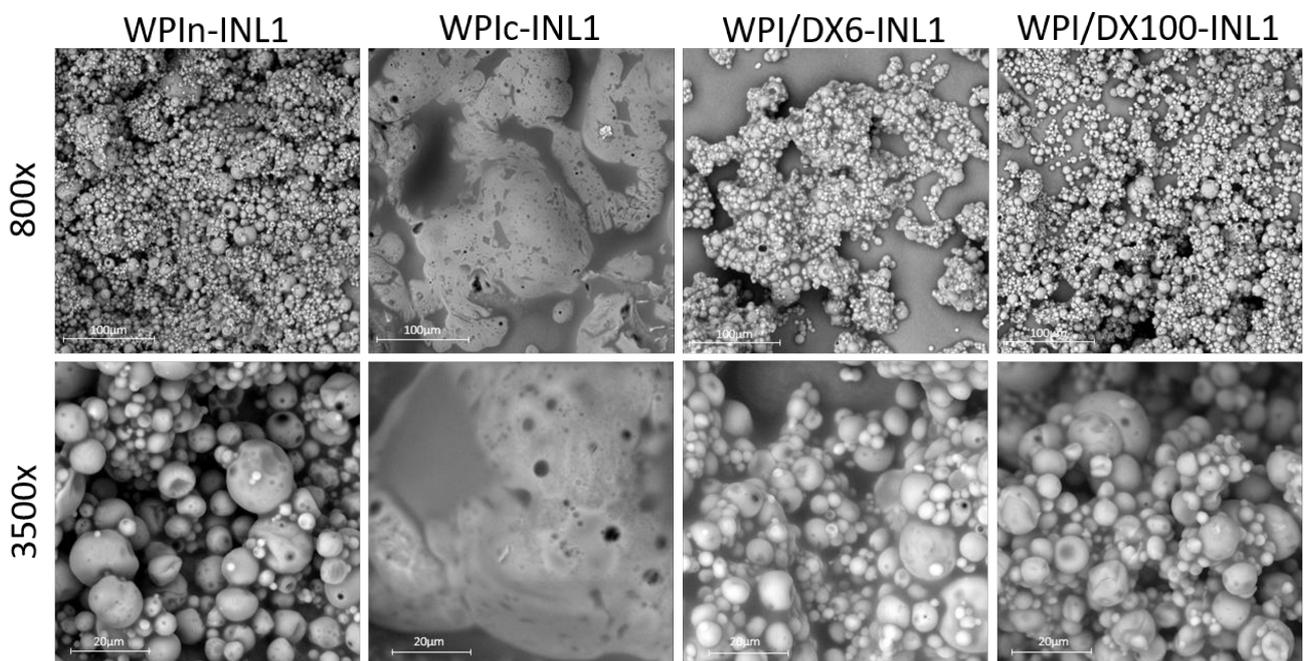


Figura 26. Fotomicrográficas (800x, fila superior y 3500x, fila inferior) de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los encapsulados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 para todos los agentes emulsionantes: WPI_n, WPI_c, WPI/DX6 y WPI/DX100.

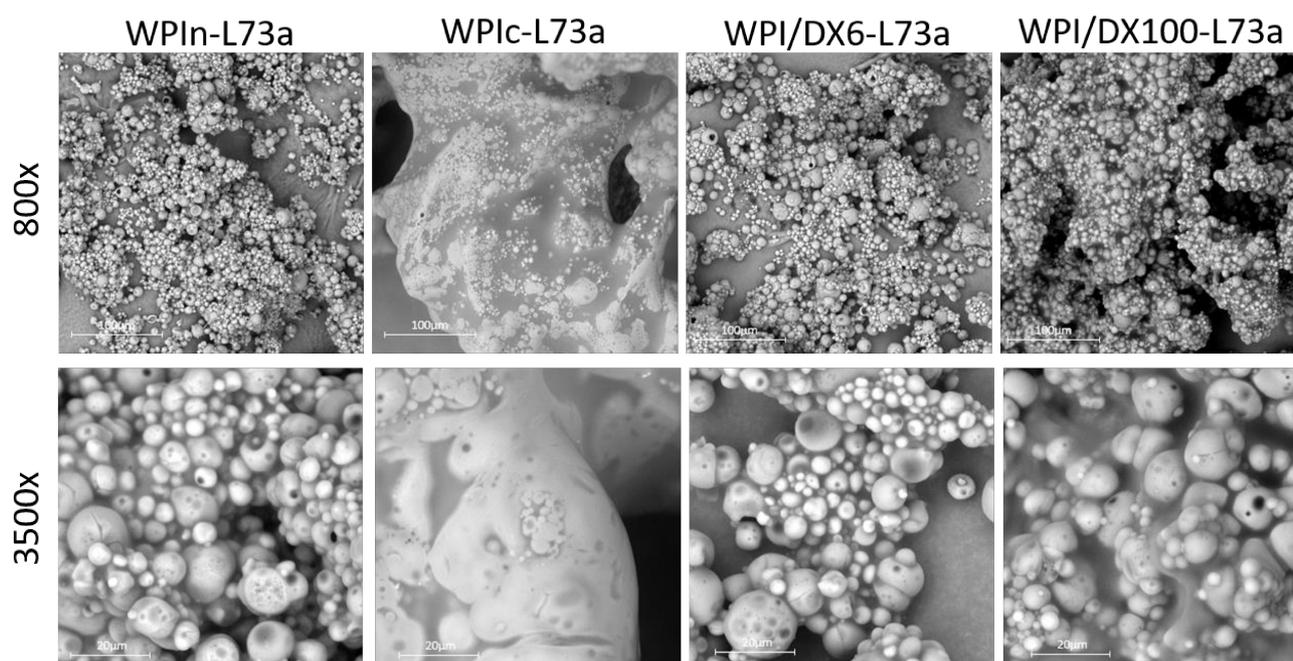


Figura 27. Fotomicrográficas (800x, fila superior y 3500x, fila inferior) de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los encapsulados de *Lactobacillus rhamnosus* 73a para todo los agentes emulsionantes: WPIIn, WPIc, WPI/DX6 y WPI/DX100.

Todos los polvos, excepto los sistemas que contenían WPIc, presentaron partículas esféricas y algunas con concavidades o poros (mejor observados en las magnificaciones de 3500x, como puntos negros). Los polvos presentan tamaños polidispersos, visualmente podría establecerse que el tamaño máximo se encuentra por debajo de los 20 μm , que se corresponden con la barra de tamaño.

Con respecto a los sistemas cuyo agente emulsificante fue WPIc, no pudieron diferenciarse partículas esféricas, sino un aglomerado de forma indefinida.

3.2. Viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis

Al igual que en los Capítulos 2 y 3, en esta oportunidad se analizó la viabilidad de ambas cepas, a lo largo de la síntesis de los encapsulados y durante el almacenamiento a tres temperaturas diferentes: - 18, 4 y 21 $^{\circ}\text{C}$.

El recuento inicial de las cepas INL1 y L73a liofilizadas en inulina fue de $9,68 \pm 0,14$ Log UFC/g y $10,07 \pm 0,10$ (Figuras 24 y 25), respectivamente. Al suspender las cepas en al AC y generar las emulsiones, los recuentos bacterianos disminuyeron aproximadamente en 2 Log UFC/g, por el efecto de dilución que sufrieron los liofilizados en el volumen final de emulsión. Sin embargo los sistemas en los cuales se utilizó WPIc como agente emulsionante, presentaron descensos en 3,84 Log UFC/g para la cepa INL1 y 2,96 Log UFC/g para el L73a; de ese modo, los recuentos se presentaron en 1,84 y 0,96 Log UFC/g por debajo del resto de los sistemas, que contenían las cepas INL1 y L73a, respectivamente. Estos resultados, sugieren que esta etapa

afectó negativamente la viabilidad bacteriana, siendo la cepa INL1 más sensible que la L73a. Por otro lado, dado que las condiciones de homogenización, la fase oleosa, la fase acuosa y las cepas eran factores constantes en el resto de los sistemas, y la única diferencia fue el agente emulsionante, podría pensarse que el WP1c no logró mantener la integridad de las gotas de aceite, haciendo que en sus sistemas la protección no fuera la deseada.

Los encapsulados obtenidos mediante el secado spray de las emulsiones, presentaron un nivel de células viables de 6,3 Log UFC/g aproximadamente, descenso que podría atribuirse al proceso de secado por spray. También, considerando que los encapsulados sintetizados en el Capítulo 2 mantenían la viabilidad bacteriana casi intacta antes y luego del secado spray, existe la posibilidad de que el AC, fase en la cual se suspendieron los liofilizados bacterianos, contenga algún compuesto antibacteriano.

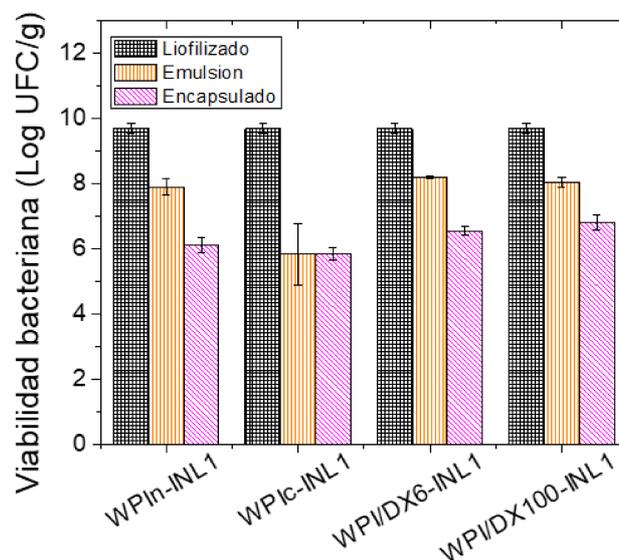


Figura 28. Recuentos (Log UFC/g) de los sistemas empleados para la síntesis de los encapsulados conteniendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1.

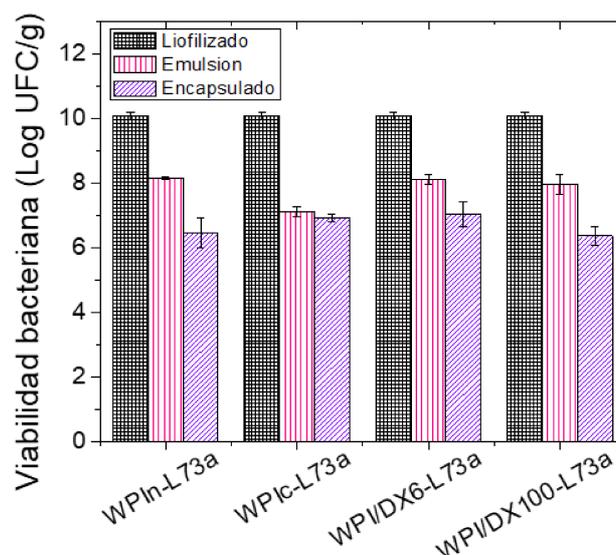


Figura 29. Recuentos (Log UFC/g) de los sistemas empleados para la síntesis de los encapsulados conteniendo *Lactobacillus rhamnosus* 73a.

3.3. Viabilidad celular durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

A los encapsulados obtenidos, se les determinó la viabilidad bacteriana al almacenarlos al resguardo de la luz, fraccionados al vacío y mantenidos a tres temperaturas diferentes. Los recuentos bacterianos se realizaron al cabo de 1, 2, 3 y 4 semanas; a los 2 y 4 meses, y los resultados se presentan para ambas cepas en la Figura 26, a -18 , 4 y 21 °C.

Los recuentos de los sistemas de WPIIn, tanto para la cepa INL1 como L73a, no se muestran debido a que a las 3 semanas la viabilidad decayó a menos de 2 órdenes logarítmicos.

Si se observa de manera global podemos concluir que la cepa L73a fue la que conservó la mayor viabilidad en las tres temperaturas. La pérdida de viabilidad celular fue inversamente proporcional a la temperatura de conservación.

Si prestamos atención a las gráficas cuya temperatura de almacenamiento fue de -18 °C, los sistemas cuyas células viables descendieron en menor medida fueron WPIC-INL1 y WPI/DX100, con $-1,94$ Log UFC/g y $-0,92$ Log UFC/g. En cuanto a 4 °C, los sistemas WPI/DX 6 y WPI/DX100 fueron los más resistentes, presentando descensos totales de $-1,87$ Log UFC/g y $-0,71$ Log UFC/g, respectivamente. En cuanto a los 21 °C, los sistemas WPI/DX6 y WPI/DX100 fueron los de menores descensos, el primero descendió en $2,05$ Log UFC/g y el segundo en $1,32$. Como puede notarse, a 4 y 21 °C, los sistemas con agentes emulsionantes conjugados, dieron lugar a los sistemas de mayor viabilidad a lo largo de los 4 meses. Sin embargo, a todas las temperaturas ensayadas los recuentos a tiempo final varían desde los 5 a 2 órdenes logarítmicos, recuentos celulares muy bajos para que los sistemas fueran considerados potenciales ingredientes funcionales.

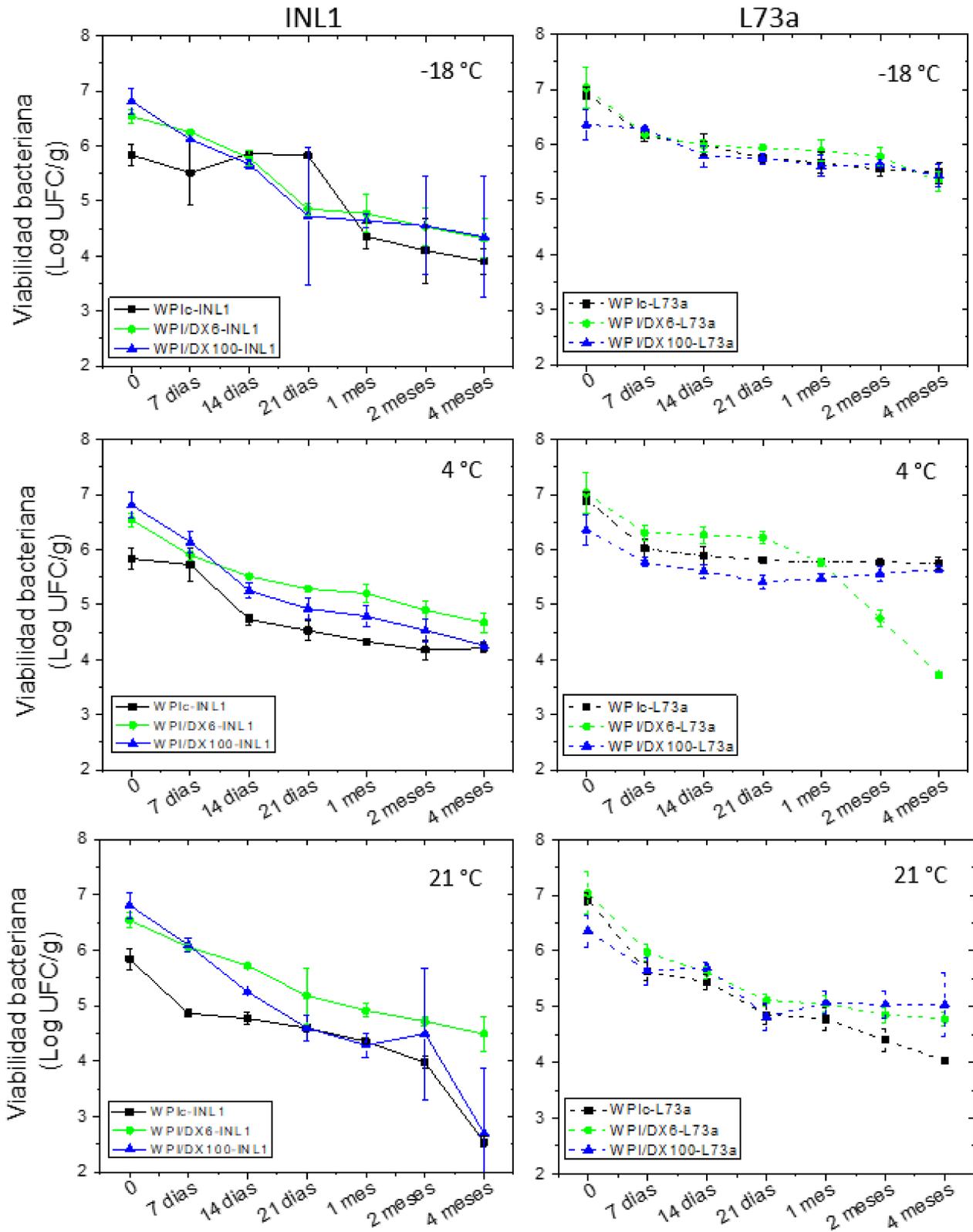


Figura 30. Recuentos (Log UFC/g) para la cepa INL1 (Primer columna) y L73a (Segunda columna) para los sistemas almacenados a -18, 4 y 21 °C.

Para este caso, también se decidió no realizar los ensayos de digestión gastrointestinal in vitro debido a los bajos valores de recuentos bacterianos determinados luego del secado spray.

3.4. Capacidad antibacteriana del aceite de canola

3.4.1. Ensayo en medio agar

La Figura 27 corresponde a fotografías de las placas del ensayo de capacidad antibacteriana de aceite en medio agarizado con filtros. El control + (C+; solución de Gentamicina) presentó un halo de inhibición para cada cepa, siendo la L73a más susceptible a la Gentamicina, ya que el diámetro de su halo fue de 2,1 cm mientras que el de la cepa INL1 fue de 1,6cm.

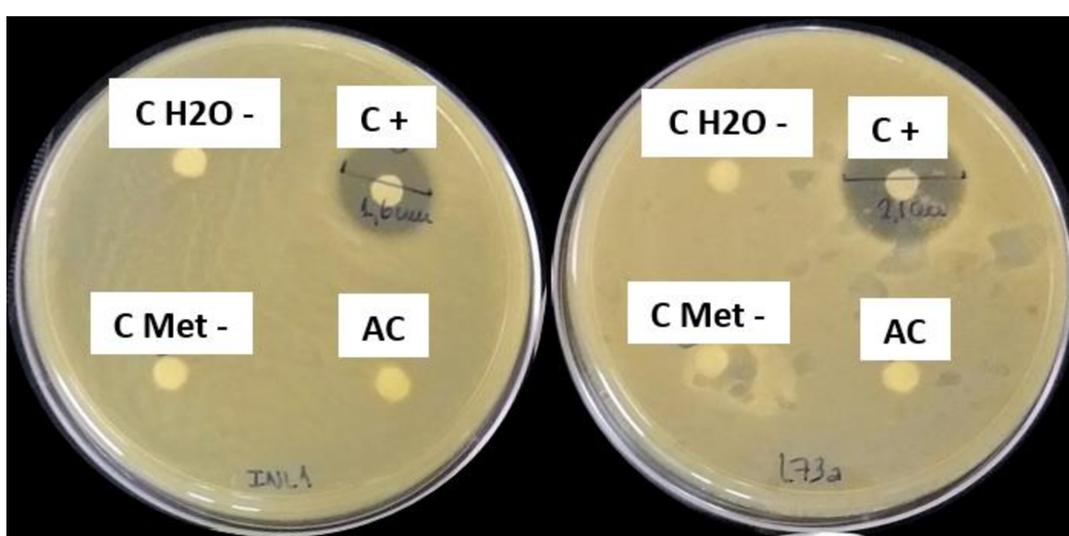


Figura 31. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite de canola para las cepas INL1 (Primer columna) y L73a (Segunda columna).

Los controles negativos, tanto de agua estéril (C H₂O -) como metanol (C Met -), no presentaron halos de inhibición. El uso de metanol, permitió determinar que si se hubiera visto halo de inhibición en el filtro embebido con AC, el efecto se debería al aceite y no al metanol utilizado en su dilución. Como se puede observar en la imagen el AC no mostró halo de inhibición, por lo que se podría suponer que el AC no fuera capaz de difundir en el medio agarizado.

Dang Xuan y col. [159] quienes ensayaron la misma técnica con cepas patógenas, de *E. coli* y *S. aureus*, frente a 14 aceites diferentes, entre ellos AC, a diferencia de nuestro ensayo, ellos si obtuvieron halos de inhibición en todas las condiciones ensayadas.

Con respecto al ensayo modificado, donde los filtros se reemplazaron por pocillos en el agar, los resultados observados en las placas tampoco fueron satisfactorios debido a que el AC diluido en metanol tampoco pudo difundir en el agar. Motivo por el cual se buscó una técnica en caldo cuyos resultados se muestran a continuación.

3.4.2. Ensayo en medio líquido

Este ensayo requirió un ensayo previo donde se verificó si el etanol (Et) afectaba o no la viabilidad de las cepas libres en estudio. El ensayo concluyó que el Et. afecta la viabilidad de ambas cepas, incluso a bajas concentraciones de aproximadamente 0,05 y 0,1%, reduciendo los recuentos de células viables en casi 7,5 órdenes logarítmicos. Según lo valores de DS calculados para la viabilidad celular, no podemos afirmar que alguna de las cepas sea más perjudicada que otra.

En la Figura 28, se presentan los resultados obtenidos con respecto al ensayo de caldo en medio líquido.

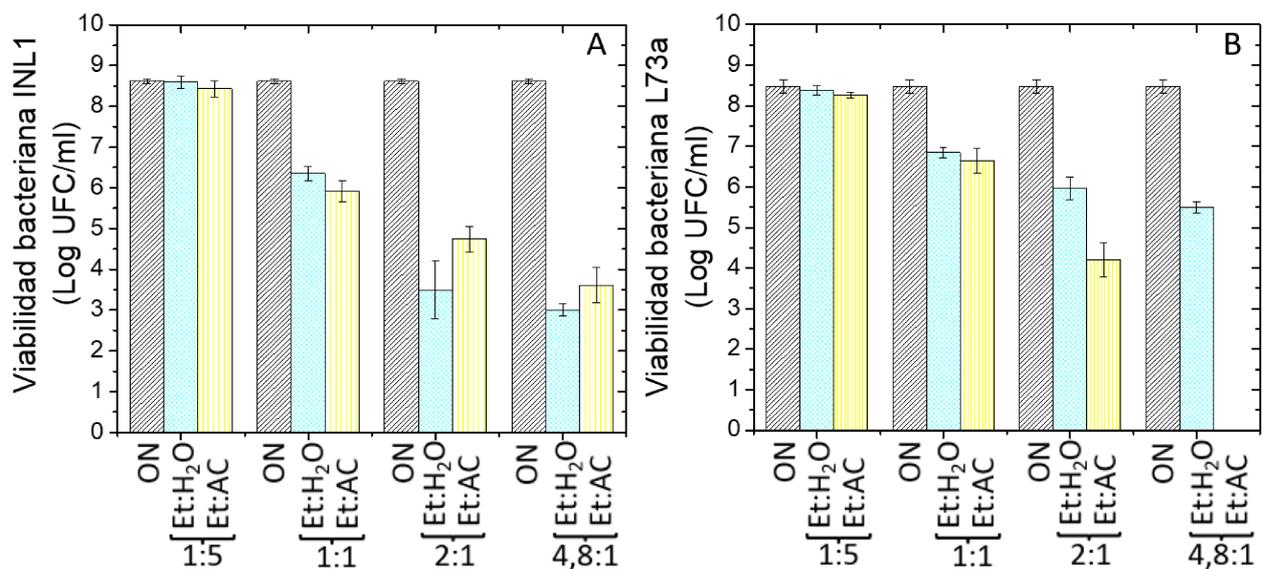


Figura 32. Susceptibilidad frente a Aceite de Canola (AC) y Etanol (Et.) de las cepas INL1 (A) y L73a (B).

Ambas cepas son susceptibles tanto al Et. como al AC (Figura 28). En cuanto a la cepa INL1 (Figura 28.A) comparando con el recuento de un cultivo ON, en las relaciones 1:5 como 1:1 se observaron disminuciones en los recuentos tanto para Et, como para la solución que contiene Et:AC. A partir de la relación Et:AC de 2:1 podría decirse que el Et. afectó más a la cepa INL1 que su combinación con AC.

La cepa L73a, fue menos susceptible al Et. que a la INL1, ya que al observar sus valores promedios de recuentos bacterianos y compararlos con los de Et:H₂O para la INL1, presentan mayores valores.

Según los gráficos de barras, ambas cepas presentan susceptibilidad frente al AC, sin embargo sería necesaria una profundización del estudio para entender mejor el fenómeno.

Estos resultados, sugieren que el AC podría tener cierta actividad antibacteriana, a pesar ser un aceite refinado, al cual luego de la neutralización química le remueven compuestos de capacidad antibacteriana. Esta conclusión, podría sostenerse según lo reportado por Ghazani &

Marangoni [165], quienes han reportado en AC comercial la identificación de un compuesto fenólico, el dímero 4-vinilsiringol, que tienen actividad antibacteriana comprobada junto con el ácido sinápico y sinapina.

4. CONCLUSIONES PRELIMINARES

Con respecto a la estabilidad de las emulsiones, resultó ser el conjugado WPI/DX100 el mejor agente emulsionante debido a que sus sistemas no presentaron IC y sus IAE fueron los mayores, indicando que sus emulsiones son las más estables y las de menor tamaño de gota, a pesar de que según las fotografías de las emulsiones todas las gotas de AC se consideren poblaciones polidispersas.

Los sistemas emulsionados con WPI_n, WPI/DX 6 y WPI/DX100 que fueron secados por spray mantuvieron los recuentos de células viables de las cepas en estudio durante el proceso de síntesis, no así los sistemas cuyo agente emulsionante fue WPI_c, lo cual sugiere que podría no ser un compuesto que mantenga la integridad de la emulsión frente al secado por spray. A lo largo del almacenamiento, la viabilidad bacteriana a temperatura ambiente (21 °C) no logró equiparar las viabilidades observadas a - 18 y 4 °C, las cuales son temperaturas alcanzadas mediante refrigeración, lo cual hubiese sido una potencial ventaja.

Con respecto a las fotografías tomadas por SEM el sistema WPI_c no presentó cápsulas similares a las que presentaron el resto de los sistemas, lo cual también podría soportar la idea de que el compuesto no mantiene la integridad de la emulsión al ser secada por spray y dicho proceso afectó más la viabilidad de las cepas que en los otros sistemas. Sin embargo, el sistema WPI_c-INL1 presentó la mayor EE cercana al 75%, indicando que a pesar de no haber formado polvo con morfología de microcápsulas, dieron lugar a sistemas de gran contenido de AC.

CONCLUSIONES GENERALES

Se pudo sintetizar PRM con WPI y DX de distintos PM, los cuales fueron caracterizados y se evidenció mediante distintas técnicas que a menor PM del DX conjugado, mayor es el grado de avance de la reacción de Maillard.

Además, se pudo determinar que a mayor PM del polisacárido, mayor resultó la hidrofobicidad superficial, lo cual se pudo relacionar luego con una mejor capacidad emulsionante. También se mostró que los conjugado WPI/DX presentan mejores capacidades antioxidantes frente al radical sintético ABTS^{•+} que el WPI de partida.

Los encapsulados cuyo material de pared fueron los PRM, si bien no lograron mejorar la estabilidad celular a lo largo de un año de almacenamiento a 25 °C en comparación con la temperatura refrigerada, mostraron una mejor resistencia a la digestión simulada in vitro con respecto al sistema WPIc. Los polvos presentaron morfologías acorde a la bibliografía existente pero los valores de porcentaje de humedad y a_w resultaron ser elevados para obtener polvos de mejores características en cuanto a la estabilidad probiótica.

Las millesferas gelificadas iónicamente, resultaron ser estructuras con buena eficiencia de encapsulación de AC, y al liofilizarse, presentaron buen tamaño como para ser consideradas un ingrediente funcional a incorporar en snacks como por ejemplo barras de cereales. Sin embargo, la viabilidad celular probiótica a las pocas semanas de ser conservadas, incluso bajo refrigeración, nos indicó que no resultaron ser buenas candidatas para desarrollar un IF.

Por último, los microencapsulados obtenidos por emulsificación y posterior secado spray, fueron morfológicamente lo esperado acorde al método de obtención. Los valores de índice de cremado, índice de actividad emulsionante y eficiencia de encapsulación de aceite no pudieron correlacionarse directamente con el PM del DX conjugado en los PRM. Como tampoco pudo mejorarse la viabilidad celular a 21 °C con respecto a la que presentaron los sistemas refrigerados. En esta ocasión, si bien los ensayos de viabilidad celular a lo largo del almacenamiento no fueron satisfactorios acorde a lo necesario para formular un IF, la cepa L73a mostró mayor viabilidad celular bajo las condiciones ensayadas.

De los resultados obtenidos de los dos últimos sistemas, se decidió analizar la capacidad antibacteriana del AC, descubriendo luego de tres ensayos diferentes, que el AC utilizado presenta cierta capacidad antibacteriana frente a las cepas INL1 y L73a.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Durán and A. Valenzuela B, "The japanese experience with FOSHU foods THE TRUE FUNCTIONAL FOODS ?," *Rev Chil Nutr*, vol. 37, no. 2, pp. 224–233, 2010.
- [2] C. P. Champagne *et al.*, "Impact of a yogurt matrix and cell microencapsulation on the survival of *Lactobacillus reuteri* in three in vitro gastric digestion procedures," *Benef. Microbes*, vol. 6, no. 5, pp. 753–763, 2015.
- [3] K. Kailasapathy, "Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 39, no. 10, pp. 1221–1227, 2006.
- [4] D. Eratte, S. McKnight, T. R. Gengenbach, K. Dowling, C. J. Barrow, and B. P. Adhikari, "Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates," *J. Funct. Foods*, vol. 19, pp. 882–892, 2015.
- [5] L. F. Ballesteros, M. J. Ramirez, C. E. Orrego, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials," *Food Chem.*, vol. 237, pp. 623–631, 2017.
- [6] O. de las N. U. para la A. y la Alimentación, "Desarrollo de la acuicultura 1. Procedimientos idóneos para la fabricación de alimentos para la acuicultura.,", 2003, pp. 1–50.
- [7] J. L. Figueroa Velasco, E. E. Chi Moreno, M. Cervantes Ramirez, and I. A. Dominguez Vara, "Functional foods for weanling pigs," *Vet Mex*, vol. 37, no. 1, pp. 117–136, 2006.
- [8] Joint FAO and WHO Working Group, "Guidelines for the evaluation of probiotics in food," 2002, pp. 1–11.
- [9] M. Saarela, G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö, and T. Mattila-Sandholm, "Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties," *J. Biotechnol.*, vol. 84, no. 3, pp. 197–215, 2000.
- [10] Y. A. Rodríguez R., A. F. Rojas G., and S. Rodríguez B., "Encapsulación De Probióticos Para Aplicaciones Alimenticias," *Biosalud*, vol. 15, no. 2, pp. 106–115, 2016.
- [11] R. Lessen and K. Kavanagh, "Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Promoting and Supporting Breastfeeding POSITION STATEMENT," *J. Acad. Nutr. Diet.*, vol. 115, pp. 444–449, 2015.
- [12] C. R. Martin, P. Ling, and G. L. Blackburn, "Review of Infant Feeding : Key Features of Breast Milk and Infant Formula," *Nutrients*, vol. 8, no. 279, pp. 1–11, 2016.
- [13] T. Gura, "Nature's first functional food," *Science (80-.)*, vol. 345, no. 6198, pp. 747–749, 2014.
- [14] W. Allan Walker, "Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis," *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 63, no. SUPPL.2, pp. 8–15, 2013.
- [15] P. V. Jeurink *et al.*, "Human milk: A source of more life than we imagine," *Benef. Microbes*, vol. 4, no. 1, pp. 17–30, 2013.
- [16] S. Moossavi, K. Miliku, S. Sepehri, E. Khafipour, and M. B. Azad, "The prebiotic and probiotic properties of human milk: Implications for infant immune development and pediatric asthma," *Front. Pediatr.*, vol. 6, no. July, pp. 1–7, 2018.
- [17] F. Savino, S. Benetti, S. A. Liguori, M. Sorrenti, and L. Cordero Di Montezemolo, "Advances on human milk hormones and protection against obesity," *Cell. Mol. Biol.*, vol. 59, no. 1, pp. 89–98, 2013.
- [18] M. P. Heikkila, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk," no. Huovinen 2001, pp. 471–478, 2003.
- [19] R. Martin *et al.*, "HUMAN MILK IS A SOURCE OF LACTIC ACID BACTERIA FOR," *J. Pediatr.*, pp. 754–758, 2003.
- [20] R. Martín, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez, "Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk," *J. Hum. Lact.*, vol. 21, no. 1, pp. 8–

- 17, 2005.
- [21] G. Vinderola, M. F. Zacarías, W. Bockelmann, H. Neve, J. Reinheimer, and K. J. Heller, "Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices," *Food Microbiol.*, vol. 30, no. 1, pp. 274–280, 2012.
- [22] M. F. Zacarías, A. Binetti, M. Laco, J. Reinheimer, and G. Vinderola, "Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products," *Int. Dairy J.*, pp. 548–555, 2011.
- [23] R. P. Ross, C. Desmond, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton, "Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods," pp. 1410–1417, 2005.
- [24] A. Lourens-Hattingh and B. C. Viljoen, "Yogurt as probiotic carrier food," vol. 11, pp. 1–17, 2001.
- [25] C. Maldonado Galdeano, A. De Moreno De Leblanc, G. Vinderola, M. E. Bibas Bonet, and G. Perdigón, "Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 14, no. 5, pp. 485–492, 2007.
- [26] C. G. Vinderola, M. Medici, and G. Perdigón, "Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 96, no. 2, pp. 230–243, 2004.
- [27] M. F. Zacarías, J. Reinheimer, L. Forzani, C. Grangette, and G. Vinderola, "Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice," *Benef. Microbes*, vol. 5, no. 4, pp. 427–436, 2014.
- [28] P. Burns *et al.*, "Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice," *Sci. Rep.*, vol. 7, pp. 1–10, 2017.
- [29] P. A. Loyeau *et al.*, "Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials," *Food Hydrocoll.*, vol. 85, no. June, pp. 129–135, 2018.
- [30] C. M. Slover, "Lactobacillus: a Review," *Clin. Microbiol. Newsl.*, vol. 30, no. 4, pp. 23–27, 2008.
- [31] E. Salvetti, H. M. B. Harris, G. E. Felis, and P. W. O'Toole, "Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 17, pp. 1–15, 2018.
- [32] M. E. Sanders, A. Benson, S. Lebeer, D. J. Merenstein, and T. R. Klaenhammer, "Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 49, no. Figure 1, pp. 207–216, 2018.
- [33] M. E. Segers and S. Lebeer, "Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. Suppl 1, pp. 1–16, 2014.
- [34] H. Szajewska, M. Kołodziej, D. Gieruszczak-Białek, A. Skórka, M. Ruszczyński, and R. Shamir, "Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children – a 2019 update," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 11, pp. 1376–1384, 2019.
- [35] L. Valík, A. Medved'ová, and D. Liptáková, "Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures," *J. Food Nutr. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 60–67, 2008.
- [36] S. B. Doherty, V. L. Gee, R. P. Ross, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and A. Brodkorb, "Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 6, pp. 1604–1617, 2011.
- [37] L. Liu *et al.*, "Effect of microencapsulation with Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival of *Lactobacillus rhamnosus*," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 37–43, 2016.
- [38] T. J. Wooster and M. A. Augustin, "Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface," *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 7, pp. 1072–1080, 2007.
- [39] A. K. Anal and H. Singh, "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 5, pp. 240–251,

- 2007.
- [40] S. A. Hogan, B. F. Mc Namee, E. D. O’Riordan, and M. O’Sullivan, “Microencapsulating Properties of Whey Protein Concentrate 75,” *J. Food Sci.*, vol. 66, no. 5, pp. 675–680, 2001.
- [41] M. A. Augustin, L. Sanguansri, and O. Bode, “Maillard Reaction Products as Encapsulants for Fish Oil Powders,” *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 2, pp. E25–E32, 2006.
- [42] A. Matalanis, O. G. Jones, and D. J. McClements, “Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 8, pp. 1865–1880, 2011.
- [43] J. Yáñez Fernández, J. . Salazar Montoya, J. Chaires Martínez, J. Jiménez Hernández, M. Márquez Robles, and E. . Ramos Ramírez, “Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación,” pp. 24–30, 2005.
- [44] E. K. Bae and S. J. Lee, “Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin,” *J. Microencapsul.*, vol. 25, no. 8, pp. 549–560, 2008.
- [45] A. Galetto and O. de la C. L. Argentina, “Diagnóstico competitivo del sector lácteo argentino.” p. 68, 2018.
- [46] K. O. Choi, J. Ryu, H. S. Kwak, and S. Ko, “Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with Maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 19, no. 4, pp. 957–965, 2010.
- [47] S. L. Young, X. Sarda, and M. Rosenberg, “Microencapsulating Properties of Whey Proteins. 1. Microencapsulation of Anhydrous Milk Fat,” *J. Dairy Sci.*, vol. 76, no. 10, pp. 2868–2877, 1993.
- [48] U. Einhorn-Stoll, M. Ulbrich, S. Sever, and H. Kunzek, “Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating,” *Food Hydrocoll.*, vol. 19, no. 2, pp. 329–340, 2005.
- [49] M. Akhtar and E. Dickinson, “Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic,” *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 4, pp. 607–616, 2007.
- [50] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, and R. Saurel, “Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview,” *Food Res. Int.*, vol. 40, no. 9, pp. 1107–1121, 2007.
- [51] R. Páez *et al.*, “Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli,” *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 66, no. 2, pp. 155–161, 2013.
- [52] L. Lavari, R. Páez, A. Cuatrin, J. Reinheimer, and G. Vinderola, “Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli,” *J. Dairy Res.*, vol. 81, no. 3, pp. 267–274, 2014.
- [53] S. G. Anema, *The whey proteins in milk : thermal interactions and effects on the functional properties of milk.* 2008.
- [54] P. Cayot and D. Lorient, “Structure-function relationships of whey proteins,” *Food Proteins their Appl.*, no. October, pp. 225–256, 2017.
- [55] C. V Morr and E. Y. W. Ha, “Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 33, no. 6, pp. 431–76, 1993.
- [56] S. A. Poeker *et al.*, “Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS),” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [57] G. R. Gibson *et al.*, “Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 8, pp. 491–502, 2017.
- [58] H. J. Flint, K. P. Scott, S. H. Duncan, P. Louis, and E. Forano, “Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute,” *Gut Microbes*, no. August, pp. 289–306, 2012.
- [59] J. E. Zimeri and J. L. Kokini, “The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin,” vol. 48, pp. 1998–2003, 2002.
- [60] M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. Van Der Voort, and W. L. J. Hinrichs, “Inulin , a flexible oligosaccharide I : Review of its physicochemical characteristics,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 130, pp. 405–419, 2015.
- [61] G. T. Macfarlane, H. Steed, and S. Macfarlane, “Bacterial metabolism and health-related

- effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics,” vol. 104, pp. 305–344, 2008.
- [62] H. K. Can, B. K. Denizli, A. Güner, and Z. M. O. Rzaev, “Effect of functional crosslinking agents on preparation and swelling properties of dextran hydrogels,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 59, no. 1, pp. 51–56, 2005.
- [63] D. Zhu, S. Damodaran, and J. A. Lucey, “Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 16, pp. 7113–7118, 2008.
- [64] R. Bilginya, F. Khan, and S. Mann, “Spontaneous patterning and nanoparticle encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 3, pp. 352–356, 2010.
- [65] F. Freitas, V. D. Alves, and M. A. M. Reis, “Advances in bacterial exopolysaccharides : from production to biotechnological applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 8, pp. 388–398, 2011.
- [66] M. M. Kool, H. Gruppen, G. Sworn, and H. A. Schols, “Comparison of xanthans by the relative abundance of its six constituent repeating units,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 914–921, 2013.
- [67] S. Rosalam and R. England, “Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp .,” vol. 39, pp. 197–207, 2006.
- [68] N. Boonlao, S. Shrestha, M. Bilal, and A. Kumar, “Influence of whey protein-xanthan gum stabilized emulsion on stability and in vitro digestibility of encapsulated astaxanthin,” *J. Food Eng.*, vol. 272, no. October 2019, p. 109859, 2020.
- [69] A. Benichou, A. Aserin, and N. Garti, “W / O / W double emulsions stabilized with WPI – polysaccharide complexes,” vol. 294, no. January 2006, pp. 20–32, 2007.
- [70] V. Somoza, “The Maillard Reaction in Food and Medicine,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, pp. 381–382, 2007.
- [71] J. A. O’Mahony, K. P. Drapala, E. M. Mulcahy, and D. M. Mulvihill, “Whey Protein–Carbohydrate Conjugates,” in *Whey Proteins*, Elsevier Inc., 2018, pp. 249–280.
- [72] S. I. F. S. Martins, W. M. F. Jongen, and M. A. J. S. Van Boekel, “A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling,” vol. 11, pp. 364–373, 2001.
- [73] M. Hattori, K. I. Numamoto, K. Kobayashi, and K. Takahashi, “Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 6, pp. 2050–2056, 2000.
- [74] G. Liu and Q. Zhong, “High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 44, 2015.
- [75] S. H. Jung, S. J. Choi, H. J. Kim, and W. T. Moon, “Molecular Characteristics of Bovine Serum Albumin-Dextran Conjugates,” vol. 70, no. 9, pp. 2064–2070, 2006.
- [76] Q. Liu, B. Kong, J. Han, C. Sun, and P. Li, “Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions,” *Food Struct.*, vol. 1, no. 2, pp. 145–154, 2014.
- [77] S. E. Fayle, J. P. Healy, P. A. Brown, E. A. Reid, J. A. Gerrard, and J. M. Ames, “Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins,” vol. 22, pp. 1518–1525, 2001.
- [78] O. R. Fennema and S. R. Tannenbaum, *Química de los alimentos*. 2006.
- [79] A. Kato, “Maillard-type protein-polysaccharide conjugates,” *Dev. Food Sci.*, vol. 41, no. C, pp. 385–395, 2002.
- [80] C. M. Oliver, L. D. Melton, and R. A. Stanley, “Creating proteins with novel functionality via the maillard reaction: A review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, no. 4, pp. 337–350, 2006.
- [81] S. Nakamura *et al.*, “Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides,” *Food Chem.*, vol. 109, no. 3, pp. 538–545, 2008.
- [82] F. Gu, J. M. Kim, K. Hayat, S. Xia, B. Feng, and X. Zhang, “Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system,” *Food Chem.*, vol. 117, no. 1, pp. 48–54, 2009.
- [83] R. Crittenden, L. Sanguansri, and M. A. Augustin, “Probiotic Storage and Delivery,” 2005.
- [84] R. Crittenden, R. Weerakkody, L. Sanguansri, and M. A. Augustin, “Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal

- Transit," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 2280–2282, 2006.
- [85] A. M. Bakry *et al.*, "Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, no. 1, pp. 143–182, 2016.
- [86] M. Shima, Y. Morita, M. Yamashita, and S. Adachi, "Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion," *Food Hydrocoll.*, vol. 20, no. 8, pp. 1164–1169, 2006.
- [87] M. Shima, T. Matsuo, M. Yamashita, and S. Adachi, "Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion," *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 2, pp. 281–285, 2009.
- [88] D. J. Pimentel-González, R. G. Campos-Montiel, C. Lobato-Calleros, R. Pedroza-Islas, and E. J. Vernon-Carter, "Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions," *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 2, pp. 292–297, 2009.
- [89] Y. Zhang, J. Lin, and Q. Zhong, "S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514," *Food Hydrocoll.*, vol. 52, pp. 804–810, 2016.
- [90] C. Loganés, S. Ballali, and C. Minto, "Main Properties of Canola Oil Components: A Descriptive Review of Current Knowledge," *Open Agric. J.*, vol. 10, no. Suppl 1: M5, pp. 69–74, 2016.
- [91] M. Ghazani and A. Marangoni, "Minor Components in Canola Oil and Effects of Refining on These Constituents : A Review," *J. Am. oil Chem. Soc.*, 2013.
- [92] S. P. Ahirrao, P. S. Gide, B. Shrivastav, and P. Sharma, "Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels," *J. Pharm. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [93] E. Morales, M. Rubilar, C. Burgos-Díaz, F. Acevedo, M. Penning, and C. Shene, "Alginate/Shellac beads developed by external gelation as a highly efficient model system for oil encapsulation with intestinal delivery," *Food Hydrocoll.*, vol. 70, pp. 321–328, 2017.
- [94] J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, and K. Matyjaszewski, "The development of microgels / nanogels for drug delivery applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, pp. 448–477, 2008.
- [95] A. Tasch Holkem *et al.*, "Technology Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsion / internal gelation followed by freeze drying," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 302–308, 2016.
- [96] L. I. Hinstroza-Córdoba and A. López-Malo, "Técnicas encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros," *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 2*, pp. 28–35, 2008.
- [97] J. A. Piornos, C. Burgos-Díaz, E. Morales, M. Rubilar, and F. Acevedo, "Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation," *Food Hydrocoll.*, vol. 63, pp. 139–148, 2017.
- [98] W. Qi, X. Liang, T. Yun, and W. Guo, "Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 3, pp. 1398–1404, 2019.
- [99] M. J. Spotti, M. J. Perduca, A. Piagentini, L. G. Santiago, A. C. Rubiolo, and C. R. Carrara, "Gel mechanical properties of milk whey protein e dextran conjugates obtained by Maillard reaction," *Food Hydrocoll.*, vol. 31, no. 1, pp. 26–32, 2013.
- [100] S. P. Chawla, R. Chander, and A. Sharma, "Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins," *Food Chem.*, vol. 116, no. 1, pp. 122–128, 2009.
- [101] Q. Wang and B. Ismail, "Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality , solubility , thermal stability and molecular con fi guration of whey proteinv," *Int. Dairy J.*, vol. 25, no. 2, pp. 112–122, 2012.
- [102] E. H. Ajandouz, L. S. Tchiakpe, F. Dalle Ore, A. Benajiba, and A. Puigserver, "Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems," *J. Food Sci.*, vol. 66, no. 7, pp. 926–931, 2001.
- [103] W. Lertittikul, S. Benjakul, and M. Tanaka, "Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH," *Food Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 669–677, 2007.

- [104] L. Jiménez-Castaño, R. López-Fandiño, A. Olano, and M. Villamiel, "Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability," *Food Chem.*, vol. 93, no. 4, pp. 689–695, 2005.
- [105] B. Miralles, A. Martínez-Rodríguez, A. Santiago, J. van de Lagemaat, and A. Heras, "The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan," *Food Chem.*, vol. 100, no. 3, pp. 1071–1075, 2007.
- [106] J. Leclère and I. Birlouez-Aragon, "The Fluorescence of Advanced Maillard Products Is a Good Indicator of Lysine Damage during the Maillard Reaction," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 4682–4687, 2001.
- [107] S. B. Matiacevich and M. P. Buera, "Food Chemistry A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction," vol. 95, pp. 423–430, 2006.
- [108] J. Angel Rufian-Henares, E. Guerra-Hernández, and B. García-Villanova, "Maillard reaction in enteral formula processing: Furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence," *Food Res. Int.*, vol. 35, no. 6, pp. 527–533, 2002.
- [109] K. Broersen, M. Elshof, J. De Groot, A. G. J. Voragen, R. J. Hamer, and H. H. J. De Jongh, "Aggregation of β -lactoglobulin regulated by glycosylation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 6, pp. 2431–2437, 2007.
- [110] J. R. Albani, "Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies," *Food Saf. Qual. Syst. Dev. Countries, Vol. 2*, 2004.
- [111] C. Bhattacharjee and K. P. Das, "Thermal unfolding and refolding of β -lactoglobulin An intrinsic and extrinsic fluorescence study," vol. 3964, no. January, pp. 3957–3964, 2000.
- [112] M. S. Vigo, L. S. Malec, R. G. Gomez, and R. A. Llosa, "Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products," *Food Chem.*, vol. 44, no. 5, pp. 363–365, 1992.
- [113] Y. Sun, S. Hayakawa, S. Puangmanee, and K. Izumori, "Chemical properties and antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction," *Food Chem.*, vol. 95, no. 3, pp. 509–517, 2006.
- [114] W. W. Sun *et al.*, "Study on the rheological properties of heat-induced whey protein isolate-dextran conjugate gel," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 10, pp. 3259–3263, 2011.
- [115] G. L. Ellman, "Tissue Sulfhydryl Groups," *Am. J. Anal. Chem.*, pp. 70–77, 1959.
- [116] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner, "[8] Reassessment of Ellman's Reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 91, no. 1979, pp. 181991–181991, 1983.
- [117] S. Hayakawa and S. Nakai, "Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins," *J. Food Sci.*, vol. 50, no. 2, pp. 486–491, 1985.
- [118] J. R. Sarkis, I. Michel, I. C. Tessaro, and L. D. F. Marczak, "Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 122, pp. 506–514, 2014.
- [119] M. L. Boiero *et al.*, "Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk," *J. Dairy Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 5328–5336, 2014.
- [120] Z. Chen, R. Bertin, and G. Froidi, "EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs," *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 414–420, 2013.
- [121] Y. Sun, S. Hayakawa, and K. Izumori, "Modification of Ovalbumin with a Rare Ketohexose through the Maillard Reaction: Effect on Protein Structure and Gel Properties," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1293–1299, 2004.
- [122] R. Sato, S. Katayama, T. Sawabe, and H. Saeki, "Stability and emulsion-forming ability of water-soluble fish myofibrillar protein prepared by conjugation with alginate oligosaccharide," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 15, pp. 4376–4381, 2003.
- [123] L. Jiménez-Castaño, M. Villamiel, and R. López-Fandiño, "Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass," *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 3, pp. 433–443, 2007.
- [124] L. M. Rich and E. A. Foegeding, "Effects of Sugars on Whey Protein Isolate Gelation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 5046–5052, 2000.
- [125] Z. Z. Xu, G. Q. Huang, T. C. Xu, L. N. Liu, and J. X. Xiao, "Comparative study on the Maillard reaction of chitosan oligosaccharide and glucose with soybean protein isolate," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 131, pp. 601–607, 2019.
- [126] K. Broersen, A. G. J. Voragen, R. J. Hamer, and H. H. J. De Jongh, "Glycoforms of B -

- Lactoglobulin With Improved Thermostability and Preserved Structural Packing," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 86, pp. 78–87, 2004.
- [127] S. B. Matiacevich, P. R. Santagapita, and M. P. Buera, "Fluorescence from the Maillard Reaction and its Potential Applications in Food Science," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 45, pp. 483–495, 2005.
- [128] M. J. Spotti, P. A. Loyeau, A. Marangón, H. Noir, A. C. Rubiolo, and C. R. Carrara, "Influence of Maillard reaction extent on acid induced gels of whey proteins and dextrans," *Food Hydrocoll.*, vol. 91, pp. 224–231, 2019.
- [129] J. Feng *et al.*, "Fabrication and Characterization of Stable Soy β - Conglycinin -," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, pp. 6075–6083, 2015.
- [130] Y. Joubran, A. Moscovici, R. Portmann, and U. Lesmes, "Implications of the Maillard reaction on bovine alpha-lactalbumin and its proteolysis during in vitro infant digestion," 2017.
- [131] V. Mishra, C. Shah, N. Mokashe, R. Chavan, H. Yadav, and J. Prajapati, "Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review," 2015.
- [132] C. Jia, D. Cao, S. Ji, W. Lin, and X. Zhang, "Whey protein isolate conjugated with xylo-oligosaccharides via maillard reaction : Characterization , antioxidant capacity , and application for lycopene microencapsulation," *LWT - Food Sci. Technol.*, no. November, p. 108837, 2019.
- [133] D. Ying, J. Sun, L. Sanguansri, R. Weerakkody, and M. A. Augustin, "Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose," *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 3, pp. 597–602, 2012.
- [134] J. Charve and G. A. Reineccius, "Encapsulation Performance of Proteins and Traditional Materials for Spray Dried Flavors," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 2486–2492, 2009.
- [135] A. Mortazavian, S. H. Razavi, M. R. Ehsani, and S. Sohrabvandi, "Archive of SID Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms," vol. 5, no. 1, pp. 1–18, 2007.
- [136] M. H. A. El-salam and S. El-shibiny, "Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics : a review," pp. 393–412, 2015.
- [137] Q. Shen, N. Shang, and P. Li, "In vitro and in vivo antioxidant activity of bifidobacterium animalis 01 isolated from centenarians," *Curr. Microbiol.*, vol. 62, no. 4, pp. 1097–1103, 2011.
- [138] V. S. T. Saito *et al.*, "Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt," *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 2, 2014.
- [139] G. E. Gardiner *et al.*, "Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 6, pp. 2605–2612, 2000.
- [140] S. Passot, S. Cenard, I. Douania, I. C. Tréleá, and F. Fonseca, "Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria," vol. 132, pp. 1699–1705, 2012.
- [141] C. Saéñz, S. Tapia, J. Chávez, and P. Robert, "Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*)," *Food Chem.*, vol. 114, no. 2, pp. 616–622, 2009.
- [142] A. M. Slavutsky, M. C. Chávez, C. S. Favaro-trindade, and M. A. Bertuzzi, "Encapsulation of *Lactobacillus Acidophilus* in a Pilot-Plant Spray-Dryer. Effect of Process Parameters on Cell Viability," *J. Food Process Eng.*, vol. 40, no. 2, pp. 1–9, 2016.
- [143] S. Khem, D. M. Small, and B. K. May, "The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*," *Food Chem.*, vol. 190, pp. 717–723, 2016.
- [144] Y. Ramakrishnan, N. M. Adzahan, Y. A. Yusof, and K. Muhammad, "Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation," *Powder Technol.*, vol. 328, pp. 406–414, 2018.
- [145] R. Xu, N. Shang, and P. Li, "In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH," *Anaerobe*, vol. 17, no. 5, pp. 226–231, 2011.
- [146] O. I. Aruoma, "[5] Deoxyribose Assay for Detecting Hydroxyl Radicals," *Methods Enzymol.*, vol. 233, no. 1983, pp. 57–66, 1994.
- [147] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL," *Free Radic. Biol.*

- Med.*, vol. 26, no. 98, pp. 1231–1237, 1999.
- [148] G. Broeckx, D. Vandenheuvel, I. J. J. Claes, S. Lebeer, and F. Kiekens, “Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics,” *Int. J. Pharm.*, vol. 505, no. 1–2, pp. 303–318, 2016.
- [149] L. Beaulieu, L. Savoie, P. Paquin, and M. Subirade, “Elaboration and Characterization of Whey Protein Beads by an Emulsification / Cold Gelation Process : Application for the Protection of Retinol,” pp. 239–248, 2002.
- [150] W. K. Ding and N. P. Shah, “Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria,” *J. Food Sci.*, vol. 74, no. 2, pp. M100–M107, 2009.
- [151] M. R. A. Ferreira, R. R. Santiago, T. P. De Souza, E. S. T. Egito, E. E. Oliveira, and L. A. L. Soares, “Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 3, pp. 1383–1390, 2010.
- [152] H. C. F. Carneiro, R. V. Tonon, C. R. F. Grosso, and M. D. Hubinger, “Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials,” *J. Food Eng.*, vol. 115, no. 4, pp. 443–451, 2013.
- [153] U. Klinkesorn, P. Sophanodora, P. Chinachoti, E. A. Decker, and D. J. McClements, “Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition,” *Food Res. Int.*, vol. 39, no. 4, pp. 449–457, 2006.
- [154] J. O’Regan and D. M. Mulvihill, “Sodium caseinate – maltodextrin conjugate stabilized double emulsions : Encapsulation and stability,” *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 224–231, 2010.
- [155] P. Burns *et al.*, “Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 132–141, 2010.
- [156] P. Burns, G. Vinderola, A. Binetti, A. Quiberoni, C. G. de los Reyes-Gavilán, and J. Reinheimer, “Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli,” *Int. Dairy J.*, vol. 18, no. 4, pp. 377–385, 2008.
- [157] K. N. Pearce and J. E. Kinsella, “Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 26, no. 3, pp. 716–723, 1978.
- [158] D. R. Cameron, M. E. Weber, R. J. Neufeld, D. G. Cooper, D. R. Cameron, and E. S. Idziak, “Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: Correction of the formula for emulsifying activity index,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 39, no. 4, pp. 655–659, 1991.
- [159] T. D. Xuan, G. Gangqiang, T. N. Minh, T. N. Quy, and T. D. Khanh, “An Overview of Chemical Profiles , Antioxidant and Antimicrobial Activities of Commercial Vegetable Edible Oils Marketed in Japan,” 2018.
- [160] R. G. Bachir and M. Benali, “Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, no. 9, pp. 739–742, 2012.
- [161] J. B. Zhang, N. N. Wu, X. Q. Yang, X. T. He, and L. J. Wang, “Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis,” *Food Hydrocoll.*, vol. 28, no. 2, pp. 301–312, 2012.
- [162] M. Akhtar and E. Dickinson, “Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 31, no. 1–4, pp. 125–132, 2003.
- [163] M. I. M. J. Barbosa, C. D. Borsarelli, and A. Z. Mercadante, “Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations,” *Food Res. Int.*, vol. 38, no. 8–9, pp. 989–994, 2005.
- [164] S. M. Jafari, E. Assadpoor, Y. He, and B. Bhandari, “Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying,” *Dry. Technol.*, vol. 26, no. 7, pp. 816–835, 2008.
- [165] S. M. Ghazani and A. G. Marangoni, “Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: A review,” *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 90, no. 7, pp. 923–932, 2013.