



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral
para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química
En el campo de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**"Estudio de las características fisicoquímicas, reológicas y
microencapsulantes de Goma Brea. Evaluación de distintos
tratamientos para mejorar sus propiedades"**

MSc. María Virginia Castel

Director: **Dr. Carlos R. Carrara**

Codirector: **Dra. Amelia C. Rubiolo**

Miembros del Jurado:

Dra. Cristina Ferrero

Dra. Laura B. Iturriaga

Dr. Luis M. Gugliotta

RESUMEN

El término "hidrocoloides" se refiere a un grupo de polisacáridos y proteínas que son ampliamente utilizados en distintos sectores industriales. El principal interés en el uso de estos se fundamenta en varias características que presentan como en la capacidad de modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos, estabilizar interfases (aire-agua o aceite-agua) y reducir la tensión interfacial entre ambas. Una aplicación importante de los hidrocoloides es la capacidad emulsionante asociada a la microencapsulación de aromas y sabores. La goma Arábica (GA) se encuentra entre los agentes microencapsulantes más usados y conocidos, junto con los almidones modificados o hidrolizados. La GA lidera actualmente el mercado mundial de este tipo de gomas. Sin embargo, su escasez periódica, inseguridad en el suministro y altos costos, impulsan la búsqueda de otras fuentes botánicas de goma capaces de remplazarla.

La goma Brea (GB) es un exudado de la especie arbórea *Cercidium praecox*. Está compuesta principalmente por polisacáridos con un porcentaje importante de proteínas, siendo muy similar a la GA en composición y propiedades funcionales.

En este contexto, el objetivo de la presente tesis doctoral fue estudiar desde el punto de vista básico y aplicado las características fisicoquímicas, reológicas y funcionales de la GB, así como también el efecto de distintos tratamientos sobre sus propiedades emulsionantes y encapsulantes.

En primer lugar, se determinó la composición centesimal de la GB. Se observó que el componente mayoritario son los polisacáridos (82,60% p/p) y que el

contenido de proteína es relativamente alto (7,52% p/p) comparado con el de la GA. Por otro lado, se estudió la distribución de masas molares de los componentes de la GB por medio de fraccionamientos cromatográficos y electroforéticos. Se determinaron tres fracciones principales: un polisacárido de $2,79 \times 10^3$ que fue mayoritario, un complejo de proteína-polisacárido de aproximadamente $1,92 \times 10^5$ y una última fracción compuesta por proteínas de 6 a 66 kDa.

En segundo lugar, se evaluaron las propiedades reológicas de la GB en solución acuosa. El comportamiento se pudo modelar con una ecuación que representó un comportamiento pseudoplástico a bajas velocidades de deformación y un comportamiento de fluido Newtoniano a mayores velocidades de deformación.

Se evaluó también la capacidad emulsionante de la GB analizando el efecto de la concentración de goma y la naturaleza de la fase dispersa. Se observó que utilizando soluciones de GB más concentradas (10 y 20% p/p) en la preparación de las emulsiones, se obtenían gotas de menor tamaño y se aumentaba la estabilidad de la emulsión. Por otra parte, se evaluaron dos fases dispersas, aceite de maíz y limoneno. Se observó que GB produce emulsiones de menor tamaño de gota y mayor estabilidad con aceite de maíz que con limoneno como fase dispersa.

La propiedad encapsulante de la GB, se evaluó produciendo microcápsulas de aceite de maíz y de limoneno por el método de secado por aspersion de las emulsiones. A mayores concentraciones de GB, las microcápsulas resultaron más eficientes en la encapsulación de aceite de maíz y en la retención y protección del limoneno.

Finalmente, se evaluaron métodos físicos para la modificación de la goma GB en vista de mejorar sus propiedades emulsionantes y encapsulantes. El tratamiento

de ultrasonido disminuyó la masa molar de los componentes de la GB resultando en una disminución de su capacidad emulsionante. Sin embargo, el tratamiento térmico resultó en un aumento de las masas molares de la GB, y de los complejos proteínas-polisacáridos que tienen gran actividad en las interfaces aceite-agua, y de esta forma se logró mejorar notablemente las propiedades de emulsionantes y encapsulantes de la GB, alcanzando, y superando en algunos casos, a la GA.

ABSTRACT

The term "hydrocolloids" refers to a group of polysaccharides and proteins widely used in several industries. The main interest in use hydrocolloids is based on several features such as the ability to modify the rheological properties of aqueous systems, to stabilize interfaces (air-water or oil-water) and to reduce the interfacial tension between them. An important application of hydrocolloids associated with the emulsifying capacity is the microencapsulation of flavors. The gum Arabic (GA) is one of the most used microencapsulating agents, along with modified or hydrolyzed starches, and it is currently leading the world market of this type of gums. However, periodic shortages, insecurity of supply and high costs of GA leads to search other botanical sources of gum able to replace it.

Brea gum (GB) is an exudate from *Cercidium praecox* tree. It is composed mainly of polysaccharides with an important percentage of protein, and is very similar to GA in composition and functional properties.

In this context, the aim of this thesis was to study, from the basic and applied point of view, the physicochemical, rheological and functional characteristics of GB, as well as the effect of different treatments on its emulsifying and encapsulating properties.

First, the percentage composition of the GB was determined and it was observed that the major component are polysaccharides (82.60% w/w) and the protein content is relatively high (7.52% w/w) compared to GA. Furthermore, the molar mass distribution of GB components was studied by chromatographic and electrophoretic fractionations. Three main fractions were determined, a

polysaccharide of 2.79×10^3 , a polysaccharide-protein complex of approximately 1.92×10^5 and a final protein fraction comprising proteins from 6 to 66 kDa.

Secondly, GB rheological properties were evaluated. The rheological behavior of the GB aqueous solutions was adjusted with an equation representing shear thinning at low strain rates and Newtonian fluid behavior at higher strain rates.

Emulsifying capacity of GB was also evaluated by analyzing the effect of gum concentration and nature of the dispersed phase. It was observed that using GB more concentrated solutions to prepare the emulsion (10 to 20% w/w), smaller droplets were obtained and the stability of the emulsion was increased. Moreover, two dispersed phases were used, corn oil and limonene. It was shown that GB produced emulsions with smaller droplets and relatively greater stability with corn oil as dispersed phase than using limonene.

GB encapsulation efficiency was evaluated by producing microcapsules of corn oil and limonene by spray drying the emulsions. At higher GB concentrations, the corn oil microcapsules were more efficient and the retention and protection of limonene was higher.

Finally, physical methods to modify GB were evaluated to improve the emulsifying and encapsulating properties. Ultrasound treatment decreases the molar mass of GB components resulting in a decrease of their emulsifying capacity. However, the heat treatment resulted in an increase of GB molar mass and the protein-polysaccharides complex, with high activity in the oil-water interfaces, and thus this treatment improved considerably the emulsifying and encapsulating properties of GB, reaching and sometimes exceeding, the GA properties.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Carlos Carrara, y a mi codirectora, Dra. Amelia Rubiolo, por la confianza que me brindaron, por el tiempo dedicado y por la orientación académica y personal.

A mi hermano Víctor, por su amor, paciencia y ayuda constante en lo profesional y personal.

A mi madre y mis tíos Juana Ida, Sara y Joel, por el amor que me brindan siempre y por ser el soporte incondicional en todos los momentos de mi vida.

A mis amigos Gisela, Ailiñ, Beatriz, Carolina, Silvana, Diana, Nicolás, Augusto, Mariela, Sabrina, Marianela, Patricia, Silvina, Eduardo, Ehira, Gabriela, May, Natham, Josimar, Taiana y Andrielli por compartir momentos de alegría y ayudarme en diferentes momentos durante estos años.

A mis compañeros del laboratorio: Silvana Fioramonti, Julia Spotti, Paula Loyeau, Juan Pablo Cecchini, Osvaldo Sponton, Adrián Pérez, Liliana Santiago, Oscar Andrich y Elena Aringoli, que en diferentes maneras contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Federico Harte, la Dra. Svetlana Zivanovic y al Dr. Juan Jurat-Fuentes por guiarme en parte del desarrollo de esta tesis.

A Fernanda Marino, Andrea Piagentini y Fabio Fontanarrosa por la colaboración técnica.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) y la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), por otorgarme las becas de postgrado para realizar el doctorado.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ASPECTOS GENERALES	1
1.2.	GENERALIDADES DE LA GOMA BREA Y LA GOMA ARÁBIGA	2
1.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA GOMA ARÁBIGA	4
1.4.	VALOR NUTRICIONAL DE LAS GOMAS.....	9
1.5.	CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE ARBÓREA <i>CERCIDIUM PRAECOX</i>	10
1.5.1.	<i>Secreción del exudado y extracción</i>	13
1.5.2.	<i>Purificación del exudado</i>	17
1.6.	ASPECTOS BROMATOLÓGICOS Y REGULATORIOS	18
1.7.	ASPECTOS COMERCIALES Y ECONÓMICOS.....	20
1.8.	ASPECTOS TECNOLÓGICOS.....	25
1.8.1.	<i>Solubilidad</i>	25
1.8.2.	<i>Propiedades reológicas asociadas a los hidrocoloides</i>	26
1.8.3.	<i>Capacidad emulsionante</i>	32
1.9.	APLICACIONES DE LAS GOMAS	34
1.9.1.	<i>Microencapsulación</i>	39
1.10.	MODIFICACIÓN DE GOMAS	44
2.	OBJETIVOS	47
2.1.	OBJETIVO GENERAL	48
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1.	MATERIALES.....	50
3.2.	MÉTODOS.....	50
3.2.1.	<i>Purificación de la Goma Brea</i>	50
3.2.2.	<i>Composición centesimal</i>	50
3.2.3.	<i>Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales</i>	51
3.2.4.	<i>Determinación de la actividad antioxidante in vitro</i>	51
3.2.5.	<i>Fraccionamiento de la Goma brea</i>	52
3.2.5.1.	Fraccionamiento mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (FPLC-HIC)	52
3.2.5.2.	Cromatografía de filtración en gel (GPC)	53
3.2.5.3.	Fraccionamiento mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (FPLC-SEC).....	53
3.2.5.4.	Determinación del contenido de proteínas en las fracciones	54
3.2.6.	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	54
3.2.7.	<i>Caracterización reológica de las soluciones de Goma brea</i>	55
3.2.8.	<i>Determinación de la capacidad emulsionante de la Goma brea</i>	56
3.2.8.1.	Preparación de las emulsiones	56
3.2.8.2.	Determinación del tamaño de gota	57
3.2.8.3.	Medición del potencial Zeta	57
3.2.8.4.	Microscopía óptica	58
3.2.8.3.	Estabilidad de las emulsiones	58
3.2.9.	<i>Determinación de las propiedades reológicas de las emulsiones</i>	61
3.2.10.	<i>Obtención de microcápsulas por secado por aspersión</i>	61
3.2.10.1.	Morfología de las microcápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	62

3.2.10.2. Determinación del contenido de humedad y la actividad de agua	63
3.2.10.3. Análisis de color	63
3.2.10.4. Determinación de aceite libre	64
3.2.10.5. Determinación de aceite total	65
3.2.10.6. Eficiencia de encapsulación	65
3.2.10.7. Estabilidad de las microcápsulas	65
3.2.11. Modificaciones de la goma brea	67
3.2.11.1. Modificación de la goma brea por tratamiento de ultrasonido	67
3.2.11.2. Modificación de la goma brea por tratamiento térmico	67
3.2.11.3. Cromatografía de filtración en gel (GPC)	67
3.2.11.4. Determinación de reactivo de Schiff y compuestos tempranos de la reacción de Maillard....	68
3.2.11.5. Intensidad del pardeamiento (Determinación de compuestos tardíos de la reacción de Maillard).	68
3.2.12. Análisis estadístico	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y REOLÓGICA DE LA GOMA BREA	71
1.1. Composición química de la goma Brea	72
1.2. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (FPLC-HIC).....	74
1.3. Cromatografía de Filtración por Gel (GPC) de las fracciones obtenidas por HIC	76
1.4. Fraccionamiento mediante Cromatografía líquida rápida de proteínas de exclusión molecular (FPLC-SEC)	80
1.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	81
1.6. Propiedades reológicas de la GB	83
1.6.1. Efecto de la concentración	84
1.6.2. Efecto de la temperatura.....	89
1.6.3. Efecto de iones mono y divalentes	91
1.6.4. Efecto del pH	94
1.6.5. Efecto del tratamiento térmico	96
1.6.6. Evaluación de la tixotropía	97
CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES DE LA GOMA BREA	100
II.1. EMULSIONES DE ACEITE DE MAÍZ	102
II.1.1. Distribución de tamaño de gota y potencial ζ de las emulsiones de aceite de maíz	102
II.1.2. Estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz.	111
II.1.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB.	116
II.2. EMULSIONES DE LIMONENO.....	118
II.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB	118
II.2.2. Estabilidad de las emulsiones de limoneno.....	123
II.2.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB.	127
CAPÍTULO III. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ENCAPSULANTES DE LA GOMA BREA	130
III.1. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE MAÍZ.....	132
III.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz	132
III.1.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de aceite de maíz.	135
III.1.3. Análisis de color de las microcápsulas de aceite de maíz.	137
III.1.4. Eficiencia de encapsulación (EE) de aceite de maíz	139
III.2. ENCAPSULACIÓN DE LIMONENO	142
III.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de limoneno.	142
III.2.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de limoneno.....	146
III.2.3. Análisis de color de las microcápsulas de limoneno.....	147
III.2.4. Estabilidad de limoneno encapsulado con GB.....	149
CAPÍTULO IV. EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA ESTRUCTURA, CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS, PROPIEDADES EMULSIONANTES Y ENCAPSULANTES DE LA GOMA BREA.....	154
IV.1. Modificación de la goma brea por tratamiento de ultrasonido	155

IV.1.1. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Filtración por Gel (GPC)	156
IV.1.2. Propiedades emulsionantes de la goma brea tratada con ultrasonido.....	160
IV. 1.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada con ultrasonido.	160
IV.2. Modificación de la goma brea por tratamiento térmico	161
IV.2.1. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Filtración por Gel (GPC).....	162
IV.2.2. Análisis de color de las GB tratadas térmicamente.	165
IV.2.3. Actividad antioxidante in vitro de las GB tratadas térmicamente.....	168
IV.2.4. Determinación de productos de Maillard en las GB tratadas térmicamente.	169
IV.2.5. Reología de las soluciones de la goma brea tratada térmicamente.	171
IV.2.6. Propiedades emulsionantes de la goma brea tratada térmicamente.	173
IV.2.6.1. EMULSIONES DE ACEITE DE MAIZ	173
IV.2.6.1.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.	173
IV.2.6.1.2. Estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.	178
IV.2.6.1.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.	182
IV.2.6.2. EMULSIONES DE LIMONENO	183
IV.2.6.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratadas térmicamente.	183
IV.2.6.2.2. Estabilidad de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.	187
IV.2.6.2.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.	190
IV.2.7. Propiedades encapsulantes de goma brea tratada térmicamente.	192
IV.2.7.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno.	193
IV.2.7.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno.	196
IV.2.7.3. Análisis de color de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno con GB tratada térmicamente.	198
IV.2.7.4. Eficiencia de encapsulación de aceite de maíz con GB tratada térmicamente.	200
IV.2.7.5. Estabilidad de limoneno encapsulado con GB tratada térmicamente.	202
5. CONCLUSIONES	206
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incisiones practicadas con sacabocados en la corteza de brea (izquierda) y con machete (derecha).....	3
Figura 2. Exudado solidificado en forma de lágrima. Lado externo (izquierda) y en contacto con la corteza (derecha).....	3
Figura 3. Estructura de la fracción AGP.....	7
Figura 4. Estructura del componente carbohidrato de la goma de <i>A. senegal</i> . A = Arabinosilo. Círculos rellenos = galactosa unida por enlace β 1-3; círculos abiertos = galactosa unida por la posición 6 (galactosa o ácido glucurónico enlazado o grupos terminales); R1 = ramnosa-ácido glucurónico; R2 = galactosa-3-arabinosa; R3 = arabinosa-3arabinosa-3arabinosa.....	8
Figura 5. Ejemplar del árbol Brea.....	11
Figura 6. Hojas (izquierda), flores (centro) y fructificación (derecha) de brea	12
Figura 7. Marcado del tronco de brea.....	15
Figura 8. Cosecha de GB realizada por la comunidad Wichí.....	16
Figura 9. Goma Arábica en una rama de <i>A.</i> (arriba) y tras ser recogida (abajo).....	17
Figura 10. Esquema de la dispersión, solubilización y textura de hidrocoloides.....	26
Figura 11. Perfil viscosidad-velocidad de deformación para una solución de polímero por encima de C^*	29
Figura 12. Gráfica de viscosidad en función de la concentración de GA.....	30
Figura 13. Esquematación de la estabilización de gotas de aceite por moléculas de GA....	34
Figura 14. Estructuras típicas de microcápsulas.....	42
Figura 15. Productos de oxidación del limoneno (I); 1,2 epoxi-limoneno (II); 8,9 epoxi-limoneno (III), 1,2-8,9 diepoxi-limoneno (IV); Carveol (V) y Carvona (VI) (Pena y col., 2012).	43
Figura 16. Principio de funcionamiento del Turbiscan.....	59
Figura 17. Coordenadas rectangulares L^* , a^* y b^* CIE Lab 1979 (imagen extraída y adaptada de internet: http://sobrecolor.es.blogspot.com.ar).....	64
Figura I.1. Perfil de FPLC – HIC de goma Brea (línea continua azul) y concentración de sulfato de amonio (línea discontinua roja).....	75

Figure I.2. Perfiles de GPC de las fracciones obtenidas mediante FPLC - HIC (A) fracción I y (B) fracción V monitoreadas por detector UV (línea continua roja) e índice de refracción (línea discontinua azul).....	77
Figure I.3. Perfiles de FPLC - SEC de goma Brea (línea continua roja) y goma Brea en presencia de agente reductor (línea punteada azul).....	81
Figura I.4. SDS-PAGE de (A) goma Brea y (B) fracciones de FPLC - SEC: línea 2 -pico 1; línea 3 – pico 2; línea 4 – pico 3; línea 5 – pico 4 y línea 6 – pico 5. PM: estándares de peso molecular.....	82
Figure I.5. Efecto de la concentración de GB sobre la viscosidad aparente de sus soluciones y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	84
Figure I.6. Efecto de la concentración de GA sobre la viscosidad aparente de sus soluciones y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	85
Figure I.7. Comparación de la viscosidad aparente de las soluciones de GA y de GB y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	85
Figure I.8. Estado de las moléculas de GA con y sin cizallamiento.....	87
Figure I.9. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	90
Figure I.10. Efecto del NaCl en la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	92
Figure I.11. Efecto del CaCl ₂ sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	92
Figure I.12. Efecto de la GDL sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	95
Figure I.13. Efecto de un tratamiento térmico (TT) sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	97
Figure I.14. Evaluación de la tixotropía de una solución de GB al 10% p/p.....	99
Figure II.1. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB a distintas concentraciones y GA al 20% p/p.....	103
Figure II.2. Micrografías de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de (A) 5%, (B) 10%, (C) 20% p/p de GB y (D) 20% p/p de GA inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barra de escala= 10 μm.....	105

Figura II.3. Energías aportadas por el equipo de ultrasonido durante el proceso de emulsificación.....	109
Figura II.4. Perfiles de <i>backscattering</i> (BS%) en función del tiempo (días) y de la altura del tubo de medición de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de (A) GB al 5% p/p, (B) GB al 10% p/p, (C) GB al 20% p/p y (C) GA al 20% p/p.....	113
Figura II.5. Emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de GB al 5% p/p (GB5), 10% p/p (GB10), 20% p/p (GB20) y solución de GA al 20% p/p (GA20) justo después de la preparación (Día 1) y luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C (Día 7).....	115
Figura II.6. Efecto de la concentración de goma en la viscosidad aparente de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).....	117
Figura II.7. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB a distintas concentraciones.....	119
Figura II.8. Micrografías de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de (A) 5%, (B) 10%, (C) 20% p/p de GB y (D) 20% p/p de GA inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barras de escalas de 10 μm	120
Figura II.9. Foto de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de GB al 5% (GB5), 10% (GB10) y 20% p/p (GB20) y GA al 20% p/p inmediatamente luego de ser preparadas y a los 7 días de almacenamiento a 25 °C.....	124
Figura II.10. Distribución de tamaño de gotas de la emulsión de limoneno estabilizadas con GB al 20% p/p luego de ser preparada (Día 1) y a los 7 días de almacenamiento (Día 7).....	125
Figura II.11. Efecto de la concentración de goma en la viscosidad aparente de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA.....	128
Figura III.1. Micrografías (SEM) de las microcápsulas (A) GB5%M-Ac al 3000X, (B) GB5%M-Ac al 10000X, (C) GB10%M-Ac al 3000X, (D) GB10%M-Ac al 10000X, (E) GB20%M-Ac al 3000X, (F) GB20%M-Ac al 10000X, (G) GA20%M-Ac al 3000X y (H) GA20%M-Ac al 10000X.....	134
Figura III.2. Fotografías de las microcápsulas en polvo de aceite de maíz.....	139

Figura III.3. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de limoneno en polvo preparadas con (A) GB5, (B) GB10, (C) GB20 y (D) GA10 a x3000, y (E) GB5, (F) GB10, (G) GB20 y (H) GA20 a x10000.....	143
Figura III.4. Micrografía (SEM) de microcápsulas de limoneno en polvo preparadas con GB20 magnificadas a x10000.....	145
Figura III.5. Micrografía confocal de fluorescencia de una microcápsula de GB20%M-Lim. Limoneno (verde) y GB (negro), tomada en un plano medio de la partícula.....	145
Figura III.6. Fotografías de las microcápsulas en polvo de limoneno.....	148
Figura III.7. Cromatograma (GC-MS) del limoneno y productos de oxidación.....	149
Figura III.8. Estabilidad de limoneno en las microcápsulas de GB5%M-Lim (●), GB10%M-Lim (■), GB20%M-Lim (▲) y GA20%M-Lim (●) en el tiempo de almacenamiento a 50 °C y (A) $a_w=0,112$, (B) $a_w=0,304$, (C) $a_w=0,488$ y (D) $a_w=0,749$	151
Figura III.9. Porcentajes de retención de limoneno de las microcápsulas de GB al inicio del periodo de almacenamiento a 50 °C y a los 100 días.....	153
Figura III.10. Efecto de "caking". Fotografía del polvo GA20%M-Lim a los 5 días de almacenamiento a 50 °C y $a_w= 0,749$	153
Figura IV.1. Perfiles cromatográficos monitoreados por UV (A) y IR (B) de GB tratadas por ultrasonido a 100% de amplitud 30 °C por 0 min (línea roja), 15 min (línea azul), 30 min (línea verde) y 60 min (línea negra).....	157
Figura IV.2. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas con ultrasonido.....	161
Figura IV.3. Perfiles cromatográficos monitoreados por UV a 280 nm (A) y IR (B) de GB tratadas térmicamente a 110 °C por 0 h (línea violeta), 24 h (línea rosada), 48 h (línea naranja) y 48 h (línea roja) y 96 h (línea bordo).....	164
Figura IV.4. Fotografía de muestras en polvo de GA, GB y las GBTT.....	166
Figura IV.5. Esquema de los pasos de la reacción de Maillard.....	167
Figura IV.6. Absorbancia a 284 nm de compuestos intermediarios tempranos de la reacción de Maillard (■), absorbancia a 304 nm de las bases de Schiff (■) y absorbancia a 420 nm de compuestos intermediarios tardíos de la reacción de Maillard (■).....	170
Figura IV.7. Comparación de la viscosidad aparente de las soluciones de GB y GBTT a (A) pH 4,4 y (B) pH7.....	171

Figura IV.8. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente.....	174
Figura IV.9. Micrografías de las emulsiones (A) GB24hE-Ac , (B) GB48hE-Ac, (C) GB72hE-Ac y (D) GB96hE-Ac inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barra de escala igual a 10 μm	177
Figura IV.10. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT a los 7 días de almacenamiento.....	179
Figura IV.11. Fotografía de las emulsiones GB24hE-Ac (GB24), GB48hE-Ac (GB48), GB72hE-Ac (GB72) y GB96hE-Ac (GB96) inmediatamente luego de ser preparadas (Día 1) y a los 7 días de preparadas (Día 7).....	180
Figura IV.12. Perfiles de <i>backscattering</i> (BS%) en función del tiempo y de la altura del tubo de medición de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de GB tratadas térmicamente a 110 °C por (A) 24h y (B) 48h.....	181
Figura IV.13. Viscosidad aparente de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente y ajuste al modelo de Sisko: Ecuación 2 (línea roja).....	182
Figura IV.14. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.....	184
Figura IV.15. Micrografías de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de GBTT. (A) GB24hE-Lim, (B) GB48hE-Lim, (C) GB72hE-Lim y (D) GB96hE-Lim inmediatamente luego de ser preparadas. Barra de escala igual a 10 μm	187
Figura IV.16. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB tratadas térmicamente a los 7 días de almacenamiento.....	188
Figura IV.17. Foto de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT luego de ser preparadas (Día 1) y a los 7 días de almacenamiento (Día 7).....	189
Figura IV.18. Viscosidad aparente de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB tratadas térmicamente y ajuste al modelo de Sisko: Ecuación 2 (línea roja).....	191
Figura IV.19. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz en polvo (A) GB24hM-Ac, (B) GB48hM-Ac, (C) GB72hM-Ac y (D) GB96M-Ac a x3000, y (E) GB24hM-Ac, (F) GB48hM-Ac, (G) GB72hM-Ac y (H) GB96hM-Ac a x10000.....	194
Figura IV.20. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de limoneno (A) GB24hM-Lim, (B) GB48hM-Lim, (C) GB72hM-Lim y (D) GB96hM-Lim a x3000, y (E) GB24hM-Lim, (F) GB48hM-Lim, (G) GB72hM-Lim y (H) GB96hM-Lim a x10000.....	195

Figura IV.21. Micrografía confocal de fluorescencia de una microcápsula de limoneno (azul) en polvo preparada con GB tratada térmicamente por 96h (negro), tomada en un plano medio de la partícula.....	196
Figura IV.22. Microcápsulas en polvo de (A) aceite y (B) limoneno preparadas con GBTT.....	198
Figura IV.23. Estabilidad de limoneno en el tiempo en las microcápsulas de GB10%M-Lim (◆), GB24hM-Lim (■), GB48hM-Lim (▲), GB72hM-Lim (◆) y GB96hM-Lim (►) en el tiempo de almacenamiento a 50 °C y (A) $a_w=0,112$, (B) $a_w=0,304$, (C) $a_w=0,488$ y (D) $a_w=0,749$	203
Figura IV.24. Porcentajes de retención de limoneno de las microcápsulas de GBTT al inicio del periodo de almacenamiento a 50 °C y a los 100 días.....	205

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición típica y de aminoácidos (residuos/1000 residuos) de goma <i>A. senegal</i> y <i>A. seyal</i> (Williams y Philips, 2000).....	6
Tabla I.1. Composición química de la goma Brea y la goma Arábiga (% b.h.).....	74
Tabla I.2. Contenido proteico de las fracciones obtenidas por FPLC - HIC	79
Tabla I.3. Efecto de la concentración de goma en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	89
Tabla I.4. Efecto de la temperatura en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) para soluciones de GB.....	91
Tabla I.5. Efecto de iones en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) para soluciones de GB.....	93
Tabla I.6. Efecto del pH y de un tratamiento térmico en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) de soluciones de GB.....	96
Tabla II.1. Tamaño de gotas de las emulsiones de aceite de maíz de GB y GA el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.....	104
Tabla II.2. pH y potencial zeta de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA.....	111
Tabla II.3. Parámetros de estabilidad medidos con el equipo Turbiscan MA de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA.....	114
Tabla II.4. Efecto de la concentración de GB en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de aceite de maíz a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	118
Tabla II.5. Tamaño de gotas de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.....	121
Tabla II.6. Medidas de pH y potencial zeta de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA.....	123

Tabla II.7. Efecto de la concentración de goma en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de limoneno a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$	129
Tabla III.1. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las microcápsulas de aceite de maíz.....	137
Tabla III.2. Coordenadas de color de las microcápsulas de aceite de maíz.....	138
Tabla III.3. Aceite libre, aceite total, aceite recuperado y eficiencia de encapsulación (EE) de la microencapsulación de aceite de maíz.....	140
Tabla III.4. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las microcápsulas de limoneno.....	147
Tabla III.5. Coordenadas de color de las microcápsulas de limoneno.....	148
Tabla VI.1. Coordenadas de color de las GB tratadas térmicamente.....	166
Tabla VI.2. Actividad antioxidante de GB, GBTT y GA medida por el método del radical DPPH.....	169
Tabla IV.3. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones a pH 4,4 de GBTT.....	172
Tabla IV.4. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones a pH 7 de GBTT.....	173
Tabla IV.5. Tamaño de gotas de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.....	175
Tabla IV.6. Potencial zeta de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT.....	178
Tabla IV.7. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT.....	183
Tabla IV.8. Parámetros de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT el día de preparación y a los 7 días de almacenado.....	185
Tabla IV.9. Potencial zeta de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.....	186

Tabla IV.10. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.....	192
Tabla IV.11. Contenido de humedad y a_w de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno preparadas con GBTT.....	197
Tabla VI.12. Coordenadas de color de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno con GBTT.....	200
Tabla IV.13. Aceite libre, aceite total, aceite recuperado y eficiencia de encapsulación (EE) de la microencapsulación de aceite de maíz con GB tratada térmicamente.....	201

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales

Los hidrocoloides son un grupo de sustancias macromoleculares (polisacáridos y proteínas) de origen vegetal, animal o microbiano, las cuales presentan gran interacción con el agua. Sus moléculas poseen elevadas proporciones de grupos hidrofílicos (neutros y/o cargados), lo que determina que al disolverse en agua se formen soluciones viscosas, pseudogeles o geles (Saha y Bhattacharya, 2010). Algunos hidrocoloides son nombrados como goma, que se define como: *una sustancia resinosa con un alto peso molecular, estructuralmente muy compleja, con características de elasticidad y adherencia*. Esta última denominación proviene de los primeros adhesivos que eran de origen natural.

Los hidrocoloides actualmente son ampliamente usados en una variedad de sectores industriales, desempeñando varias funciones, por ejemplo: espesantes y gelificantes de soluciones acuosas, estabilizantes de espumas, emulsiones y dispersiones, inhibidores de la formación de hielo y cristalización del azúcar, liberación controlada de sabores, etc. (Williams y Philips, 2000). Actualmente se utilizan hidrocoloides de diversos orígenes:

- Botánico: aquí se incluyen diversas fuentes como árboles (celulosa), exudados de árboles (goma Árábica y Tragacanto), plantas (pectinas, almidón), semillas (goma Guar) y tubérculos.
- De algas rojas (Agar, Carragenatos) y de algas marrones (Alginato).
- Microbiológico (goma Xántica, goma Gelana).
- Animal (Gelatina, proteínas de suero lácteo).

En las últimas décadas, ha aumentado la demanda de hidrocoloides en la industria alimenticia impulsada por los cambios en el estilo de vida moderno, el conocimiento de la

relación entre dieta y salud, las nuevas tecnologías de procesamiento que han llevado a un rápido incremento en el consumo de comidas de rápida preparación, alimentos novedosos y estandarizados, y el desarrollo de productos ricos en fibras y bajos en grasa. El principal interés en el uso de hidrocoloides en la industria de alimentos se debe a su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los solventes (agua), generar y estabilizar estructuras, modificar texturas, etc. (Bertuzzi y col., 2006; Yaseen y col., 2005). Por otra parte, también existe el creciente interés en los consumidores por productos con bajos niveles de aditivos sintéticos. Esto ha generado la búsqueda de nuevas fuentes de hidrocoloides naturales, biocompatibles y biodegradables, económicamente rentables y que cumplan con las características funcionales requeridas en diversas aplicaciones. En este contexto, la goma Brea aparece como un prometedor hidrocoloide para ser utilizado como aditivo alimentario.

1.2. Generalidades de la goma Brea y la goma Arábiga

La goma Arábiga (GA), es una exudación obtenida de los troncos y ramas de árboles de 5 o más años de edad de la especie arbórea *Acacia senegal*, aunque también se extrae de la *Acacia seyal* (FAO, 1999; Williams y Philips, 2000). La GA extraída de *A. senegal* también es nombrada como goma Hashab ó goma Kordofan, mientras que a la GA de *A. seyal* se la conoce como goma Talha. La goma Hashab es un sólido cuya coloración va del blanco pálido al naranja-marrón pálido, que se quiebra con una fractura vítrea, mientras que la goma Talha es más oscura y más disgregable (Williams y Philips, 2000; Yebeyen y col., 2009).

La goma Brea (GB), es un exudado que se obtiene de la especie arbórea *Parkinsonia praecox* (Bertuzzi y col., 2006; Calzon y col., 2007), denominada recientemente como *Cercidium praecox* (árbol) y *Cercidium australe* (arbusto) (The International Plant Names

Index). La composición y propiedades funcionales de la GB se ha visto que favorecen su uso como aditivo alimentario, presentando en dicho aspecto, similitudes con la GA pero en contraste con ésta la GB ha sido muy poco estudiada.

La GB recién segregada es de color amarillo dorado pálido, de consistencia semi-líquida y de sabor débilmente azucarado. A medida que se va solidificando en contacto con el aire, toma diversas coloraciones hasta llegar a un amarillo rojizo en el punto de mayor consistencia (Figura 1) (Alesso y col., 2003a). La goma exudada de la corteza del árbol se presenta bajo la forma de pequeñas gotas o lágrimas con impurezas como polvo, astillas, etc. (Figura 2) (Bertuzzi y col., 2006).



Figura 1. Incisiones practicadas con sacabocados en la corteza de brea (izquierda) y con machete (derecha).



Figura 2. Exudado solidificado en forma de lágrima. Lado externo (izquierda) y en contacto con la corteza (derecha).

Un conocimiento más detallado de la GB, con respecto a condiciones de acopio, características de calidad, propiedades funcionales y aplicaciones, aumentaría la rentabilidad de este recurso, y principalmente, permitiría reemplazar insumos importados como la GA tanto como aditivo de la industria alimenticia como en otras industrias (farmacéutica, de impresión, etc.) (Bertuzzi y col., 2006; Calzon y col., 2007; Kleiman, 2010).

1.3. Composición química y estructura molecular de la goma arábica

La composición química de la GA y su calidad varía ligeramente con el origen botánico, las condiciones agronómicas, el clima, la manipulación post-cosecha, etc. (Verdeken y col., 2003; Yebeyen y col., 2009; Williams y Philips, 2000).

La GA tanto de *A. senegal* como de *A. seyal* está formada por una mezcla muy compleja de polisacáridos, sales de Calcio, Potasio y Magnesio, y pequeñas cantidades de proteínas (alrededor de un 2%) (Idris y col., 1998; Li y col., 2009; Renard y col., 2006; Williams y Philips, 2000). Los polisacáridos de la GA tienen como componentes principales D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico y poseen un tamaño relativamente pequeño, con un peso molecular del orden de los 250 kDa (Calvo, 2011; Gracia, s.f.; Williams y Philips, 2000). El reconocimiento de diferencias en las especies, variedades y ambientes es importante para producir GA para usos específicos. Según Williams y Philips (2000) y Calvo (2011) tanto las variedades de goma Hashab (*A. Senegal*) como goma Talha (*A. seyal*) están compuestas de los mismos residuos de azúcar pero esta última tiene menor contenido de ramnosa y ácido glucurónico; y más alto contenido en arabinosa y ácido 4-O-metil glucurónico que la goma de *A. senegal*. La goma de *A. seyal* contiene una menor proporción de nitrógeno y la rotación específica es muy diferente. La

determinación de estos parámetros puede proveer un medio rápido de diferenciación entre las 2 especies, además de los métodos inmunológicos. La masa molecular promedio de la goma de *A. seyal* es mayor que la de *A. senegal*. Ambas especies no necesariamente son intercambiables tecnológicamente (Williams y Philips, 2000).

La fracción proteica de la GA, está constituida fundamentalmente por glicoproteínas con pesos moleculares superiores a los 2.000 kDa. Los restos glucídicos de las glicoproteínas son arabinogalactanos (Calvo, 2011). La composición de aminoácidos de las proteínas de ambas gomas son similares, con hidroxiprolina y serina en mayor proporción (Calvo, 2011; Williams y Philips, 2000) como se muestra en la Tabla 1.

Pueden diferenciarse tres principales constituyentes de la goma Arábica: los llamados Arabinogalactanos (AG), Arabinogalactanos-Proteína (AGP) y Glicoproteínas (GP) (Idris y col., 1998; Li y col., 2009; Renard y col., 2006). El principal componente de los tres es AG, el cual representa alrededor de un 90% en peso del total de la goma (Li y col., 2009; Williams y Philips, 2000). Las moléculas de esta fracción presentan una conformación de elipsoide delgado aplanado (Li y col., 2009). El componente AGP representa el 10% en peso del total de la goma, contiene 12% de proteína y se ha propuesto una estructura tipo retoño en flor (Figura 3), en la que los bloques de carbohidratos están unidos a una cadena polipeptídica común (Al-Assaf y col., 2005a; Li y col., 2009; Williams y Philips, 2000). La fracción AGP es la responsable de las propiedades emulsionantes y de adhesión de la goma Arábica (Al-Assaf y col., 2005a, b; Ikeda y col., 2005; Li y col., 2009). El carácter hidrofílico de los polisacáridos y el hidrofóbico de los aminoácidos contribuyen a la actividad interfacial de la goma. Las fracciones AG y AGP tienen peso molecular medio de 286.000 y 1.860.000 g/mol, respectivamente (Renard y col., 2006; Williams y Philips, 2000). Idris y col. (1998) y Al-Assaf y col. (2005a, b), informaron pesos moleculares del mismo orden para AG y AGP. Por último,

la fracción GP representa cerca del 1 o 2% del total de la goma y puede desempeñar cierto rol en las propiedades de emulsificación y estabilización (Al-Assaf y col., 2005a; Ikeda y col., 2005).

Tabla 1. Composición típica y de aminoácidos (residuos/1000 residuos) de goma *A. senegal* y *A. seyal* (Williams y Philips, 2000).

	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia seyal</i>
% galactosa	44	38
% arabinosa	27	46
% ramnosa	13	4
% ácido glucurónico	14,5	6,5
Ácido 4-O-metil glucurónico	1,5	5,5
% nitrógeno	0,36	0,15
Rotación específica/grados	-30	+51
Masa molecular promedio (Mw)	380.000	850.000
Hyp	256	240
Asp	91	65
Thr	72	62
Ser	144	170
Glu	36	38
Pro	64	73
Gly	53	51
Ala	28	38
Cys	3	
Val	35	42
Met	2	
Ile	11	16
Leu	70	85
Tyr	13	13
Phe	30	24
His	52	51
Lys	27	18
Arg	15	11

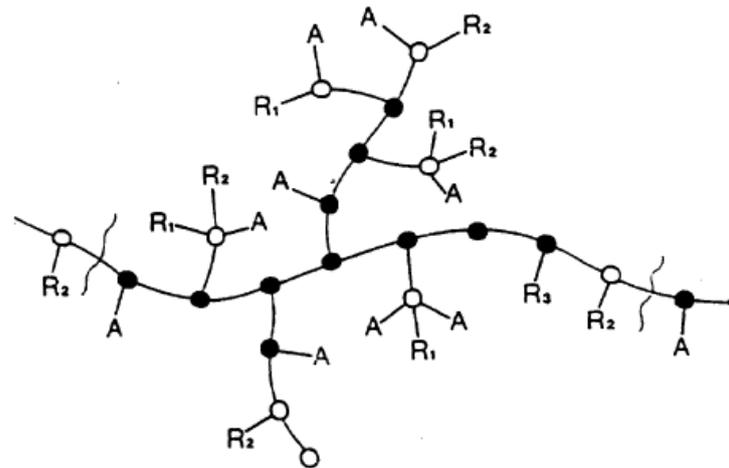


Figura 4. Estructura del componente carbohidrato de la goma de *A. senegal*. A = Arabinosilo. Círculos rellenos = galactosa unida por enlace β 1-3; círculos abiertos = galactosa unida por la posición 6 (galactosa o ácido glucurónico enlazado o grupos terminales); R1 = ramnosa-ácido glucurónico; R2 = galactosa-3-arabinosa; R3 = arabinosa-3-arabinosa-3-arabinosa.

En lo que respecta al número de cargas de las fracciones de la GA, según Renard y col. (2006), el 100% de las cargas en la fracción AG proviene de polisacáridos como el ácido glucurónico, mientras que las cargas provenientes de polisacáridos son del 91,3% y 37,9% para AGP y GP, respectivamente. Los restantes 8,7% y 62,1% de las cargas en estas fracciones provienen a las cadenas polipeptídicas.

La información científica de base sobre la GB es muy escasa. Está compuesta en un 75% de azúcares hidrolizables, no presenta almidón, dextrinas, ni taninos (Coirini y Zapata, 2010). De acuerdo a Cerezo y col. (1969) y De Pinto y col. (1993) que estudiaron la fracción de los carbohidratos, la definen principalmente como un polisacárido ácido formado por L-arabinosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil D-glucurónico. Estos residuos se presentan asociados a un pequeño porcentaje de proteínas (aproximadamente 8%), lo que puede indicar la presencia de complejos polisacárido – proteínas semejantes a los AGP de la GA (Bertuzzi y col., 2006; Majewska-Sawka y col., 2000), que son determinantes en la

funcionalidad de las gomas, principalmente en las propiedades emulsionantes y en sus aplicaciones. Estas macromoléculas están relacionadas directamente con los procesos de desarrollo y crecimiento de los vegetales y se las encuentra en la mayoría de los tejidos de las plantas superiores.

Según Cerezo y col. (1969), las principales características estructurales de la GB parece ser una columna vertebral de D-xilano (polisacárido de D-xilosa unido mediante enlaces β -(1-4) y posiblemente contenga algunos enlaces (1-2)), la cual está fuertemente sustituida en la posición 2 por cadenas ramificadas cortas que contienen residuos de D-xilosa, L-arabinosa y Acido D-glucurónico, en la que ambos residuos pueden ser terminales. Aproximadamente una tercera parte del ácido urónico está presente como el 4-metil éter.

1.4. Valor nutricional de las gomas

Muchos hidrocoloides como la goma Guar, la GA, la goma Xántica, las pectinas, etc., han mostrado reducir el nivel de colesterol sanguíneo. Otros hidrocoloides, como la inulina y la GA, han mostrado tener un efecto prebiótico. Estos hidrocoloides son resistentes a las enzimas del sistema digestivo, por lo que no son metabolizados. En cambio, son fermentados en el intestino para producir ácidos grasos de cadena corta y estimular el crecimiento específico de bacterias intestinales benéficas, principalmente, bifidobacterias y reducir el crecimiento de microorganismos patógenos tales como clostridios (Williams y Philips, 2000).

La GA presenta solamente 1,5 kcal/g como valor calórico y actúa como fibra soluble. Esta característica, la hace un ingrediente fisiológicamente beneficioso que contribuye a una alimentación equilibrada (Bénech, 2010).

1.5. Características de la especie arbórea *Cercidium praecox*

La especie forestal *Cercidium praecox* pertenece a la familia de las leguminosas, al igual que la especie *A. senegal* y la *A. seyal* de donde se obtiene la GA (von Müller y col., 2006b; Williams y Philips, 2000).

El árbol de brea, también llamada chañar brea o palo verde (Coirini y Zapata, 2010) posee una distribución geográfica natural que se extiende en regiones cálidas, áridas y semiáridas, del centro, oeste y noroeste de Argentina incluyendo las provincias de Chaco, Santiago del Estero, Salta, Catamarca, La Rioja, Córdoba, San Luis y San Juan. Forma parte de las grandes unidades de vegetación del Parque Chaqueño y fuera de Argentina se extiende por países vecinos como Bolivia, Sur de Perú, Paraguay, Venezuela, Sur de los Estados Unidos y México (Alesso y col., 2003b).

Esta especie crece muy bien en suelos pobres y desertificados, por lo que se puede encontrar también bajo la forma de rodales puros (breales) en ambientes degradados por ser una especie pionera que coloniza rápidamente dichos ambientes carentes de cobertura vegetal, como los típicos peladares, que son zonas en avanzado estado de degradación como consecuencia no sólo de la tala desmedida, sino también de cargas ganaderas excesivas (Alesso y col., 2003b; von Müller, 2006b). Estos peladares pueden volver a ser revegetados con la plantación de breas, lo que le da gran importancia ecológica a la especie en cuanto a la protección de los suelos, aporte de una cantidad importante de materia orgánica y nitrógeno a los mismos y demás beneficios ambientales que brindan los bosques (Calzon y col., 2007; Coirini y Zapata, 2010; Kleiman, 2010). Además de posibilitar la revegetación, la plantación de árboles de brea aportará la posibilidad de producción de goma de brea en un tiempo entre 10 y 20 años luego de su plantación (Calzon y col., 2007).

La especie *Parkinsonia* (Figura 5) tiene porte arbustivo o arbóreo, espinoso, de 3 a 9 m de altura (Alesso y col., 2003; Calzon y col., 2007). El árbol tiene un tronco de 10 a 30 cm de diámetro, corto, tortuoso, de corteza lisa, con actividad fotosintética y color verde claro lo que lo hace fácilmente reconocible. Las ramas también son tortuosas y de color verde. No es un árbol longevo, llega a la adultez rápidamente (3 a 5 años) y vive unos 20 a 30 años (Calzon y col., 2007).

Sus hojas (Figura 6) son pequeñas, compuestas, tempranamente caducaceas y brotan después de iniciada la floración la cual se da en forma muy abundante en los meses de septiembre y octubre. Sus flores son racimos amarillos (Figura 6) suavemente perfumadas y tienen valor melífero, ya que producen abundante polen y néctar siendo muy visitada por los diversos insectos productores de miel en el chaco salteño (Calzon y col., 2007).



Figura 5. Ejemplar del árbol Brea

El fruto (Figura 6) es una vaina o chaucha membranosa, elíptica, castaña, muy aplanada, que se abre a la madurez. Antes de madurar presenta una coloración rojiza y

contiene 1-6 semillas elípticas, aplastadas, color castaño verdoso. En el Chaco salteño, la fructificación se produce entre octubre y noviembre, pudiendo mantenerse los frutos en la planta hasta por un año.

La subespecie *praecox*, (Coirini y Zapata, 2010) posee mayor exigencia térmica e hídrica, se la encuentra en áreas con precipitaciones desde 300 mm hasta 850 mm anuales. Soporta temperaturas extremas, con máximas de 48°C y mínimas de -10°C. Se encuentra principalmente en áreas planas y en planicies suavemente onduladas con pendientes entre 2-3%, con suelos arenosos. La subespecie *glaucum* posee mayor capacidad de adaptación a climas áridos y más fríos. Se la encuentra en áreas con precipitaciones desde 100 mm hasta 300 mm anuales. Soporta altas temperaturas con máximas de 45°C a mínimas de -15°C. Se encuentra en laderas muy secas y soleadas y en piedemontes, observándose el mayor desarrollo en áreas de escurrimiento.



Figura 6. Hojas (izquierda), flores (centro) y fructificación (derecha) de brea.

1.5.1. Secreción del exudado y extracción

Estos árboles, tanto la brea como las Acacias, segregan la goma de su tronco y ramas mediante un proceso inducido llamado gomosis que se manifiesta bajo condiciones de estrés, como una reacción a la evaporación exagerada de la savia, una infección bacteriana o fúngica, una picadura de insecto o una herida o lesión mecánica (Calvo, 2011, Calzon y col., 2007; Coirini y Zapata, 2010; Garlo el al., s.f.; Williams y Philips, 2000). Por medio de esta segregación, se cicatrizan las lesiones y grietas que se producen en la corteza (Alesso y col., 2003; Calvo, 2011).

La gomosis es el resultado de la secreción de las células parenquimáticas asociadas a los vasos. Debido a las presiones hídricas internas, se vierte en la superficie del órgano a nivel de las heridas y allí se acumula. Es decir, que la goma producida puede considerarse como un producto de tipo cicatrizante ya que una vez exudada, tiende a solidificarse superficialmente en contacto con el aire formando una capa protectora (Garlo el al., s.f.; Losano y col., 2000).

Posiblemente, los precursores de dicha sustancia gomosa provengan del almidón, acumulado en el parénquima xilemático no asociado a los vasos, ya que este está presente en los leños sanos y desaparece en los leños heridos. La producción de goma posiblemente constituya un mecanismo adaptativo de plantas que colonizan hábitats degradados, como defensa contra la pérdida de agua (Losano y col., 2000).

La extracción para el aprovechamiento de la GB se basa en la realización de incisiones y en la cosecha de la goma antes que cicatrice la herida. De esta manera se obtiene periódicamente la goma vegetal (Alesso y col., 2003a).

Las lesiones se pueden practicar con sacabocado, hacha o machete, realizándose incisiones o cortes en forma de “V” y heridas horizontales (Figura 7), en un número de entre 6 y 10 cortes por árbol (Calzon y col., 2007); este procedimiento se denomina “marcado”. Las heridas en la brea deben ser superficiales, de 1 a 2 cm de profundidad. Luego se limpia el área alrededor de la misma para que el exudado sea de mejor calidad. Alesso y col., (2003) encontraron que la producción está directamente relacionada con la superficie de las heridas (practicadas con sacabocados), alcanzándose la máxima producción con heridas de 30 a 50 cm² de superficie. Por otro lado, Calzon y col., (2007) observaron una disminución considerable de los volúmenes de recolección durante los temporales de viento sur, caracterizado por producir descenso de la temperatura local.

La goma comienza a fluir en un lapso de 1 a 3 días después de realizada la incisión, y a partir de los 12 o 15 días disminuye la secreción, pero no cesa durante dos meses (Alesso y col., 2003a). El exudado en forma de lágrimas es de color más claro o más oscuro según el tiempo que permanezca expuesto y se va solidificando con los días. La disminución de la producción de GB a partir de los 15 días y los riesgos de lavado, aconsejan recoger las cosechas entre 15 y 30 días, aunque más próximo a los 15 días en los meses lluviosos. Períodos más largos de permanencia en el árbol permitirían un prolongado contacto con el aire lo que produce oxidaciones en la goma provocando el aumento del color amarillo, y la acumulación de polvo, restos de hojas e insectos que al adherirse a la goma y ensuciarla disminuirían su calidad y por lo tanto, su valor comercial (Alesso y col., 2003a; Calzon y col., 2007). Por lo tanto, es aconsejable realizar la cosecha en forma periódica, además se suma el hecho de la posible cicatrización de la corteza y por lo tanto, la salida del ciclo de producción antes de lo esperado con el consecuente cese del exudado (Calzon y col., 2007; Coirini y Zapata, 2010).



Figura 7. Marcado del tronco de brea.

La cosecha se hace con cuchillo o con el mismo machete con el que se hace el marcado. Debe hacerse con cuidado para que cuando se retira el exudado no se arrastre la corteza. El árbol produce goma durante todo el año aunque con diferencias importantes según la época, lo que está relacionado con la actividad vegetativa del árbol. Se ha encontrado las menores cosechas en los meses de invierno (junio a septiembre) (Alesso y col., 2003b). Sin embargo, de acuerdo a Losano y col. (2000), Coirini y Zapata (2010), la secreción esta activa desde septiembre a marzo, con un máximo en diciembre cuando el estado hídrico mejora con las precipitaciones. Estas oscilan entre los 500 y 750 mm anuales en la provincia de Salta distribuyendose en general entre setiembre y marzo, ocurriendo el 80% de las mismas entre los meses de diciembre y febrero (Calzon y col., 2007). A los fines prácticos y por las mayores cosechas, la recolección se realiza en los meses de septiembre a diciembre y de marzo a mayo cuando el clima es cálido y seco, ya que en verano las lluvias disuelven la goma hidrosoluble y cae al suelo disminuyendo el rendimiento (Calzon y col., 2007). De acuerdo a Coirini y Zapata (2010), un árbol adulto puede secretar entre 100 y 300

gramos de goma al año, siendo la producción de brea muy variable entre los rodales, las condiciones del sitio y los individuos arbóreos. Las mayores producciones se obtienen de individuos de tamaños intermedios siendo escasa a nula la producción en árboles muy pequeños o los de mayor diámetro o edad.



Figura 8. Cosecha de GB realizada por la comunidad Wichí

Según Calzon y col., 2007, la floración de la brea no se vio afectada por los cortes para producción de goma, a excepción de los árboles viejos o con problemas sanitarios que se secaron luego del periodo de recolección.

A diferencia de la GB, el exudado de GA aparece en cantidad suficiente tras efectuar las heridas para ser recogida entre 3 y 6 semanas después, formando excrecencias redondeadas (Figura 9) que pueden alcanzar un diámetro de hasta 10 cm, y que se endurecen al contacto con el aire (Calvo, 2011).



Figura 9. Goma Arábica en una rama de A. (arriba) y tras ser recogida (abajo).

La GA se recoge y se clasifica por color y pureza, valorándose más la goma de colores más claros (Calvo, 2011). La brea produce menor cantidad de exudado que las Acacias de donde se obtiene la GA, las cuales llegan a producir entre 1 y 5 kg de GA/ año durante la estación seca de octubre a junio (Calvo, 2011).

1.5.2. Purificación del exudado

En el caso de la GA el procesamiento de purificación del exudado puede incluir molienda mecánica que rompe los nódulos de exudado en varios tamaños específicos. La molienda se hace en molinos de martillos, ya que es más conveniente que el de discos que tiene la desventaja de recalentar la goma produciendo un aumento de color por oxidación,

lo que disminuye su valor comercial. La disolución de la goma ya molida se realiza en cubas metálicas con agua, calentando la solución por una corriente de vapor vivo o baño María utilizando pailas de doble fondo o bien a fuego directo. Las soluciones se agitan para evitar recalentamientos locales. La temperatura es mantenida en un mínimo para asegurar que la goma no se desnaturalice ya que esto puede tener un efecto negativo sobre sus propiedades funcionales. Después se separa el material insoluble por decantación o filtración, se pasteuriza la solución y se seca por aspersión o rodillos. El secado por aspersión involucra la pulverización de la solución en una cámara con aire caliente. El agua se evapora rápidamente y el polvo seco, típicamente de 50-100 micrones, es separado del aire usando un ciclón. Durante el secado en rodillo la solución es pasada por entre rodillos calentados con vapor y el agua se evapora rápidamente por flujo de aire. El espesor del film de goma producido es controlado por ajuste del espacio entre los rodillos. El film es raspado del rodillo usando una cuchilla produciendo partículas como escamas de varios cientos de micrones en tamaño. El secado por aspersión y por rodillos tiene la ventaja sobre la goma cruda o la triturada en que son virtualmente libres de contaminación microbiológica y se disuelven más rápidamente (Williams y Philips, 2000). La GB se puede purificar en forma similar a la GA.

1.6. Aspectos bromatológicos y regulatorios

La GB se encuentra registrada recientemente en el Código Alimentario Argentino como aditivo (Resolución Conjunta SPReI N° 222/2013 y SAGyP N° 331/2013).

Diversos estudios justifican y avalan su potencialidad productiva (Alesso y col., 2003a; Bertuzzi y col., 2006; Vilela y Ravetta, 2005) y ausencia de toxicidad (von Müller y col.,

2006a), por lo que tiene buenas posibilidades de conseguir un lugar en el mercado de las gomas.

En lo que respecta a la toxicidad, se realizaron análisis bioquímicos e histopatológicos tanto a corto como a largo plazo (toxicidad crónica), según lo exigido por la CONAL para su incorporación al Código Alimentario Argentino, como aditivo alimentario. von Müller y col. (2006a) encontraron mediante un estudio que responde a la metodología FAO/OMS, que la incorporación de GB en concentraciones de hasta el 5% en la dieta de ratones BALB/c de ambos sexos, no provocó efectos tóxicos crónicos adversos en los mismos. Es decir, los ratones no mostraron alteraciones en el comportamiento ni en su aspecto físico general. Sólo en los tratamientos con GB al 5% y GA al 5% se observó una mayor cantidad de heces en las jaulas, esto como consecuencia de un exceso en el aporte de fibra en la dieta de los animales. Asimismo, los perfiles enzimáticos y hematológicos del plasma y los exámenes histopatológicos, tanto macro como microscópicos, no revelaron efectos tóxicos.

Por otro lado, en un estudio inédito realizado por Rosés y López (1993) citado en von Müller y col. (2006a), se encontró que la GB carecía de efectos tóxicos agudos vía ingestión oral en ratas Wistar. También debe considerarse el hecho de que la GB ha sido utilizada por pobladores rurales de la región chaqueña como caramelo de monte por su sabor ligeramente dulce, no registrándose antecedentes de toxicidad por su consumo (Coirini y Zapata, 2010; von Müller y col., 2006a). Además la GB ha sido aprovechada tradicionalmente por las comunidades campesinas de las zonas más áridas como medicina para afecciones bronquiales. Por lo tanto, la GB es un producto apto para el consumo humano y fue incorporada al Código Alimentario Argentino para ser utilizada como aditivo en la industria alimentaria.

Respecto a la GA, en el Sistema Internacional de Numeración de aditivos es designada como INS N° 414 o E 414 (la numeración INS y la E son intercambiables) en la lista europea de aditivos permitidos (Bénech, 2010; Williams y Philips, 2000). Las gomas extraídas de *Acacia senegal* y *Acacia seyal* se definen como un producto 100% vegetal y natural, sin OGM (Organismos Genéticamente Modificados), sin valor IDA (ingesta diaria admitida), es decir sin limitación cuantitativa de ingestión y también goza del estatuto GRAS de la FDA (Food and Drugs Administration-USA) es decir “Generally Recognized As Safe” (Generalmente Reconocido Como Seguro) (Bénech, 2010; Calvo, 2011; López-Franco, 2006; Williams y Philips, 2000).

1.7. Aspectos comerciales y económicos

La GB ofrece cuatro alternativas para su comercialización según el grado de purificación (Rique, 1977; Orueta, 1992):

- En forma natural: como proviene del monte o del acopio. Es la forma en que habitualmente la comercializan los campesinos e indígenas de las zonas del monte Chaqueño.
- Seleccionada: desechando las partes más oscuras y las que tiene adherencias de corteza, con posterior molienda por medio de molino de martillos y zarandeo. El producto molido presenta una granulometría de 1 a 5 mm y estaría dispuesto para la venta a productores de témperas y acuarelas, empresas que utilizan baños electrolíticos, industrias que fabrican elementos cerámicos y artísticos, y para otros usos varios en droguerías industriales como elemento espesante, astringente, etc.
- En solución goma-agua: (20% goma-80% agua), para la industria gráfica.

- En forma de polvo purificado: para su utilización en la industria alimenticia y farmacéutica.

Esta última es la única forma aceptada para consumo humano y es la más importante de todas sus alternativas de comercialización, puesto que alcanza su mayor valor comercial (Alesso y col., 2003a).

Por otra parte, el árbol de brea tiene un escaso valor económico para la actividad de extracción maderera debido a su baja durabilidad a la intemperie o en contacto con el suelo y a su baja calidad, utilizándose como combustible alternativo de bajo valor como leña y carbón (Coirini y Zapata, 2010).

Tanto la GA como la GB son productos forestales no madereros (PFNM) definidos como aquellos bienes de origen biológico que no son madera, y que derivan de los bosques, de otras tierras boscosas y de los árboles fuera del bosque (FAO, 2002). Los PFNM pueden ser de origen vegetal o animal. Los exudados son parte de esta categoría, e incluyen sustancias tales como: gomas (hidrosoluble), resinas (no hidrosolubles) y látex (lechoso o jugo claro) extraídos de plantas. El beneficio más destacable de estos productos es su posibilidad de ser extraídos, preservando la integridad de los recursos naturales de donde se obtienen (Kleiman, 2010).

En lo que respecta a la GA, tanto la *A. senegal* como la *A. seyal* son especies arbóreas que crecen ampliamente en una región conocida como "el cinturón de la GA", que bordea por el sur el desierto del Sahara en África oriental y occidental, al norte del bosque ecuatorial conectando Senegal, en el Oeste con Somalia, en el este (López-Franco, 2006; Pitron, 2011; Williams y Philips, 2000). Esta situación le otorga a esta zona el control de los precios y la producción mundial de GA (López-Franco, 2006). La mayor parte de la GA se

extrae de Sudan, llegando a valores de hasta el 70% de la producción mundial (Calvo, 2011), aunque también se produce en otros países africanos. La producción tiene un alto impacto en las economías regionales de las subregiones, llegando a una dependencia de la misma casi absoluta (von Müller y col., 2006a). Este es un ejemplo de la importancia que puede llegar a tener las gomas vegetales en las economías regionales de zonas áridas. El lado negativo de tal dependencia es que los cambios en las pautas de mercado pueden llegar a amenazar estas economías.

Actualmente, la producción de GA en Sudan parece estar en declive. Los países de Chad y Nigeria producen cantidades menores, aunque su producción está creciendo, mientras Senegal, Mali, Mauritania y Níger producen cantidades casi insignificantes en proporción a los mayores productores (Calvo, 2011; Williams y Philips, 2000).

La goma Hashab es indudablemente el producto más valorado, pero también la goma Talha ha encontrado recientemente otros usos lo que ha hecho aumentar su valor. No es posible identificar precisamente el balance exacto entre estos dos productos en el mercado ya que es continuamente cambiante. Europa es el principal importador seguido de Estados Unidos y Japón.

En Argentina, los PFNM no han alcanzado un desarrollo productivo importante, dificultando su incorporación en las economías regionales (von Müller, 2006b). Respecto a la GB, al requerir de mucha mano de obra, especialmente en su recolección, constituye una alternativa productiva importante para las comunidades indígenas del Chaco. Por su precio, la GB tiene para estas comunidades una relación costo-beneficio que no puede ser igualada por ningún otro recurso natural, dando además mayor sustentabilidad al sistema productivo (von Müller, 2006b). De allí el enorme impacto social y económico que podría tener la producción y comercialización de GB para las comunidades rurales Wichí y criollas del chaco

salteño semiárido. Hoy son una de las poblaciones con mayor nivel de pobreza y necesidades básicas insatisfechas del país (Calzon y col., 2007). Por ello existe un programa de promoción de esta goma, como PFMN para el desarrollo sostenible de dichas comunidades. El proyecto puesto en marcha desde marzo de 2007 es financiado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación y está a cargo de la Fundación de Altos Estudios (Fundaltes) de la Universidad Nacional de Salta (Kleiman, 2010; www.gomabrea.com.ar; www.ruralprimicias.com.ar). El proyecto tiene el propósito de determinar el potencial del recurso que existe en la provincia y asistir a tres comunidades wichis, cercanas al río Pilcomayo, para que comiencen a acopiar y comercializar esta sustancia (Rabe, 2007). La cosecha de GB es una actividad muy aceptada por las comunidades indígenas, no reviste ningún tipo de complejidad y puede ser realizada por cualquier miembro de la familia, permitiendo, además, el ingreso de dinero para la cobertura de sus necesidades en un momento del año en que la oferta de recursos naturales del ambiente es baja (Alesso y col., 2003a; Calzon y col., 2007).

Por otra parte, como se ha citado, la GA lidera actualmente el mercado mundial de este tipo de goma y fue llamada “el petróleo que no maneja Estados Unidos” por la magnitud económica del mercado. Sin embargo, existen problemas asociados a su escasez periódica, a la inseguridad en su suministro manifestada en los últimos 20-30 años y a los precios variables como ocurrió, por ejemplo, en 1985, donde una sequía en Sudán hizo que el precio de la GA se multiplicara por 6 (Calvo, 2011). Estos problemas impulsan la búsqueda de otras fuentes botánicas de goma capaces de remplazarla y que ofrezcan mayor seguridad en el suministro y los precios. Así, por ejemplo, se han llevado a cabo estudios sobre goma mezquite en Méjico (López-Franco, 2006; Vernon-Carter y col., 2000). Cabe mencionar que la selección de hidrocoloides en la industria es determinada por las características

funcionales requeridas pero inevitablemente influenciada por el precio y la seguridad de su suministro (Williams y Philips, 2000).

El gran crecimiento de la industria agroalimentaria que registra nuestro país y los altos costos de importación de estas gomas, hace prever una sostenida y creciente demanda de GB por la necesidad de incorporar productos más económicos con aplicaciones definidas respecto a calidad, función y disponibilidad (von Müller y col., 2006a). De aquí que al profundizar los conocimientos sobre sus características y propiedades fisicoquímicas y funcionales aumenten las posibilidades de su aplicación en distintas industrias como la alimenticia, farmacéutica, textil, cosmética, vitivinícola, etc. Actualmente la extracción de la GB puede ser una alternativa económica competitiva por los precios internacionales (www.gomabrea.com.ar). La GA tiene un precio (FOB) entre US\$ 4 y 11 mientras la GB entre US\$ 1 y 3 por Kg.

La GB durante algún tiempo se comercializó como sustituto de la GA con distinto éxito, según fluctuaba el precio internacional de la misma. Como consecuencia de la crítica situación mundial de materias primas durante la década de los 70, varias firmas locales se interesaron en comercializar GB en el mercado interno (Alesso y col., 2003a). Cabe mencionar que en los '70 el precio de la GA se incrementó de alrededor de US\$ 1.500 a US\$ 5.000 por tonelada llegando luego incluso hasta US\$ 8.000 (Williams y Philips, 2000).

Según datos del INDEC (1996) la importación de GA en Argentina se incrementó durante la década del '90 de 100 Ton a 250 Ton anuales. Cabe destacar que durante el año 2002 se importaron 355 Ton, mientras que en el año 2005 se importaron 516,5 Ton de GA por un monto de 2.972.308 U\$S, según los datos de la Administración Nacional de Aduanas (Bertuzzi y col., 2006). Este incremento en la importación de GA y los altos costos, conllevan a la necesidad de incorporar productos que se obtengan de especies nativas y que cumplan

con los mismos requisitos de calidad y mercado, para ser utilizados en la industria agroalimentaria nacional. Todo esto evidencia una gran posibilidad de mercado para la GB, lo que permitiría a nuestro país un ahorro importante en importaciones, y para ello deben identificarse los canales de comercialización y realizarse estudios de mercado para favorecer el desarrollo productivo asociado a esta goma.

1.8. Aspectos tecnológicos

1.8.1. Solubilidad

Los hidrocoloides, en general, se comercializan como polvos y para su utilización se los dispersa en agua para su hidratación. La solubilización puede acelerarse por efecto de la agitación y/o el calentamiento (Figura 10), obteniéndose finalmente una solución con moléculas hidratadas individuales (espesantes) o enlazadas (gelificantes) de acuerdo a la naturaleza del hidrocoloide.

Según Bertuzzi y col. (2006), la GB tiene una alta solubilidad en agua, superior al 40% p/v, que aumenta con el incremento de la temperatura. Esta solución aparece como homogénea, viscosa y de carácter ácido ($\text{pH} \approx 4$). Este comportamiento es similar al de la GA, la cual es fácilmente soluble en agua dando una solución entre amarilla muy pálida y naranja-marrón, de pH ácido, alrededor de 4,5 (Calvo, 2011; Williams y Philips, 2000; Yebeyen y col., 2009). La rápida solubilidad en agua de la GA en forma de polvo permite reducir los tiempos de producción y el consumo de energía (Bénech, 2010).

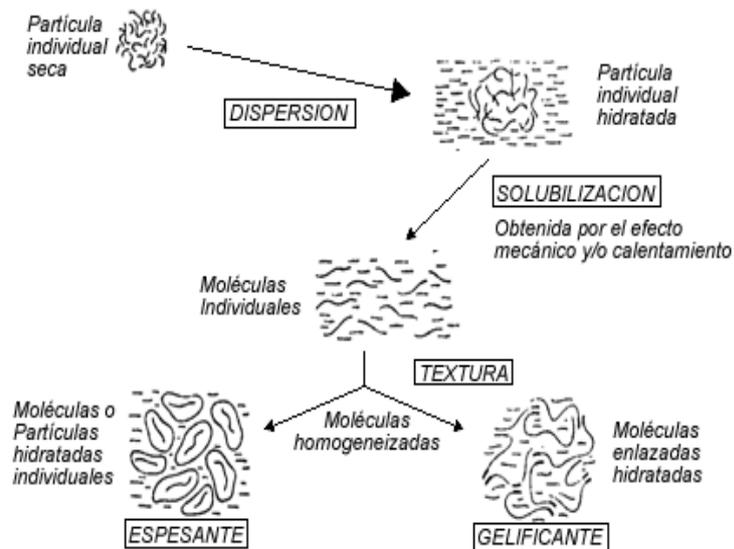


Figura 10. Esquema de la dispersión, solubilización y textura de hidrocoloides.

Bertuzzi y col. (2006) encontraron que la solución acuosa de GB al 1% p/p es soluble en yodo, ácido sulfúrico concentrado, ácido clorhídrico, ácido tánico (10%), hidróxido de sodio e hidróxido de potasio (10%) y leche descremada. Por otro lado, resultó insoluble en reactivos como ácido acético, glicerol, aceites, alcohol etílico 96° y en la mayor parte de los solventes orgánicos. Al igual que la GA, resultó insoluble en presencia de sales metálicas trivalentes, como por ejemplo soluciones de cloruro férrico (5%) (Yebeyen y col., 2009).

1.8.2. Propiedades reológicas asociadas a los hidrocoloides

Cuando se aplica un esfuerzo de corte (σ) a un material, se deformará en cizalla. En el caso de un líquido, el material empieza a fluir a una determinada velocidad de deformación $\dot{\gamma} = d\gamma/dt$ donde γ es la deformación en cizalla y t es el tiempo. Si el líquido es Newtoniano, la razón entre el esfuerzo de corte (σ) y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) es constante y se denomina viscosidad (η) (Rosenthal, 2001). Para los líquidos no newtonianos (por ejemplo

soluciones de gomas, etc.), la relación entre σ y $\dot{\gamma}$ no es lineal. En este caso se obtiene una viscosidad que depende de la velocidad de deformación denominada viscosidad aparente (η_{ap}) (Rosenthal, 2001). Si la η_{ap} disminuye con $\dot{\gamma}$ se habla de comportamiento pseudoplástico. Es decir que los líquidos pseudoplásticos son menos espesos cuando se someten a altas $\dot{\gamma}$ que cuando se cizallan lentamente. Dicho comportamiento se puede modelar en un intervalo limitado de $\dot{\gamma}$ mediante la ley de la Potencia (Rosenthal, 2001):

$$\sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{y} \quad \eta_{AP} = k \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)}$$

En estas expresiones k es el índice de consistencia y n índice de comportamiento al flujo. Si $n < 1$ el comportamiento es pseudoplástico. Tanto k como n no tienen bases físicas, son el ajuste de un resultado experimental a una expresión matemática, k tiene unidades de Pa.s.

Los hidrocoloides son ampliamente usados para espesar sistemas alimenticios y un gran entendimiento de su comportamiento reológico ha sido obtenido en los últimos 30 años y particularmente, a través del desarrollo de reómetros de alta sensibilidad capaces de medir muy bajas velocidades de deformación (Saha y col., 2010; Williams y Philips, 2000).

De acuerdo a Saha y Bhattacharya (2010), para que un hidrocoloide sea espesante debe predominar la interacción con el agua sobre la interacción de las propias moléculas. Es decir que una vez solubilizado, sus moléculas están rodeadas por una importante capa acuosa de solvatación. Ello limita la movilidad normal del agua y determina que la viscosidad de la solución (resistencia al flujo de este sistema de macromoléculas solvatadas) alcance valores importantes.

El aumento de la viscosidad se debe entonces, al volumen hidrodinámico ocupado por las cadenas del polisacárido en la solución y a la interacción entre las cadenas de polímero presentes (Bertuzzi y col., 2006).

La viscosidad de soluciones de polímeros muestra un marcado incremento a una concentración crítica de polímero, comúnmente referida como C^* , correspondiente a la transición de la llamada “región diluida”, donde las moléculas de polímero están libres para moverse independientemente en solución sin interpenetración, a la “región semi-diluida” donde la agregación molecular da lugar a un aumento del solapamiento entre los polímeros y ocurre la interpenetración (Williams y Philips, 2000).

Las soluciones de polisacáridos normalmente exhiben un comportamiento Newtoniano a concentraciones por debajo de C^* , por lo que su viscosidad es independiente de la velocidad de deformación. Sin embargo, por encima de C^* usualmente se observa un comportamiento No-Newtoniano. La Figura 11 muestra un típico perfil de viscosidad-velocidad de deformación para una solución de polímero por encima de C^* . En la misma, se distinguen 3 regiones: (a) Una meseta Newtoniana a baja velocidad, (b) una región de dilución por cizallamiento (comportamiento pseudoplástico), y (c) una región Newtoniana a alta velocidad.

A baja velocidad de deformación la disrupción de la estructura es menor que la velocidad de reordenamiento y aquí la viscosidad es independiente de la velocidad. Por encima de la velocidad crítica, el desordenamiento predomina y la viscosidad cae a un valor mínimo constante a velocidad infinita. La viscosidad de soluciones de polímeros es influenciada significativamente por la masa molecular del polímero. La dependencia de la viscosidad con la velocidad aumenta con el incremento de la masa molecular y la velocidad

a la cual ocurre la dilución por cizallamiento cambia a valores más bajos (Williams y Philips, 2000).

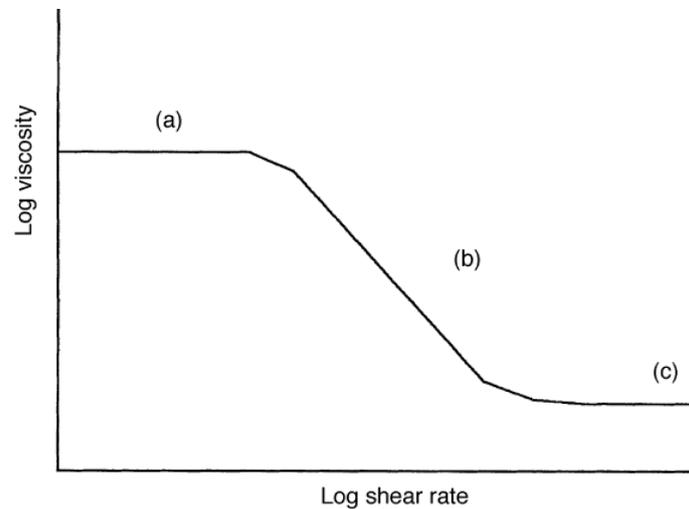


Figura 11. Perfil viscosidad-velocidad de deformación para una solución de polímero por encima de C^* .

El tamaño hidrodinámico de las moléculas de polímero en solución es significativamente influenciado por la estructura molecular. Las moléculas rígidas y lineales (goma xántica, ciclotilcelulosa (CMC), etc.) tienen un mayor tamaño hidrodinámico que aquellos polímeros altamente ramificados y de estructura compacta (GA, etc.) de la misma masa molecular y producen un aumento mucho más alto de viscosidad al establecer interacciones intermoleculares más rápidamente que los ramificados (Ikeda y col., 2005; Williams y Philips, 2000).

Mientras la mayor parte de las gomas forman soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones, la GB, al igual que la GA, resultan excepcionales por su alta solubilidad y por no impartir gran viscosidad a bajas concentraciones (Bertuzzi y col., 2006). La estructura altamente compactada y ramificada de la GA (*A. senegal*) y de la GB dan lugar a un aumento de moléculas compactas con un relativamente pequeño volumen hidrodinámico, y como

consecuencia, presentan baja viscosidad en solución (Figura 12), obteniéndose viscosidades importantes recién a altas concentraciones (Bertuzzi y col., 2006; Calvo, 2011; Verbeken y col., 2003; Williams y Philips, 2000). Una solución de 30% p/p de GA tiene una menor viscosidad que las soluciones al 1% de Goma xántica y al 1% de CMC a baja velocidad de deformación (Williams y Philips, 2000).

El hecho de que las gomas presenten baja viscosidad a altas concentraciones no siempre es una característica desfavorable. Las gomas no solamente son agregadas para dar viscosidad, sino también como vehículo de sabores o como emulsionantes (Yaseen y col., 2005).

Esta capacidad de formar soluciones altamente concentradas con baja viscosidad es responsable de las excelentes propiedades estabilizantes y emulsionantes de estas gomas cuando se incorporan a preparaciones con grandes cantidades de materiales insolubles (Bertuzzi y col., 2006).

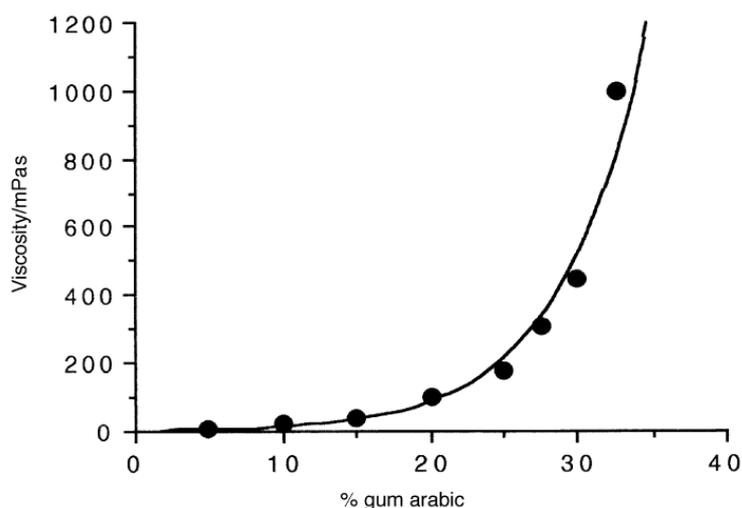


Figura 12. Gráfica de viscosidad en función de la concentración de GA.

Los polímeros cargados tienen una mayor viscosidad que aquellos no iónicos de similar masa molecular debido al hecho de que su cadena molecular está expandida por repulsión de cargas intramoleculares. El agregado de electrolitos, que ocultan las cargas o la disminución de pH que reduce el grado de disociación de grupos carboxilos cargados, normalmente llevan a la compactación de las cadenas y a un significativo descenso de la viscosidad. La CMC y la goma Xántica muestran un comportamiento atípico con un aumento de la viscosidad con el agregado de electrolitos (Williams y Philips, 2000).

El cambio de pH de las soluciones ocasiona modificaciones en los enlaces puente hidrógenos establecidos entre cadenas de polisacáridos y con las moléculas de agua, resultando en una variación en el comportamiento reológico del hidrocólide (Bertuzzi y col., 2006).

En lo que respecta a la GB, Bertuzzi y col. (2012), determinaron que la viscosidad de sus soluciones aumenta con la concentración y disminuyen con la temperatura. A medida que aumentan la concentración de GB en sus soluciones presentan un efecto más marcado de la temperatura sobre la viscosidad de la solución. Además una solución al 1,5% p/p de GB presentó valores de viscosidad superiores a los de soluciones al 4% p/p de goma Karaya y 4% p/p de goma tragacanto en un rango de temperatura que va de 25 a 50°C.

La GB también forma soluciones de mayor viscosidad que las de GA a igual concentración (Defain-Tesoriero y col., 2004). Una parte de GB en seis de agua, da un mucílago más consistente que el de la GA en las mismas proporciones lo que permite utilizarse en combinación con otras gomas como espesantes y ligantes en concentraciones menores respecto a la GA (Bertuzzi y col., 2006).

1.8.3. Capacidad emulsionante

Una emulsión es un sistema coloidal que consiste en una mezcla íntima de líquidos inmiscibles entre sí, donde una fase está subdividida en pequeñas gotas (fase discontinua o dispersa) y éstas a su vez están suspendidas en el seno de otra fase (fase continua o dispersante). En alimentos se utilizan principalmente dos clases de emulsiones: aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O). De acuerdo al Código Alimentario Argentino (2011), los agentes emulsionantes o emulsificantes “son sustancias que hacen posible la formación o mantenimiento de una mezcla uniforme de dos o más fases inmiscibles en el alimento”. Es decir, favorecen la formación de una emulsión o su estabilidad en el tiempo.

Las moléculas de las sustancias emulsionantes poseen características ambivalentes, con una parte hidrofílica formada mayoritariamente por grupos afines al agua y otra parte lipofílica (hidrofóbica) constituida por cadenas o grupos hidrocarbonados solubles en la fase grasa. Una de las propiedades fundamentales de estas moléculas es la tendencia que tienen a concentrarse y orientarse en la interfase, disponiendo los grupos lipofílicos hacia la fase grasa y la porción hidrofílica en interacción con el agua.

Para generar una emulsión debe entregarse energía en forma de trabajo para lograr un importante grado de subdivisión de la fase dispersa. En consecuencia, son sistemas metaestables con tendencia a pasar a menores niveles de energía. Progresivamente se verifica la disminución de la superficie de interfase a través de procesos como la agregación de gotas (floculación) y la coalescencia (unión de las mismas en partículas de mayor tamaño), hasta concluir en la separación visible de las fases o en la ruptura de la emulsión.

Los aditivos que estabilizan y favorecen la formación de las emulsiones, reducen la tensión superficial en la interfase y, en consecuencia, el trabajo necesario para lograr la

emulsificación. Además, estas moléculas forman una capa triple (grasa- emulsificante-agua) en la interfase, que actúa como una barrera estérica o eléctrica impidiendo el acercamiento de las partículas dispersas a la vez que interaccionan con proteínas y carbohidratos presentes en la fase continua, variando la textura y propiedades reológicas (viscosidad, consistencia) de esta fase.

En el caso de los hidrocoloides, aquellos que contienen proteínas (por ejemplo GA, GB, goma mezquite) son buenos estabilizadores, ya que tienen suficientes grupos hidrofóbicos para actuar como puntos de anclaje o unión y pueden formar películas viscoelásticas en las interfases (Huang y col., 2001).

Las propiedades emulsionantes de la GA, como ya se ha citado, están asociadas al complejo Arabinogalactanos-proteínas (AGP) formado por el polisacárido (región hidrofílica) y las proteínas (región hidrofóbica). Durante la formación de la emulsión aceite en agua, los residuos de aminoácidos hidrofóbicos de la porción proteica de la GA se adsorben y anclan la molécula a la superficie de la gota de aceite, mientras que los bloques hidrofílicos de carbohidratos sobresalen hacia la fase acuosa (Figura 13) inhibiendo la floculación y la coalescencia de gotas de aceite adyacentes, a través de repulsiones electrostáticas y estéricas, lo que confiere excelente estabilidad a la emulsión (Calvo, 2011; Bertuzzi y col., 2006; Ikeda y col., 2005; Williams y Philips, 2000).

Una vez formada la emulsión con GA puede permanecer estable por largos periodos de tiempo, sin evidencia de que se produzca coalescencia.

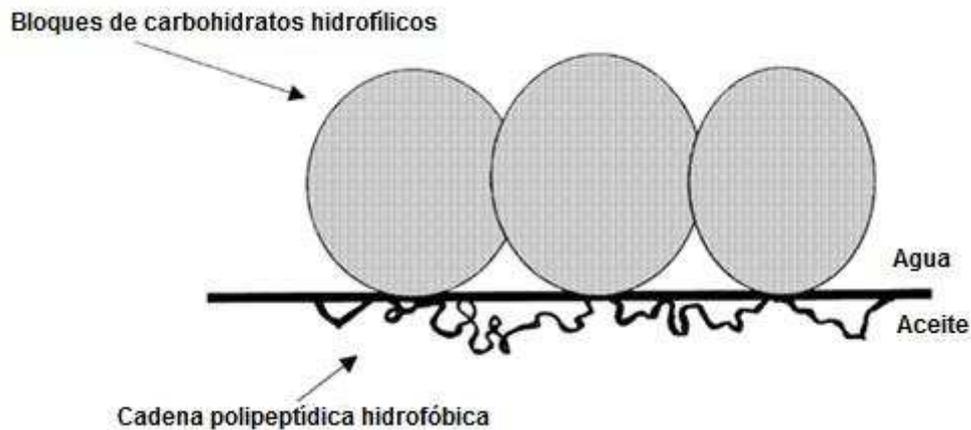


Figura 13. Esquematación de la estabilización de gotas de aceite por moléculas de GA.

El contenido relativamente bajo de proteínas de la GA implica que sólo una parte de la goma está involucrada en el proceso de emulsificación, por lo que la concentración requerida para producir una emulsión es mucho más alta que la proteína pura (Bertuzzi y col., 2006; Williams y Philips, 2000). Por otro lado, la alta concentración de goma en la fase continua puede mejorar la estabilidad por el incremento en la viscosidad del medio dispersante.

1.9. Aplicaciones de las gomas

El principal interés en el uso de estos polisacáridos se fundamenta en varias características que presentan como la capacidad de modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos, estabilizar interfases (aire-agua o aceite-agua) y reducir la tensión interfacial entre ambas fases. Estas características hacen que la GA sea utilizada como agente emulsionante y estabilizante, agente de batido, modificador de textura en productos dietéticos, microencapsulación de aceites y aromas, etc. (Calvo, 2011).

Por su parte, la GB posee características funcionales que la convierten en un excelente hidrocoloide para su uso como espesante y estabilizante de emulsiones y espumas (Bertuzzi y col., 2006).

La GA ha sido utilizada desde hace al menos 4.500 años por los antiguos egipcios, en el valle del Nilo, en distintas aplicaciones, como la preparación de vendas para momificación o la fabricación de cosméticos, tintas y pinturas jeroglíficas. Fue objeto de comercio durante toda la historia, desde los tiempos bíblicos hasta la actualidad (Calvo, 2011; Williams y Philips, 2000).

La principal aplicación de la GA en alimentos se desarrolla en la industria de la confitería, donde se emplea más de la mitad de la GA producida en el mundo (Pasquel, 2001). En este contexto, es utilizada en una variedad de productos incluyendo gomas, pastillas, grajeados, malvaviscos y caramelos. En esta aplicación la GA da brillo a los productos, retarda o previene la cristalización del azúcar, promueve la emulsificación, y en tabletas o esferas cubiertas con azúcar forma una cubierta protectora inicial antes de agregar el jarabe (Armada, 2010; Williams y Philips, 2000). En caramelos, la GA permite emulsificar la grasa presente, mientras que en malvaviscos la GA es utilizada como estabilizante de la espuma, función que también desempeña en la fabricación de la cerveza y refrescos (Armada, 2010; Calvo 2011; Pasquel, 2001; Williams y Philips, 2000). La GA también es usada para formar un glasé en nueces recubiertas y productos similares. Otro uso es la producción de gomas o patillas (Williams y Philips, 2000).

Debido a la escasez de GA y a las fluctuaciones de los precios, se usa GA en mucha menor concentración en combinación con otros hidrocoloides, como almidón, maltodextrina, gelatina, pectina y agar. En estas formulaciones puede producirse una separación de fases debido a la incompatibilidad entre los hidrocoloides. La extensión de la

separación de fases dependerá de la velocidad de formación del gel inducido por los otros hidrocoloides presentes, y determinará, consecuentemente, la textura final obtenida.

Un 30% del total de la GA en el mundo se emplea en la industria de bebidas no alcohólicas como estabilizante y emulsionante (Pasquel, 2001), en la producción de concentrados de cítricos para bebidas, concentrados aromáticos de aceites esenciales para bebidas cola (debido a su estabilidad en condiciones ácidas), en bebidas dulces con cierto contenido de alcohol, bebidas funcionales para deportistas, bebidas lácteas y bebidas dietéticas (Bénech, 2010; Calvo, 2011; Williams y Philips, 2000). Los resultados logrados con la GA en la producción de bebidas turbias son excelentes, allí donde las emulsiones aromáticas generan la turbidez deseada en el producto acabado. Esta propiedad se debe al índice de refracción de la fase aceitosa durante la emulsificación, especialmente cuando se trata de aceites esenciales cítricos (Bénech, 2010). La goma es capaz de inhibir la floculación y coalescencia de las gotas de aceite por varios meses y además la emulsión permanece estable por más de un año cuando se diluye alrededor de 500 veces con agua carbonatada edulcorada previo al envasado (Williams y Philips, 2000).

En el caso de bebidas lácteas aromatizadas, la GA estabiliza las partículas aromáticas en la leche, impidiendo su precipitación, favoreciendo una estructura homogénea y una textura agradable al paladar (Bénech, 2010).

Por otro lado, respecto a la industria vitivinícola Nacional, cabe mencionar que el Instituto Nacional de Vitivinicultura, en el año 2004, resolvió autorizar como práctica enológica lícita, el uso de GA en vinos como coloide protector estabilizante, en una cantidad máxima permitida de 300 mg/L (Resolución N° C.26). En enología la GA cumple las siguientes funciones (AEB IBERICA S. A., 2011):

- Prevenir el enturbiamiento.

- Reforzar el efecto del ácido metatartárico.
- Romper la aspereza tánica en vinos estructurados.
- Suavizar los vinos y prolongar el gusto.
- Evidenciar la intensidad y complejidad aromática.
- Impedir la aglomeración de partículas inestables evitando precipitaciones en la botella.

En lo que respecta a la aplicación de la GB en alimentos, Armada (2010) ha formulado diferentes productos alimenticios, los cuales exhibieron buenos resultados y características particulares:

- Glacé (cobertura de torta, alfajores) con 5 y 5,5% de GB. Características: suave, adhesivo, brillante, de secado rápido y no se agrieta.
- Jugo dietético concentrado de kiwi con 25% de GB. Características: sabor dulce, agradable, buen cuerpo y buena estabilidad.
- Pan tipo lactal con 3,3 y 2,2% de GB. Características: buena formación de miga, confiere humedad a la miga y estabilidad al almacenamiento de 7 días (la estabilidad de la misma fórmula sin adición de goma fue de 5 días).
- Mermelada de zanahoria con 6% de GB. Características: coloración más oscura que la referencia sin goma, sabor agradable, semejante al zapallo y reduce el tiempo de cocción. Sólidos solubles 68%.
- Mermelada de zanahoria dietética con 12% de GB Características: color y sabor agradable. Sólidos solubles 40% (en concordancia a productos dietéticos).
- Postre de vainilla dietético con 4,5% de GB. Características: prolonga la estabilidad al almacenamiento retardando la sinéresis.

A todas las formulaciones se les realizó una evaluación de aceptabilidad con un panel piloto de 30 jueces no entrenados y utilizando una escala hedónica de 9 puntos. Se obtuvo una aceptabilidad mayor al 70% en todas las formulaciones.

La GB también ha encontrado aplicación en la formación de películas protectoras. Las películas son utilizadas para retardar la maduración de frutas y vegetales mediante el control del intercambio gaseoso (Armada, 2010; Calvo 2011). Las películas de GB plastificadas con glicerol poseen muy buenas propiedades mecánicas y de barrera a gases pero estas se ven muy afectadas por el contenido de humedad de la película, lo que se soluciona con el agregado de aceite vegetal. Se obtienen así membranas homogéneas y translúcidas con menor permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua y mayor hidrofobicidad superficial respecto a aquellas producidas sin aceite (Spotti y col., 2016).

Otras las aplicaciones de la GA y potenciales de la GB en la industria alimentaria son (Armada, 2010; Calvo, 2011):

- En panificación, para dar suavidad a la corteza y miga en el pan, retardando su envejecimiento.
- En productos lácteos congelados (helados, nieves, postres, etc.), para producir una textura fina, inhibiendo la formación y crecimiento de los cristales de hielo, el helado no se funde rápidamente y se puede usar en combinación con carragenatos.
- En repostería, para favorecer el hinchamiento del merengue.

Otras industrias no alimenticias donde tiene aplicación la GA y podría tener la GB son (Armada, 2010; Motlagh y col., 2006):

- Farmacéutica y cosmética (cremas y lociones).

- Textil, en el estampado de tejidos.
- Minera, como espumante en proceso de separación de metales.
- Metalúrgica, en el recubrimiento de piezas por electrolisis (niquelado, cobreados y cadmiadas) donde evita formación de agregados, y en la construcción de moldes formulados con GB, yeso y cuarzo para fundición de metales, por resistencia mecánica, y como inhibidor de corrosión de metales.
- Pinturera, en la elaboración de pinturas artísticas (temperas y acuarelas).
- Gráfica para la protección de planchas offset.

1.9.1. Microencapsulación

La encapsulación y/o microencapsulación es una tecnología que permite envolver físicamente en una matriz protectora denominada “material de pared”, a aquellos ingredientes considerados sensibles, como una manera de protegerlos o cubrirlos, de diversas reacciones adversas, pérdidas volátiles, deterioro nutricional (Hogan y col., 2001), de la humedad, calor, o condiciones extremas, y así desarrollar o mejorar su estabilidad y mantener la viabilidad del producto (Gibbs y col., 1999). La técnica posee un alto potencial para generar nuevos productos y procesos (Sanguansri y Agustín, 2006). En las aplicaciones para alimentos, son típicamente empleados para resolver problemas de formulación que puedan surgir de la estabilidad química o física limitada del ingrediente activo, una incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz, control de liberación del compuesto, o biodisponibilidad de un nutriente (Ubbink y Krüger, 2006). Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante (Yañez et al.,

2002). Luego de estos inicios se han desarrollado diferentes aplicaciones en diversos campos.

Desde el punto de vista tecnológico, la encapsulación es definida como el proceso de recubrimiento de productos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “micropartículas”, “microcápsulas”, “microesferas”, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna, todos ellos presentan como característica común el tamaño de partícula, el cual es siempre inferior a 1 mm. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “nanoesferas”, “nanopartículas” o “nanocápsulas”.

Los materiales a atrapar, abarcan sabores, olores, nutrientes esenciales, microorganismos, fragancias, drogas farmacológicas, agentes de diagnóstico médico, etc.

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas. En general estos métodos pueden ser divididos en tres grupos (Yáñez, 2002):

- Métodos físicos: secado por aspersión, extrusión, recubrimiento en lecho fluido, evaporación por solventes, suspensión en aire y disco rotatorio.
- Métodos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
- Métodos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

Entre los citados, el secado por aspersión de una emulsión, solución o suspensión, es el más utilizado para producir microcápsulas, donde el componente activo quedara recubierto por el material de pared generándose polvos con buena calidad, baja actividad de agua, fácil manejo y almacenamiento (Bae y Lee, 2008; Fuchs, 2006; Partanen, 2008).

Cuando se trata de emulsiones, el material pared actúa como un estabilizador de la emulsión, y la emulsión secada por aspersión es capaz de dispersarse de nuevo en agua (Carneiro y col., 2013). Las partículas secadas por aspersión tienen típicamente un tamaño de 10 a 200 micrones y la retención del material volátil, es normalmente mayor al 80%, dependiendo de variables operativas como: la temperatura de entrada y salida, la concentración de los componentes de la emulsión, la viscosidad, etc.

Otro método para encapsular es la coacervación compleja (Schmitt y col., 2010; Turgeon y col., 2007), y presenta la característica de que las partículas se forman durante el proceso de coacervación en lugar de producirse en el proceso de secado. La coacervación se define como la separación de dos fases líquidas en determinadas condiciones de pH y fuerza iónica, una de las fases contiene el/los polímero/s y se llama fase de coacervado, y la otra que no los contiene se llama solución de equilibrio. Para esta metodología, en general, se utiliza como cubierta la combinación de una proteína, como la gelatina, y un polisacárido, como la GA. La GA ha sido ampliamente estudiada y utilizada como material de pared (Bertolini y col., 2001; Liu y col., 2010), sola o en combinación con maltodextrina para reducir costos.

Actualmente, en la industria alimentaria se utiliza una gran variedad de materiales de pared, siendo los principales la GA, la maltodextrina, los almidones modificados, la celulosa modificada, la gelatina, la ciclodextrina, la lecitina, las proteínas del suero lácteo y la grasa hidrogenada.

Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del centro activo, del material de pared y de la técnica utilizada para la microencapsulación, se pueden obtener diferentes tipos de macropartículas (Figura 14): esferas simples rodeadas por una membrana de espesor uniforme, partículas conteniendo un núcleo de estructura irregular, múltiples

partículas embebidas en una matriz continua formada por el material de pared, varias partículas encerradas en el núcleo de una misma cápsula y macropartículas con múltiples membranas interfaciales.

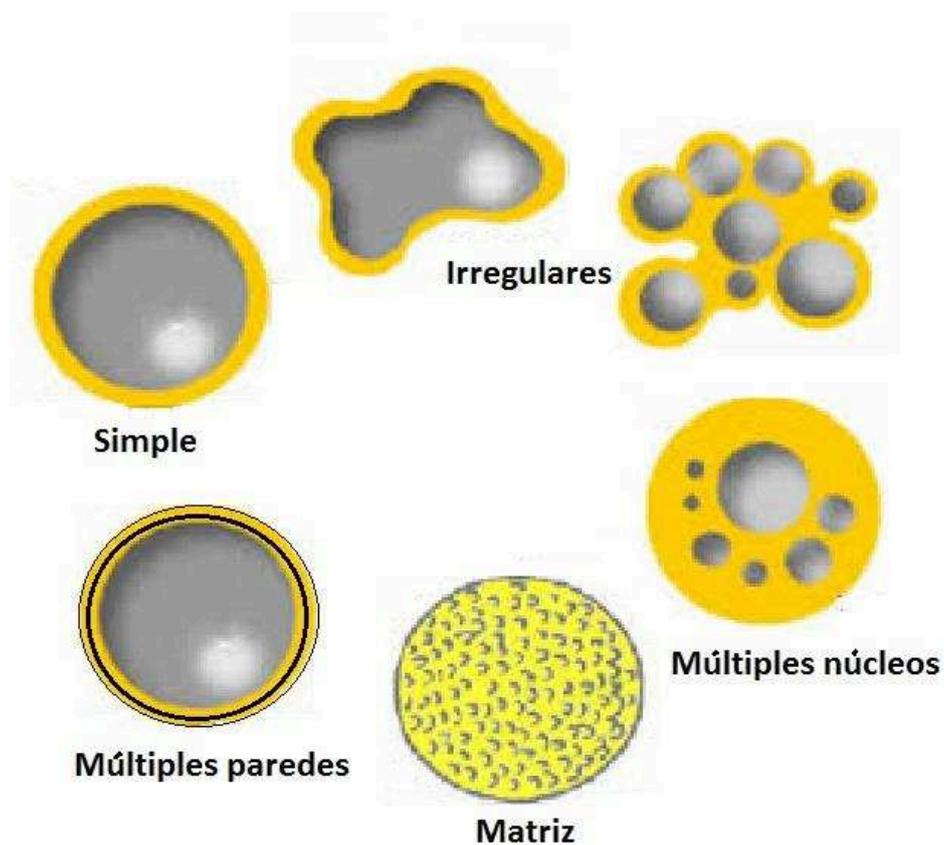


Figura 14. Estructuras típicas de microcápsulas.

Un compuesto utilizado en muchos trabajos para evaluar la eficiencia de encapsulación estabilidad a la oxidación ha sido el limoneno. Este compuesto es un terpeno, que se extrae del aceite de las cáscaras de los cítricos y que da el olor característico a los mismos. El limoneno presenta cierta inestabilidad oxidativa degradándose en varios compuestos (Figura 15).

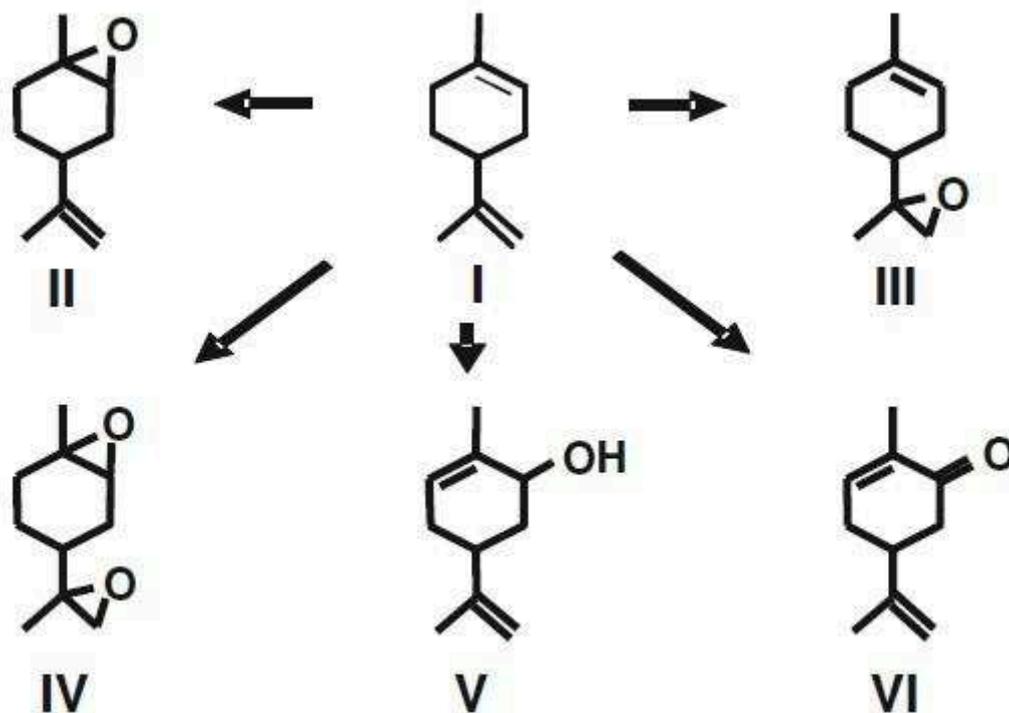


Figura 15. Productos de oxidación del limoneno (I); 1,2 epoxi-limoneno (II); 8,9 epoxi-limoneno (III), 1,2-8,9 diepoxi-limoneno (IV); Carveol (V) y Carvona (VI) (Pena y col., 2012).

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de reemplazar a la GA por la GB en técnicas de microencapsulación de aromas, Defain-Tesoriero y col. (2004) estudiaron comparativamente a la GB y la GA en el proceso de microencapsulación por coacervación compleja empleando como proteína a la gelatina. Observaron que las micropartículas obtenidas con GB-gelatina eran de mayor tamaño y tendían a aglomerarse al compararlas con las micropartículas obtenidas con GA-gelatina. Sin embargo al disminuir la concentración de las soluciones de GB, se obtuvieron, micropartículas semejantes a aquellas obtenidas con GA, de un tamaño de aproximadamente 10 μm . A partir de estos estudios, se vio la posibilidad de sustituir a la GA con la GB en distintos procesos de microencapsulación.

1.10. Modificación de gomas

En general, las gomas naturales son preferibles a los materiales sintéticos comparables debido a su ausencia de toxicidad, bajo costo y disponibilidad. Sin embargo, hay ciertos problemas asociados con el uso de gomas naturales. Estos incluyen las tasas de hidratación, la solubilidad dependiente del pH, alta viscosidad, la caída de la viscosidad en el almacenamiento, y la posibilidad de contaminación microbiana. La modificación de las gomas no solo minimiza estos inconvenientes sino que también cambia su respuesta ante el calor o el frío, mejora su textura y/o el rendimiento de sus propiedades funcionales pudiendo adaptarlas a usos específicos en un alimentos u otros productos. Se han utilizado diversas estrategias para la modificación, incluyendo métodos químicos, físicos o enzimáticos, sin contar los métodos biotecnológicos.

Una modificación química utilizada es la carboximetilación que aumenta la hidrofiliidad y solubilidad en agua de las gomas y clarifica las soluciones de las mismas. Ejemplos de esta modificación son la goma guar derivatizada con ácido monocloroacético para producir goma guar carboximetilada (CMGG) (Thimma y Tammishetti, 2001) y la goma de cashew carboximetilada (Silva y col., 2004). Otra modificación conocida es la modificación de almidones mediante la introducción de grupos monofuncionales (hidroxipropilo, octenilsuccínico, acetilo, etc.) que actúan como agentes de bloqueo tridimensional para mejorar las propiedades gelificantes (López y col., 2004).

Entre los métodos para modificaciones físicas se encuentran el tratamiento térmico, el uso de ultrasonido, la homogeneización a alta presión, entre otros.

La goma arábica ha sido modificada mediante tratamiento térmico obteniéndose mejoras notables en su capacidad emulsionante (Al-Assaf y col., 2007). El producto formado

por este proceso, denominado Acacia (sen) SUPER GUM™, tiene una estructura en la que el componente de alto peso molecular de la goma arábiga, el AGP, se encuentra en mayor proporción, y en consecuencia esta goma modificada posee mejores propiedades emulsionantes según lo demostrado por Al-Assaf y col. (2003a), Al-Assaf y col. (2007) y Hayashi (2002).

La tecnología de ultrasonido (US) de alta intensidad ha cobrado importancia en las últimas décadas como método para la modificación de polímeros, ya que no sólo representa una rápida, eficiente y fiable alternativa para mejorar las propiedades, sino que también tiene potencial para desarrollar nuevos productos con una funcionalidad única. El efecto del US se relaciona con la cavitación, calentamiento, agitación dinámica, tensiones de cizallamiento y turbulencia (Arzeni y col., 2012). La aplicación de ultrasonidos de alta intensidad es cada vez más estudiada para modificar biopolímeros y la mayoría de los trabajos se centran en la capacidad de ultrasonido para despolimerizar polisacáridos tales como dextranos, goma xántica, λ -carragenina, quitosano y almidón, lo que repercute en la masa molar relativa, el peso molecular, la despolimerización, y por lo tanto, en sus propiedades funcionales (Iida y col., 2008; Kardos y Luche, 2001; Li y Feke, 2015; Lorimer y col., 1995). Kardos y Luche (2001) encontraron que el ultrasonido ofrece un potencial importante para la conversión de hidratos de carbono poliméricos a moléculas de menor peso con utilidades específicas.

La modificación de polímeros mediante homogenización de alta presión ha sido aplicada principalmente a proteínas para mejorar sus propiedades emulsionantes. Se ha visto que la aplicación de esta técnica produjo desnaturalización y despolimerización en proteínas de soja lo que aumento su capacidad emulsionantes (Molina y col., 2004). En otro

estudio, la homogenización causó la agregación de las proteínas de lupino lo que también mejoró sus propiedades emulsionantes (Chapleau y Lamballerie-Anton, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar desde un punto de vista básico y aplicado las características fisicoquímicas, reológicas y funcionales de goma Brea (GB), así como también el efecto de distintos tratamientos sobre sus propiedades emulsionantes y microencapsulantes.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar las características fisicoquímicas de GB en relación a sus fracciones (hidratos de carbono y proteínas).
- Evaluar las propiedades reológicas en solución acuosa de GB.
- Analizar las propiedades microencapsulantes de GB aplicando métodos basados en emulsión.
- Evaluar la aplicación de diferentes tratamientos: térmicos y por ultrasonido, para mejorar las propiedades emulsionantes y microencapsulantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El exudado de GB se obtuvo de árboles de la zona cercana a la ciudad de Salta y fue donada por el Proyecto Promoción de la Brea como Producto forestal no maderero para el desarrollo sostenible de las comunidades Wichí y Criollas del Chaco Salteño.

La GA fue provista por Colloïdes Naturels International (Rouen, France). Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron grado analítico y calidad HPLC.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificación de la Goma Brea

La goma Brea cruda fue purificada siguiendo los siguientes pasos generales: disolución en agua, filtración, liofilización y trituración.

Se preparó una solución al 15 % m/m del exudado de GB pesando la cantidad correspondiente y agregando luego agua ultra-pura, Mili-Q, se favoreció su disolución mediante el empleo de un agitador magnético. La disolución se completó tras 24 hs. Luego se efectuó la separación del material grueso filtrando a través de un tamiz y posteriormente se filtró mediante vacío a través de un filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro. Las muestras de GB purificadas se secaron por liofilización (Flexy-dry TM, SP Scientific, Stone Ridge, EU) y se molieron hasta conseguir un polvo fino.

3.2.2. Composición centesimal

La composición centesimal fue determinada mediante técnicas estandarizadas para alimentos (AOAC, 1995), por triplicado tanto para la GB como para la GA, a fin de poder compararlas. Se determinó humedad, materia grasa, proteínas, cenizas y carbohidratos (por

diferencia de los anteriores). Para la determinación de proteínas se utilizó un factor de 6,6 (Al-Assaf y col., 2005b).

3.2.3. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

La concentración de compuestos fenólicos totales fue medida de acuerdo con el método descrito por Castel y col. (2014). A 100 µl de las soluciones de GB cruda (18,13 %), GB clarificada (12,9 %) y GA (16,48 %) se le agregaron 2 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio 2%. Después de dos minutos, se agregaron 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu disuelto en agua (1:1), se agitó vigorosamente en Vortex y se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm contra el blanco de reacción en un espectrofotómetro Lambda 20, Perkin Elmer. La curva de calibración fue realizada con ácido gálico disuelto en agua en concentraciones de 0,002 - 0,12 g/ml.

3.2.4. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

La actividad antioxidante de GB, GB tratada térmicamente y GA fue medida contra el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), según lo descrito por Thaipong y col. (2006). Se preparó una solución stock de DPPH (24 mg de DPPH/100mL de metanol) que se almacenó a -20 °C hasta su uso. A partir de esa solución se preparó una solución de trabajo mezclando 8,6 ml de solución stock con 50 ml de metanol. Las soluciones de goma (10% p/p) (150 µl) reaccionaron con 2,9 ml de la solución de trabajo de DPPH por 24 horas en oscuridad. La absorbancia a 515 nm fue medida en espectrofotómetro Lambda 20, Perkin Elmer. Los análisis fueron realizados por triplicado. Se realizó una curva patrón con Trolox ((R)-(+)-6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid, 98 %) disuelto en metanol

en concentraciones de 25 a 1558 μM . La actividad antioxidante se expresó en mg equivalente de Trolox (ET)/ g de muestra.

3.2.5. Fraccionamiento de la Goma brea

Las técnicas analíticas de esta sección fueron realizadas en el Departamento de Ciencias de Alimentos de la Universidad de Tennessee, Estados Unidos, bajo la supervisión del Dr. Federico Harte.

3.2.5.1. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (FPLC-HIC)

La cromatografía de interacción hidrofóbica fue usada para separar la GB en varias fracciones. Se usó un sistema FPLC ÄKTA (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) equipado con una columna HiTrap phenyl HP (1ml) y una computadora con el programa UNICORN (versión 3.2) para controlar la unidad de separación. La columna fue pre-equilibrada con buffer de unión (50 mM fosfato de sodio/ 1,0 M sulfato de amonio, pH 7, filtrado a través de una membrana de 0,45 μm). Se inyectaron 50 ml de una solución de GB al 0.001 g/ml en buffer de unión. La fracción de GB que no fue retenida por la columna fue recolectada como Fracción 1. La fracción adsorbida en la columna fue eluída con un gradiente de elución comenzando con 100% de buffer de unión incrementando gradualmente el buffer de elución (50 mM fosfato de sodio, pH 7, filtrado a través de una membrana de 0,45 μm) de 0% a 100%. El perfil de elución fue monitoreado con un detector UV a 280 nm y se recolectaron fracciones de 2 ml las cuales fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis.

3.2.5.2. Cromatografía de filtración en gel (GPC)

La distribución de masas moleculares (MM) de cada fracción separada por FPLC-HIC fue analizada por GPC en un módulo Waters 2596 con un set de dos columnas Ultrahydrogel 500 y 2000 (Waters, Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Se utilizó una solución de 0,05 M NaNO₃ a 25 °C como eluyente y se mantuvo un flujo de 1 ml/min. El perfil de elución fue monitoreado con dos detectores simultáneamente: un detector UV-visible a 280 nm para detectar proteínas y un detector de índice de refracción (IR) para detectar polisacáridos. Una alícuota de 100 µl de una solución de GB de 25 mg/ml fue inyectada en la columna.

Las MM de los picos de IR fueron estimadas a partir de una curva de calibración preparada con estándares de pululano Shodex (Showa Denko, Munich, Alemania): P-5 (MM=6,0 kDa), P-10 (MM=10,0 kDa), P-20 (MM=21,7 kDa), P-50 (MM=48,8 kDa), P-100 (MM=113,0 kDa), P-200 (MM=210,0 kDa), P-400 (MM= 366,0 kDa) y P-800 (MM=805,0 kDa).

La ecuación lineal resultante de la curva de calibración fue:

$$\text{Log MM} = -0,1838 t + 8,7167 \quad (r^2 = 0,9969) \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde: t es el tiempo de elución en minutos y MM es la masa molecular aparente en kDa.

3.2.5.3. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (FPLC-SEC)

La cromatografía de exclusión molecular fue llevada a cabo en condiciones nativas y desnaturalizantes usando un equipo FPLC ÄKTA (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)

equipado con una columna Superdex 200 PG (GE Healthcare), un detector UV-visible operando a 280 nm y un *loop* de muestra de 2 ml. Para realizar la experiencia en condiciones nativas, la GB fue disuelta al 10% (p/p) en buffer de elución (0,15 M NaNO₃, filtrado a través de una membrana de 0,22 µm) y aplicada a la columna. La muestra fue eluída isocráticamente con el buffer de elución con un flujo de 0,3 ml/min. Para la experiencia en condiciones desnaturizantes, la GB fue disuelta al 10% (p/p) en buffer desnaturizante (0,15 M NaNO₃, 10 mM ditiotreitól (DTT), filtrado a través de una membrana de 0,22 µm). La muestra fue aplicada en la columna y eluída con un flujo de 0,3 ml/min.

3.2.5.4. Determinación del contenido de proteínas en las fracciones

El contenido total de nitrógeno de cada fracción separada por FPLC-HIC fue determinado por el método de combustión Dumas (ISO 14891/IDF185) usando un analizador TruMacR N (Leco, St. Joseph, Michigan, Estados Unidos). El contenido de proteínas se calculó utilizando un factor de conversión de 6,6 y se informó el promedio de triplicados.

3.2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las electroforesis se realizaron utilizando geles prefabricados de 12% TRIS-HCl de 10 pocillos (Biorad, Hercules, California, Estados Unidos). Las muestras fueron disueltas en buffer de siembra (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, glicerol, 10% (p/v) SDS, β-mercaptoetanol, 0,5% (p/v) azul de bromofenol en agua) (FisherScientific, Fair Lawn, New Jersey, Estados Unidos) y calentadas a 95 °C por 5 min. Se sembraron 35 µL de muestra en cada pocillo y se realizó la

corrida a voltaje constante de 200 volts por 50 min con buffer de corrida (25 mM Tris- base, 192 mM glicina, 1% (p/v) SDS, pH 8,3). Los geles fueron revelados con el colorante Coomassie blue o con el kit de colorante de plata Bio-Rad (Bio- Rad, code 161-0449, Steinheim, Germany) de acuerdo a la concentración de proteínas.

La masa molecular (MM) de las proteínas fue estimado usando los siguientes estándares: miosina (200,0 kDa); β -galactosidasa (116,25 kDa); fosforilasa b (97,4 kDa); albúmina sérica bovina (66,2 kDa); ovoalbúmina (45,0 kDa); anhidrasa carbónica(31,0 kDa); inhibidor de tripsina (21,5 kDa); lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) (Bio- Rad, Steinheim, Alemania).

3.2.7. Caracterización reológica de las soluciones de Goma brea

Se realizaron test rotacionales con un equipo HAAKE RS80- Rheo stress (Haake Mess - Technik GmbH, Alemania), con una geometría de cono (4°) y plato de 40 mm de diámetro, dejando 1 mm de separación entre cono y plato. Se registraron los valores de viscosidad aparente variando la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de 0,1 a 100 s⁻¹. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se estudió la influencia de distintos factores:

Efecto de la concentración de goma: Se midió la viscosidad aparente a 20 ± 0,2°C de soluciones de GB y GA en concentraciones de 2, 5, 10 y 15% (p/p) en agua ultra pura Milli-Q.

Efecto de la temperatura: Se midió la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% (p/p) y pH 7 a temperaturas de 20, 40 y 60°C.

Efecto del Cloruro de Sodio: Para evaluar el comportamiento en presencia de cationes monovalentes, se prepararon soluciones de las gomas al 10% (p/p) con 40 y 100 mM de NaCl y se determinó la viscosidad aparente de las mismas a 20 ± 0,2°C.

Efecto del pH: Se midió la viscosidad y el pH a $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ de las soluciones de las gomas al 10% (p/p) en presencia de 0,05 y 0,15 ppm de glucono- δ -lactona (GDL).

Efecto del tratamiento térmico: Para evaluar la estabilidad del hidocoloide después de un calentamiento se preparó una solución de GB al 10 % y se calentó por 30 min a 90°C , luego se determinó la viscosidad aparente a $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Evaluación de la tixotropía: Se determinó la viscosidad aparente a $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ de soluciones de GB a pH 4,4 (pH de la GB disuelta) y a pH ajustado a 7,0 con rampa de deformación ascendente ($0,1$ a 100 s^{-1}) y descendente (100 a $0,1 \text{ s}^{-1}$).

Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Sisko (1985), por regresión no lineal utilizando el software OriginPro 8.

3.2.8. Determinación de la capacidad emulsionante de la Goma brea

3.2.8.1. Preparación de las emulsiones

La GB fue disuelta en concentración de 5%, 10% y 20% p/p en agua ultrapura Milli-Q con 0,01% p/p de azida sódica para evitar el desarrollo microbiano. Las soluciones fueron agitadas a temperatura ambiente hasta la completa disolución de la goma y dejadas en reposo 24 horas para garantizar la completa hidratación de las molecular poliméricas. Posteriormente, las soluciones se conservaron a 4°C hasta su utilización. El mismo procedimiento fue llevado a cabo para preparar las soluciones de GA al 20% p/p.

Las emulsiones fueron preparadas mediante un método de dos pasos:

(a) Inicialmente, se obtuvieron pre-emulsiones mezclando 10% p/p de aceite de maíz (calidad alimenticia) comercial (Mazola®) o (R)-(+)-Limoneno con 97% de pureza (Sigma

Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), según el caso, con 90% p/p de solución acuosa de goma utilizando un homogeneizador Omni mixer (Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Connecticut, Estados Unidos) por 5 min a 5000 rpm.

(b) Las pre-emulsiones fueron sonicadas utilizando un procesador ultrasónico de 20 KHz (Sonics and Materials VCX-750, Newton, Connecticut, Estados Unidos) a 75% de amplitud por 2 min con control de temperatura máxima de 30 °C. Se empleó una sonda de aleación de titanio de 13 mm de diámetro. Las emulsiones fueron sonicadas en un baño de hielo para evitar su calentamiento.

Este método de emulsificación fue optimizado por ensayos previos y también fue utilizado para preparar las emulsiones con GB tratadas térmicamente utilizando soluciones de gomas al 10% p/p.

3.2.8.2. Determinación del tamaño de gota

La distribución de tamaño de gota fue determinada mediante retrodispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido) a 25 °C. Las medidas fueron llevadas a cabo luego de la dilución apropiada de las emulsiones con agua ultrapura Milli-Q. El diámetro promedio de las gotas de las emulsiones (*Z-average*) y el índice de polidispersidad (PDI) fueron automáticamente calculados por el equipo como el promedio de diez medidas por muestra.

3.2.8.3. Medición del potencial Zeta

El potencial zeta (ζ) de las emulsiones fue determinado utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las emulsiones fueron diluidas apropiadamente con agua ultrapura Milli-Q, y luego fueron inyectadas en la cubeta para medición de movilidad electroforética. El equipo calculó automáticamente el potencial- ζ midiendo la dirección y la velocidad del movimiento de las gotas en un campo eléctrico aplicado. La medida fue llevada a cabo cinco veces por muestra para obtener un potencial- ζ promedio y una desviación estándar.

3.2.8.4. Microscopía óptica

La microestructura de las emulsiones fue visualizada mediante un microscopio óptico convencional (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara fotográfica. Una gota de la emulsión recién preparada se colocó entre un porta y un cubreobjetos y se observó con un aumento de 40x. Durante la observación, se seleccionaron varios campos y se tomaron fotografías de los más representativos.

3.2.8.3. Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones se evaluó con un analizador vertical de dispersiones coloidales Turbiscan MA 2000 (Formulaction, Tolouse, Francia), que permite evaluar la desestabilización global de emulsiones, suspensiones y espumas sin dilución, con tamaños de partícula entre 0,05 a 5000 μm . El principio de funcionamiento de este equipo es el siguiente: una fuente de luz la cual se compone de un diodo electro luminiscente en el infrarrojo cercano ($\lambda_{\text{air}} = 850 \text{ nm}$) incide sobre el tubo de vidrio que contiene la muestra y

dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° de la luz incidente, sensor de Transmisión), y la luz retrodispersada por la muestra (45° de la radiación incidente, detector de backscattering (BS) o retrodispersión) como se muestra en la Figura 16. Este equipo trabaja en modo de escaneo: la cabeza de lectura óptica escanea a lo largo del tubo (el cual contiene la muestra) en una longitud máxima de 80 mm, adquiriendo los datos de transmisión y retrodispersión cada $40\ \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos son presentados mediante un software como curvas correspondientes al flujo de luz transmitida (T %) y retrodispersada (BS %) en porcentaje relativo a un estándar de calibración (suspensión de esferas monodispersas y aceite de silicona) como una función de la altura del tubo en mm. La adquisición de datos puede repetirse a lo largo del tiempo de una forma programada y los resultados son expresados en función del tiempo. El análisis de los perfiles de T % y BS % obtenidos permite determinar la cinética para un dado mecanismo de desestabilización (cremado o coalescencia) si se elige adecuadamente la zona del tubo (Pan y col., 2002).

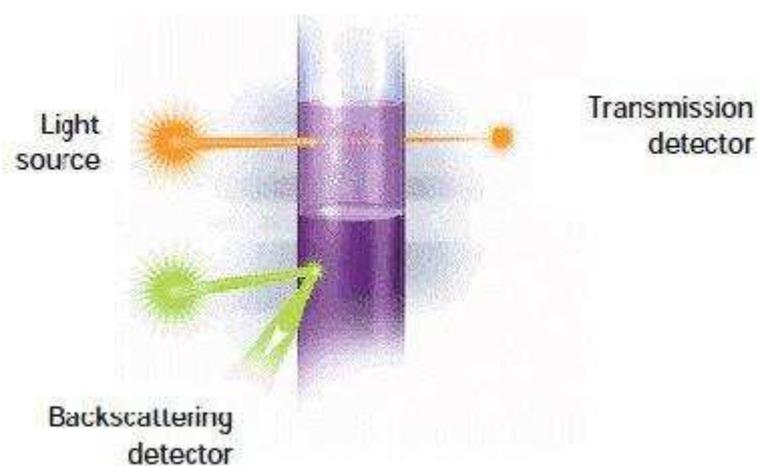


Figura 16. Principio de funcionamiento del Turbiscan

Fuente: Formulaction S.A. (2014).

Las emulsiones pueden sufrir tres fenómenos principales de inestabilidad que transcurren simultáneamente: Cremado, donde las partículas se concentran en la superficie; Floculación, donde las partículas se adhieren sin fusionarse y Coalescencia, donde las partículas se funden y forman partículas más grandes.

Evolución de la retrodispersión o backscattering (BS), permite obtener el BS en función de la longitud del tubo en cada escaneo realizado a distintos tiempos, dichos datos proporcionan una medida de variación del tamaño de partícula que se corresponde con la floculación y/o coalescencia durante el almacenamiento de las emulsiones. El software también permite visualizar esto como Delta de BS según sea conveniente.

Espesor del pico de cremado: con este análisis se puede obtener la evolución del pico de cremado en la parte inferior del tubo, registrándose en el equipo perfiles en transmisión o en backscattering dependiendo de si se trata de una muestra translúcida u opaca, respectivamente.

Debido a que las emulsiones eran opacas se estudió la desestabilización analizando el perfil del Delta de backscattering ($\Delta\%BS$) donde se observa un aumento del espesor del pico de cremado en función del tiempo, como resultado de la acumulación de partículas en la parte superior de la emulsión. De la gráfica del espesor del pico en función del tiempo se estimó una medida de la velocidad inicial de cremado (v_i) mediante el cálculo de la pendiente de la curva a los primeros tiempos por una regresión lineal. Por otro lado, se tomó el tiempo en que se desestabiliza el 5 % de la emulsión como el Tiempo de retardo en minutos.

Para todos los ensayos 7 mL de muestra fueron transferidos a los tubos de vidrio del equipo, y se registraron medidas de Retrodispersión de luz y de Transmitancia en función del tiempo, durante un período de 7 días. Para visualizar mejor los cambios producidos en

los sistemas evaluados, fue conveniente trabajar en modo de referencia ($\Delta\%BS$ o $\Delta\%T$), donde los valores de la primera curva (curva de referencia a $t=0$) se sustraen de las subsiguientes. De esta manera pueden analizarse mejor las variaciones producidas en relación al estado inicial. Los perfiles obtenidos para cada sistema se analizaron empleando el software del equipo y de allí se obtuvo el índice de cremado (IC), expresado como:

$$\text{Índice de cremado} = (H_S/H_T)*100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde H_S : altura de la fase suero, H_T : altura total de la emulsión (Gu y col., 2007), como un parámetro de la desestabilización global de las emulsiones luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

3.2.9. Determinación de las propiedades reológicas de las emulsiones

Se realizaron test rotacionales con un equipo HAAKE RS80- Rheo stress (Haake Mess - Technik GmbH, Alemania), con una geometría de cono (4°) y plato de 40 mm de diámetro, dejando 1 mm de separación entre cono y plato. Se registraron los valores de viscosidad aparente variando la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de 0,1 a 100 s^{-1} . Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.10. Obtención de microcápsulas por secado por aspersión

Las emulsiones fueron secadas en un secador por aspersión escala laboratorio (Spray Dryer, ADL311 Yamato, Japón). Las condiciones de trabajo fueron seleccionadas mediante ensayos previos para un adecuado secado del material y funcionamiento del equipo:

temperatura de entrada del aire de secado de 150 ± 1 °C, temperatura de salida de 80 ± 1 °C, presión del atomizador 0,1 MPa y flujo de alimentación del producto de 2,7 g/min.

3.2.10.1. Morfología de las microcápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología y la microestructura de las microcápsulas obtenidas fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning Electronic Microscopy) utilizando un microscopio JEOL modelo JSM-35C (Tokio, Japón). Para esto, los polvos fueron colocados en los tacos portamuestras utilizando cinta con doble cara adhesiva y luego fueron cubiertos con una delgada película de oro para asegurar la conductividad superficial.

Se realizaron observaciones con objetivos de 1000x, 3000x y 10000x. Se obtuvo un rango aproximado de tamaño de partícula midiendo los diámetros de las partículas con el programa ImageJ 1.48v. Se capturaron varias micrografías de cada muestra para lograr una medida representativa de la muestra.

3.2.10.2. Morfología de las microcápsulas por Microscopía Confocal

Las microcápsulas fueron observadas mediante microscopía confocal para observar su microestructura interna utilizando un microscopio confocal Leica SP8 Compact.

Para esto, los polvos fueron colocados entre un cubre y un portaobjeto y luego fueron cubierto con aceite de inmersión.

Se realizaron observaciones utilizando diferentes láseres de 488 nm, 514 nm, 552 nm y 638 nm. Y se utilizaron dos detectores, detector 1: con detección entre 498 y 542 nm, y detector 2: con detección entre 562 y 632 nm. Para lograr las imágenes se restaron de las

imágenes obtenidas con laser de 552 nm y detector 2, donde fluoresce la GB y el limoneno, las imágenes obtenidas con laser 488 nm detector 1, donde fluoresce sólo la GB. Para esto se utilizó el software de procesamiento de imágenes ImageJ 1.48V. Se capturaron varias micrografías de cada muestra para lograr una medida representativa de la muestra.

3.2.10.3. Determinación del contenido de humedad y la actividad de agua.

La actividad de agua de los polvos obtenidos se determinó en un equipo Aqualab Systems (Washington, Estados Unidos) a temperatura ambiente ($25 \pm 0,1$ °C). Para determinar el contenido de humedad se colocó 2 g de polvo en una estufa de vacío a 70 °C durante 24 h. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de pesada (Jafari y col., 2008a).

3.2.10.4. Análisis de color

El análisis de color de las muestras se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta Modelo 508d que aplica el sistema CIELAB, definido en coordenadas rectangulares (L^* , a^* , b^*). Se utilizó un iluminante D65 (luz solar atardecer) y un ángulo de observador de 10° . Las muestras fueron sometidas a compresión durante 5 s con un peso de 1 kg antes del análisis. Los parámetros: L^* (luminosidad de la muestra) varía entre 0 (negro) y 100 (blanco), a^* indica la contribución de rojo (+) y verde (-) y el parámetro b^* muestra la contribución del amarillo (+) y azul (-) (Figura 17).

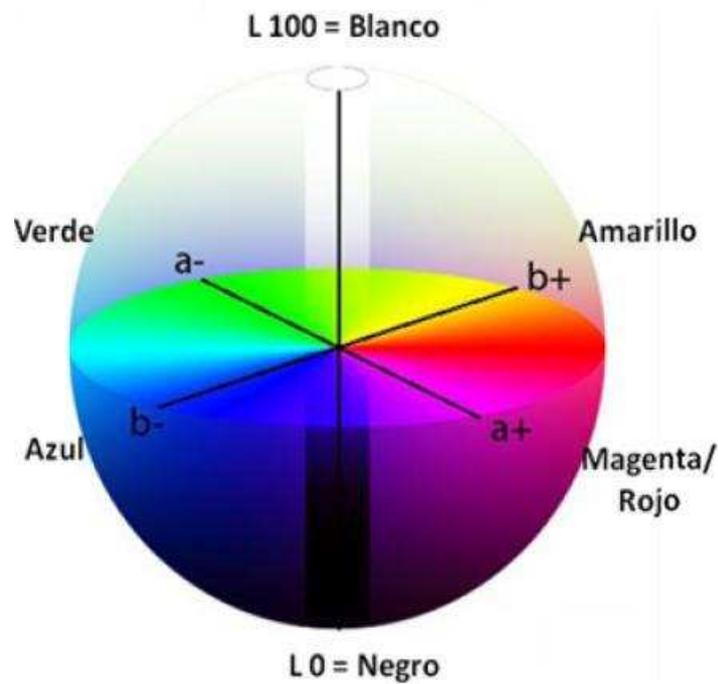


Figura 17. Coordenadas rectangulares L^* , a^* y b^* CIE Lab 1979 (imagen extraída y adaptada de internet: <http://sobrecolors.blogspot.com.ar>).

3.2.10.5. Determinación de aceite libre

El aceite libre de las microcápsulas fue determinado de acuerdo al método de Klinkesorn y col. (2006) con algunas modificaciones. La extracción del aceite libre se llevó a cabo a partir 2,5 g de polvo con 15 mL de éter de petróleo. La mezcla fue agitada manualmente durante 2 min y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se filtró a través de un papel de filtro Munktel 00R y se recuperó en un balón de destilación. El hexano se evaporó en un evaporador rotatorio a 70°C y el extracto libre de solvente se secó en estufa a 105°C, hasta pesada constante. El contenido de aceite libre se calculó por gravimetría.

3.2.10.6. Determinación de aceite total

El contenido de aceite total fue determinado de acuerdo al método de Klinkesorn y col. (2006) con modificaciones. La emulsión se reconstituyó mezclando 4 mL de agua ultrapura Milli-Q con 0,5 g de polvo, agitando hasta la completa disolución. Luego, se agregaron 25 mL de una mezcla hexano/isopropanol (3:1) y se agitó durante 10 min en vortex. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. La fase orgánica se filtró a través de un papel de filtro Munktel 00R y se recuperó en un balón de destilación. Se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio a 70°C y el residuo se secó en estufa a 105°C, hasta pesada constante. El contenido de aceite total se calculó por gravimetría.

3.2.10.7. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) fue calculada a partir de la relación entre la cantidad de aceite encapsulado y el aceite total presente en los polvos:

$$EE (\%) = \frac{[\text{Aceite Total } (\frac{\text{g}}{100\text{g polvo}}) - \text{Aceite libre } (\frac{\text{g}}{100\text{g polvo}})] \times 100}{\text{Aceite total } (\frac{\text{g}}{100\text{g polvo}})}$$

3.2.10.8. Estabilidad de las microcápsulas

La estabilidad de las microcápsulas de limoneno frente a la degradación oxidativa se analizó por un período de 100 días de acuerdo a Beristain y col., (2002). Las microcápsulas

se almacenaron en envases adecuados, sellados herméticamente, que contenían soluciones saturadas de LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, y NaCl (Método isopestico). Estos envases se colocaron en estufa a 50 °C lográndose en su interior actividades de agua (aw) de 0,112, 0,304, 0,488 y 0,749 respectivamente (Ascheri y Bastos, 2015).

Semanalmente, se retiró un set de muestras y fueron analizadas inmediatamente o almacenadas en envases herméticos a -18 °C hasta el momento del análisis.

La degradación del compuesto D-limoneno se evaluó midiendo su concentración. Para esto, 0,15 g de polvo se dispersaron en 0,85 g de agua ultrapura Milli-Q en un vial con tapa rosca, luego se agregaron 4 mL de una solución de 1 mg/mL de ciclohexanol (estándar interno) en acetona y se agitó la mezcla en vortex por 30 seg. Luego, una alícuota del sobrenadante, previamente filtrado con membrana de nylon (0,2 µm), fue inyectada en un cromatógrafo de gases acoplado a con un espectrómetro de masas (GC-MS) (Cromatógrafo gaseoso Perkin-Elmer Clarus 600). El sistema GC-MS consistió en un espectrómetro de masa de captura iónica, equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico (EI), controlado con un detector espectrométrico de masa. Una columna capilar 0,25 mm; 25 µm espesor de película fue usada con gas helio a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La columna en el horno fue inicialmente colocada a una temperatura inicial de 35 °C por 3 min, calentada a 80 °C a una tasa de 6 °C/min, incrementándose a 280 °C, a una tasa de 20 °C/min y siendo mantenida a 280 °C por 2 min. El tiempo total de análisis fue de 22,5 min. El espectrómetro de masa fue operado en un rango de 40 a 200 a una tasa de scan de 1,00 s/scan. La cuantificación fue realizada por un total de iones (TIC). La detección se llevó a cabo por captura electrónica a 70 eV y la cuantificación se realizó tomando en consideración la corriente gastada por el número total de iones referidos a una curva de calibración de D-limoneno (Aldrich 183164), a una concentración en un rango de 0,2 - 4 µg/mL en una

solución de 1 mg/mL de ciclohexanol en acetona. El coeficiente de correlación fue 0,9986, y el tiempo de retención, fue alrededor de 8,9 y 11,7 min para el estándar interno y limoneno, respectivamente.

3.2.11. Modificaciones de la goma brea

3.2.11.1. Modificación de la goma brea por tratamiento de ultrasonido

Para la modificación de GB por ultrasonido se prepararon soluciones al 10% p/p de GB las que fueron sonicadas utilizando un procesador ultrasónico de 20 Khz (Sonics and Materials VCX-750, Newton, Connecticut, Estados Unidos) a diferentes amplitudes: 50%, 75% y 100% y por diferentes tiempos 2, 15, 30 y 60 min. Se empleó una sonda de aleación de titanio de 13 mm de diámetro.

3.2.11.2. Modificación de la goma brea por tratamiento térmico

La modificación de la goma brea por tratamiento térmico se llevó a cabo en base a lo descrito por Al-Assaf y col., (2007) con modificaciones. Muestras de 10 g de goma brea fueron colocadas en recipientes de vidrio dentro de una estufa a 110 °C y se retiraron a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas.

3.2.11.3. Cromatografía de filtración en gel (GPC)

Las distribuciones de masas moleculares (MM) de las GB modificadas fueron analizadas por GPC en un módulo Waters 2596 con un set de dos columnas Ultrahydrogel 500 y 2000 (Waters, Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Se utilizó una solución de 0,05 M NaNO₃ a 25 °C como eluyente y se mantuvo un flujo de 0,5 ml/min. El perfil de elución fue monitoreado con dos detectores simultáneamente: un detector UV-visible a 280 nm y un detector de índice de refracción (IR). Se inyectaron alícuotas (100 µL) de 25 mg/ml de las GB modificadas.

3.2.11.4. Determinación de reactivo de Schiff y compuestos tempranos de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard está asociada con el desarrollo de compuestos intermediarios, antes de la generación de pigmentos. Según Chawla y col. (2009), estos productos tempranos de la reacción de Maillard absorben a 284 nm. Según Zhu y col. (2008) y Wang y Ismail (2012), a 304 nm absorben las bases de Schiff. Por lo tanto, se tomaron medidas puntuales a estas dos longitudes de onda (284 y 304 nm).

3.2.11.5. Intensidad del pardeamiento (Determinación de compuestos tardíos de la reacción de Maillard).

Los compuestos tardíos de la reacción de Maillard son aquellos se forman en las etapas avanzadas y son los que producen pardeamiento (Ajandouz y col., 2001; Chawla y

col., 2009; Lertittikul y col., 2007). La intensidad de los mismos se determinó mediante medidas puntuales de absorbancia a 420 nm (Jiménez-Castaño y col., 2005; Miralles y col., 2007). Esta medida se relaciona directamente con el progreso que tuvo la reacción de Maillard en las muestras estudiadas.

3.2.12. Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics Centurion XV. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando un nivel de confianza de 0,05 ($p \leq 0,05$) para determinar la significancia. Para la comparación de medias se utilizó el test de LSD.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y REOLOGICA DE LA GOMA BREA

I.1. Composición química de la goma Brea

La composición química porcentual de la GB y la GA se presentan en la Tabla I.1. Se observó que el componente mayoritario en ambas muestras fueron los polisacáridos (82,60% p/p en GB y 84,60% p/p en GA). El contenido de proteína de la GA estuvo en el rango de valores reportados por otros autores para la goma de *Acacia senegal* (Idris y col., 1998; Karamalla y col., 1998; Williams y Phillips, 2000; Renard y col. 2006; Yebeyen y col., 2009). Sin embargo, el contenido de proteína de la GB (7,52% de proteína, 1,14% de N) determinado en este estudio difiere de los valores reportados por otros autores. Bertuzzi y col. (2012) y Slavutsky y col. (2014) reportaron contenidos proteicos menores para GB recolectada en Tartagal en la provincia de Salta, Argentina (5,9% de proteína, 0,95% de N). De Pinto y col. (1993) también encontraron valores de N menores a los de este trabajo en exudados recolectados de diferentes árboles de *Cercidium praecox* de la zona del Golfo de Venezuela (0,5 a 0,9% de N). La GB recolectada en Puebla, México, presentó un contenido de proteína mayor al determinado en este estudio (10,6% de proteína) (Anderson y col., 1990). Las diferencias encontradas en la composición química de GB eran de esperarse ya que los exudados de plantas varían según la zona geográfica de origen, la edad de los árboles, las condiciones climáticas y el suelo (Verbeken y col. 2003).

Tabla I.1. Composición química de la goma Brea y la goma Arábica (% b.h.).

	Goma Brea	Goma Arábica
Proteína ^(a)	7,52 (± 0,09)	2,44 (± 0,27)
Ceniza	4,23 (± 0,09)	3,00 (± 0,11)
Grasa	0,11 (± 0,01)	0,11 (± 0,03)
Compuestos fenólicos	1,25 (± 0,04)	0,20 (± 0,04)
Humedad	4,83 (± 0,13)	9,65 (± 0,10)
Polisacáridos ^(b)	82,06	84,60

^(a) N x 6,6

^(b) Determinado por diferencia de los restantes componentes.

Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar (n=3).

Por otra parte, el contenido de proteínas en GB fue tres veces mayor al de GA. Esta diferencia podría tener un efecto sobre las propiedades interfaciales de la GB comparadas con las de GA. Vernon-Carter y col. (1996) reportaron que la goma Mesquite con un contenido de nitrógeno de 0,49% produjo emulsiones más estables que las producidas con GA con menor contenido de nitrógeno (0,35%). Estos autores sugirieron que el mayor contenido de proteína de la goma mesquite fue la causa por la que ésta presentó mejores propiedades emulsionantes.

El porcentaje de cenizas de la GB determinado en este trabajo (4,23%) está en el rango de valores reportados en estudios previos (Anderson y col. 1990; Bertuzzi y col. 2012; De Pinto y col. 1993; Slavutsky y col. 2014), pero fue mayor al determinado en este trabajo para la GA (3,00%).

El porcentaje de grasa resultó bajo en ambas gomas (0,11%) mientras que el contenido de compuestos fenólicos de la GB (1,25%) fue considerablemente mayor que el de la GA (0,20%). Por un lado, los compuestos fenólicos pueden ser un indicador de la actividad antioxidante del

hidrocoloide, aunque esto va a depender del tipo y concentración de los compuestos fenólicos que estén presentes (Ismail y col., 2004; Nsimba y col., 2008; Ozsoy y col., 2009). Por lo tanto, la GB podría llegar a ser considerada como una fuente de compuestos fenólicos. El consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos ha atraído la atención de los consumidores por su capacidad antioxidante beneficiosa para la salud por retardar el envejecimiento y prevenir el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden ligarse a las proteínas por varios mecanismos resultando en polímeros altamente coloreados. La interacción proteína-fenol, además tiene efectos en la desnaturalización térmica, solubilidad y digestibilidad de las proteínas (Rubino y col., 1996; Bejosano y Corke, 1998; González-Pérez y col., 2002).

I.2. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (FPLC-HIC)

La GB fue separada en diferentes fracciones en función de la hidrofobicidad con el objetivo de separar y caracterizar, por un lado, las proteínas y polisacáridos asociados a éstas, y por otro, las fracciones de polisacáridos de la GB. El perfil de elución monitoreado con un detector UV a 280 nm se muestra en la Figura I.1. Al inicio, se observó un extenso pico de relativa alta absorbancia en UV (Fracción I), indicativo de un gran contenido de proteína en esta fracción que pasa a través de la columna sin ser retenida. Los componentes de esta fracción no se unieron a la columna posiblemente por falta de residuos hidrofóbicos.

Los componentes de la GB que fueron retenidos en la columna se eluyeron mediante un gradiente de concentración de sal (sulfato de amonio) y fueron detectados como un pico ancho

de menor absorbancia relativa a la Fracción I. Estos componentes se recolectaron en 12 fracciones (Fracciones II a XIII) que fueron analizadas posteriormente para determinar la distribución de masas molares (MM).

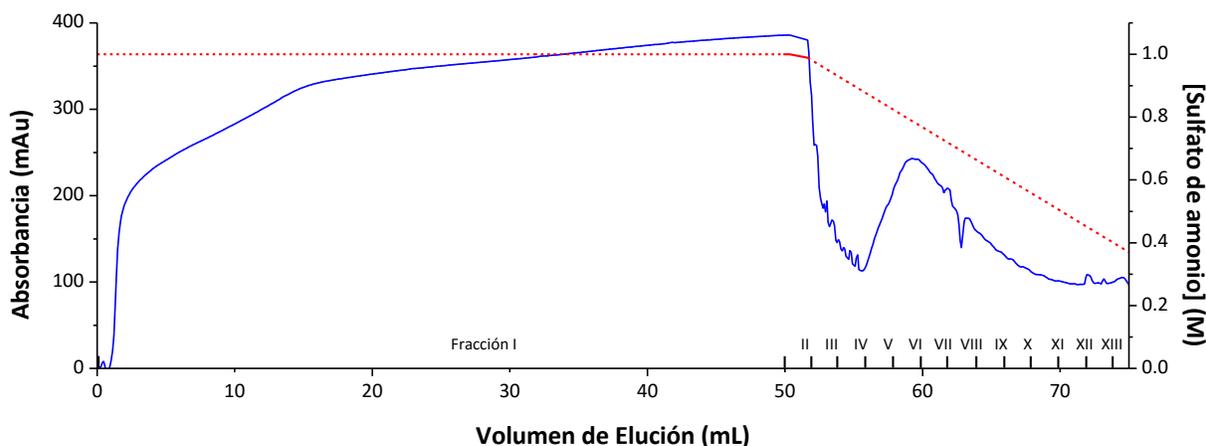


Figura I.1. Perfil de FPLC – HIC de goma Brea (línea continua azul) y concentración de sulfato de amonio (línea discontinua roja).

Cuando la GA fue fraccionada similarmente por cromatografía de interacción hidrofóbica se obtuvieron tres fracciones: una fracción de arabinogalactanos (AG) deficiente en proteínas que representó el 88,4% de la masa total; una fracción de arabinogalactanos-proteína (AGP) que contenía el 50% del total de proteínas y que representó el 10,4% de la masa total, y una fracción de glicoproteínas (GP) con el 25% del total de proteínas que representaba el 1,24% de la masa total (Randall y col., 1988, 1989). Estudios posteriores, en los que se fraccionó la GA por medio de cromatografía de intercambio iónico, mostraron que estas fracciones contenían componentes de diferentes pesos moleculares que eran responsables de la polidispersidad de la GA (Osman y col., 1995).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el fraccionamiento por FPLC-HIC no fue suficiente para separar las diferentes componentes de la GB o para elucidar la distribución molecular de la GB por lo que se recurrió a otras técnicas de fraccionamiento posteriores.

I.3. Cromatografía de Filtración por Gel (GPC) de las fracciones obtenidas por HIC

Las fracciones obtenidas por FPLC-HIC fueron analizadas por GPC y el eluyente fue monitoreado con detectores de índice de refracción (IR) y UV a 280 nm para determinar la distribución de MM de los polisacáridos y proteínas, respectivamente.

Los cromatogramas de dos fracciones típicas se muestran en la Figura I.2. La Figura I.2 A muestra los perfiles de elución de la Fracción I, que son los componentes que pasaron a través de la columna de HIC sin ser retenidos. En el perfil de IR se observaron claramente dos poblaciones de polisacáridos. El primer pico de IR (pico 1) fue detectado a un volumen de elución aproximado de 17,5 mL con una MM equivalente de pululano de $1,92 \times 10^5$, y representó un pequeño porcentaje del total de polisacáridos de la Fracción I (16% determinado por relación de áreas de los picos, suponiendo que todos los polisacáridos tiene el mismo incremento de índice de refracción específico, dn/dc). Al mismo volumen de elución que el pico 1 se observó también un pico de UV. Esto podría indicar una asociación entre los polisacáridos y las proteínas coeluidas, representando un complejo proteína-polisacárido similar a la fracción Arabinogalactanos- proteína (AGP) de la GA.

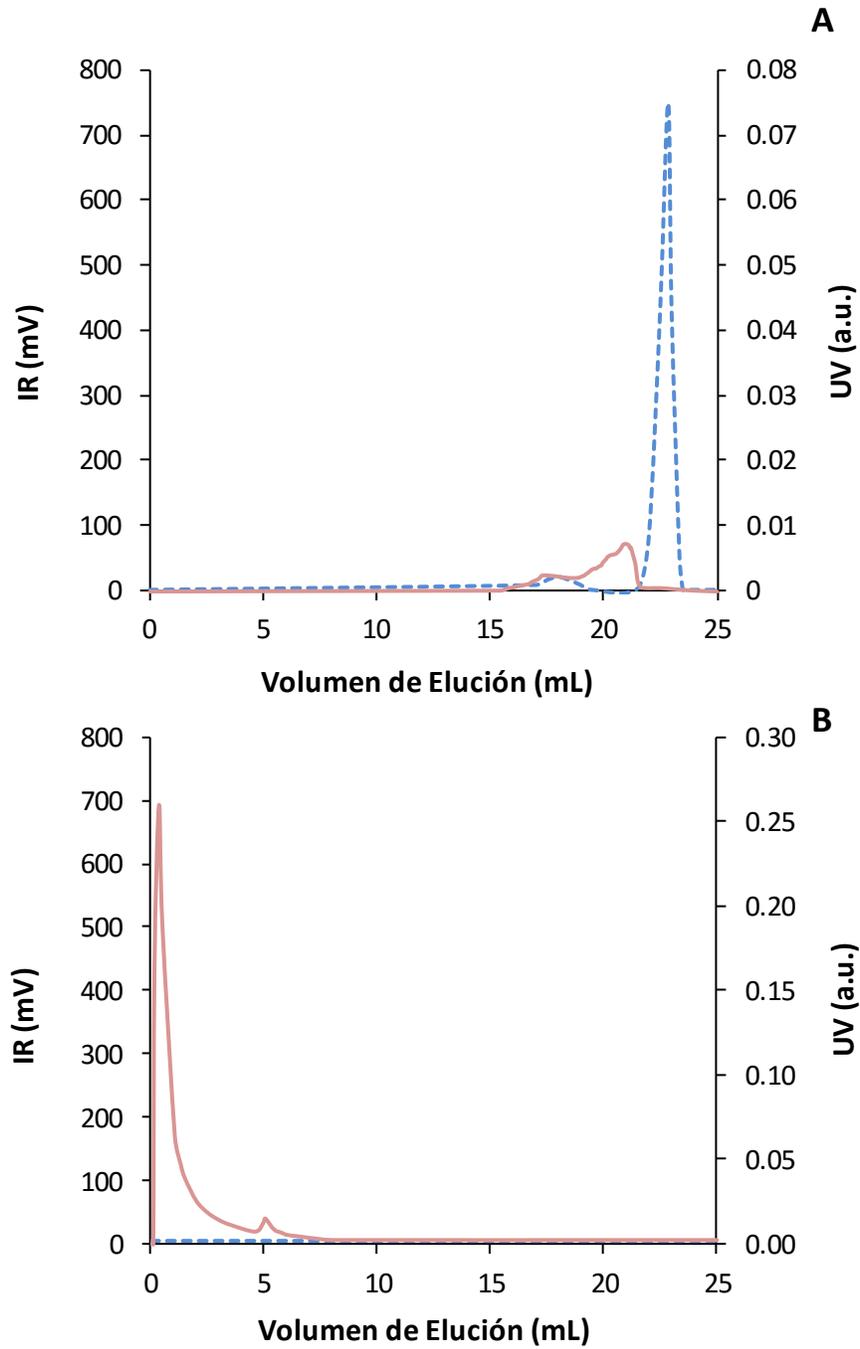


Figura I.2. Perfiles de GPC de las fracciones obtenidas mediante FPLC - HIC (A) fracción I y (B) fracción V monitoreadas por detector UV (línea continua roja) e índice de refracción (línea discontinua azul).

El segundo pico de IR (pico 2) que fue detectado a un volumen de elución de 22,5 mL correspondió a una MM de $2,79 \times 10^3$ (equivalente de pululano) y representó aproximadamente el 84% del total de polisacáridos de la Fracción I (según la relación de áreas de los picos). A diferencia del pico 1, no se observó ningún pico de UV eluyendo al mismo volumen, lo que sugiere que el pico 2 contiene únicamente polisacáridos, siendo similar a la fracción de Arabinogalactanos (AG) de la GA.

Las MM del pico 1, relacionado con la fracción de AGP, y el pico 2, relacionado a la fracción de AG, fueron menores a las MM reportadas para las fracciones de AGP y AG de la GA (Al-Assaf y col. 2005; Connolly y col. 1988; Picton y col. 2000; Randall y col. 1989). Por ejemplo, Randall y col. (1989) reportaron MM de $3,8 \times 10^5$ para la fracción de AG, $1,46 \times 10^6$ para la fracción de AGP y $2,5 \times 10^5$ para GP.

Por otro lado, en el perfil UV de la Fracción I se observó otro pico ancho y poco definido que representa componentes proteicos en un amplio rango de pesos moleculares y que se relacionaría a la fracción de Glicoproteínas (GP) de la GA.

La Figura I.2B muestra los cromatogramas UV y IR de la fracción V como un perfil típico de las fracciones eluidas al disminuir la concentración de sal en el buffer de elución de la HIC. Se observa un pico de intensidad relativamente alta en el perfil de UV a bajo volumen de elución (0,2 mL) que indica la presencia de especies proteicas de alta MM. También se observó otro pico de UV a los 5 mL de elución correspondiente a especies proteicas de menor tamaño relativo. Sin embargo, no se observó ningún pico en el perfil RI de esta fracción, lo que indicaría que la fracción V consiste sólo en especies proteicas. Las demás fracciones presentaron perfiles similares al de la fracción V con la diferencia de que se observa una disminución gradual de la

intensidad del primer pico de UV de la fracción II a la fracción XIII. Esto es consistente con las concentraciones de proteína determinadas para cada fracción (Tabla I.2). Se observa que la Fracción II es relativamente rica en proteínas (0,197%) y que el contenido proteico disminuye progresivamente en las siguientes fracciones eluidas. Por otra parte, la absorbancia relativamente baja observada en el perfil de UV de FPLC-HIC de la fracción I no concuerda con la concentración de proteína determinada (0,168%), esto puede deberse a diferencias en los coeficientes de extinción molar de las diferentes especies proteicas como han informado otros autores (Randall y col., 1988). Entonces, se puede decir que las fracciones II a la XIII consisten en especies proteicas con una distribución de MM bimodal y no contienen polisacáridos (o estarían en concentraciones no detectables). Estas proteínas se diferenciarían en su hidrofobicidad superficial ya que eluyen gradualmente con el gradiente de concentración de sal.

Tabla I.2. Contenido proteico de las fracciones obtenidas por FPLC - HIC.

Fracciones de FPLC-HIC	Volumen (mL)	Contenido de proteína (% p/p)
1	50	0,168
2	2	0,197
3	2	0,180
4	2	0,166
5	2	0,145
6	2	0,125
7	2	0,104
8	2	0,082
9	2	0,060
10	2	0,038
11	2	0,017
12	2	0,002
13	2	0,000

Resumiendo, el análisis de las fracciones obtenidas con HIC identificó una fracción que consiste en proteínas y polisacáridos (fracción I) y otra fracción o grupo de fracciones que consisten sólo en componentes proteicos (fracciones de II a XIII).

I. 4. Fraccionamiento mediante Cromatografía líquida rápida de proteínas de exclusión molecular (FPLC-SEC)

Con el fin de analizar la posible interacción de las especies proteicas por medio de puentes disulfuro se obtuvieron perfiles SEC de la GB bajo condiciones nativas y condiciones reductoras. En el perfil SEC en condiciones nativas (Figura I.3, línea continua) se observaron tres picos. Los dos primeros picos eluyeron en el volumen muerto de la columna, sugiriendo que estos contienen proteínas de alta MM. En contraste con estos picos, el tercer pico observado resultó amplio y de mayor intensidad UV, sugiriendo la presencia de proteínas en un amplio rango de MM. En presencia del agente reductor (DTT) (Figura I.3, línea de puntos), el primer pico observado en condiciones nativas desaparece indicando la ruptura de agregados proteicos de alta MM unidos por puentes disulfuro. A diferencia de éste, el segundo pico observado en condiciones nativas permanece bajo condiciones reductoras, lo que indicaría que este pico consiste en un monómero proteico de alta MM. Finalmente, el tercer pico observado en condiciones nativas también desaparece y en su lugar eluyen cuatro picos. Estos picos podrían ser proteínas resultantes de la desagregación evidenciando la existencia de agregados proteicos formados por puentes disulfuro.

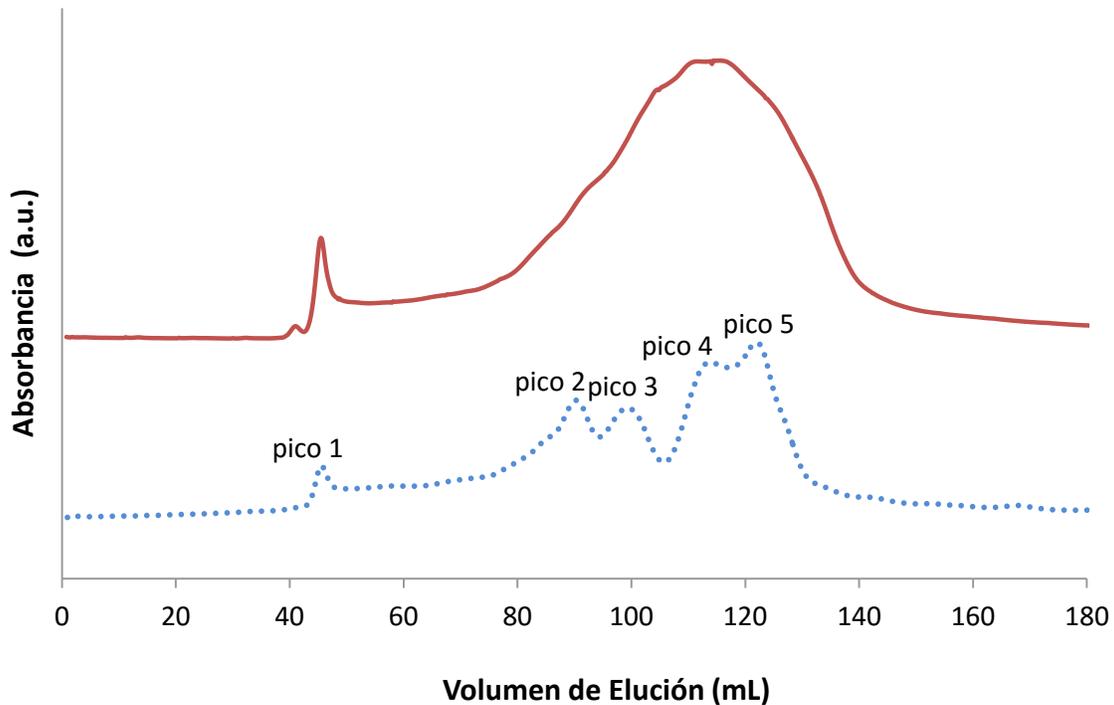


Figure I.3. Perfiles de FPLC - SEC de goma Brea (línea continua roja) y goma Brea en presencia de agente reductor (línea punteada azul).

I.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de la GB nativa y de las fracciones aisladas en SEC bajo condiciones reductoras (picos 1 a 5, Figura I.3) se muestra en la Figura I.4. En la electroforesis de la GB (Figura I.3, línea GB) se detectaron dos bandas proteicas de mayor abundancia relativa a los 36,9 kDa y 6,5 kDa. También se observaron otras bandas menos abundantes correspondientes a MM de 43 kDa, 31 kDa, 25 kDa, 14 kDa y 9 kDa.

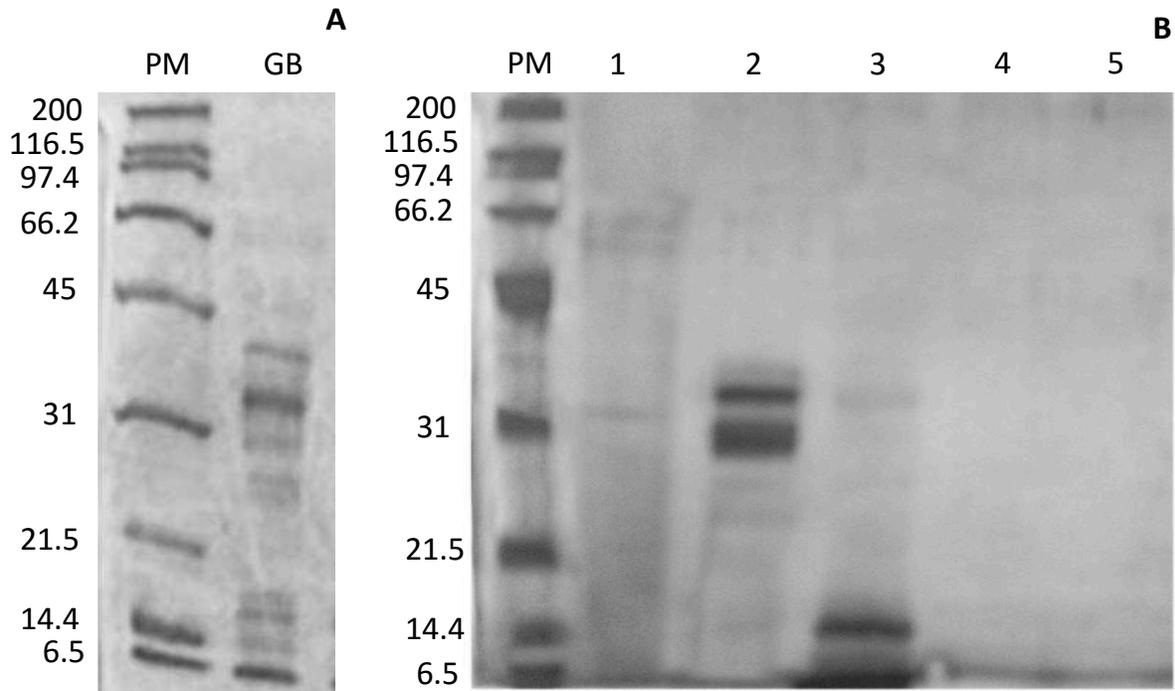


Figura I.4. SDS-PAGE de (A) goma Brea y (B) fracciones de FPLC - SEC: línea 2 -pico 1; línea 3 – pico 2; línea 4 – pico 3; línea 5 – pico 4 y línea 6 – pico 5. PM: estándares de peso molecular.

En comparación, el pico 1 (volumen de elución de 44 a 46 mL) aislado en SEC bajo condiciones reductoras consistió en dos proteínas de aproximadamente 60 y 66 kDa (Figura I.4, línea 1), las cuales se observaron poco abundantes en el perfil electroforético de la GB. El pico 2 (volumen de elución de 90 a 92 mL, Figura I.4, línea 2) incluyó una banda intensa de 36,9 kDa observada previamente en el perfil de GB y otra banda intensa de 31 kDa que aparecía con menor intensidad en la muestra de GB. El perfil electroforético del pico 3 (volumen de elución de 98 a 100 mL) mostró una banda intensa de 14 kDa y varias bandas proteicas de menor MM, incluyendo la banda de 6,5 kDa observada en el perfil de GB. En los picos 4 (volumen de elución

de 114 a 116 mL) y 5 (volumen de elución de 124 a 126 mL) no se observaron bandas proteicas (Figura I.4, líneas 4 y 5) ya sea porque las proteínas en estas fracciones no estaban en el rango de resolución del gel o porque estaban presentes en concentraciones muy bajas. La detección de estos diferentes componentes proteicos ayuda a explicar la polidispersidad de la GB.

El procedimiento de múltiples pasos desarrollado en este trabajo es la primera caracterización química de los componentes moleculares de la GB y muestra su compleja estructura macromolecular. Los resultados mostraron que GB de *Cercidium praecox* es un sistema heterogéneo y polidisperso que consiste en polisacáridos, proteínas en un amplio rango de MM y complejos proteína-polisacárido.

I.6. Propiedades reológicas de la GB

El análisis reológico de las soluciones de GB resulta imprescindible a la hora de caracterizar sus propiedades como aditivo alimentario, a la vez que permite relacionar el comportamiento reológico del sistema con su microestructura. Los parámetros reológicos de soluciones de goma son útiles en el control de calidad, la correlación con la evaluación sensorial, las aplicaciones de manejo de materiales, y para caracterizar las macromoléculas.

En este sentido, se analizó la viscosidad de las soluciones de GB variando diferentes factores a fin de poder predecir el comportamiento reológico en base a la composición del sistema y a las condiciones a las que es expuesto.

I.6.1. Efecto de la concentración

En primer lugar, se analizó el efecto de la concentración de GB en la viscosidad de la solución en comparación con la GA. Con tal fin, se efectuaron mediciones de la viscosidad aparente (η_{ap}) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de soluciones de GB y GA con concentraciones de 2, 5, 10 y 15% (p/p) (Figuras I.5 y I.6, respectivamente). Se observó que al aumentar la concentración de GB y GA aumenta la η_{ap} de las soluciones y el efecto es más marcado para la GB que para la GA. Así mismo, se observó que, a igual concentración, las soluciones de GB presentaron mayores valores de η_{ap} que las soluciones de GA (Figura I.7). Este comportamiento también fue encontrado por Defain Tesoriero y col. (2004) y Bertuzzi y col. (2006).

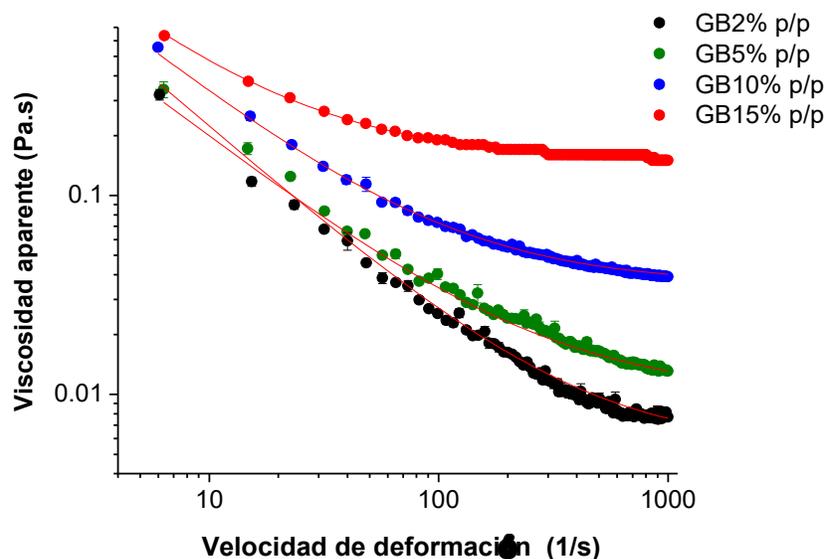


Figura I.5. Efecto de la concentración de GB sobre la viscosidad aparente de sus soluciones y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

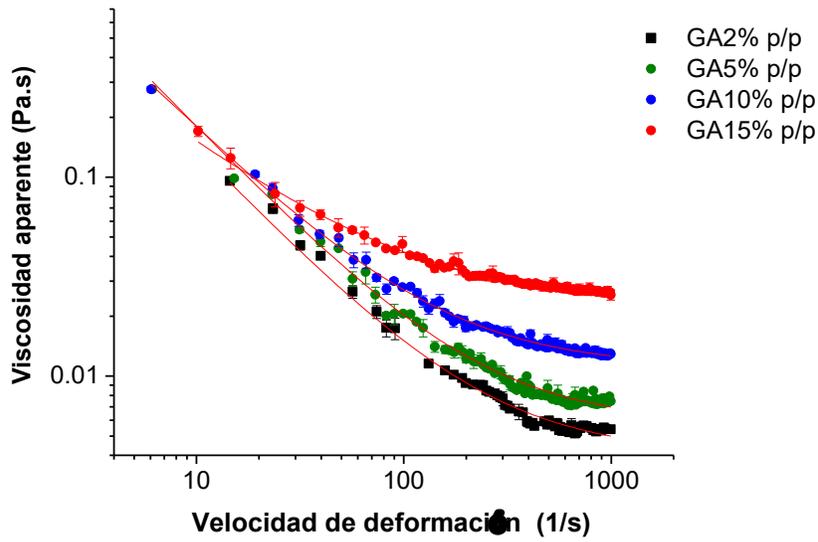


Figura I.6. Efecto de la concentración de GA sobre la viscosidad aparente de sus soluciones y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

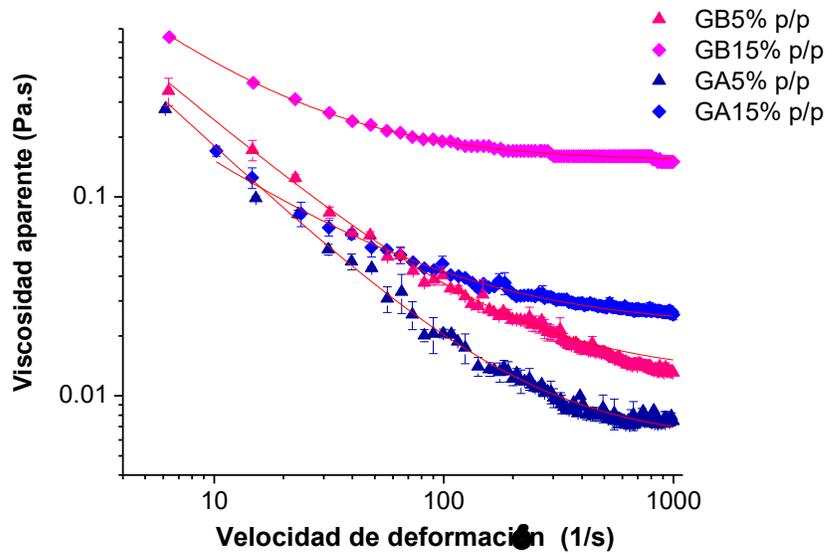


Figura I.7. Comparación de la viscosidad aparente de las soluciones de GA y de GB y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

Por otro lado, se observa que tanto las soluciones de GB como las de GA presentan un comportamiento pseudoplástico (dependencia de η_{ap} con $\dot{\gamma}$) a bajas velocidades de deformación y tienden a comportarse como un fluido Newtoniano (independencia de η_{ap} con $\dot{\gamma}$) a mayores velocidades de deformación. Las soluciones de GB a bajas concentraciones (2 y 5% p/p) muestran un comportamiento pseudoplástico en un rango amplio de $\dot{\gamma}$. Mientras que para mayores concentraciones (10 y 15% p/p), el comportamiento pseudoplástico se mantiene sólo en la zona inicial y a medida que aumenta $\dot{\gamma}$ el comportamiento tiende a ser Newtoniano. A diferencia de éstas, las soluciones de GA presentan comportamiento pseudoplástico más pronunciado en las diferentes concentraciones estudiadas. Este comportamiento también fue observado para GA por diferentes autores (Mothé y Rao, 1999; Sánchez y col. 2002; Li y col., 2009). Li y col. (2009), proponen que el comportamiento pseudoplástico de GA puede ser atribuido a la presencia de un equilibrio de asociación de moléculas de GA (Figura 1.8). Las moléculas de carbohidratos de la GA son altamente ramificadas y con gran impedimento estérico, por lo que pueden ser consideradas como moléculas granuladas. Una vez disuelta la GA, las moléculas forman agregados. Cuando se aplica un cizallamiento los agregados formados por asociación pueden ser disociados en entidades más pequeñas y la solución tiende a comportarse como Newtoniana. Cuando cesa el cizallamiento, el equilibrio de asociación cambia en dirección opuesta para formar agregados débiles. Si se permite suficiente reposo estos agregados pueden volver a auto-compactarse por efecto de drenado. Por lo tanto, el proceso de cizallamiento partiendo de bajas a altas $\dot{\gamma}$ es un proceso consecutivo de disociación de agregados y así la viscosidad disminuye sincrónicamente con la disociación. A altas $\dot{\gamma}$, se alcanza un equilibrio de asociación y se observa un comportamiento Newtoniano (Li y col.,

2009). Con el incremento del grado de ramificación y la concentración de goma, aumenta el grado de asociación de las moléculas y el rango de $\dot{\gamma}$ de comportamiento Newtoniano se vuelve más amplio y el comportamiento pseudoplástico desaparece gradualmente (Li y col., 2009). Por lo tanto, se podría decir que los polisacáridos de la GB tienen un mayor grado de ramificación que los de la GA, ya que sus soluciones presentan un comportamiento Newtoniano más acentuado a igual concentración.



Figura I.8. Estado de las moléculas de GA con y sin cizallamiento.

Cuando las curvas de flujo muestran regiones que se ajustan a la Ley de la Potencia (comportamiento pseudoplástico) y regiones de comportamiento Newtoniano, puede usarse el modelo de Sisko (Sisko, 1958) para describir los datos:

$$\eta_{ap} = k_s \dot{\gamma}^{(n_s-1)} + \eta_{\infty} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde, η_{ap} es la viscosidad aparente (Pa s), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), η_{∞} es la viscosidad a deformación infinita (Pa s), k_s es el índice de consistencia, y n_s es el índice de comportamiento al flujo (Mothé y Rao, 1999).

El modelo de Sisko (Ecuación 2) describe bien los datos de η_{ap} vs. $\dot{\gamma}$ de las soluciones de GB y GA como se observa en la Figura I.5 y I.6, respectivamente. En la Tabla I.3 se presentan los parámetros k_s , n_s , η_{∞} y R^2 obtenidos por regresión no lineal de los datos con la ecuación de Sisko para valores de $\dot{\gamma}$ entre 5 y $100 s^{-1}$. Para las soluciones de GB se observa que los valores de k_s y η_{∞} aumentan con la concentración, indicando que aumenta la viscosidad de las soluciones al incrementar la concentración de goma. Los valores de $n_s < 1$ reflejan el comportamiento pseudoplástico. Por otro lado, en las soluciones de GA no se observa una tendencia clara de los valores de k_s con respecto a la concentración, mientras que los valores η_{∞} aumentan con la concentración y los valores de $n_s < 1$ como se observó para GB. En general, los valores de k_s y η_{∞} de las soluciones de GB fueron mayores que los de GA, reflejando una mayor viscosidad de las soluciones de GB. El comportamiento pseudoplástico se considera una propiedad importante en el procesamiento de polímeros, ya que acelera el flujo de material y reduce la generación de calor y el consumo de energía durante el proceso. A peso molecular constante, la cantidad de energía necesaria para procesar un polímero está directamente relacionada con el grado de pseudoplasticidad que se relaciona con la distribución del peso molecular: los polímeros con una distribución de pesos moleculares amplia tienden a presentar comportamiento pseudoplástico a $\dot{\gamma}$ más bajas que aquellos con una distribución estrecha. Por esto se podría decir que GB tendría una distribución de pesos moleculares más estrecha que la GA.

Tabla I.3. Efecto de la concentración de goma en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Goma	% p/p	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R^2
GB	2	$1,21 \pm 0,07^e$	$0,16 \pm 0,02^a$	$0,0024 \pm 0,0008^f$	0,998
	5	$2,21 \pm 0,36^c$	$0,02 \pm 0,05^d$	$0,0126 \pm 0,0013^d$	0,992
	10	$2,45 \pm 0,14^b$	$0,09 \pm 0,02^b$	$0,0356 \pm 0,0013^b$	0,992
	15	$2,78 \pm 0,19^a$	$0,07 \pm 0,02^c$	$0,1512 \pm 0,0016^a$	0,996
GA	2	$1,20 \pm 0,12^e$	$0,07 \pm 0,04^c$	$0,0011 \pm 0,0010^f$	0,991
	5	$1,62 \pm 0,04^d$	$0,01 \pm 0,01^d$	$0,0038 \pm 0,0006^f$	0,999
	10	$1,29 \pm 0,25^e$	$0,07 \pm 0,06^c$	$0,0097 \pm 0,0012^e$	0,988
	15	$0,84 \pm 0,11^f$	$0,19 \pm 0,04^a$	$0,0220 \pm 0,0010^c$	0,996

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar ($n=3$). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

I. 6.2. Efecto de la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la viscosidad de las soluciones de GB se realizaron determinaciones de η_{ap} en las mismas condiciones de I.6.1 de soluciones al 10% p/p de GB a temperaturas de 20°C , 40°C y 60°C . En la Figura I.9 se muestran las curvas correspondientes donde se observa una disminución de la η_{ap} con el aumento de la temperatura. La mayoría de los materiales disminuyen su viscosidad con la temperatura y en general la dependencia es exponencial. Respecto a los polímeros, la dependencia con la

temperatura que estos presentan es función de la estructura y del tipo de polímero. El estudio de este factor es de gran importancia y tiene interés práctico durante el procesado de cualquier polímero.

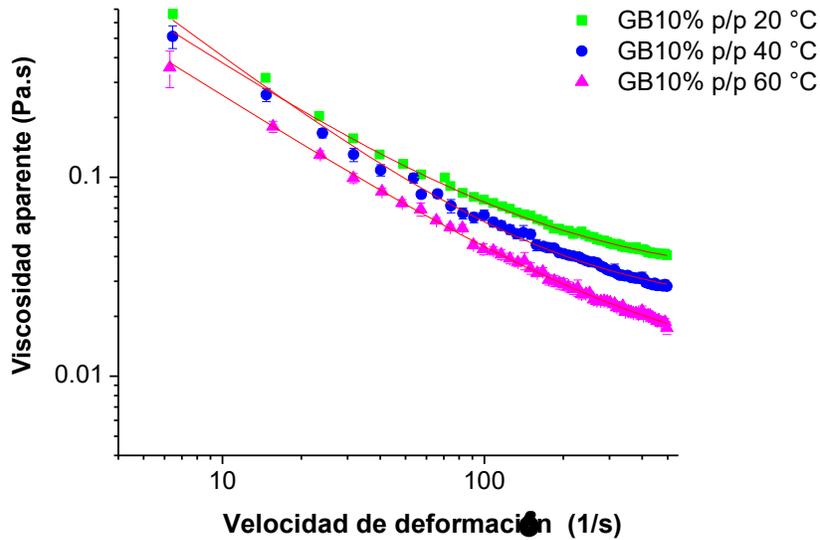


Figura I.9. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

Los parámetros del modelo de Sisko (Ecuación 2) obtenidos por regresión no lineal de los datos se muestran en la Tabla I.4. Se observa que k_s y η_∞ disminuyen con el aumento de la temperatura y n_s no cambia. Este comportamiento indica que a mayores temperaturas las soluciones son menos viscosas.

Tabla I.4. Efecto de la temperatura en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) para soluciones de GB.

Muestra	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)
GB 10% pH 7 20 °C	2,63 ± 0,15 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,0293 ± 0,0009 ^a
GB 10% pH 7 40 °C	2,06 ± 0,12 ^b	0,17 ± 0,02 ^a	0,0166 ± 0,0009 ^b
GB 10% pH 7 60 °C	1,94 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,02 ^a	0,0091 ± 0,0006 ^c

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3).
 Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

I.6.3. Efecto de iones mono y divalentes

El efecto de diferentes iones sobre la viscosidad aparente de las soluciones de GB se estudió determinando la η_{ap} de soluciones de GB al 10% a 20°C con concentraciones de 40 mM y 100 mM de NaCl y CaCl₂ en las mismas condiciones de I.6.1. Los polímeros cargados tienen una viscosidad superior a los polímeros no iónicos de similar masa molecular debido a la expansión de sus cadenas por causa de las repulsiones de cargas intramoleculares. La adición de electrolitos reduce el grado de disociación de los grupos cargados lo que normalmente llevaría a la compactación de las cadenas y caída significativa en la viscosidad (Williams y Philips, 2000). En las Figuras I.10 y I.11 se muestran los resultados; no se observan diferencias entre las curvas con agregado y sin agregado de iones por lo que se podría decir que los iones adicionados no tuvieron efecto sobre el comportamiento reológico de soluciones de GB en las condiciones ensayadas.

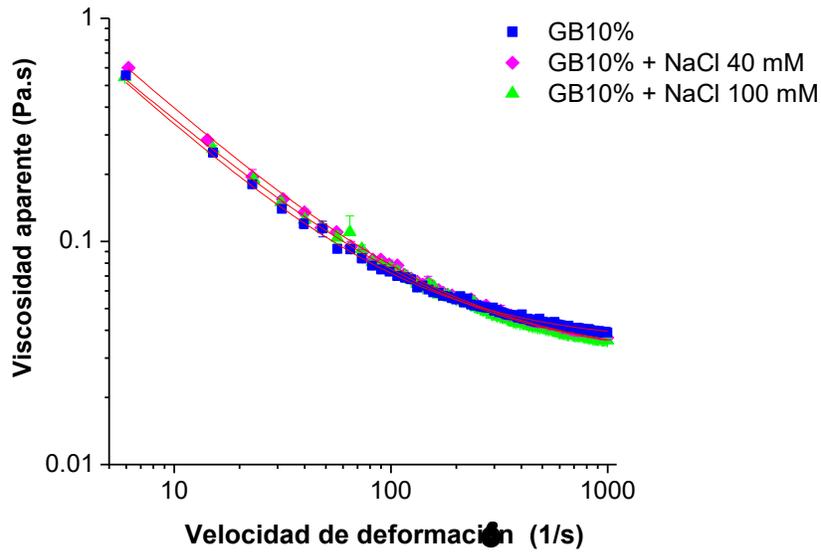


Figura I.10. Efecto del NaCl en la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

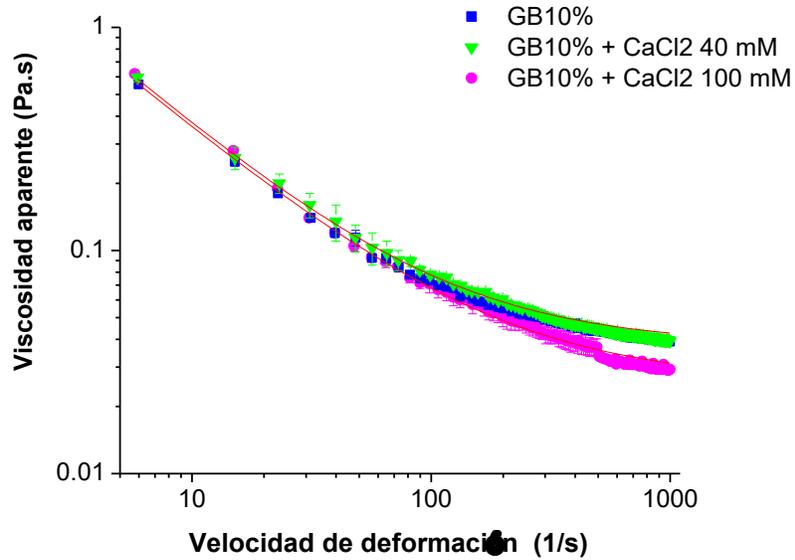


Figura I.11. Efecto del CaCl_2 sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

Sin embargo, se observan leves variaciones en los parámetros del modelo de Sisko (Tabla I.5). Con el agregado de 100 mM del ion monovalente NaCl, se observa que los parámetros η_∞ y k_s disminuyen indicando una disminución de la viscosidad, mientras que n_s aumenta lo que indica que aumenta la pseudoplasticidad. Se puede decir entonces que la GB posee grupos cargados que se ven afectados por la adición en solución de iones monovalentes y que esto produce un cambio en la conformación de las cadenas de los polímeros y por consiguiente en la viscosidad de la solución. Los grupos cargados de la GB que participarían en este comportamiento corresponden a los grupos carboxilo (-COOH) del ácido glucurónico y los residuos de los aminoácidos polares.

Por otro lado, el agregado del ion divalente CaCl_2 produjo un aumento de η_∞ y k_s , esto indicaría un aumento de la viscosidad producto de la expansión de las cadenas poliméricas.

Tabla I.5. Efecto de iones en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) para soluciones de GB.

Muestra	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)
GB 10% pH 4,4 25 °C	2,45 ± 0,14 ^b	0,09 ± 0,02 ^b	0,0356 ± 0,0013 ^b
GB 10% + NaCl 40 mM	2,78 ± 0,08 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	0,0300 ± 0,0149 ^c
GB 10% + NaCl 100 mM	2,29 ± 0,03 ^c	0,15 ± 0,01 ^a	0,0296 ± 0,0009 ^c
GB 10% + CaCl_2 40 mM	2,87 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,0380 ± 0,0010 ^b
GB 10% + CaCl_2 100 mM	2,65 ± 0,06 ^a	0,10 ± 0,01 ^b	0,0590 ± 0,0014 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

I.6.4. Efecto del pH

Los polímeros cargados también pueden ser afectados por la variación del pH. La viscosidad podría disminuir en presencia de electrolitos debido a la neutralización de cargas lo que disminuye la repulsión de cargas intramoleculares produciendo una compactación de las moléculas y una caída significativa de la viscosidad. Por otro lado, otro efecto a considerar es que a pH bajos los grupos carboxilos estarían en estado no disociado lo que también disminuiría la repulsión de cargas. El efecto del pH sobre la viscosidad de los hidrocoloideos puede variar dependiendo de la especie de hidrocoloide. Para evaluar este fenómeno se determinó η_{ap} de soluciones de GB al 10% a 20°C, con concentraciones de Glucono- δ -Lactona (GDL) (0,05 y 0,15 ppm) que a través de su hidrólisis disminuye el pH lentamente. El pH de la solución de GB sin agregado de GDL fue de 4,4 mientras que los pH finales con GDL fueron igual a 3,0 en ambas concentraciones ensayadas. En la Figura I.12 se muestran las curvas obtenidas donde se observa que la variación del pH no provocó cambios en la viscosidad aparente de estas soluciones. Tampoco se observaron diferencias en los parámetros del modelo de Sisko (1958) (Tabla I.6). Debido a que no se presentaron cambios en la viscosidad de la GB al variar la fuerza iónica y el pH es indicativo de este hidrocoloide no posee grupos cargados que puedan variar el comportamiento electrolítico de la solución (William y Philips, 2009). Estos efectos son de importancia en la aplicación de GB en emulsiones y espumas, ya que no se observaron variaciones en la viscosidad al modificar la concentración de sales y/o el pH de las matrices alimenticias.

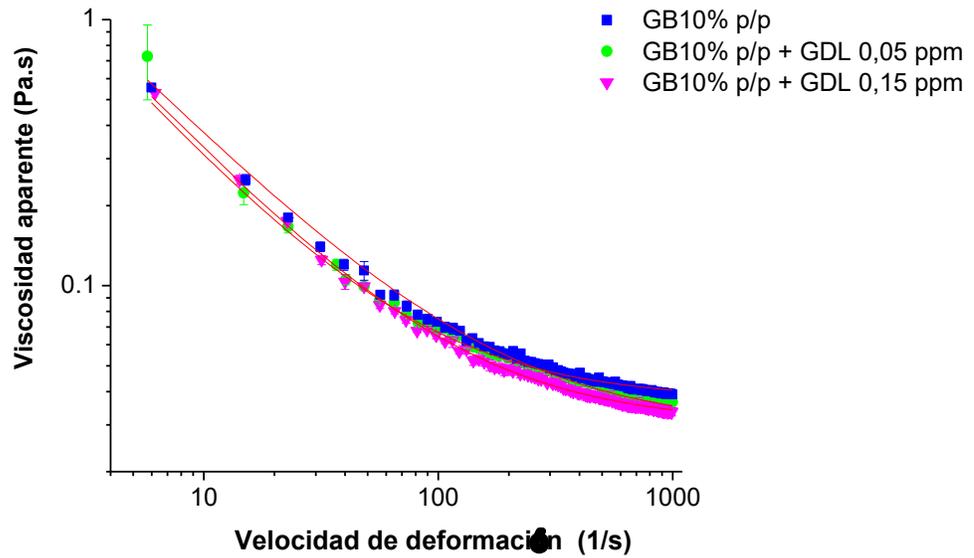


Figura I.12. Efecto de la GDL sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

Tabla I.6. Efecto del pH y de un tratamiento térmico en los parámetros del modelo de Sisko: Índice de consistencia (k_s), índice de comportamiento al flujo (n_s) y viscosidad a deformación infinita (η_∞) de soluciones de GB.

Muestra	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)
GB 10% pH 4,4 25 °C	2,45 ± 0,14 ^a	0,09 ± 0,02 ^b	0,0356 ± 0,0013 ^b
GB 10% + GDL 0,05 ppm	2,55 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,06 ^b	0,0374 ± 0,0014 ^b
GB 10% + GDL 0,15 ppm	2,60 ± 0,06 ^a	0,06 ± 0,02 ^b	0,0302 ± 0,0011 ^b
GB 10% TT pH 4,4	2,30 ± 0,06 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	0,0396 ± 0,0004 ^b

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD. TT: tratamiento térmico de 90°C por 30 min.

I.6.5. Efecto del tratamiento térmico

El tratamiento térmico puede afectar de diferentes formas a los polisacáridos y proteínas de la GB. Las proteínas pueden sufrir desnaturalización y/o agregación, como se observó en soluciones de GA que al ser expuesta a prolongados tiempos de calentamiento presentaban precipitación de los componentes proteicos lo que modificando su comportamiento reológico y sus propiedades emulsionantes (Williams y Phillips, 2000). Los polisacáridos bajo tratamiento térmico pueden modificar su estado termodinámico y hasta llegar a la descomposición, lo que también afectaría el comportamiento reológico. Para evaluar la estabilidad de la solución de GB frente a un calentamiento, se sometió una solución de la misma a un tratamiento térmico a 90°C por 30 min y posteriormente se determinó la η_{ap} en las mismas condiciones que I.6.1. En las curvas obtenidas se observa que la solución sometida al tratamiento térmico presentó valores de viscosidad ligeramente menores, a bajas $\dot{\gamma}$, respecto a la solución sin tratamiento (Figura I.13). Sin embargo, los parámetros de ajuste al modelo de Sisko no presentaron diferencias significativas entre las soluciones tratadas y no tratadas térmicamente (Tabla I.6). Se puede decir que las soluciones de GB no son afectadas por las altas temperaturas sugiriendo que la GB puede ser empleada en productos alimenticios que requieran estabilidad en la exposición a procesos de calentamiento al igual que varios hidrocoloides, como la goma guar y la goma xántica, que presentan una excelente estabilidad térmica (Downey, 2000).

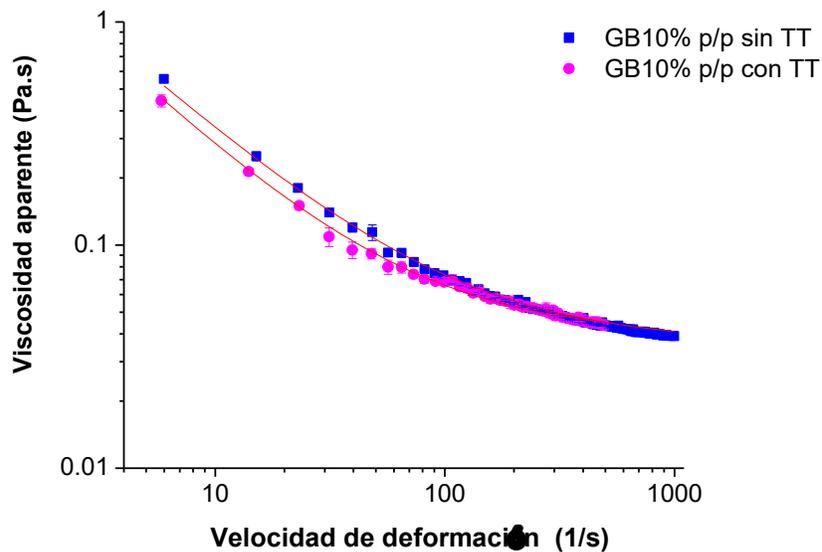


Figura I.13. Efecto de un tratamiento térmico (TT) sobre la viscosidad aparente de una solución de GB al 10% p/p y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

I.6.6. Evaluación de la tixotropía

En la Figura I.14 se puede observar el comportamiento de soluciones al 10 % (p/p) de GB a pH 4,4 y pH 7, con el aumento y la disminución de la velocidad de deformación. El comportamiento exhibido corresponde a un modelo tixotrópico al no coincidir la curva de $\dot{\gamma}$ ascendente con la descendente, y esta última se ubica por arriba de la ascendente. Para los dos pH ensayados las curvas se superponen y no hay diferencias significativas.

La tixotropía es un ablandamiento dependiente del tiempo (Muller, 1973). La representación gráfica que le corresponde es una curva similar a la de pseudoplasticidad en cuanto que η_{ap} desciende con el aumento de $\dot{\gamma}$, pero las fases de *carga* y *descarga* no coinciden (Muller, 1973). Se ha observado que la GA presenta este comportamiento, pero en su caso para

una determinada $\dot{\gamma}$ la η_{ap} es menor en la rampa descendente que en la ascendente, lo cual se corresponde con el modelo ejemplificado en la Figura 1.8. (Li y col., 2009), donde al aumentar $\dot{\gamma}$ se rompen los agregados moleculares presentes en la GA llegando a un equilibrio de asociación/disociación de moléculas. Luego al disminuir $\dot{\gamma}$, el equilibrio de asociación cambia a agregación y una nueva arquitectura de los agregados es reconstruida. Según Li y colaboradores (2009), en este punto, la reconstitución de los agregados va a depender de la concentración de moléculas en la solución y se han distinguido tres regímenes diferentes: (i) régimen diluido, donde las moléculas de goma se encuentran inicialmente formando agregados pequeños y compactos que se rompen por cizallamiento, al bajar la $\dot{\gamma}$ no se pueden volver a formar esos agregados por la baja concentración de moléculas formándose estructuras laxas de enlaces más largos, induciendo a la viscosidad de $\dot{\gamma}$ ascendente a ser más alta que la descendente, (ii) régimen de superposición, inicialmente las moléculas se encuentran formando agregados más grandes y menos compactos y se reconstituyen formando grandes redes de partículas agregadas, (iii) régimen semi-concentrado, a mayor concentración de goma las moléculas ya se encuentran formando estas redes de partículas agregadas y al reconstituirse se producen cambios en el grado de asociación en la red más que cambios estructurales significativos.

El comportamiento de la GB, donde a una determinada $\dot{\gamma}$ la η_{ap} es mayor en la rampa descendente que en la ascendente, se propone que al aumentar $\dot{\gamma}$ se rompen los agregados presentes en la GB llegando a un equilibrio de asociación/disociación de moléculas. Luego al disminuir $\dot{\gamma}$, el equilibrio de asociación cambia a agregación y el sistema evoluciona a un estado donde los agregados reconstituidos son pequeños y compactos lo que produce una menor η_{ap} .

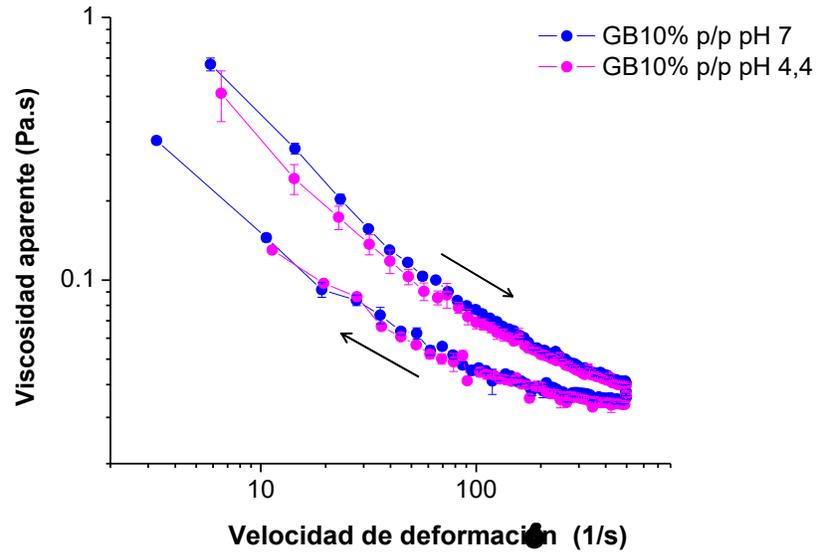


Figura I.14. Evaluación de la tixotropía de una solución de GB al 10% p/p.

Capítulo II. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES DE LA GOMA BREA

Una posible aplicación de la GB es como agente emulsionante y estabilizante, para ser usado tanto en la industria alimenticia como en la cosmética, farmacéutica y de pinturas sintéticas, entre otras. Como se ha presentado en el Capítulo I, la GB tiene un porcentaje de proteínas relativamente alto en comparación con la GA y parte de estas proteínas se encuentran formando complejos polisacárido-proteínas similares a los Arabinogalactanos-proteína (AGP) de la GA responsables de la actividad interfacial de la goma. Estas características convierten a la GB en un excelente hidrocoloide para su uso como estabilizante de emulsiones y espumas (Bertuzzi y col., 2006). En este contexto, se estudió la capacidad emulsionante y estabilizante de la GB, evaluando la formación y estabilidad de emulsiones de dos fases dispersas: aceite de maíz y limoneno, este último como sustancia natural y conocido monoterpeno, extraído de materiales cítricos. En este capítulo utilizaremos las siguientes siglas para nombrar las emulsiones de aceite de maíz:

GB5%E-Ac, GB10%E-Ac y GB20%E-Ac, emulsiones de aceite de maíz al 10% p/p preparadas con soluciones de GB al 5, 10 y 20% p/p, respectivamente, y GA20%E-Ac, emulsión de aceite de maíz al 10% p/p preparada con una solución de GA al 20% p/p.

GB5%E-Lim, GB10%E-Lim y GB20%E-Lim, emulsiones de limoneno al 10% p/p preparadas con soluciones de GB al 5, 10 y 20% p/p, respectivamente, y GA20%E-Lim, emulsión de limoneno al 10% p/p preparada con una solución de GA al 20% p/p.

II.1. EMULSIONES DE ACEITE DE MAIZ

II.1.1. Distribución de tamaño de gota y potencial ζ de las emulsiones de aceite de maíz

Una emulsión puede ser definida como "un sistema compuesto de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales es dispersado en forma de gotas (fase dispersa) a lo largo del otro (fase continua)" (Becher, 2001; Friberg y Larsson, 1997). Muchas propiedades de las emulsiones como la estabilidad, color, apariencia, textura, reología y vida útil dependen del tamaño de gota (Becher, 2001; McClements, 2005). Varios autores han reportado que el tamaño de gota de la emulsión también juega un rol importante en la retención de volátiles y el aceite superficial de los polvos obtenidos por microencapsulación mediante secado por aspersión (Liu y col., 2000, 2001; Risch y Reineccius, 1988; Soottitantawat y col., 2005, 2003). Por lo general, el objetivo de un proceso de emulsificación es producir una fase dispersa con tamaño de gota lo más pequeña posible. Existen diferentes parámetros que influyen en el tamaño final de gota como ser el uso de emulsionantes, el tipo de emulsionante, su concentración y velocidad de adsorción, la relación volumétrica fase continua/fase dispersa, viscosidad de la fase dispersa y de la emulsión, el método de emulsificación y la energía entregada durante la emulsificación y la temperatura (Jafari y col. 2008b). Cabe aclarar que en este trabajo el método de emulsificación utilizado, (a) conversión de las fases aceite y agua en una pre-emulsión y (b) reducción final del tamaño utilizando ultrasonido, fue optimizado en estudios previos.

En primer lugar, se analizó el efecto de la concentración inicial de GB en la fase acuosa en la formación de las emulsiones aceite en agua. En la Figura II.1 se presenta la distribución de tamaños de gota de las emulsiones de aceite de maíz preparadas con soluciones de GB en

diferentes concentraciones (5%, 10% y 20% p/p) y GA al 20 % (p/p). En la Tabla II.1 se presentan los valores de diámetro de gota promedio (Z-average), el índice de polidispersidad (Pdl) y el diámetro correspondiente al máximo del pico de distribución de las distintas emulsiones analizadas.

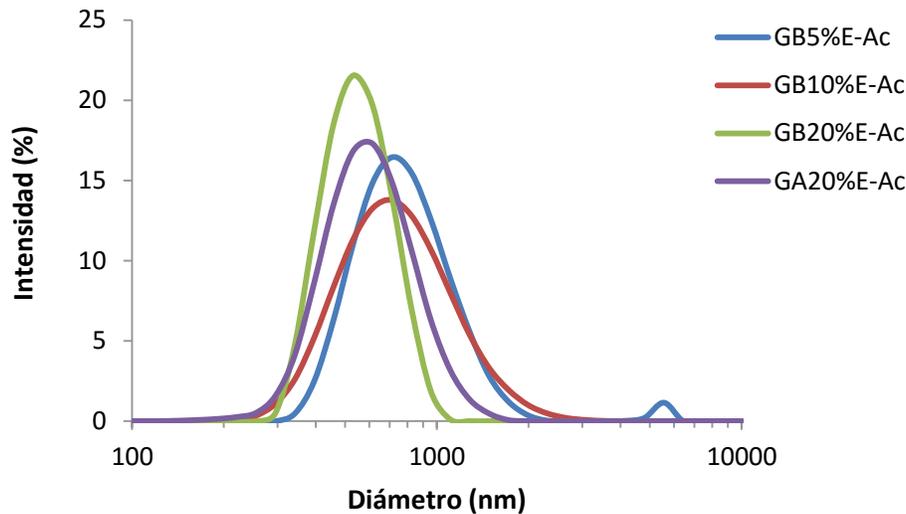


Figura II.1. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB a distintas concentraciones y GA al 20% p/p.

Las emulsiones GB5%E-Ac presentaron una distribución bimodal con una población mayoritaria alrededor de los 741,5 nm y una población menor con gotas de alrededor de 4894 nm. Las micrografías de esta emulsión muestran claramente la presencia de partículas pequeñas y otras relativamente más grandes comparadas con las demás emulsiones, como también se observa la presencia de partículas agregadas formando pequeños flóculos (Figura II.2 A). Esta gran polidispersidad observada se refleja en el Pdl que fue significativamente

superior al de las demás emulsiones (0,34). El Z-average calculado para esta emulsión (783,8 nm) también resultó significativamente mayor, sin embargo, este parámetro representa un promedio de la distribución total y no describe cada población, por lo que resulta inadecuado para caracterizar este sistema.

Tabla II.1. Tamaño de gotas de las emulsiones de aceite de maíz de GB y GA el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.

Emulsión	Día 1			Día 7		
	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)
GB5%E-Ac	783,8 ± 34,2 ^c	0,34 ± 0,07 ^b	741,5 ± 77,0 ^b 4894 ± 501,5 ^c	1115,5 ± 4,9 ^d	0,30 ± 0,11 ^b	1080,0 ± 99,0 ^b 5207 ± 188,0 ^c
GB10%E-Ac	674,4 ± 11,2 ^b	0,20 ± 0,03 ^a	760,3 ± 48,2 ^b	754,7 ± 20,1 ^c	0,19 ± 0,02 ^a	801,4 ± 44,0 ^a
GB20%E-Ac	529,6 ± 13,2 ^a	0,10 ± 0,04 ^a	576,1 ± 14,2 ^a	700,0 ± 4,7 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	745,2 ± 4,0 ^a
GA20%E-Ac	546,8 ± 26,5 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	599,6 ± 32,5 ^a	621,1 ± 7,1 ^a	0,15 ± 0,04 ^a	696,4 ± 43,0 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

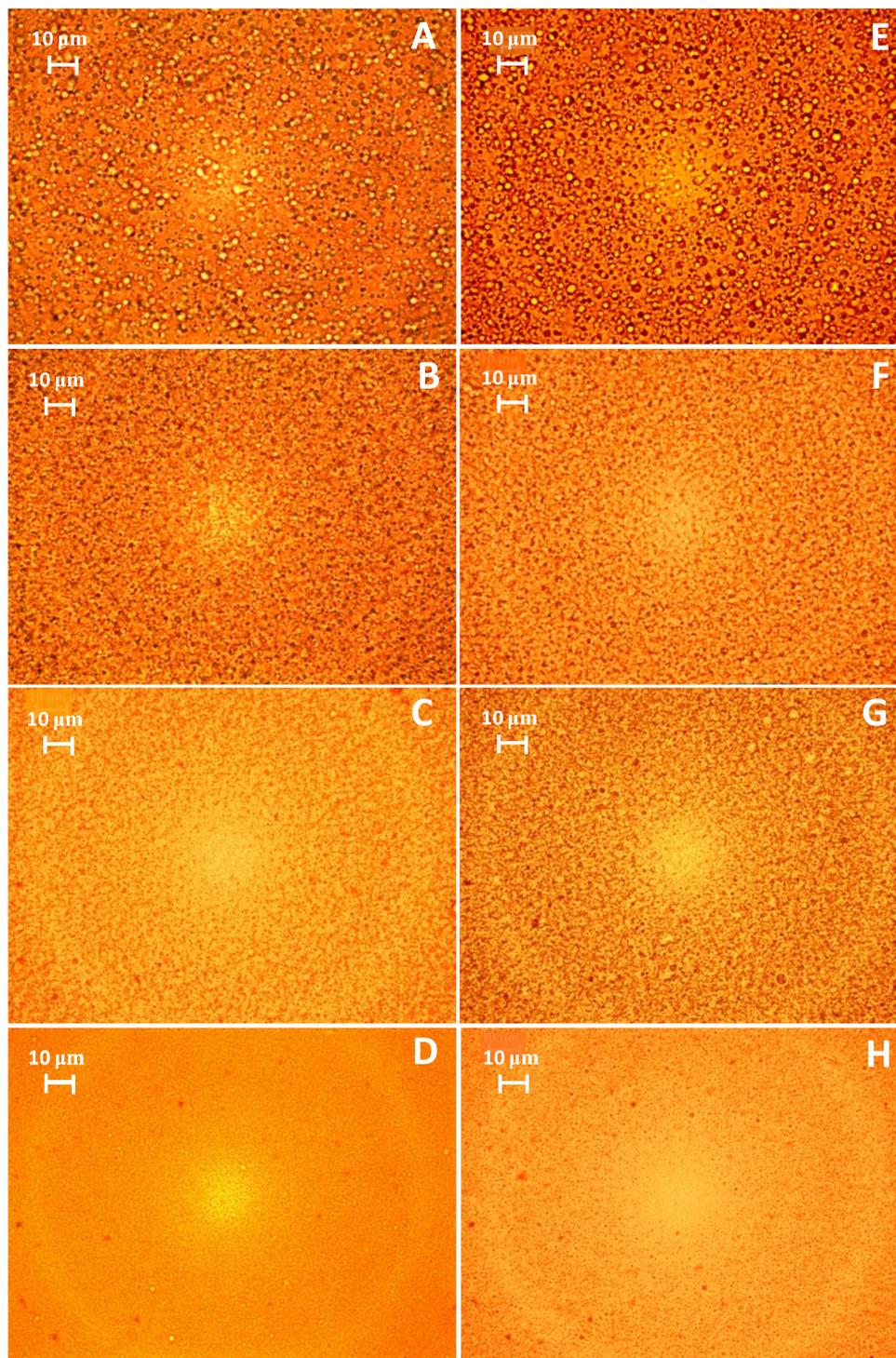


Figura II.2. Micrografías de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de (A) 5%, (B) 10%, (C) 20% p/p de GB y (D) 20% p/p de GA inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barra de escala= 10 µm.

Al aumentar la concentración de GB al 10% y 20% p/p (GB10%E-Ac y GB20%E-Ac), se obtuvieron distribuciones monomodales y disminuyeron el Z-average, el Pdl y el máximo del pico (Tabla II.1), siendo GB20 la condición que presenta los valores más bajos. En estos sistemas monomodales, el parámetro Z-average puede representar adecuadamente el diámetro promedio de gota de la distribución, aunque se observa una diferencia con los valores obtenidos para los máximos de los picos. Según el manual del equipo analizador de tamaño (Zetasizer Nano) el valor calculado de Z-average resulta menor que el máximo del pico cuando los cumulantés ajustan sólo a la parte inicial de la función de correlación, por lo que de alguna manera, se ve sobreestimado el decaimiento inicial de la distribución. Estos resultados son consistentes con las micrografías obtenidas de estas emulsiones (Figura II.2 C y E), en las que se observan partículas más pequeñas que las observadas en GB5 y sin formación de flóculos.

La emulsión GA20%E-Ac presentó una distribución similar a la de GB20%E-Ac y los parámetros obtenidos no presentaron diferencias significativas entre estas emulsiones. Por lo tanto, se puede decir que GB presenta propiedades de formación de emulsiones similares a las de GA.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados teniendo en cuenta varios fenómenos. En primer lugar, a bajas concentraciones de GB (5% p/p), las moléculas disponibles no serían suficientes para cubrir completamente la interface aceite-agua creada durante el proceso de emulsificación y se estaría produciendo un fenómeno de re-coalescencia que resulta en gotas de mayor tamaño (Jafari y col., 2008b). El proceso de emulsificación consiste en: (1) la formación de nuevas gotas, lo que aumenta el área interfacial de la emulsión, y (2) la estabilización de la nueva interface por adsorción del emulsionante, lo cual previene la

coalescencia de la gotas formadas recientemente (Floury y col., 2004; Perrier-Cornet y col., 2005; Tesch y Schubert, 2002). Una vez formada la gota es sujeta a un movimiento que lleva a una colisión entre gotas, y si en este choque la gota no está completamente cubierta por el emulsionante se produciría una fusión de las gotas o re-coalescencia. Por otro lado, la población de partículas con diámetro alrededor de 4894 nm observada en la distribución de GB5 podría tratarse de gotas agregadas (como se observa en las micrografías) que no se han separado luego de la dilución realizada para realizar la medición. Este fenómeno podría tratarse de una "floculación por puentes" que se produce cuando la cantidad de moléculas de emulsionante es insuficiente para cubrir el área interfacial creada. Esto ocurre cuando en una colisión entre gotas, una molécula adsorbida en la interface de una gota encuentra un espacio libre de moléculas en una segunda gota y se adsorbe en la interface de esta última, creando un puente entre ambas. La elasticidad del mismo mantiene las gotas a una corta distancia, es decir, floculadas (Dickinson, 1998). Además, la formación de flóculos estaría facilitada por la baja repulsión estérica debida al bajo número de moléculas de GB adsorbidas en la interface aceite-agua (McClements y col. 1999). Esto se corresponde con los flóculos observados en las micrografías.

Al aumentar la concentración de GB, al 10% y 20% p/p, aumenta el número de moléculas disponibles para cubrir el área interfacial formada durante la emulsificación, de modo que se produce una estabilización rápida de las nuevas interfaces y se previene la re-coalescencia lo que resulta en gotas de menor tamaño (Karbstein y Schubert, 1995; Lobo y Svereika, 2003; Stang y col., 1994). Por otro lado, el mayor número de moléculas adsorbidas en la interface incrementaría la repulsión estérica entre gotas previniendo la agregación. Además, la alta

concentración de GB produce una fase continua de alta viscosidad (Capítulo I) que restringe el movimiento de las gotas impidiendo el acercamiento y retarda el drenado de líquido entre dos gotas en el momento del choque lo que también protege a las gotas de la re-coalescencia (Behrend y col., 2000; Khouryieh y col., 2015; Tesch y Schubert, 2002). Algunos autores también proponen la posible formación de una red entre las partículas de goma que inmoviliza las gotas de aceite previniendo que se acerquen (Acedo-Carrillo y col., 2006). Estas pueden ser las causas de porque no se observaron poblaciones de gran diámetro ni flóculos al utilizar soluciones de 10% y 20% p/p de GB al preparar las emulsiones. Varios autores estudiaron el efecto del tipo y la concentración de emulsionante sobre el tamaño de gota y sugieren que existen dos condiciones: (a) condición de baja concentración de emulsionante en donde el tamaño de gota depende fuertemente de la concentración inicial de emulsionante y (b) condición de alta concentración de emulsionante en la cual el tamaño de gota no depende de la concentración de emulsionante y está determinada por la tensión interfacial y por la cantidad de energía entregada al sistema en el proceso de emulsificación (Narsimhan y Goel, 2001; Lobo y Svereika, 2003; Tcholakova y col. 2004; Schramm, 2005; Jafari y col., 2008a). En este estudio, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la energía entregada por el dispositivo de ultrasonido (Figura II.3), se observa una tendencia a aumentar la energía para obtener la misma amplitud en los sistemas que tendrían mayor viscosidad lo que podría ser otro factor determinante del tamaño de las gotas.

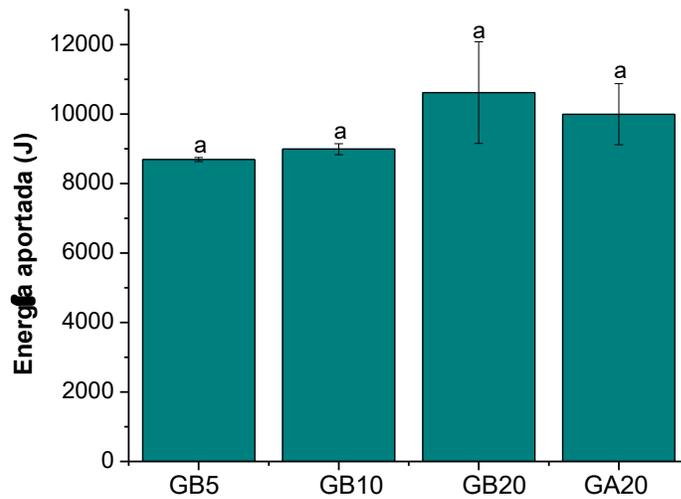


Figura II.3. Energías aportadas por el equipo de ultrasonido durante el proceso de emulsificación. Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), test LSD.

En contraste con estos resultados, Bertuzzi y colaboradores (2012) observaron que el tamaño de gota de las emulsiones de aceite de maíz aumentaba al incrementar la concentración de GB por encima de 5% p/p. Por otra parte, los tamaños de gota obtenidos por estos autores para las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con 5, 10 y 20% p/p de GB fueron superiores a los obtenidos en este trabajo (21300; 42800 y 45600 nm, respectivamente). Estas diferencias podrían deberse al método utilizado para preparar las emulsiones. Bertuzzi y colaboradores (2012) prepararon las emulsiones en un sólo paso utilizando un homogeneizador de rotor y estator mientras que en este trabajo se aplicó un paso adicional de ultrasonido para obtener la emulsión final. El paso adicional incrementa la energía total suministrada al sistema lo que provoca mayor deformación y ruptura de las gotas de aceite, y por lo tanto, disminuye el

tamaño de gota (Jafari y col., 2007). Además, durante el tratamiento de ultrasonido la causa principal de la rotura es la cavitación. La cavitación es la formación y colapso de cavidades de vapor en un líquido que fluye. Tales cavidades de vapor se forman cuando la presión local se reduce a la presión de vapor a la temperatura del líquido que fluye debido a cambios de velocidad local. El colapso de estas cavidades provoca potentes ondas de choque que irradian toda la solución rompiendo el líquido disperso. Desde la publicación de la primera patente hace más de 50 años, muchos científicos e industriales han utilizado diferentes tipos de dispositivos de ultrasonido para hacer emulsiones (Jafari y col., 2006). Por otra parte, en el sistema rotor-estator generalmente la fuerza actuante es el esfuerzo de corte, el cual es menos efectivo en la ruptura de gotas. Según varios autores, no se podrían obtener emulsiones de gotas con diámetros menores a una micra utilizando sistemas de homogenización tipo rotor-estator (Abismail y col., 1999; Jafari y col., 2007; Perrier-Cornet y col., 2005; Pinnamaneni y col., 2003; Stang y col., 2001; Urban y col., 2006).

En la Tabla II.2, se presentan los valores de potencial- ζ de las emulsiones de GB y GA. Se observa que todos los valores fueron mayores a 37,5 mV en valor absoluto que es, de acuerdo al modelo DVLVO, la barrera de energía de la floculación irreversible (Acedo-Carrillo y col., 2006). Además, todos estos valores fueron negativos debido a la carga negativa de la GB en el pH estudiado.

Tabla II.2. pH y potencial zeta de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y

GA.

Emulsión	pH ($\pm 0,02$)	ζ (mV)
GB5%E-Ac	4	$-44,72 \pm 3,38^c$
GB10%E-Ac	4	$-39,97 \pm 0,44^b$
GB20%E-Ac	4	$-39,91 \pm 0,46^b$
GA20%E-Ac	4	$-33,27 \pm 0,60^a$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

II.1.2. Estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz.

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido al contacto desfavorable entre la fase agua y aceite, y dado que estas fases tienen densidades diferentes, tenderán a separarse en el tiempo (Dickinson, 1992; McClements, 2005). La desestabilización generalmente resulta de varios procesos físicos como: la coalescencia, la maduración de Ostwald o la floculación que llevan al aumento del tamaño de gota, la migración de las gotas que lleva al cremado o a la sedimentación, y la inversión de fases (Domian y col., 2015; Mengual y col., 1999). La inestabilidad física da lugar a una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas.

En el presente estudio, se procedió en primer lugar a analizar la estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz y soluciones de GB mediante dispersión múltiple de luz con el equipo Turbiscan TMA 2000 que provee información de la condición real de la emulsión y el curso del proceso de desestabilización antes de que se vuelva perceptible por el ojo humano

(Domian y col., 2015; Mengual y col., 1999). En esta técnica una fuente de luz irradia fotones a la emulsión y se mide la luz que atraviesa la muestra (transmisión, en muestras no opacas) y la retrodispersión que producen las partículas (*backscattering*, en muestras opacas), a lo largo de la longitud del tubo, de manera que se obtienen perfiles de transmisión y *backscattering* (BS). Estos perfiles constituyen la huella macroscópica de la emulsión en un momento dado (Mengual y col., 1999). En este estudio, como las emulsiones resultaron sistemas opacos se utilizó el perfil de BS para analizar el proceso de desestabilización. Un aumento de la intensidad de BS indica que la concentración, el tamaño o la reflectancia de la partícula han aumentado, mientras que una disminución en la intensidad de BS indica una disminución en la concentración, tamaño o reflectancia de la partícula (Durand y col., 2003).

La Figura II.3 muestra los perfiles de BS a lo largo del tiempo de almacenamiento (0 a 7 días) a 25 °C para las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA, y en la Tabla II.3 se presentan los parámetros de estabilidad determinados a partir de estos perfiles.

En los perfiles obtenidos para GB5%E-Ac se observa gran variación con el tiempo (Figura II.3.A). En el fondo del tubo se observa una acentuada disminución de BS que indica una disminución del número de gotas en esta parte del tubo lo que está relacionado con el proceso de clarificación. Simultáneamente en la parte superior del tubo se observa un incremento del BS que corresponde a un aumento de la concentración de gotas reflejando un proceso de cremado. En la zona intermedia del tubo también se observa una disminución de BS que puede deberse a un aumento del tamaño de partículas por floculación o coalescencia.

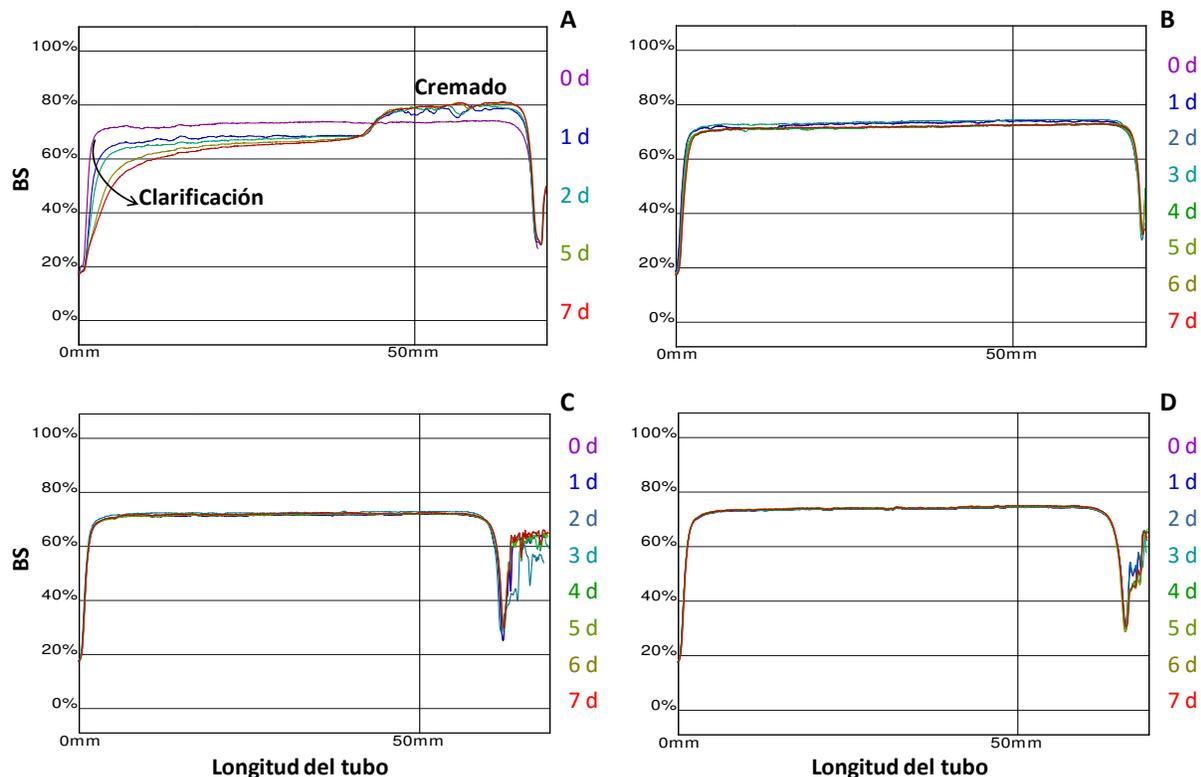


Figura II.4. Perfiles de *backscattering* (BS%) en función del tiempo (días) y de la altura del tubo de medición de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de (A) GB al 5% p/p, (B) GB al 10% p/p, (C) GB al 20% p/p y (D) GA al 20% p/p.

Además, GB5%E-Ac presentó el mayor índice de cremado (IC) entre las muestras (14,42%) (Tabla II.3). El IC es un parámetro indirecto del grado de agregación, cuanto mayor es el IC, más rápido ascienden las gotas, mayores son los flóculos formados, y por lo tanto mayor es la agregación que se ha producido (Onsaard y col., 2006; Sun y col., 2007). La agregación también fue evidente en el incremento del tamaño de gotas medido por DLS luego de los siete días de almacenamiento (Tabla II.1). El pico principal del perfil de GB5%E-Ac se corrió hacia valores de diámetros mayores lo que resultó en un aumento de 34% en el diámetro de las gotas (máximo

de pico= 1080 nm) aunque el Pdl permaneció constante. En concordancia con estos resultados, las micrografías de GB5%E-Ac luego de siete días de almacenamiento mostraron un mayor número de gotas grandes comparado la micrografía del día 1 (Figura II.2.B).

Tabla II.3. Parámetros de estabilidad medidos con el equipo Turbiscan MA de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA.

Emulsión	IC (%)	Tiempo de retardo (h)
GB5%E-Ac	14,42	1
GB10%E-Ac	1,97	26
GB20%E-Ac	0,77	No presentó
GA20%E-Ac	0,85	168

Al aumentar la concentración de GB aumentó notablemente la estabilidad de la emulsión como se puede observar en los perfiles de BS de GB10%E-Ac y GB20%E-Ac en la Figura II B y C, respectivamente. Los perfiles de BS de GB10%E-Ac y GB20%E-Ac mantuvieron durante los siete días de almacenamiento lo que indica que son sistemas estables durante este período. Además, los IC de estas emulsiones disminuyeron drásticamente en comparación con GB5%E-Ac (Tabla II.3). El IC de GB20%E-Ac fue el más bajo siendo esta emulsión la más estable. Los valores de tamaño de gota después de siete días de almacenamiento muestran incrementos de alrededor del 13% en GB10%E-Ac y GB20%E-Ac (Tabla II.1), lo que fue imperceptible en las observaciones microscópicas (Figura II.2 D y F). En la Figura II.4 se presentan fotos de las emulsiones tomadas luego de ser preparadas (Día 1) y luego de los siete días de almacenamiento (Día 7). GB5%E-Ac

fue la única emulsión que presentó variación a simple vista, observándose una clarificación en el fondo del tubo.

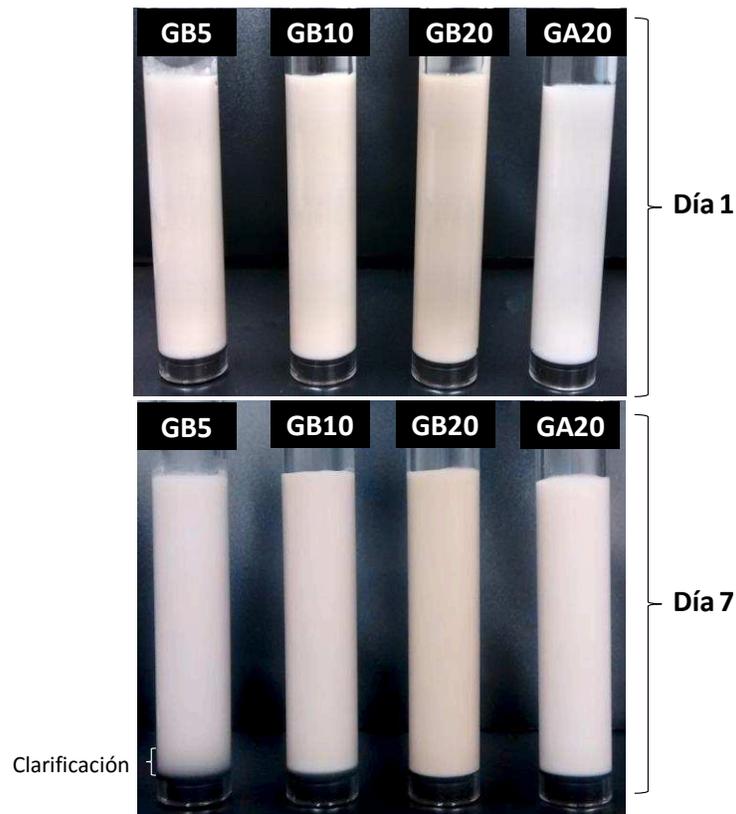


Figura II.5. Emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de GB al 5% p/p (GB5), 10% p/p (GB10), 20% p/p (GB20) y solución de GA al 20% p/p (GA20) justo después de la preparación (Día 1) y luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C (Día 7).

El aumento de la estabilidad que se evidenció al aumentar la concentración de GB está relacionado con el aumento de moléculas de GB adsorbidas en la interfase aceite-agua lo que produce una mayor repulsión estérica de las gotas y previene la agregación de las gotas. Por

otro lado, el aumento de la concentración de GB aumenta la viscosidad de la emulsión restringiendo el movimiento de las gotas de aceite a través de una fase continua altamente viscosa (Khouryieh y col., 2015). Algunos autores también proponen la idea de la formación de una red de goma que inmoviliza las gotas de aceite y les impide acercarse aumentando la estabilidad física (Acedo-Carrillo y col., 2006). El mecanismo de la estabilización de la interface aceite-agua de la GB se basa en los componentes AGP presentes en su estructura macromolecular, como se vio en el Capítulo I. Los AGP confieren un carácter anfifílico a la GB y son responsables de su actividad interfacial. Las partes proteicas de los AGP se adsorben en la interfase por sus residuos hidrófobos disminuyendo la tensión interfacial, mientras que los polisacáridos se extienden desde la superficie de la gota hacia la fase continua hidrofílica aumentando la repulsión estérica entre las gotas (Picton y col., 2000).

II.1.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB.

En la Figura II.6 se muestran las medidas de viscosidad aparente (η_{ap}) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de emulsiones preparadas con soluciones de GB a diferentes concentraciones. Se puede observar que el aumento de concentración de GB produce un aumento en la η_{ap} de las emulsiones. La emulsión GA20%E-Ac presentó menor η_{ap} que GB20%E-Ac, así como se vio en el Capítulo I al comparar la η_{ap} de las soluciones de GB y GA (Figura I.7).

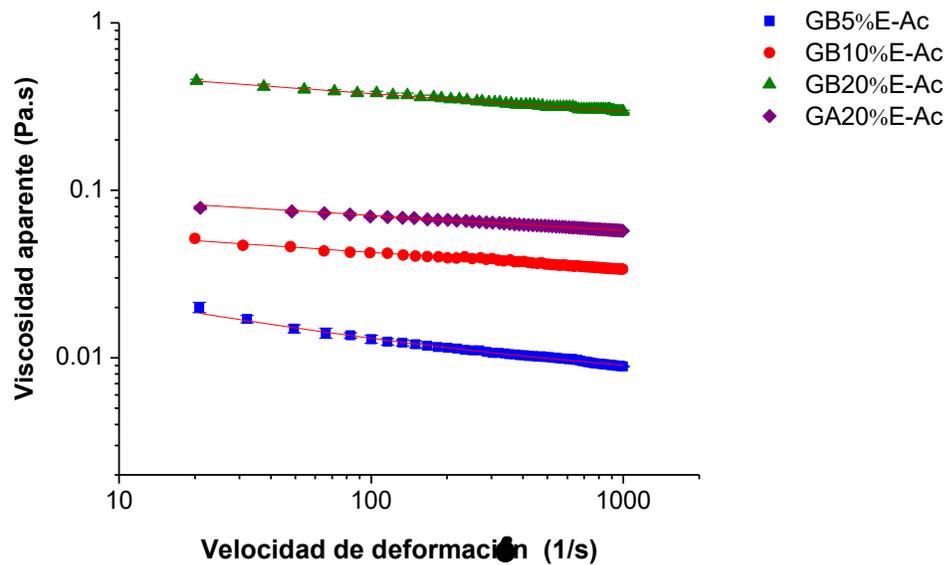


Figura II.6. Efecto de la concentración de goma en la viscosidad aparente de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB y GA y ajuste al modelo propuesto por Sisko (1958) (línea roja).

Por otro lado, todas las emulsiones de GB y GA presentaron comportamientos de un fluido pseudoplástico a bajas $\dot{\gamma}$ y a mayores $\dot{\gamma}$ el comportamiento se vuelve el de un fluido Newtoniano al igual que lo observado para las soluciones de estas gomas. Los datos se ajustaron al modelo propuesto por Sisko (1958) y se obtuvieron los parámetros de índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) (Tabla II.4). Al aumentar de concentración de GB, se puede observar que los parámetros k_s y η_∞ presentan una tendencia a aumentar, indicando un incremento de la viscosidad, como se observó en las soluciones de GB. Por otro lado, el parámetro n_s fue menor a 1 en todos los casos reflejando un comportamiento pseudoplástico. Se puede decir que las

emulsiones de GB mantienen el comportamiento presentado por las soluciones de GB, aunque los valores de η_{ap} fueron menores en el caso de las emulsiones.

Tabla II.4. Efecto de la concentración de GB en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de aceite de maíz a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R^2
GB5%E-Ac	$0,04 \pm 0,00^a$	$0,65 \pm 0,02^b$	$0,0058 \pm 0,0003^a$	0,993
GB10%E-Ac	$0,08 \pm 0,00^a$	$0,53 \pm 0,01^a$	$0,0316 \pm 0,0004^b$	0,998
GB20%E-Ac	$0,59 \pm 0,05^b$	$0,88 \pm 0,02^d$	$0,0295 \pm 0,0057^b$	0,987
GA20%E-Ac	$0,08 \pm 0,00^a$	$0,73 \pm 0,05^c$	$0,0478 \pm 0,0009^c$	0,998

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar ($n=3$). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$), test LSD.

II.2. EMULSIONES DE LIMONENO

II.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB

La naturaleza de la fase dispersa en las emulsiones de GB se consideró un aspecto importante a estudiar, en línea con estudios anteriores realizados con GA y otras gomas (Acedo-Carrillo y col., 2006; Dickinson y col., 1991). En este sentido, se ensayaron y analizaron emulsiones de limoneno estabilizadas con GB en diferentes concentraciones en comparación

con una emulsión preparada con GA. Se eligió el compuesto limoneno como compuesto modelo de flavour. Este compuesto es utilizado en alimentos, cosméticos, productos de limpieza e insecticidas, entre otras aplicaciones.

En primer lugar, se analizó la distribución de tamaños de gotas de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de GB en diferentes concentraciones (Figura II.7).

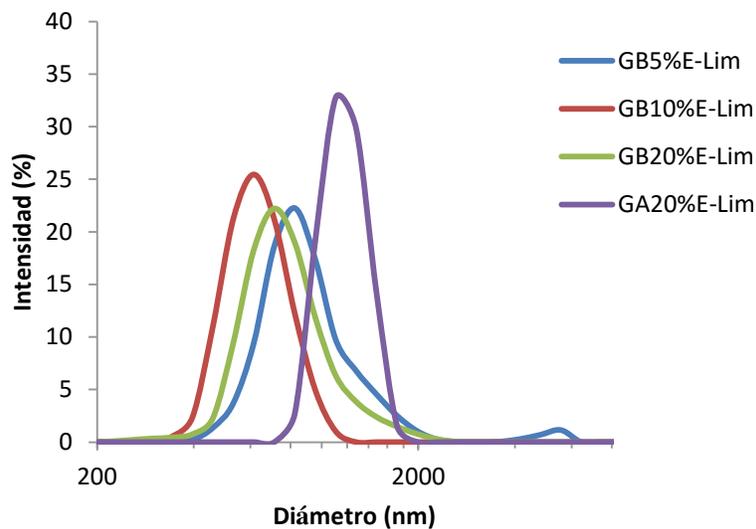


Figura II.7. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB a distintas concentraciones.

La emulsión GB5%E-Lim presentó una distribución bimodal (Figura II.7), lo cual se comprobó en las micrografía de esta emulsión, donde se observa la presencia de dos poblaciones de partículas una de diámetro alrededor de $1\ \mu\text{m}$ y otra de diámetro mayor alrededor de $5\ \mu\text{m}$ (Figura II.8 A).

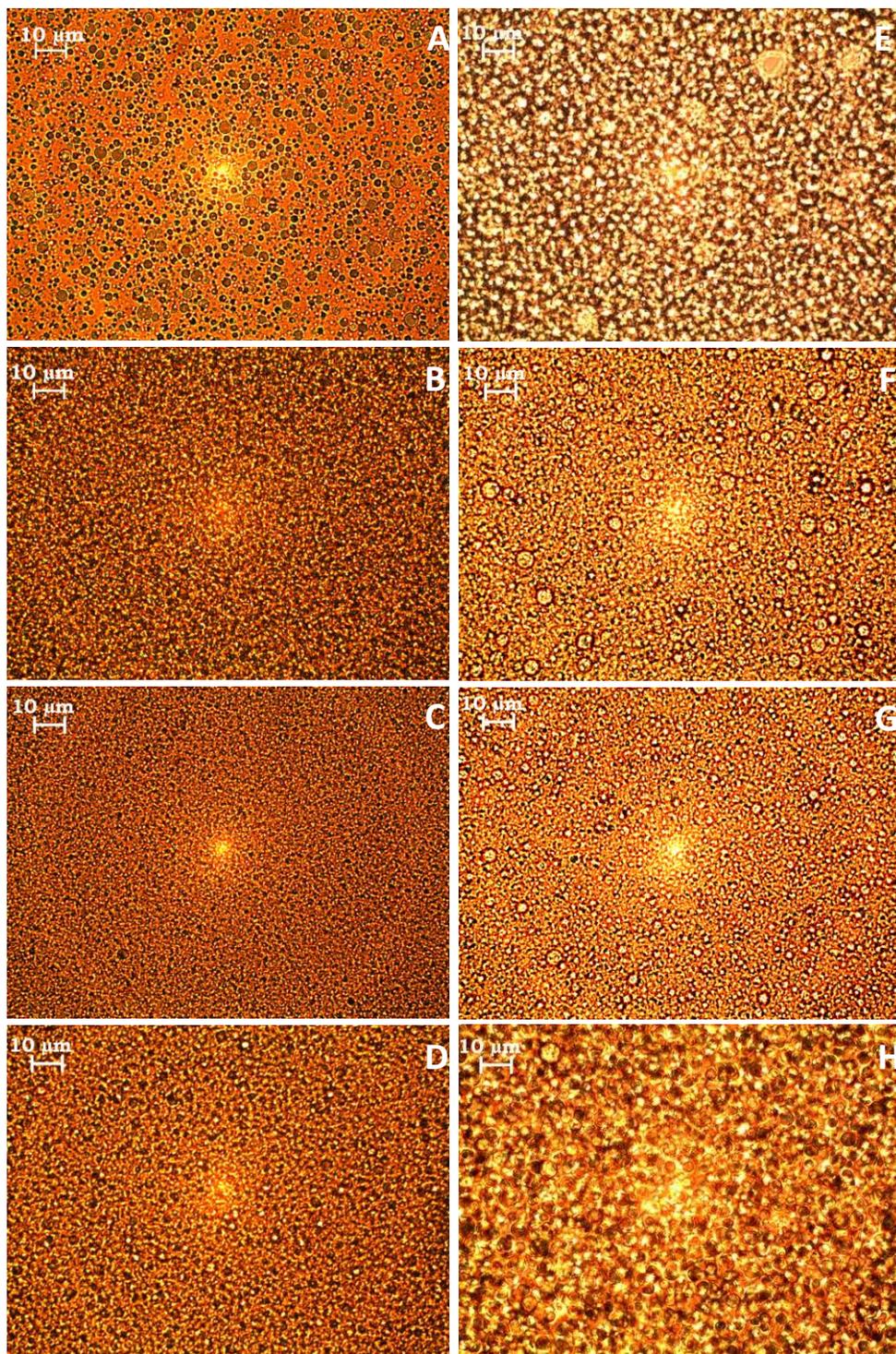


Figura II.8. Micrografías de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de (A) 5%, (B) 10%, (C) 20% p/p de GB y (D) 20% p/p de GA inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barras de escalas de 10 μm.

Las demás emulsiones presentaron distribuciones monomodales (Figura II.7) con menor tamaño de gota como se pudo observar en las micrografías (Figura II.8) y en los parámetros de distribución obtenidos (Tabla II.5).

Tabla II.5. Tamaño de gotas de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.

Emulsión	Día 1			Día 7		
	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)
GB5%E-Lim	1000,6 ± 19,0 ^c	0,46 ± 0,01 ^a	936,0 ± 25,0 ^b	Inestable	Inestable	Inestable
			5086,0 ± 30,4 ^d			
GB10%E-Lim	631,1 ± 17,2 ^a	0,14 ± 0,10 ^a	654,5 ± 18,2 ^a	Inestable	Inestable	Inestable
GB20%E-Lim	759,5 ± 4,0 ^{b,B}	0,19 ± 0,00 ^{a,A}	812,3 ± 3,6 ^{b,C}	775,0 ± 0,4 ^B	0,2 ± 0,0 ^A	834,1 ± 23,0 ^C
GA20%E-Lim	1182,0 ± 47,8 ^d	0,45 ± 0,23 ^a	1126,7 ± 95,9 ^c	Inestable	Inestable	Inestable

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en la misma columna y letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

La emulsión GB10%E-Lim presentó los valores más bajos de Z-average, Pdl y máximo de pico. GB20%E-Lim presentó un tamaño de gota mayor que GB10%E-Lim, por lo que se podría decir que 10% p/p de GB en la solución de preparación se saturó la interface, y al aumentar la concentración de GB se produjo un aumento en el espesor de la capa que recubre la gota, y por lo tanto, las gotas presentaron mayor diámetro. Por otro lado, GA20%E-Lim presentó mayor diámetro de gota que GB20%E-Lim. Estas diferencias de tamaño entre las emulsiones fueron visibles en las micrografías obtenidas (Figura II.8 A, B, C y D).

En comparación con las emulsiones de aceite de maíz, las emulsiones de limoneno en general presentaron un mayor diámetro de gota, siendo claro el aumento del Z-average, del máximo del pico y también del Pdl. Una excepción a esto fue la emulsión de GB10%E-Lim, que presentó valores de Z-average, máximo de pico y Pdl inferiores a los de GB10%E-Ac. Esto es probablemente debido a que las moléculas de GB tendrían mayor afinidad con la interface aceite de maíz-agua que con la interface limoneno-agua y formarían mayor área interfacial en la emulsión de aceite de maíz que en la de limoneno (Bylaite y col., 2001).

Por otra parte, uno de los estudios realizados para entender el comportamiento de los hidrocoloides en la interface agua-aceite es la determinación del potencial ζ . Varios estudios han demostrado la presencia de una interacción electrostérica en la interface agua-aceite debido a la adsorción macromolecular (Garti y col., 1999; Jayme y col., 1999). En la Tabla II.6 se presentan los valores de potencial ζ de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA. Se puede observar que al aumentar la concentración de GB al 20% p/p disminuye el valor absoluto del potencial ζ , lo que podría indicar que esas condición es de menor estabilidad. En comparación con las emulsiones de aceite de maíz se puede observar que, en general, la magnitud del potencial ζ de las emulsiones de limoneno fueron menores, lo que también estaría indicando una menor estabilidad entre la GB que se deposita en la interface y el limoneno.

Tabla II.6. Medidas de pH y potencial zeta de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA.

Emulsión	pH ($\pm 0,02$)	ζ (mV)
GB5%E-Lim	4	$-39,38 \pm 0,73^a$
GB10%E-Lim	4	$-39,70 \pm 0,61^a$
GB20%E-Lim	4	$-33,80 \pm 0,83^b$
GA20%E-Lim	4	$-34,00 \pm 0,87^b$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3).
Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

II.2.2. Estabilidad de las emulsiones de limoneno.

La estabilidad de las emulsiones de limoneno se evaluó midiendo la variación del tamaño de gota en las muestras que no presentaron separación de fases a los siete días de almacenamiento a temperatura ambiente. Sólo la emulsión GB20%E-Lim fue estable a la separación de fases como puede observarse en la fotos de las emulsiones (Figura II.9).

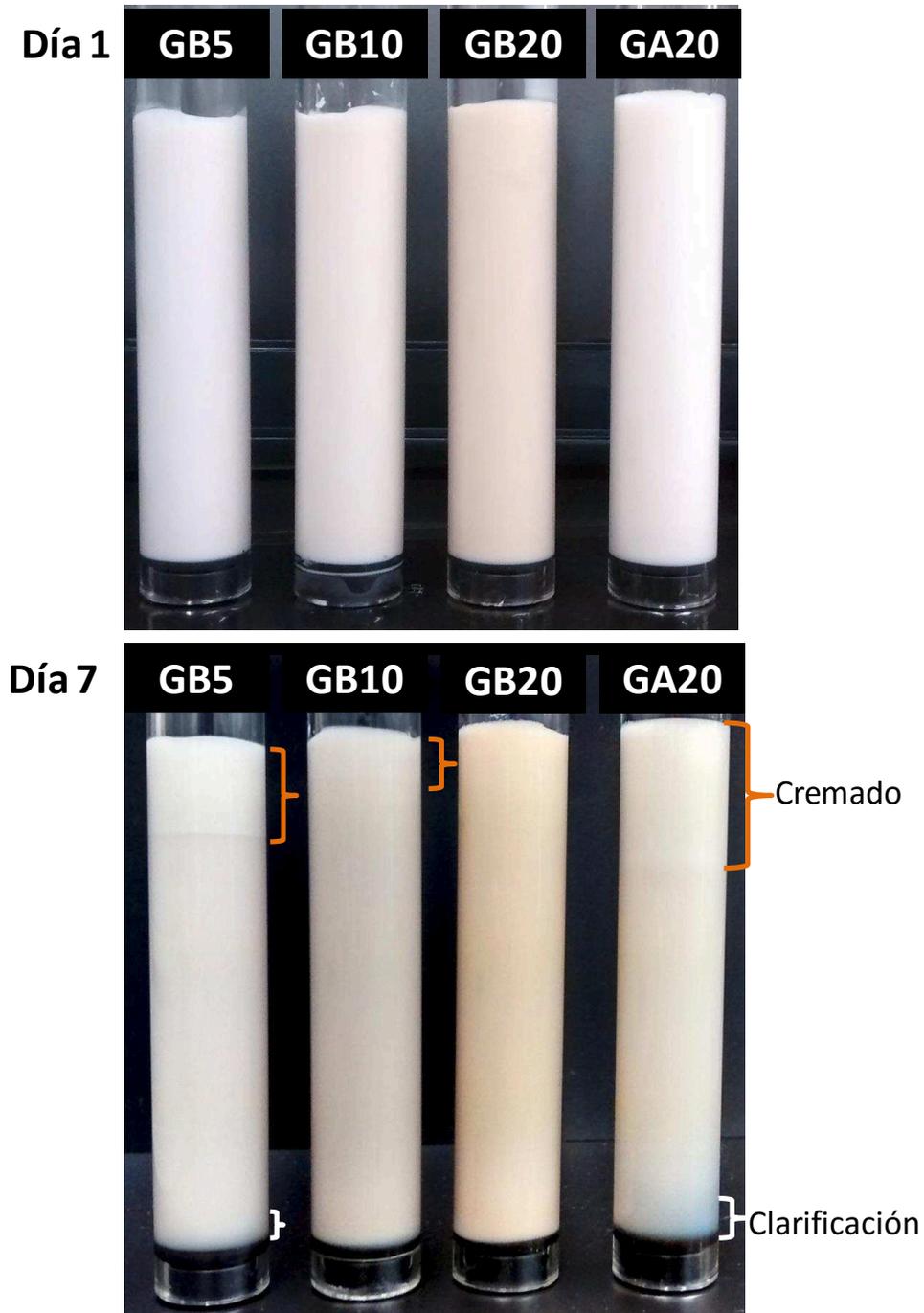


Figura II.9. Foto de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de GB al 5% (GB5), 10% (GB10) y 20% p/p (GB20) y GA al 20% p/p inmediatamente luego de ser preparadas y a los 7 días de almacenamiento a 25 °C.

La distribución de tamaño de gota de GB20%E-Lim a los 7 días de almacenamiento presentó un leve corrimiento hacia valores de diámetros mayores (Figura II.10), así como se puede observar, en la micrografía de esta emulsión, la presencia de partículas de mayor tamaño a los 7 días con respecto a las del día 1 (Figura II.8 G). A pesar de esto, los parámetros Z-average, Pdl y máximo de pico no presentaron diferencias significativas entre las mediciones del día 1 y el día 7 (Tabla II.5).

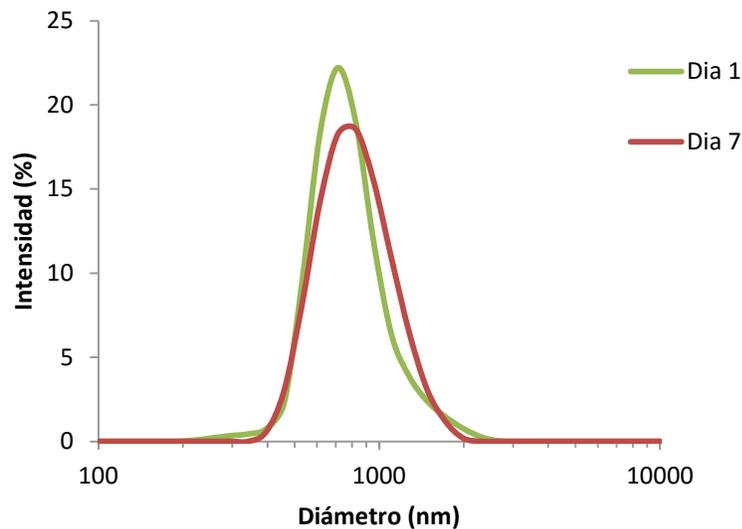


Figura II.10. Distribución de tamaño de gotas de la emulsión de limoneno estabilizadas con GB al 20% p/p luego de ser preparada (Día 1) y a los 7 días de almacenamiento (Día 7).

GB5%E-Lim, GB10%E-Lim y GA20%E-Lim presentaron separación de fases que pudo observarse a simple vista (Figura II.9). GB5%E-Lim presentó una fase de cremado compacta en la parte superior de la emulsión y una fase de clarificación en la parte inferior del tubo.

Mientras que GB10%E-Lim presentó una fase de cremado difusa de menor espesor que la de GB5%E-Lim y no se observó clarificación. Esto estaría indicando una menor velocidad de desestabilización de GB10%E-Lim comparada con GB5%E-Lim. GA20%E-Lim por su parte presentó una fase de crema de mayor espesor y a la vez una fase de clarificación relativamente mayor. Por lo que se podría decir que la estabilidad de las emulsiones seguiría el orden GA20%E-Lim < GB5%E-Lim < GB10%E-Lim < GB20%E-Lim. Esto concuerda con lo observado en las micrografías tomadas el día siete de almacenamiento (Figura II.8 E, F, G y H). La mayor estabilidad presentada por GB20%E-Lim estaría relacionada con una viscosidad relativamente mayor de esta emulsión, y la posible formación de una red tipo gel entre las moléculas de GB que inmoviliza y estabiliza las gotas de limoneno, lo que se analizará en la siguiente sección.

En comparación con las emulsiones de aceite de maíz, se pudo observar menor estabilidad de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA. Este comportamiento fue observado por varios autores en emulsiones estabilizadas con diferentes hidrocoloides como GA, goma de mesquite y β -lactoglobulina entre otros, al comparar la estabilidad al emulsionar diferentes fases dispersas (Acedo-Carrillo y col., 2006; Buffo y Reineccius, 2001; Bylaite y col., 2001; Dickinson y col., 1991). Esta diferencia puede deberse, por una parte, al tamaño de gota relativamente mayor de las emulsiones de limoneno lo que está fuertemente relacionado con la estabilidad. Por otra parte, muchos autores han propuesto el hecho de que el limoneno sea menos insoluble en agua que el aceite de maíz favorece la desestabilización de la emulsión por el proceso de maduración de Ostwald (Acedo-Carrillo y col., 2006; Buffo y Reineccius, 2001; Dickinson y col., 1991). Según la ficha de datos de seguridad provista por Sigma-Aldrich, el compuesto (*R*)-(+)-limoneno es inmiscible en agua, a pesar de esto en la literatura se ha

reportado que este compuesto presenta baja o escasa solubilidad en agua, por lo que se presenta cierta ambigüedad con respecto a esta explicación.

Otro factor que podría estar influyendo en la estabilidad podría ser la diferencia en la viscosidad de las emulsiones de aceite de maíz y de limoneno lo que se analizara en la sección siguiente.

II.2.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB.

En la Figura II.11 se presentan las medidas de viscosidad aparente (η_{ap}) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB en diferentes concentraciones.

Como se puede observar al aumentar la concentración de GB aumenta la η_{ap} de las emulsiones, siendo GB20%E-Lim la emulsión con mayor η_{ap} . Esto concuerda con la mayor estabilidad observada en GB20%E-Lim. Como ya se ha mencionado, el aumento de la viscosidad de la emulsión limita el movimiento de las gotas de la fase dispersa a través de la fase continua, retardando el acercamiento y el drenado de líquido entre dos gotas lo que protege a las gotas de la re-coalescencia y disminuye la velocidad de desestabilización de la emulsión.

Por otro lado, se observó un leve aumento de la η_{ap} de GB10%E-Lim con respecto a GB10%E-Ac, contrariamente a lo esperado al analizar la estabilidad de las emulsiones.

Las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA presentaron comportamientos de un fluido pseudoplástico a bajas $\dot{\gamma}$ y de fluido Newtoniano a mayores $\dot{\gamma}$ por lo que se pueden modelar con la ecuación de Sisko (1958) (Ecuación 2).

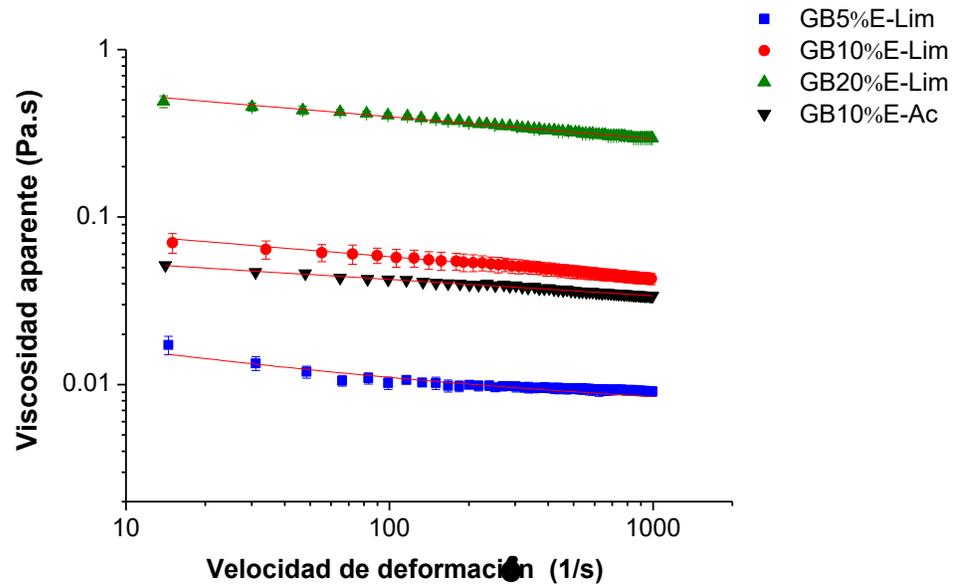


Figura II.11. Efecto de la concentración de goma en la viscosidad aparente de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y GA.

En la Tabla II.7 se presentan los parámetros de índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de limoneno. Al aumentar la concentración de GB se presenta una tendencia a aumentar los parámetros k_s y η_∞ , lo que indicaría un incremento de la viscosidad de las emulsiones al aumentar el porcentaje de GB. Al comparar estos parámetros para GB10%E-Lim y GB10%E-Ac no se aprecia diferencia significativa, a diferencia de lo observado en la Figura II.11, por lo que se puede decir que, en estas condiciones, las características de la fase dispersa no tuvieron efecto sobre la viscosidad de la emulsión.

Tabla II.7. Efecto de la concentración de goma en el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de limoneno a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R^2
GB5%E-Lim	$0,09 \pm 0,06^a$	$0,12 \pm 0,02^a$	$0,0090 \pm 0,0000^a$	0,988
GB10%E-Lim	$0,10 \pm 0,00^a$	$0,80 \pm 0,01^b$	$0,0177 \pm 0,0027^a$	0,992
GB20%E-Lim	$0,68 \pm 0,00^b$	$0,75 \pm 0,03^c$	$0,1898 \pm 0,0237^b$	0,975
GB10%E-Ac	$0,08 \pm 0,00^a$	$0,53 \pm 0,01^c$	$0,0316 \pm 0,0004^a$	0,998

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

Capítulo III. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ENCAPSULANTES DE LA GOMA BREA

La utilización de la técnica de encapsulación se ha diversificado desde sus inicios en innumerables aéreas. En el campo de la alimentación, la enorme demanda en la producción de alimentos funcionales con mayor valor nutricional, bajo porcentaje de aditivos sintéticos y mejores características organolépticas, impulsa la utilización de la encapsulación en innumerables aplicaciones en la formulación y procesamiento de alimentos. Por ejemplo, esta tecnología ha sido utilizada para mejorar la estabilidad de compuestos sensibles (vitaminas) durante la producción, almacenamiento e ingestión, disminución de la evaporación y degradación de volátiles bioactivos (aromas), enmascarar sabores indeseados (polifenoles), o limitar la exposición de ácidos grasos insaturados al oxígeno, agua o aire (Fathi y col., 2014). Numerosos materiales están disponibles comercialmente para encapsular, siendo los polisacáridos, como la goma arábiga y almidones modificados, los más ampliamente utilizados en aplicaciones alimentarias. Hay una demanda creciente para encontrar polímeros naturales alternativos de bajo costo que proporcionen una alta productividad y, al mismo tiempo, satisfagan una adecuada calidad de los productos alimenticios finales (Re, 1998).

La GB al ser hidrocoloide natural, biodegradable, con propiedades funcionales semejantes a las de la GA, representa una prometedora alternativa para reemplazar a la GA en diversas aplicaciones de encapsulación. En este capítulo, se presentan los resultados obtenidos al evaluar la GB como material de pared en la encapsulación de aceite de maíz y limoneno, utilizando la técnica de secado por aspersión. En este capítulo utilizaremos las siguientes siglas para nombrar las microcápsulas obtenidas:

GB5%M-Ac, GB10%M-Ac y GB20%M-Ac, microcápsulas de aceite de maíz obtenidas mediante secado por aspersión de emulsiones de aceite (10% p/p) y soluciones de GB al 5, 10 y 20% p/p, respectivamente, y GA20%M-Ac, microcápsulas de aceite de maíz preparadas con solución de GA al 20% p/p.

GB5%M-Lim, GB10%M-Lim y GB20%M-Lim, microcápsulas de limoneno obtenidas mediante secado por aspersión de emulsiones de limoneno (10% p/p) y soluciones de GB al 5, 10 y 20% p/p, respectivamente, y GA20%M-Lim, microcápsulas de limoneno preparadas con solución de GA al 20% p/p.

III.1. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE MAÍZ

III.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz.

Las emulsiones de aceite maíz fueron deshidratadas mediante secado por aspersión para obtener un producto en polvo. En la Figura III.1 se muestran las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas.

En general, las microcápsulas preparadas con GB y GA como materiales de pared presentaron morfologías externas similares: forma cuasi esférica, con algunas contracciones, sin grietas o fisuras aparentes y diferentes tamaños. Esto podría indicar que las microcápsulas tienen una baja permeabilidad a los gases, otorgando protección y retención del material encapsulado. Sin embargo, se observó que algunas partículas de GB5%M-Ac presentaron poros (Figura III.1B). Algunos autores sugieren que estos poros se forman probablemente en la última

fase del proceso de secado, debido a una contracción no uniforme del material de pared (Buma, 1971). La porosidad de las microcápsulas expone al material encapsulado y puede afectar la determinación de aceite libre que se realiza mediante la extracción con solvente ya que una parte considerable del aceite encapsulado podría ser extraído desde el interior de las microcápsulas debido a la penetración de solvente a través del poro (Klinkesorn y col., 2006). Varios autores también han obtenido microcápsulas de morfología similar a las observadas en este trabajo, al utilizar secado por aspersión como proceso de microencapsulación (Carneiro y col., 2013; Klinkesorn y col., 2006; Rodea-González y col. 2012).

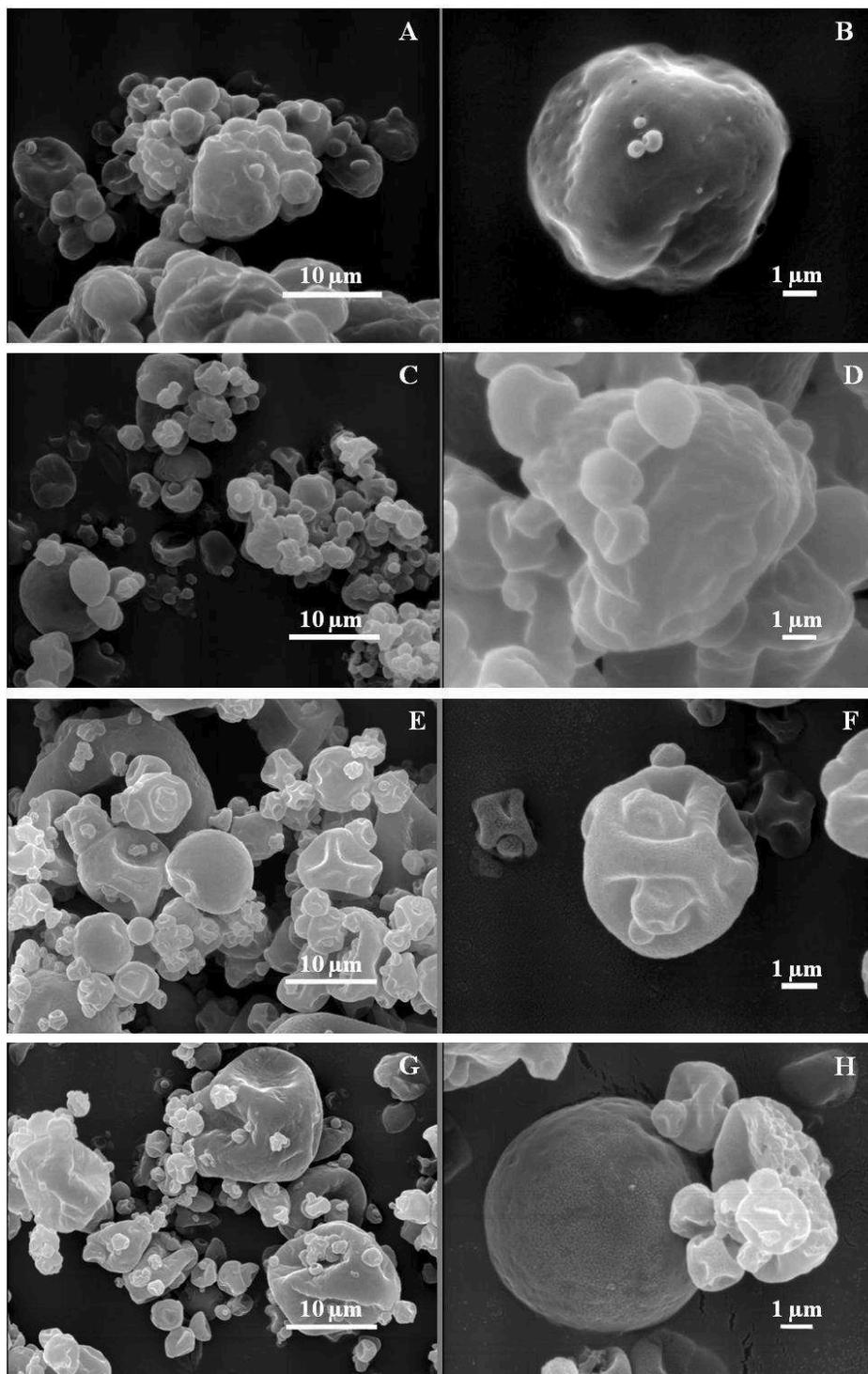


Figura III.1. Micrografías (SEM) de las microcápsulas (A) GB5%M-Ac al 3000X, (B) GB5%M-Ac al 10000X, (C) GB10%M-Ac al 3000X, (D) GB10%M-Ac al 10000X, (E) GB20%M-Ac al 3000X, (F) GB20%M-Ac al 10000X, (G) GA20%M-Ac al 3000X y (H) GA20%M-Ac al 10000X.

Por otro lado, se observó que en general los polvos exhiben un amplio rango de tamaño de partícula, con diámetros que varían desde 0,6 hasta 26 μm (determinados con el procesador de imágenes Leica Application Suite X). Esta gran dispersión de tamaños es una característica típica de las partículas que se producen mediante secado por aspersion (Carneiro y col., 2013).

Las partículas de GB5%M-Ac mostraron tamaños de partículas ligeramente mayores que GB10%M-Ac pero con menor polidispersidad (de 1,8 a 10 μm). Además, GB5%M-Ac mostró una tendencia a formar aglomerados de partículas con aspecto de estar fusionadas. Según McNamee y col. (1998), esta apariencia podría estar relacionada con la presencia de aceite superficial en los polvos. GB10%M-Ac y GB20%M-Ac presentaron partículas en rangos de tamaños más amplio, 0,8 a 10 μm y 0,9 a 26 μm , respectivamente. Aunque la polidispersidad de tamaños de partícula aumentó con la concentración de goma, las partículas más pequeñas fueron la población mayoritaria en ambos polvos. Esto estaría relacionado a la mayor concentración de GB que dio lugar a emulsiones con menor tamaño de partícula (Capítulo II, Tabla II.1). GA20%M-Ac presentó apariencia similar a GB20%M-Ac, aunque se observaron algunas partículas de mayor tamaño en los polvos de GA.

III.1.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de aceite de maíz.

El agua es uno de los principales componentes de los alimentos y un factor determinante para su conservación y seguridad. El contenido de humedad se ha utilizado en muchas ocasiones como un parámetro indicativo de las propiedades de un alimento, ingrediente o aditivo. La actividad de agua (a_w) de un producto (alimento, ingrediente o aditivo) es el

parámetro que mide el estado energético del agua, o dicho de forma equivalente, es la fracción del contenido de humedad total que está en forma libre (no unida o coordinada a radicales hidrófilos). Normalmente, el valor de la a_w en un producto alimentario condiciona los procesos de alteración relacionados con el desarrollo de microorganismos, la inestabilidad química y enzimática, las propiedades físicas y la absorción de humedad ambiental. El agua puede afectar la reactividad química a través de distintos mecanismos, actuando como solvente, reactivo, o afectando a la movilidad de los reactivos debido a su influencia sobre la viscosidad del sistema. Por lo que la a_w tiene influencia sobre la oxidación de las grasas, el oscurecimiento no enzimático, la degradación de vitaminas, las reacciones enzimáticas, la desnaturalización de proteínas, y la temperatura de gelatinización y retrogradación de almidones. Por lo tanto, cuanto menor sea la a_w , mejor se conservará el producto. Por otro lado, la a_w también está relacionada con la textura de los alimentos, a una mayor actividad, la textura es mucho más jugosa y tierna, sin embargo, el producto resulta más susceptible a alteraciones.

En la Tabla III.1 se presentan los valores de humedad y a_w de los polvos de aceite de maíz preparados con soluciones de GB y GA. No se observó una tendencia en la relación de la concentración de la goma con el contenido de humedad o el a_w . GB5%M-Ac presentó el menor contenido de humedad, seguida por GB20%M-Ac. Por otra parte, el contenido de humedad y a_w de GB20%M-Ac fueron menores que los de GA20%M-Ac y menor que algunos valores encontrados en la literatura. Por ejemplo, Kim y Morr (1996) informaron un contenido de humedad de 5,7% para microcápsulas de aceite de naranja con GA como material de pared obtenidas por secado por aspersión con una relación de aceite/goma similares a GB20%M-Ac. Rodea-González y col. (2012) obtuvieron contenidos de humedad en el rango de 4,35 a 5,26%

en microcápsulas de aceite de chía preparadas con concentrado proteico de suero de leche (WPC), GA y goma de mezquite como materiales de la pared. Autores como Carneiro y col. (2013), Hogan y col. (2001b) y Jafari y col. (2008a) obtuvieron contenidos de humedad inferiores a éstas (1- 3%) al encapsular aceite de soja, aceite de pescado y aceite de linaza, con diferentes materiales de la pared y observaron que los resultados obtenidos eran independientes del material de pared utilizado. En cambio, el contenido de humedad ha sido relacionado con las temperaturas utilizadas en el proceso de secado por aspersión (Klinkesorn y col., 2006).

Tabla III.1. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las microcápsulas de aceite de maíz.

Muestra	Contenido de Humedad (%)	a_w
GB5%M-Ac	1,17 ± 0,02 ^a	0,356 ± 0,004 ^b
GB10%M-Ac	3,73 ± 0,10 ^c	0,374 ± 0,002 ^c
GB20%M-Ac	2,77 ± 0,07 ^b	0,318 ± 0,001 ^a
GA20%M-Ac	4,38 ± 0,02 ^d	0,412 ± 0,003 ^d

Resultados presentados como la media de triplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

III.1.3. Análisis de color de las microcápsulas de aceite de maíz.

La diferencia de color de los polvos puede ser cuantificada por mediciones colorimétricas de coordenadas triestímulo, con los parámetros L^* que representa la luminosidad de color

Resultados y Discusión

($L^*=0$ indica negro y $L^*=100$ indica blanco), a^* que representa la posición entre rojo y verde (valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y b^* la posición entre amarillo y azul (valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo). En la Tabla III.2 se presentan los valores de estos parámetros obtenidos para GB, GA y para los polvos de aceite de maíz, y en la Figura III.2 se muestran las fotografías de estos últimos.

Tabla III.2. Coordenadas de color de las microcápsulas de aceite de maíz.

Muestra	L^*	a^*	b^*
GB	$70,05 \pm 0,59^a$	$4,70 \pm 0,09^e$	$23,44 \pm 0,43^e$
GA	$87,15 \pm 0,25^d$	$1,26 \pm 0,04^d$	$12,31 \pm 0,07^d$
GB5%M-Ac	$85,59 \pm 0,38^b$	$0,60 \pm 0,06^b$	$10,21 \pm 0,47^c$
GB10%M-Ac	$88,03 \pm 0,43^e$	$0,58 \pm 0,05^b$	$9,76 \pm 0,05^b$
GB20%M-Ac	$86,35 \pm 0,19^c$	$0,70 \pm 0,03^c$	$10,41 \pm 0,12^c$
GA20%M-Ac	$92,43 \pm 0,48^f$	$0,10 \pm 0,03^a$	$4,33 \pm 0,10^a$

Resultados presentados como la media de cuadruplicados \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

En las fotografías se puede observar un aumento de color en los polvos al aumentar la concentración de GB, sin embargo, las coordenadas de color no reflejan una tendencia clara del color con respecto a la concentración de goma. Se puede decir que GB20%M-Ac presentó una relativa baja luminosidad (bajo L^*) y una leve tendencia hacia el rojo (a^*+) y amarillo (b^*+).



Figura III.2. Fotografías de las microcápsulas en polvo de aceite de maíz.

Por otro lado, se observa una clara diferencia entre los polvos de GB y GA, tanto en la fotografía como en los parámetros de color. La fotografía muestra que todos los polvos de GB resultaron más coloridos que el polvo de GA. Al comparar las coordenadas, se observa que los polvos de GB presentaron menos luminosidad (valores más bajos de L^*) y fueron más coloridos (a^* y b^* +) que GA20%M-Ac. Esto es coherente con el color de la GB que es marrón rojizo, y presentó los valores más altos de a^* y b^* , y el valor más bajo de luminosidad (L^*), mientras que la GA es de un color blanco amarillento.

III.1.4. Eficiencia de encapsulación (EE) de aceite de maíz.

Para evaluar la capacidad de encapsulación de la GB comparada con la GA se determinaron diferentes parámetros como ser el aceite libre, aceite total, porcentaje de aceite recuperado y la eficiencia de encapsulación (EE) de los diferentes polvos obtenidos. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla III. 3. Cabe aclarar que la cantidad de aceite libre de los

Resultados y Discusión

polvos por lo general se define como que parte del aceite que se puede extraer con disolventes orgánicos y depende fuertemente de las condiciones de extracción utilizadas y del material de pared (Klinkerson y col., 2006). Por lo tanto, el valor de EE refleja no sólo la presencia de aceite libre en la superficie de las partículas, sino también el grado en que la matriz de encapsulación puede impedir la extracción de aceite encapsulado (Hogan y col., 2001a).

Tabla III.3. Aceite libre, aceite total, aceite recuperado y eficiencia de encapsulación (EE) de la microencapsulación de aceite de maíz.

Muestra	Aceite libre (g/ 100g polvo)	Aceite total (g/ 100g polvo)	Aceite recuperado*(%)	EE (%)
GB5%M-Ac	40,29 ± 2,28 ^b	61,20 ± 0,70 ^c	88,74 ± 0,72 ^a	34,16 ± 3,16 ^a
GB10%M-Ac	29,75 ± 1,08 ^c	47,59 ± 1,69 ^b	90,42 ± 2,27 ^a	37,48 ± 0,72 ^a
GB20%M-Ac	9,50 ± 2,82 ^b	33,12 ± 3,40 ^a	92,74 ± 6,74 ^a	71,32 ± 8,30 ^b
GA20%M-Ac	3,83 ± 0,01 ^a	33,80 ± 0,44 ^a	94,64 ± 0,87 ^a	88,66 ± 0,09 ^c

*Calculado en base a la masa de aceite agregada en la preparación de la emulsión. Resultados presentados como la media de triplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0,05$ (Test LSD).

Los valores muestran que la cantidad de aceite libre disminuye al aumentar la concentración de GB utilizada para preparar la emulsión siendo GB5%M-Ac la muestra que presentó el mayor valor de aceite libre. Este resultado podría deberse a diferentes efectos: (i) alta cantidad de aceite en la superficie de las partículas de GB5%M-Ac como se apreció en las imágenes de SEM donde se observó la formación de agregados y partículas fusionadas (Figura III.3 A) (Hogan y col., 2001a), (ii) aceite extraído del interior de la partícula a través de los poros

observados en algunas partículas de GB5%M-Ac (Figura III.3 B), y (iii) tal vez la ruptura de algunas partículas en el proceso de extracción por estar constituidas de una matriz delgada y frágil. La baja concentración de GB disponible para formar la matriz podría ser la causa de los poros observados y la fragilidad de las microcápsulas de GB5%M-Ac. Por otra parte, muchos autores afirman que generalmente un menor tamaño de gotas en la emulsión representa una mayor estabilidad de la misma y esto está fuertemente relacionado con una baja concentración de aceite superficial en los polvos (Barbosa y col., 2005; Carneiro y col., 2013; Jafari y col., 2008a; Kim y Morr, 1996; Liu y col., 2001; Soottitantawat y col., 2005). En el Capítulo II, se mostró que las emulsiones de GB5%E-Ac presentaron gotas de mayor tamaño y menor estabilidad que las otras emulsiones, lo que estaría en concordancia con la elevada cantidad de aceite libre determinado para GB5%M-Ac. Como consecuencia de esto la EE de GB5%M-Ac resultó baja. Cuando se incrementó la concentración de GB, GB10%M-Ac, aunque el aceite libre determinado fue menor, la EE no aumentó significativamente. Un significativo aumento de la EE se logró en GB20%M-Ac, aproximándose a la EE obtenida con que GA20%M-Ac. En esta condición, el aceite libre se redujo drásticamente lo cual es importante para proporcionar estabilidad en el almacenamiento de los materiales encapsulados (Anandaraman y Reineccius, 1987). La EE alcanzada en GB20%M-Ac está en el rango de las obtenidas por Kim y Morr (1996) en el encapsulado de aceite de naranja con GA (75,9% EE) y WPI (72,7% EE) como materiales de la pared. Rodea-González y colaboradores (2012) lograron una EE en el rango de 70,7 a 80,7% al encapsular aceite esencial de chía con WPC combinado con goma mezquite o GA pero utilizando un mayor contenido total de sólidos (30 y 40%). Carneiro y colaboradores (2013) obtuvieron una EE de 62,3% al utilizar GA/maltodextrina como material de la pared para

encapsular aceite de linaza. Los mismos autores alcanzaron 95,7% de EE utilizando una matriz de almidón modificado/maltodextrina.

III.2. ENCAPSULACIÓN DE LIMONENO

III.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de limoneno.

Una vez obtenidas las emulsiones de limoneno fueron deshidratadas por secado por aspersión para obtener un producto en polvo, que en vista de ser utilizado como aditivo en alimentos, resulta más adecuado para su transporte, almacenamiento y conservación. Para analizar la morfología de las partículas de polvo obtenidas se utilizó la técnica de SEM que entrega imágenes de la topografía superficial de las muestras. En la Figura III.3 se presentan las imágenes de las microcápsulas de limoneno con GB y GA como material de pared. Las microcápsulas de limoneno en general presentaron una morfología cuasi esférica y tamaños polidispersos, aunque con particularidades según la concentración de GB utilizada en su preparación. Las partículas de GB5%M-Lim mostraron una apariencia de estar fundidas entre sí formando agregados de partículas. Además se observan en la superficie fisuras de la matriz y algunos pocos poros (Figura III.3 A y E). La muestra de GB10%M-Lim no presentó partículas fundidas ni se observaron fisuras, sin embargo, si se observaron más poros que en GB5%M-Lim (Figura III.3.B y F). En la micrografía de GB20%M-Lim se observaron partículas relativamente más grandes que presentaban fracturas importantes y muchos poros (Figura III.3 C y G).

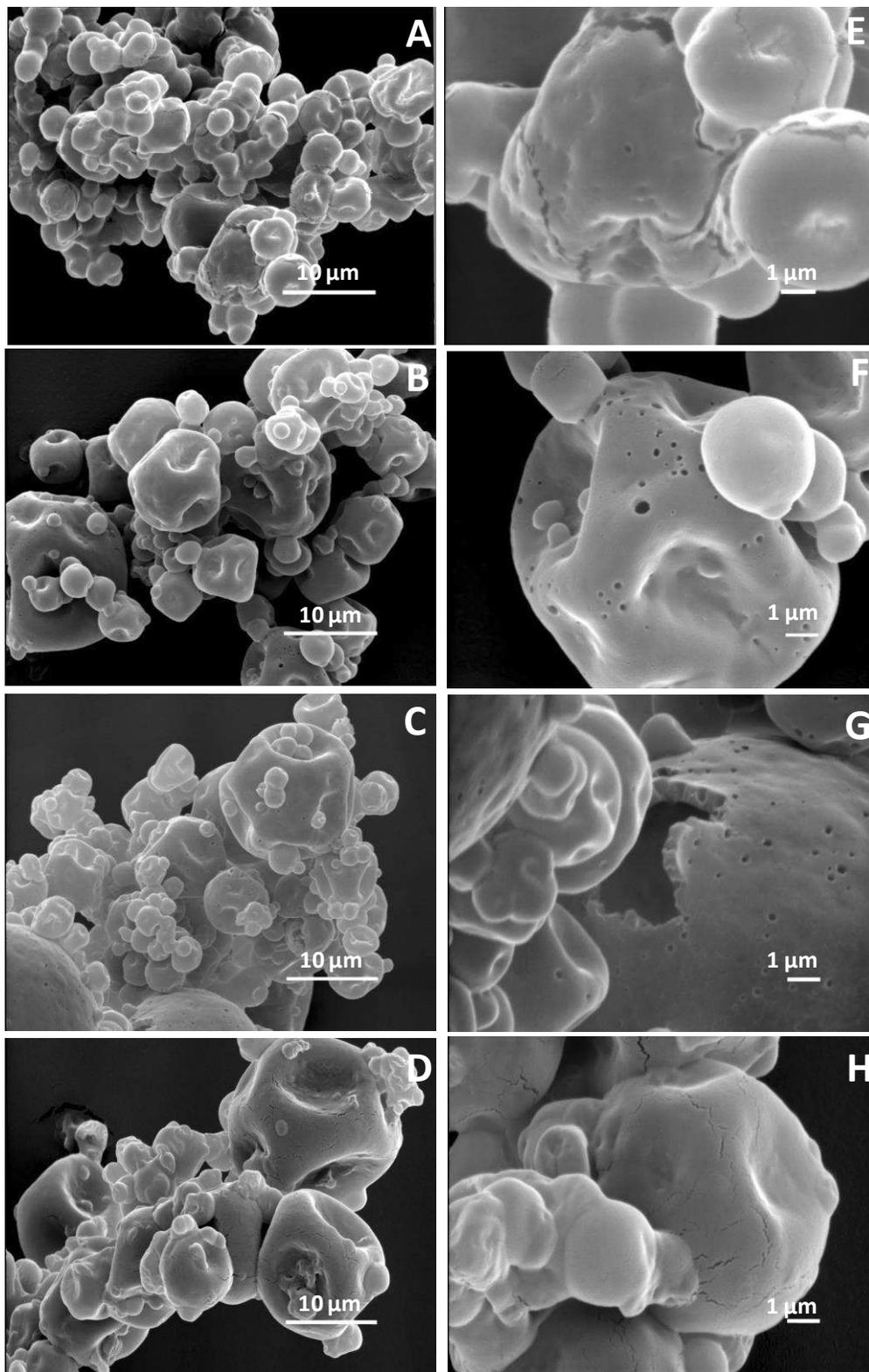


Figura III.3. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de limoneno en polvo preparadas con (A) GB5, (B) GB10, (C) GB20 y (D) GA10 a x3000, y (E) GB5, (F) GB10, (G) GB20 y (H) GA20 a x10000.

Estas imperfecciones en las superficies de las partículas, que no se observaron en las microcápsulas de aceite de maíz (Sección II.1), estarían relacionadas a la baja afinidad de la GB para estabilizar la interface limoneno-agua y la consiguiente baja estabilidad de las emulsiones como se observó en el Capítulo II.

La formación de poros, como se explicó en la sección II.1, puede deberse a una contracción de la matriz en el proceso de secado, y en este caso, donde la matriz formada fue menos estable, fue evidente la formación de mayor cantidad de poros y aparición de importantes fracturas. Esto afectaría en gran medida la estabilidad del producto encapsulado. Sin embargo, pudo observarse que la que estructura interior de las partículas tenían una morfología del tipo matriz (Martins y col., 2014), como se observa en la Figura III.4. Este tipo de estructura estaría protegiendo el material encapsulado que se encuentra en cavidades internas a pesar de los poros y fisuras superficiales. A través de una observación con microscopía confocal de fluorescencia se pudo comprobar que el material encapsulado se encuentra distribuido en la matriz de GB en forma de pequeñas gotas (Figura III.5)

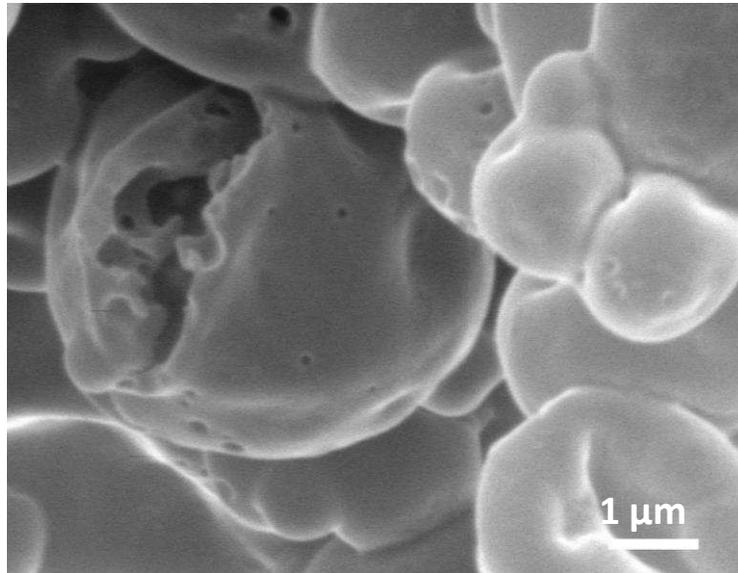


Figura III.4. Micrografía (SEM) de microcápsulas de limoneno en polvo preparadas con GB20 magnificadas a x10000.

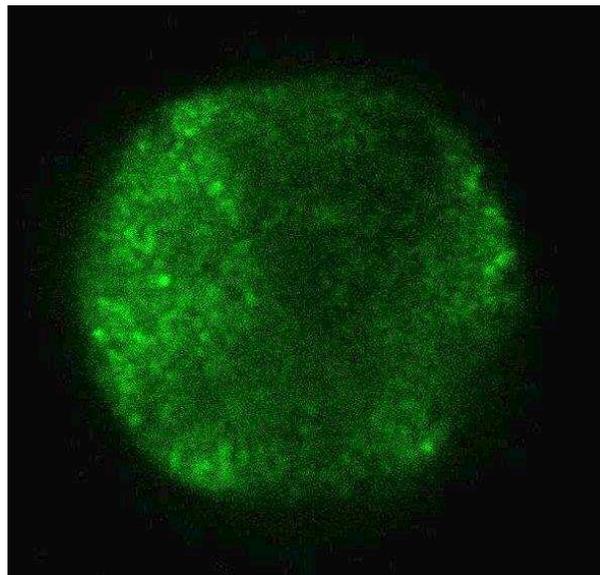


Figura III.5. Micrografía confocal de fluorescencia de una microcápsula de GB20%M-Lim. Limoneno (verde) y GB (negro), tomada en un plano medio de la partícula.

Por otro lado, las partículas de GA20%M-Lim presentaron una apariencia similar a la GB5%E-Lim, pudiéndose observar partículas fundidas formando agregados y muchas fisuras en las superficies principalmente de las partículas de mayor tamaño.

III.2.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de limoneno.

En la Tabla III.4 se presentan los valores de humedad y a_w de las microcápsulas de limoneno preparadas con soluciones de GB y GA. Se observa que la humedad de los polvos disminuye con el aumento de concentración de la goma, siendo GB20%M-Lim la muestra que presentó el menor contenido de humedad entre los polvos de GB. Sin embargo, el contenido de humedad de GA20%M-Lim fue el más bajo.

En los polvos de limoneno se pudo observar que la a_w también disminuyó al aumentar el contenido de GB al 20% p/p y todos los valores estuvieron por debajo de la a_w límite para el desarrollo de microorganismos.

En comparación con las microcápsulas de aceite de maíz, las microcápsulas de limoneno presentaron valores de humedad muy superiores, esto podría deberse a que en la determinación de la humedad se evaporó, además de agua, limoneno que se encontraba en la superficie de las partículas o que difundió a través de los poros observados.

Tabla III.4. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las microcápsulas de limoneno.

Muestra	Contenido de Humedad (%)	a_w
GB5%M-Lim	$8,03 \pm 0,02^d$	$0,499 \pm 0,002^b$
GB10%M-Lim	$7,25 \pm 0,04^c$	$0,499 \pm 0,016^b$
GB20%M-Lim	$5,38 \pm 0,02^b$	$0,472 \pm 0,019^b$
GA20%M-Lim	$3,91 \pm 0,78^a$	$0,390 \pm 0,021^a$

Resultados presentados como la media de triplicados \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

III.2.3. Análisis de color de las microcápsulas de limoneno.

En la Tabla III.5 se presentan los valores de las coordenadas triestímulo determinadas en los polvos de limoneno preparados con GB y GA. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros lo que indica diferencias de color entre los polvos. En general, al aumentar la concentración de GB, los polvos fueron más rojizos (aumenta a^*) y menos luminosos (disminuye L^*), resultando en definitiva en un color más oscuro o intenso, como se observó en los polvos de aceite de maíz y como es de esperar por el color de la GB. Sin embargo, las microcápsulas de GB10%M-Lim fueron particularmente más luminosas.

Tabla III.5. Coordenadas de color de las microcápsulas de limoneno.

Muestra	L*	a*	b*
GB5%M-Lim	88,66 ± 0,51 ^b	-0,06 ± 0,02 ^a	11,88 ± 0,19 ^d
GB10%M-Lim	89,07 ± 0,20 ^b	0,13 ± 0,02 ^c	9,93 ± 0,10 ^b
GB20%M-Lim	86,95 ± 0,09 ^a	0,03 ± 0,02 ^b	10,88 ± 0,14 ^c
GA20%M-Lim	92,99 ± 0,56 ^c	0,17 ± 0,06 ^c	5,45 ± 0,22 ^a

Resultados presentados como la media de cuadruplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

En la Figura III.6 se muestra la fotografía de los polvos de limoneno encapsulados con GB y GA donde se observa una clara diferencia de color entre los polvos, y el hecho de que se vuelven más oscuros y rojizos al aumentar la concentración de GB. Las microcápsulas de GA resultaron blancas y luminosas a diferencia de las de GB.



Figura III.6. Fotografías de las microcápsulas en polvo de limoneno.

III.2.4. Estabilidad de limoneno encapsulado con GB.

En primer lugar, se identificaron los principales productos de oxidación del limoneno, a partir de una muestra oxidada del mismo, mediante cromatografía gaseosa con detector masa (GC/MS), utilizando la biblioteca del National Institute of Standards and Technology (NIST) para identificar los espectros. En la Figura III.7 se muestra el cromatograma obtenido y se identifican los productos de oxidación y los tiempos de retención respectivos. Se puede observar que el limoneno eluyó a los 6,43 min, y posteriormente eluyen varios picos entre los que se identificaron algunos de los productos más conocidos de la degradación del limoneno, entre ellos el 1,2-epoxi-limoneno cis (8,31 min) y trans (8,38 min), el carveol (10,00 min) y la carveona (10,26 min). Estos resultados fueron complementarios para definir, entre otras condiciones, el estándar interno que se utilizaría en el estudio de la estabilidad del limoneno encapsulado.

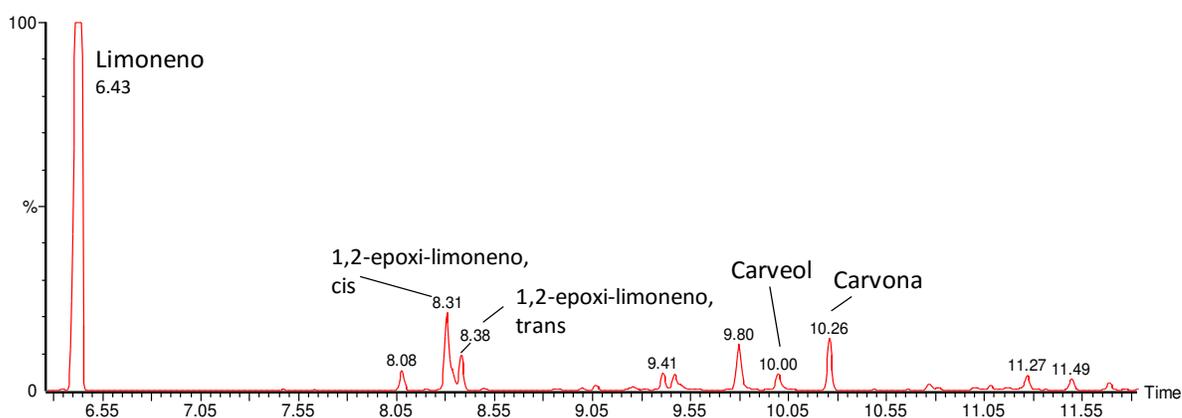


Figura III.7. Cromatograma (GC-MS) del limoneno y productos de oxidación.

La estabilidad del limoneno encapsulado con GB se evaluó a través del seguimiento de la concentración de limoneno en los polvos en el tiempo de almacenamiento en condiciones de alta temperatura (50 °C) para acelerar el proceso de oxidación, y a diferentes a_w para analizar la influencia de este parámetro sobre la estabilidad de las microcápsulas. El limoneno extraído de las microcápsulas fue cuantificado mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando un patrón de limoneno y un método de estándar interno.

En la Figura III.8 se presentan las curvas de concentración de limoneno extraído de las microcápsulas, preparadas con GB en diferentes concentraciones, en función del tiempo de almacenamiento a 50 °C y en presencia de diferentes soluciones saturadas de sales.

Se puede observar que en todos los polvos en las diferentes condiciones de a_w , la concentración de limoneno disminuyó drásticamente en la primera semana y luego tiende a mantenerse constante. Esto puede deberse a que en la primer semana se oxida el limoneno superficial que se encuentra desprotegido del oxígeno. Al continuar el almacenamiento el limoneno que está dentro de la matriz de GB se encuentra protegido de la oxidación, por lo que la concentración de limoneno permanece prácticamente constante.

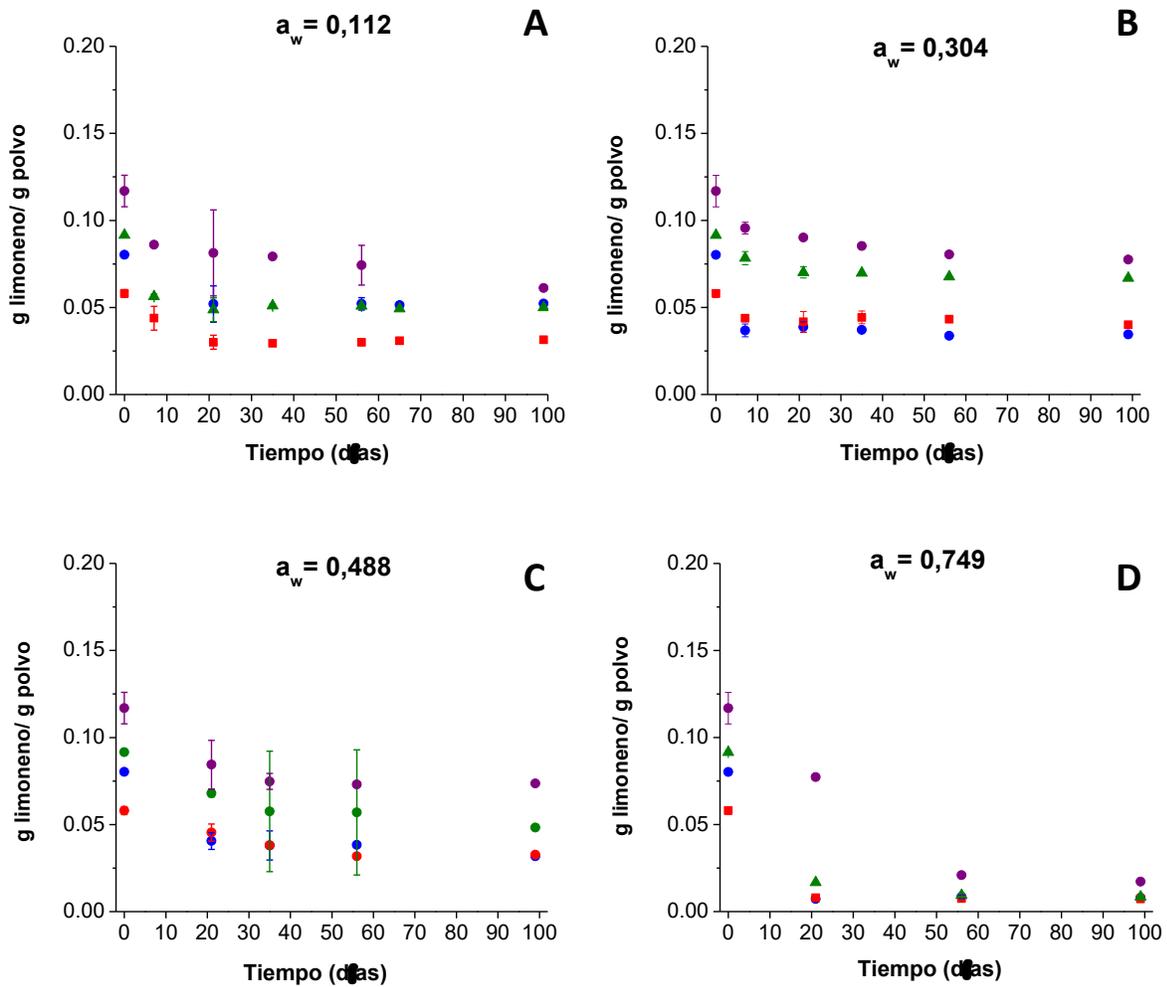


Figura III.8. Estabilidad de limoneno en las microcápsulas de GB5%M-Lim (●), GB10%M-Lim (■), GB20%M-Lim (▲) y GA20%M-Lim (●) en el tiempo de almacenamiento a 50 °C y (A) $a_w=0,112$, (B) $a_w=0,304$, (C) $a_w=0,488$ y (D) $a_w=0,749$.

Por otro lado, no se observaron diferencias importantes entre las curvas de GB5%M-Lim y GB10%M-Lim en las diferentes condiciones, mientras que las curvas GB20%M-Lim en todos los casos presentó valores superiores de concentración de limoneno aproximándose a los valores de GA20%M-Lim, por lo que se puede decir que a esta concentración se obtiene un notable

aumento de la capacidad de retención del limoneno. Sin embargo, las curvas de GA20%M-Lim, fueron en todos los casos superiores a las curvas de las microcápsulas de GB.

En la Figura III.9 se presentan los porcentajes de retención de limoneno iniciales y finales para los distintos polvos en las diferentes condiciones de a_w . La retención inicial de los polvos de GB5%M-Lim y GB10%M-Lim es similar, mientras que los polvos de GB20%M-Lim presentaron el doble de retención inicial. En general, se observa un aumento de la estabilidad del limoneno a medida que la a_w aumenta hasta 0,488, en este punto se produjo los mayores porcentajes de retención por lo que sería la condición de mayor estabilidad del limoneno encapsulado. A mayor a_w (0,749), la retención de limoneno cae drásticamente. En estas condiciones, se observaron cambios estructurales visibles y ganancia de agua por parte de los polvos, resultando en la formación de agregados y aglomeración ("caking") de las partículas (Figura III.10), lo que conduciría a cambios en sus propiedades de flujo y podría ser la causa de la menor capacidad de protección del limoneno. El mismo comportamiento fue observado por Beristain y col. (2002) en microcápsulas de goma de mezquite expuestas a a_w de 0,743. Este autor observó que las tasas de oxidación aumentan a medida que aumenta la a_w de las microcápsulas, cuando el material de pared está en el estado vítreo. En contraste, las microcápsulas en estado viscoelástico muestran mayor estabilidad.

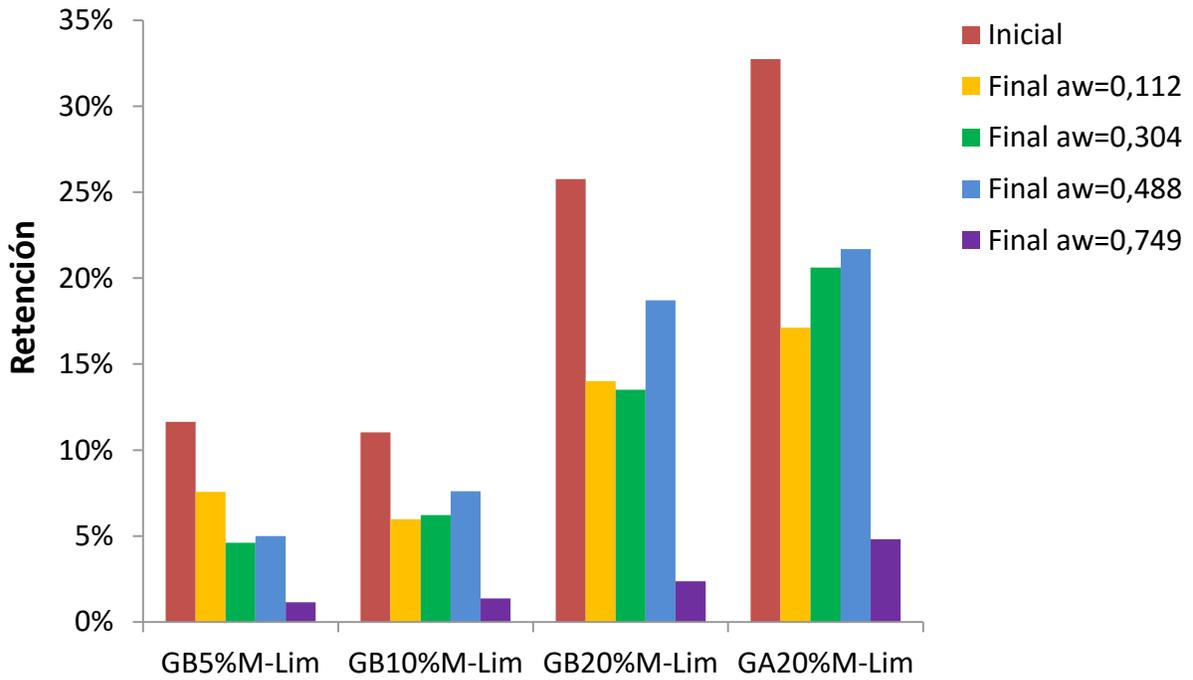


Figura III.9. Porcentajes de retención de limoneno de las microcápsulas de GB al inicio del periodo de almacenamiento a 50 °C y a los 100 días.

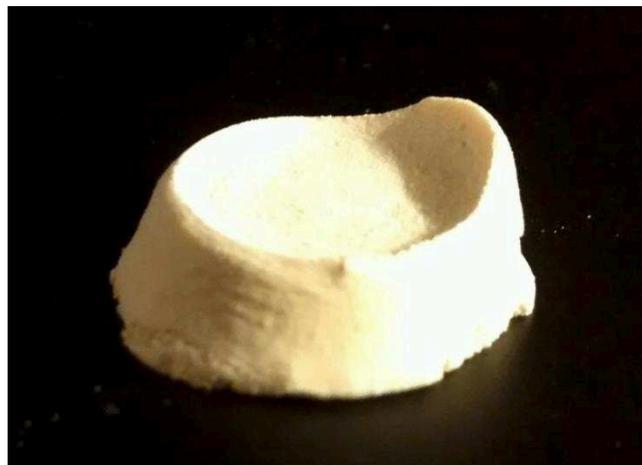


Figura III.10. Efecto de "caking". Fotografía del polvo GA20%M-Lim a los 5 días de almacenamiento a 50 °C y $a_w= 0,74$.

Capítulo IV. EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA ESTRUCTURA, CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS, PROPIEDADES EMULSIONANTES Y ENCAPSULANTES DE LA GOMA BREA

Como ya se ha mencionado, la modificación de gomas se plantea como estrategia para disminuir los inconvenientes que se presentan al utilizar gomas naturales, para mejorar las propiedades funcionales o para desarrollar materiales con propiedades nuevas. En este capítulo se abarca el estudio de dos métodos, tratamiento de ultrasonido y tratamiento térmico, para la modificación de la GB en busca de mejorar sus propiedades como aditivo alimentario y como material de pared para microencapsulación.

IV.1. Modificación de la goma brea por tratamiento de ultrasonido

El ultrasonido (US) de alta intensidad se conoce como una tecnología emergente de procesamiento utilizada cada vez más en la síntesis química, preparación y procesamiento de productos alimenticios y farmacéuticos (Gülseren y col., 2007), y en terapias de enfermedades y daños orgánicos (Mason, 2011). El uso de US para manipular la masa molar (MM) de polímeros ha surgido en la última década como un enfoque prometedor para el procesamiento de oligosacáridos (Li y Feke, 2015). Hasta el momento, se ha estudiado el efecto del US en una variedad de polímeros como el quitosano, xantano, dextrano, quitina, β -(1-3)-D-glucano, lambda-carragenina y almidón, con el fin de elucidar la estructura molecular, producir moléculas de menor MM y/o disminuir la polidispersidad de los sistemas (Kardos y Luche, 2001). En esta sección, se presentan los resultados obtenidos al aplicar un tratamiento de US (100% de amplitud y 30 °C) a soluciones de GB al 10% p/p por diferentes tiempos (15, 30 y 60 min).

IV.1.1. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Filtración por Gel (GPC)

El efecto del tratamiento de US sobre la distribución de MM de la GB se evaluó mediante cromatografía de filtración por gel (GPC) monitoreada por detectores UV y RI simultáneamente. Los perfiles cromatográficos de las muestras de GB sometidas a tratamiento de US (GBUS) a diferentes tiempos se muestran en la Figura VI.1.

En el perfil de UV de la GB sin tratamiento (Figura VI.1 A), se observan picos que eluyen entre 0 y 13 mL correspondiendo a fracciones de alta MM, que podrían ser proteínas agregadas. En los perfiles de UV de las GBUS, se observa que la intensidad de estos picos disminuye progresivamente al aumentar el tiempo de tratamiento de US. Por otro lado, se observa que el hombro que eluye aproximadamente a 35 mL en el perfil de GB, desaparece en los perfiles de las GBUS, y los picos que eluyen entre los 40 y 50 mL en la GB se corren hacia MM menores en las GBUS. Estos resultados indican que el tratamiento de US disminuyó la MM de las fracciones proteicas de la GB.

En el perfil de IR de la GB, se observan dos picos que eluyen a los 35 mL (pico I) y 46 mL (pico II), aproximadamente (Figura IV.1 B). En los perfiles de las GBUS desaparece el pico I y el pico II aumenta notablemente en intensidad a medida que aumenta el tiempo de procesamiento con US. El pico I coincide con el hombro observado a los 35 mL en el perfil de UV, por lo que correspondería al complejo polisacárido-proteínas.

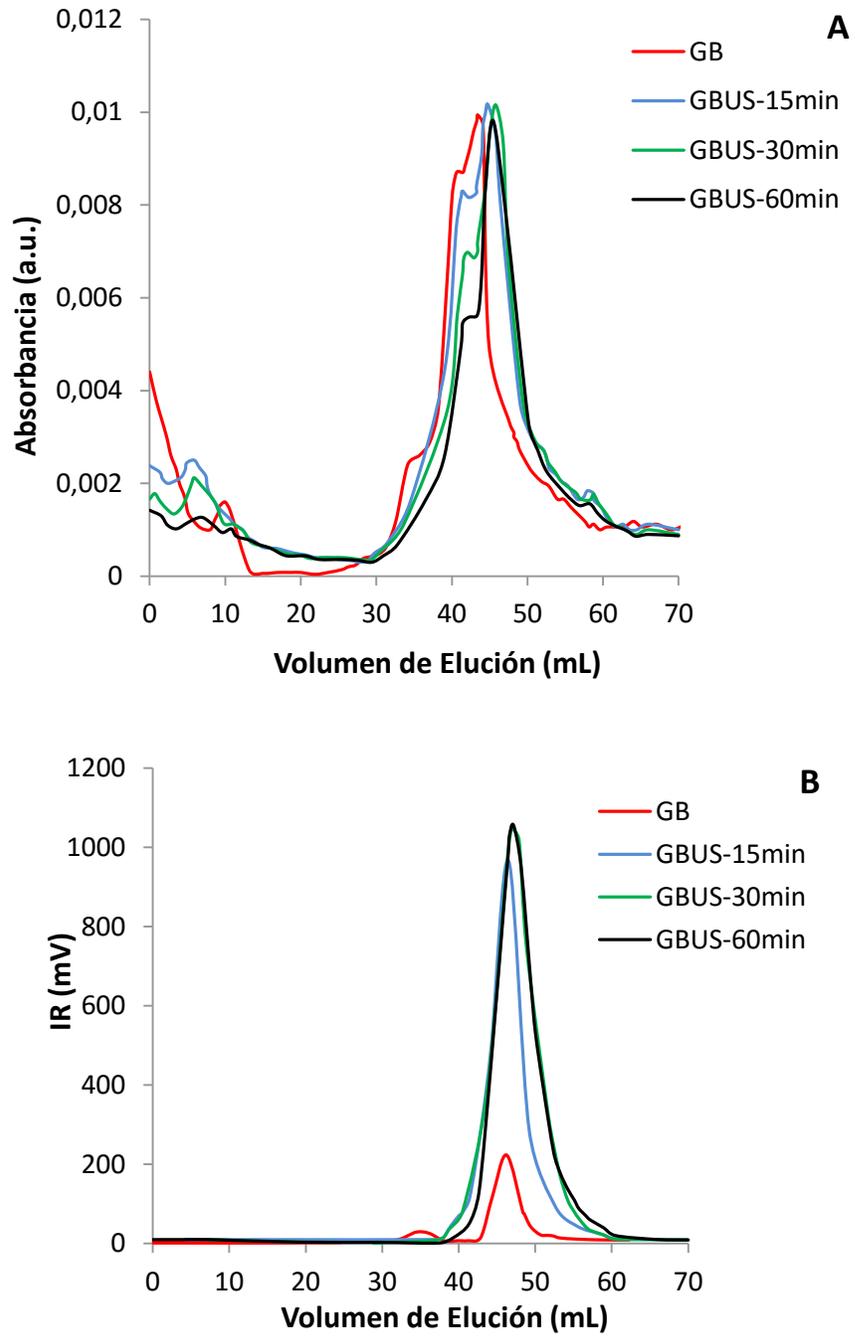


Figura IV.1. Perfiles cromatográficos monitoreados por UV (A) y IR (B) de GB tratadas por ultrasonido a 100% de amplitud 30 °C por 0 min (línea roja), 15 min (línea azul), 30 min (línea verde) y 60 min (línea negra).

A partir de estas observaciones se puede concluir que el tratamiento de US ha disgregado los complejos polisacárido-proteínas y los agregados proteicos de alta MM, resultando en un aumento de fracciones de menores MM.

El efecto del US observado en las conformaciones de polímeros se ha asociado al estrés mecánico causado por la cavitación (Barteri y col., 1996). Cuando el ultrasonido es aplicado al líquido, las ondas sonoras son propagadas en ciclos de compresión y expansión. Por encima de un umbral de intensidad, el ciclo de expansión puede romper la cohesión del líquido y crear microcavidades o burbujas, efecto que se conoce como cavitación (Lepoint y Lepoint-Mullie, 1998; Vilku y col., 2008). Las burbujas crecen hasta finalmente colapsar violentamente generándose alta presión y temperatura. La alta presión debida al choque de la onda, en la zona de la burbuja genera fuerzas de corte lo que puede producir efectos mecánicos, o daño, sobre el medio y/o macromoléculas que se encuentren presentes. Esto podría causar el rompimiento de los enlaces de hidrógeno e interacciones van der Waals en las cadenas polipeptídicas, ocurriendo luego la modificación de la estructura secundaria y terciaria, y la oxidación de los grupos sulfidrilos. Por otro lado, el calor producido por la "implosión" de la cavidad en soluciones acuosas puede producir radicales hidroxilos y átomos de hidrógeno ("termólisis cavitacional" o sonólisis), que pueden favorecer la formación de peróxido de hidrógeno, y en ausencia de oxígeno, radicales de hidroxiperóxidos (Portenlänger y Heusinger, 1994). Estas especies son las responsables de las propiedades oxidativas de las soluciones acuosas sonicadas, pero también, los radicales pueden modificar los aminoácidos con residuos sulfidrilos y fenólicos y formar nuevas uniones covalentes entre las cadenas poliméricas. Los radicales formados por la ruptura de biopolímeros también tienen el potencial para

recombinarse en nuevas estructuras poliméricas (Vilkhu y col., 2011). Además, existe una amplia y rápida oscilación del tamaño de la burbuja, causando un flujo del fluido (microflujo) que produce una mezcla a bajas velocidades de flujo, mientras que a altas velocidades produce una fuerza ligera (sin mezcla), considerada suficiente para causar cierto daño a las macromoléculas (Sinisterra y Barrios,1990).

En la literatura se citan ambos efectos con respecto al efecto del US en la MM. Por ejemplo, se determinó la formación de agregados de soluciones de hidroxipropil metil celulosa (HPMC) sonicadas (Camino y col., 2009), y también, se observó un incremento del tamaño de partícula de albumina sérica bovina, lo que se atribuyó a la formación de agregados. En cambio, la mayoría de los autores que estudiaron el efecto del US sobre la MM en polisacáridos y proteínas informaron una reducción de tamaño como se observó en el presente estudio (Ashokkumar y col., 2009; Baxter y col., 2008; Chen y col., 1997; Furukawa y col., 1983; Iida y col., 2008; Jambrak y col., 2009, 2010; Lorimer y col., 1995; Tang y col., 2009; Villamiel y col., 2000; Zisu y col., 2010). El US podría potencialmente alterar el número de zonas de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas, de manera que se alteraría la fuerza impulsora para el proceso de adsorción en la interfase aceite-agua. Además, si se pierde la estructura terciaria o cuaternaria debido a la aplicación de US, la proteína podría asumir nuevas configuraciones en la interfase más rápidamente, y acelerar el proceso de adsorción (Weis y col., 2011).

IV.1.2. Propiedades emulsionantes de la goma brea tratada con ultrasonido.

IV. 1.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada con ultrasonido.

En la Figura VI.2 se presentan las distribuciones de tamaños de gota de las emulsiones de aceite de maíz (10% p/p) estabilizadas con soluciones de GB al 10% p/p y con soluciones de GBUS al 10% p/p. Se observa que las emulsiones de GBUS producen emulsiones con tamaños de gota mayores a los de la GB sin tratamiento y el tamaño aumenta con el tiempo de tratamiento de US. Por otro lado, las emulsiones preparadas con GBUS se desestabilizaron y separaron en fases dentro de las 24 horas posteriores a su preparación. Por lo que se puede decir que el tratamiento disminuyó la capacidad emulsionante de la GB.

Como se vio en la sección anterior el tratamiento de US disminuyó la MM de las fracciones de GB y disgregó el complejo polisacárido-proteínas que es el responsable de la actividad interfacial de la goma. Esto podría ser la causa de la disminución de la capacidad formadora y estabilizadora de emulsiones de la GB. Por consiguiente, y siendo el objetivo del presente estudio mejorar las propiedades de la GB, no se realizaron otras evaluaciones a partir de las GBUS.

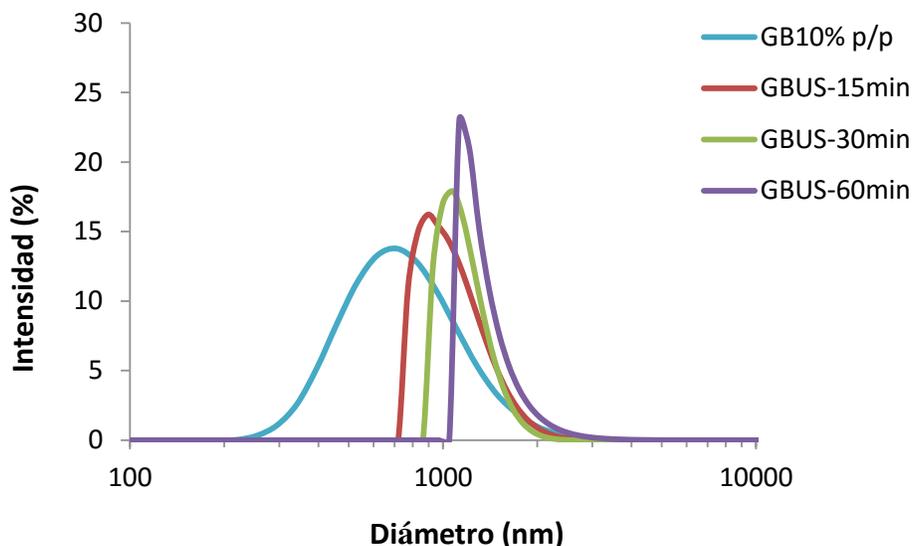


Figura IV.2. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas con ultrasonido.

IV.2. Modificación de la goma brea por tratamiento térmico

El tratamiento térmico aplicado a polímeros produce una variedad de efectos según la naturaleza y conformación del polímero, la temperatura aplicada, el tiempo de tratamiento, el pH y la actividad de agua.

Las proteínas tratadas térmicamente pueden sufrir procesos de desnaturalización y agregación que modifican su conformación en todos los niveles de organización, es decir, estructura primaria, secundaria y terciaria, lo cual es crítico en muchos mecanismos que regulan su funcionalidad. En los tratamientos térmicos suaves (temperaturas hasta 100°C o ligeramente superiores) se rompen uniones de baja energía, como puentes hidrógeno, y se refuerzan las interacciones hidrofóbicas. El desplegamiento de una proteína nativa con los

grupos hidrofóbicos en el interior provoca la exposición de estos grupos al medio. Si hay interacciones hidrofóbicas proteína-proteína y el grado de desplegamiento es elevado, se produce agregación, que puede ocasionar una disminución de la solubilidad y la precipitación de la proteína. Otras consecuencias del tratamiento térmico pueden ser la gelificación, la variación en la capacidad de retención de agua y en las propiedades emulsionantes y espumantes.

Los tratamientos térmicos en los polisacáridos también modifican su estructura y, como consecuencia, sus propiedades funcionales, entre ellas la viscosidad. El calentamiento puede facilitar la disolución de gomas, como la goma guar, pero también puede producir su degradación si se alcanza una temperatura suficientemente alta. Además, se pueden producir reacciones en las que no hay ruptura de enlaces carbono-carbono como la anomerización, la isomerización aldosa-cetosa, y las reacciones de deshidratación; y reacciones en las que sí hay ruptura de enlaces carbono-carbono, dando lugar a la formación de compuestos como acetol, acetoína, diacetilo, y ácidos levulínico, fórmico, láctico, pirúvico y acético. Otro posible efecto es el pardeamiento no enzimático que incluye la caramelización, que involucra sólo a azúcares, y la reacción de Maillard, que ocurre entre un grupo carbonilo, usualmente de un azúcar reductor, y una amina, generalmente de un aminoácido, péptido o proteína.

IV.2.1. Fraccionamiento mediante Cromatografía de Filtración por Gel (GPC)

Para evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre la distribución MM de la GB se utilizó el fraccionamiento mediante GPC monitoreado por detectores UV y RI simultáneamente. En la

Figura IV.3 A se presentan los perfiles cromatográficos monitoreados por UV de las muestras de GB sometidas a 110 °C a distintos tiempos. La GB sin tratamiento térmico presentó cuatro picos dentro de los que se destacan dos picos de relativa alta absorbancia que eluyen a los 40 mL y 44 mL aproximadamente. También se observan picos de alta MM que eluyen al inicio del cromatograma (entre 1 a 5 mL) y a los 10 mL aproximadamente, que como se dijo anteriormente podrían ser agregados proteicos. Y por último se observa un hombro a los 34 mL. Al comparar este perfil con los perfiles de GB tratada térmicamente (GBTT), se observó que las GBTT presentaron picos con mayor absorbancia que la GB nativa y corrimiento en los tiempos de elución. El pico eluído a los 40 mL en GB eluye a los 39 mL en las muestras de GBTT, así también el codo que se observaba a los 34 mL en GB eluye a los 33 mL. Además, en los perfiles de GBTT, se observan picos de menor MM a los 51, 55 y 59 mL y un pico ancho a los 23 mL, los cuales no se observaron en GB. Por otro lado, se observó que las especies de alta MM que eluyen al inicio del cromatograma en GB desaparecen en los perfiles de GBTT, esto podría indicar la desagregación de agregados proteicos.

El perfil cromatográfico de IR de GB presentó dos picos, uno a 34 mL y otro de mayor absorbancia a los 46 mL. El pico eluído a los 34 mL coincide con la elución del hombro observado en el perfil UV, por lo que se puede decir que esta sería la fracción de complejos polisacárido-proteínas. En los perfiles de GBTT, ambos picos aumentan en absorbancia.

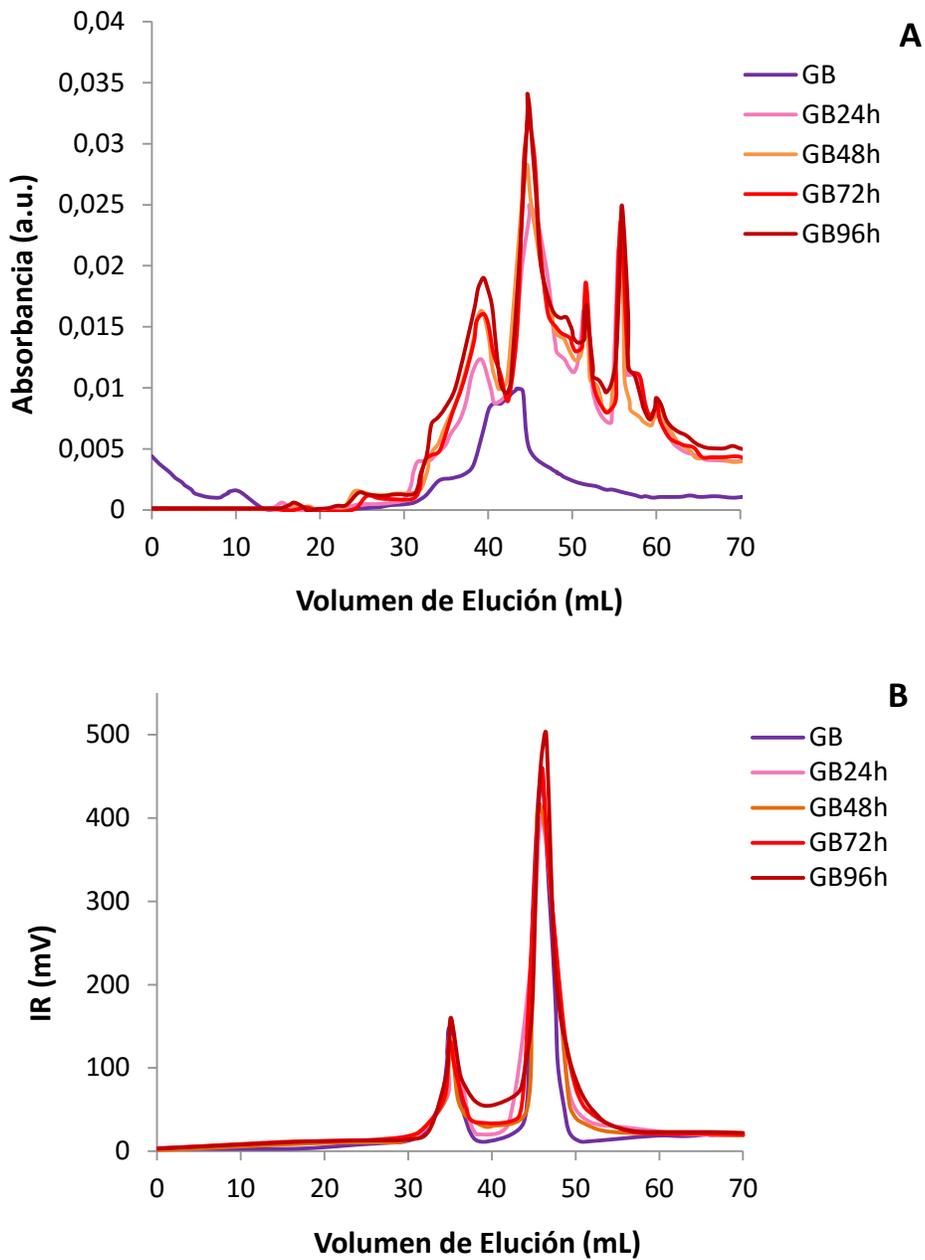


Figura IV.3. Perfiles cromatográficos monitoreados por UV a 280 nm (A) y IR (B) de GB tratadas térmicamente a 110 °C por 0 h (línea violeta), 24 h (línea rosada), 48 h (línea naranja) y 48 h (línea roja) y 96 h (línea bordo).

Estas diferencias pueden deberse a un aumento en la MM de estas fracciones. Según lo propuesto por Al-Assaf y col. (2007) para GA, el tratamiento térmico produciría la "maduración" de la goma, lo que se refiere a que las especies proteicas de la goma estarían formando enlaces covalentes con las cadenas de carbohidratos formando fracciones de mayor MM, o dicho de otra forma, se estaría produciendo una reacción de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard. La reacción de Maillard, involucra la formación de pigmentos marrones, y consiste en la condensación de un grupo carbonilo de un azúcar reductor (aldehídos o cetonas) y un grupo amino libre de (α -amino terminal o ϵ -amino de residuos de lisina expuesto), de aminoácidos, péptidos, proteínas o cualquier compuesto nitrogenado. Se considera una reacción compleja, la cual produce un amplio número de productos denominados "Productos de Reacción de Maillard (PRM)", ocasionando compuestos aromáticos, intermediarios que absorben la luz ultra-violeta y compuestos de oscurecimientos identificados como melanoidinas (Wijewickreme y Kitts, 1997). Estas especies resultantes explican las diferentes funcionalidades y reactividades exhibidas por este tipo de productos.

IV.2.2. Análisis de color de las GB tratadas térmicamente.

El tratamiento térmico de la GB ocasionó un oscurecimiento de las muestras tratadas como se observa en la Figura IV.4.



Figura IV.4. Fotografía de muestras en polvo de GA, GB y las GBTT.

En la Tabla IV.1 se presentan los valores de las coordenadas triestímulo determinadas en las muestras de GB, GA y las GBTT. Se observan diferencias significativas en todos los parámetros lo que indica diferencias de color entre los polvos.

Tabla IV.1. Coordenadas de color de las GB tratadas térmicamente.

Muestra	L*	a*	b*
GA	87,15 ± 0,25 ^f	1,26 ± 0,04 ^a	12,31 ± 0,07 ^a
GB	70,05 ± 0,59 ^e	4,70 ± 0,09 ^b	23,44 ± 0,42 ^b
GB24h	56,70 ± 0,33 ^d	14,13 ± 0,38 ^d	33,02 ± 0,55 ^e
GB48h	56,21 ± 0,26 ^c	13,66 ± 0,21 ^c	30,14 ± 0,39 ^d
GB72h	54,75 ± 0,10 ^b	13,52 ± 0,20 ^c	27,29 ± 0,10 ^c
GB96h	52,96 ± 0,69 ^a	14,12 ± 0,26 ^d	28,29 ± 0,55 ^d

Resultados presentados como la media de cuadruplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

En primer lugar, la GB resultó menos luminosa (menor L*), más rojiza (a*+) con mayor tendencia al marrón (mayor b*) que la GA. Al analizar las GBTT, se observa que el parámetro L*

Resultados y Discusión

disminuye a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, indicando que los polvos se vuelven menos luminosos. Los parámetros a^* y b^* aumentan con respecto a la GB, pero no se observan tendencias con respecto al tiempo de tratamiento térmico. Por lo tanto, en concordancia a lo que se observa en la fotografía, las muestras de GBTT son más oscuras, rojizas y con tonos marrones.

Estos resultados concuerdan con el avance de la reacción de Maillard que produce pigmentos de alto peso molecular denominados melanoidinas. El primer paso, que se identifica para la obtención de los productos de Maillard, es la reacción del azúcar reductor con un amino ácido, donde se observa la formación de los llamados compuestos de Amadori, lo que se consideran el comienzo de las principales reacciones de oscurecimiento (Figura IV.5).

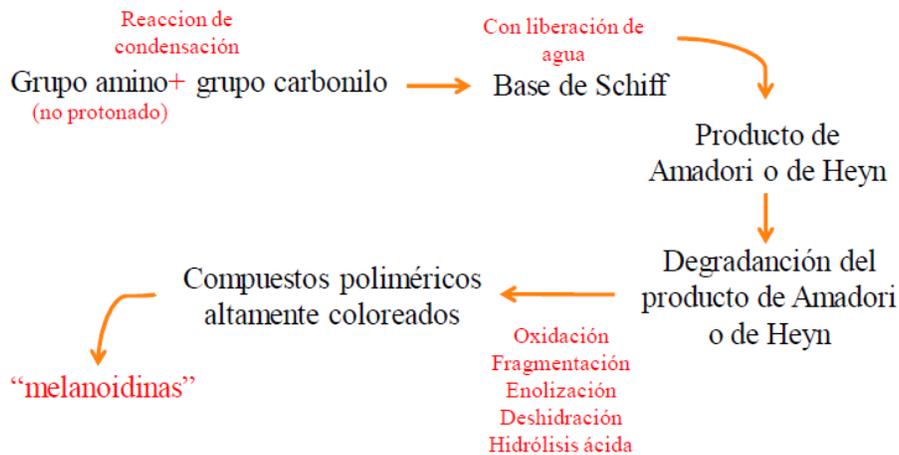


Figura IV.5. Esquema de los pasos de la reacción de Maillard.

IV.2.3. Actividad antioxidante *in vitro* de las GB tratadas térmicamente.

Las melanoidinas, que son los productos más complejos de la reacción de Maillard, de estados más tardíos, han probados ser antioxidantes. La actividad antioxidante y la formación de pigmentos coloreados va aumentando con la temperatura y el tiempo de tratamiento, relacionándose a ambos (Turkmen y col., 2006). Un antioxidante, se define como una molécula capaz de detener o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante, produciendo los denominados radicales libres, los cuales comienzan una cadena de reacción. Los antioxidantes terminan estas cadenas de reacción por remoción de radicales libres intermediarios, inhibiendo otras reacciones de oxidación por oxidación de sí mismos. Como resultado, los antioxidantes a menudo son agentes reductores, como los tioles o polifenoles. Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante, entre ellos, el método de “captura” por el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), es ampliamente usado para evaluar las actividades antioxidantes en un tiempo relativamente corto, comparado con otros métodos (Yanga y col., 2008). Se basa en la reducción de la solución etanólica DPPH[•] en la presencia de un antioxidante donante de hidrogeno, destacándose la formación de un producto no-radical DPPH-H.

En la Tabla IV.2 se presentan los valores de actividad antioxidante evaluados por el método del radical libre DPPH, de las muestras de GB, GBTT y GA. Los valores muestran una notable diferencia entre la muestra de GA y las de GB y GBTT, siendo la actividad antioxidante de estas últimas prácticamente el doble de la actividad presentada por GA. A pesar de las diferencias de color observadas en la sección anterior entre las muestras de GBTT, lo que

podría indicar un mayor avance en la reacción de Maillard, con mayor formación de compuestos tardíos como las melanoidinas, no se observa diferencias significativas de capacidad antiradical entre GB y las GBTT, ni entre estas últimas.

Tabla IV.2. Actividad antioxidante de GB, GBTT y GA medida por el método del radical DPPH.

Muestra	Actividad antioxidante (mg ET*/g polvo)
GA	0,69 ± 0,07 ^a
GB	1,36 ± 0,00 ^b
GB24h	1,39 ± 0,01 ^b
GB48h	1,36 ± 0,00 ^b
GB72h	1,40 ± 0,01 ^b
GB96h	1,37 ± 0,00 ^b

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa al $p < 0,05$ (Test LSD). *Equivalente de Trolox.

IV.2.4. Determinación de productos de Maillard en las GB tratadas térmicamente.

Una forma de evaluar el avance de la reacción de Maillard es la medición de los PRM. Los pigmentos generados tienen absorbancia en el espectro visible a una longitud de onda particular. Según Chawla y col. (2009) a 284 nm absorben las bases de Schiff, y según Zhu y col. (2008) y Wang y Ismail (2012) a 304 nm absorben los compuestos de Amadori. Por lo tanto, se tomaron medidas puntuales a estas longitudes de onda. Como se puede observar en la Figura IV.6 hay una preponderancia de los compuestos tempranos y bases de Schiff por sobre los compuestos tardíos. Esto indicaría que en todas las muestras la reacción se encuentra

principalmente en su fase temprana. Por otro lado, las absorbancias de las GBTT medidas a las diferentes longitudes de onda aumentan con el tiempo de tratamiento térmico, indicando el progreso de la reacción de Maillard. En comparación con la GB sin tratamiento, se puede decir que es notable el aumento en todas las medidas de las GBTT y esto concuerda con los valores de a^* y b^* (Tabla IV.1). Estos resultados evidencian que el tratamiento térmico aplicado sobre la GB produce como resultado la reacción de pardeamiento no enzimático resultando en productos coloreados de mayor MM.

La GA presentó los valores de absorbancia más bajos en todas las longitudes de onda, como era de esperarse por los valores de a^* y b^* analizados previamente.

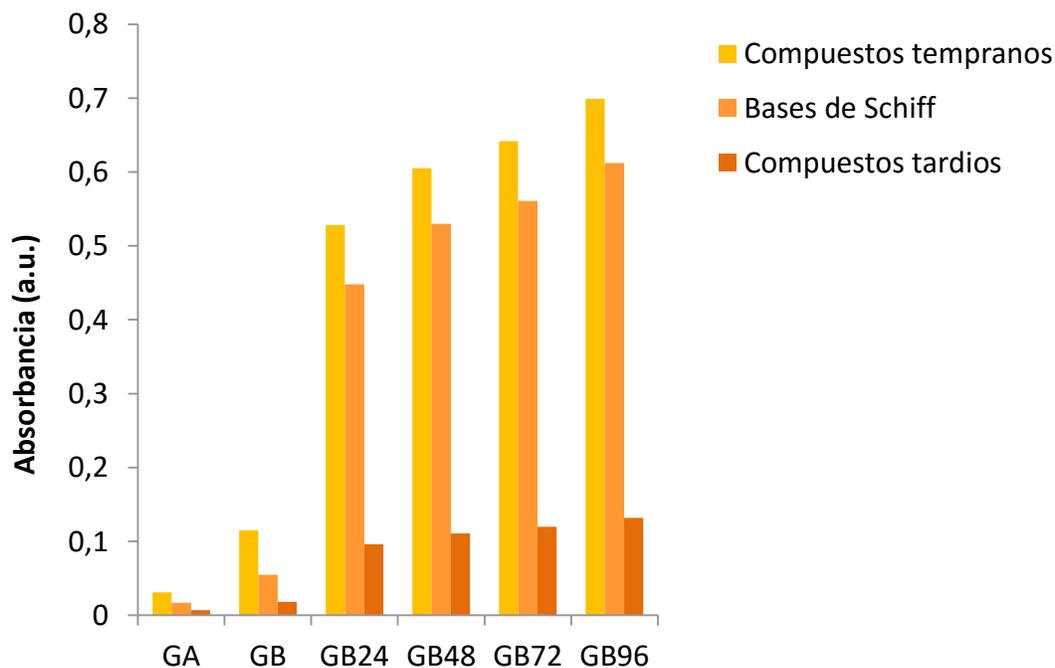


Figura IV.6. Absorbancia a 284 nm de compuestos intermediarios tempranos de la reacción de Maillard (■), absorbancia a 304 nm de las bases de Schiff (■) y absorbancia a 420 nm de compuestos intermediarios tardíos de la reacción de Maillard (■).

IV.2.5. Reología de las soluciones de la goma brea tratada térmicamente.

Se evaluó el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas de las soluciones de las GBTT al 10% p/p. En la Figura IV.7 se presentan las curvas de flujo de la GB y las GBTT a pH 4,4, que es el pH de disolución de la GB en agua, y pH 7.

En ambos pHs se observa que las soluciones de GB24h, GB48h y GB72h presentaron valores de η_{ap} menores (pH 4,4) o iguales (pH 7) a los de GB sin tratamiento. Sin embargo, se las soluciones de GB96h presentaron valores de η_{ap} superiores a las demás GBTT e inclusive mayores que la GB sin tratamiento.

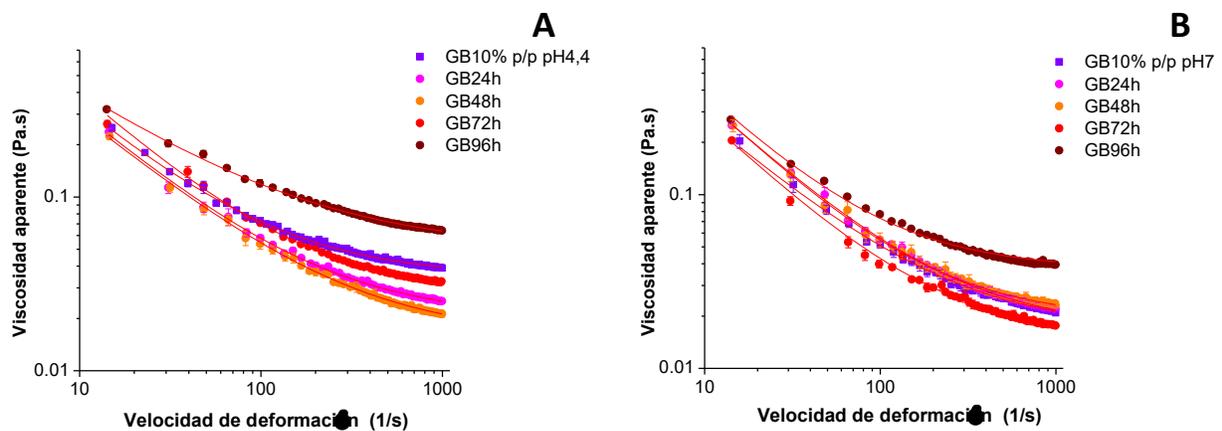


Figura IV.7. Comparación de la viscosidad aparente de las soluciones de GB y GBTT a (A) pH 4,4 y (B) pH7.

Las curvas de flujo de las GBTT pudieron modelarse con la ecuación de Sisko (1958) al igual que las curvas obtenidas para GB sin tratar. En la Tabla IV.3 se presentan los valores del

índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones de GBTT a pH 4,4. Los valores de k_s de las GBTT fueron menores a los de GB sin tratar, lo que se corresponde con las bajas η_{ap} observadas en las curvas de flujo. Se observa también una tendencia a disminuir k_s al aumentar el tiempo de tratamiento, siendo la solución de GB96h la que presentó inesperadamente el menor valor de k_s , lo que no se corresponde con los altos valores de η_{ap} observados para esta muestra en las curvas de flujo. Por otra parte, los valores de n_s y η_∞ no muestran una tendencia clara.

Tabla IV.3. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las soluciones a pH 4,4 de GBTT.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R ²
GB10% p/p	2,45 ± 0,14 ^d	0,09 ± 0,02 ^b	0,0356 ± 0,0013 ^c	0,992
GB24h	2,24 ± 0,17 ^c	0,11 ± 0,02 ^b	0,0203 ± 0,0002 ^b	0,995
GB48h	2,03 ± 0,19 ^b	0,14 ± 0,01 ^b	0,0159 ± 0,0003 ^a	0,991
GB72h	2,27 ± 0,19 ^c	0,06 ± 0,02 ^a	0,0274 ± 0,0003 ^c	0,995
GB96h	1,80 ± 0,05 ^a	0,29 ± 0,01 ^c	0,0506 ± 0,0004 ^d	0,996

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa al $p < 0,05$ (Test LSD).

Los parámetros de la ecuación de Sisko (1958) obtenidos por regresión no lineal de las curvas de flujo a pH 7 se presentan en la Tabla IV.4. En general, las GBTT presentaron valores de k_s mayores al de la GB sin tratar y n_s menores. Y no se observan tendencias en relación al

parámetro η_{∞} . Se observa que los parámetros k_s y η_{∞} de las soluciones de GB96h fueron los más altos lo que se corresponde con la curva de flujo observada.

Tabla IV.4. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_{∞}) de las soluciones a pH 7 de GBTT.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_{∞} (Pa s)	R^2
GB10% p/p	1,89 ± 0,16 ^a	0,13 ± 0,02 ^c	0,0166 ± 0,0003 ^b	0,990
GB24h	2,75 ± 0,12 ^c	0,08 ± 0,01 ^b	0,0170 ± 0,0001 ^b	0,997
GB48h	3,10 ± 0,17 ^d	0,03 ± 0,01 ^a	0,0195 ± 0,0002 ^c	0,992
GB72h	2,44 ± 0,15 ^b	0,03 ± 0,02 ^a	0,0147 ± 0,0002 ^a	0,984
GB96h	3,40 ± 0,04 ^e	0,01 ± 0,00 ^a	0,0375 ± 0,0004 ^a	0,993

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa al $p < 0,05$ (Test LSD).

IV.2.6. Propiedades emulsionantes de la goma brea tratada térmicamente.

IV.2.6.1. EMULSIONES DE ACEITE DE MAIZ

IV.2.6.1.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.

En la Figura VI.8 se presentan las distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB10 al 10% p/p y las GBTT al 10% p/p.

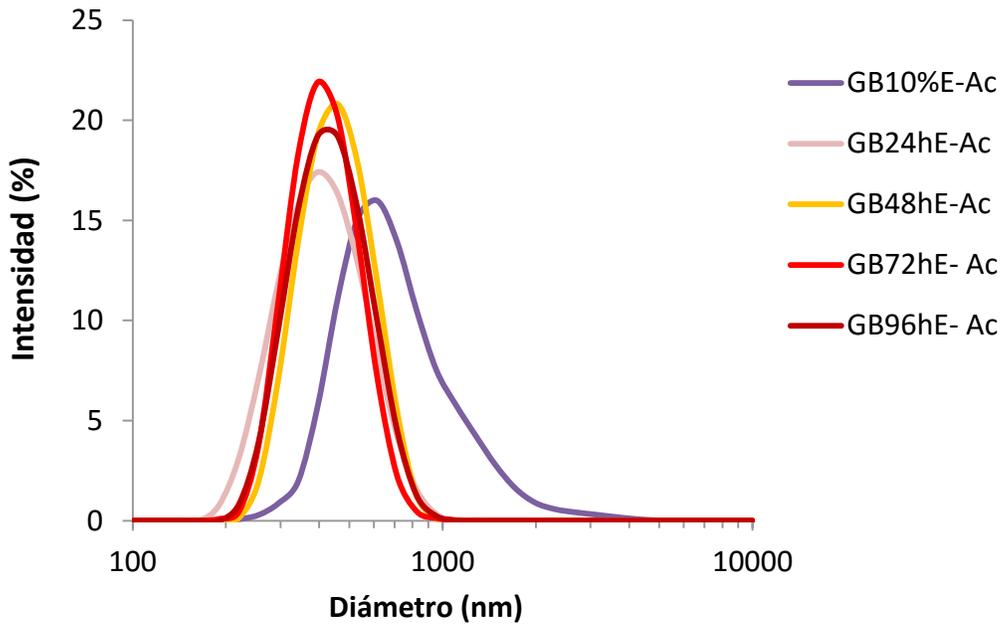


Figura IV.8. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente.

Puede observarse una clara disminución del tamaño de gota en las emulsiones preparadas con GBTT, por lo que se puede decir que el tratamiento térmico mejoró la actividad emulsionante de la GB. Al-Assaf y col. (2007) encontró resultados semejantes a estos en emulsiones estabilizadas con GA tratada térmicamente.

El tratamiento térmico, como se dijo en las secciones anteriores, estaría produciendo componentes de alta MM, productos de la reacción de Maillard, que podrían aumentar la actividad interfacial de la GB. En concordancia con estos resultados, varios autores han reportado el incremento de la capacidad emulsionante de productos de la reacción de Maillard (Dickinson y col., 1991; Kato y col., 1993).

Resultados y Discusión

En la Tabla IV.5 se presentan los valores de Z-average, Pdl y máximo de pico de las emulsiones de aceite estabilizadas con GB y las GBTT. Se observa una significativa disminución del Z-average en todas las emulsiones con GBTT en comparación con la GB no tratada. Al comparar el Z-average de las emulsiones con GBTT no se observa una tendencia clara con respecto al tiempo de tratamiento. GB24hE-Ac fue la emulsión con menor Z-average y GB48hE-Ac presentó el mayor Z-average que fue sólo un 9% superior al de GB24hE-Ac. Entonces, se podría decir que 24 horas de tratamiento térmico sería suficiente para mejorar las propiedades emulsionantes de la GB. En 24 horas y a 110 °C se estarían produciendo enlaces entre proteínas y polisacáridos, formándose así los complejos responsables de la actividad en la interface aceite- agua (Al-Assaf y col., 2007).

Tabla IV.5. Tamaño de gotas de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente el día de preparación y a los 7 días de almacenamiento.

Emulsión	Día 1			Día 7		
	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)
GB10%E-Ac	674,4 ± 11,2 ^e	0,20 ± 0,03 ^b	760,3 ± 48,2 ^c	754,7 ± 20,1 ^b	0,19 ± 0,02 ^c	801,4 ± 44,0 ^b
GB24hE-Ac	398,8 ± 1,4 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	429,1 ± 3,5 ^a	430,4 ± 8,3 ^a	0,13 ± 0,00 ^b	475,7 ± 30,3 ^a
GB48hE-Ac	435,3 ± 4,3 ^d	0,08 ± 0,01 ^a	461,7 ± 5,0 ^b	442,2 ± 2,3 ^a	0,11 ± 0,00 ^a	482,5 ± 1,9 ^a
GB72hE-Ac	403,6 ± 3,2 ^b	0,08 ± 0,02 ^a	433,6 ± 10,0 ^a	430,8 ± 1,1 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	454,9 ± 4,1 ^a
GB96hE-Ac	415,4 ± 0,1 ^c	0,07 ± 0,00 ^a	444,9 ± 3,3 ^a	438,4 ± 11,7 ^a	0,11 ± 0,00 ^a	484,0 ± 18,4 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± la desviación estándar entre paréntesis (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0,05), test LSD.

En la Figura IV.9 se presentan las micrografías de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT. GB24hE-Ac y GB48hE-Ac presentaron partículas de diámetro menor o igual a 1 μm . Por otro lado, en GB72hE-Ac y GB96hE-Ac se observaron algunas partículas de mayor tamaño, entre 1 y 2 μm , que no se observan en la distribución obtenida por DLS. En comparación con GB10%E-Ac (Capítulo II, Figura II.2), los tamaños observados en GBTT parecieran ser mayores.

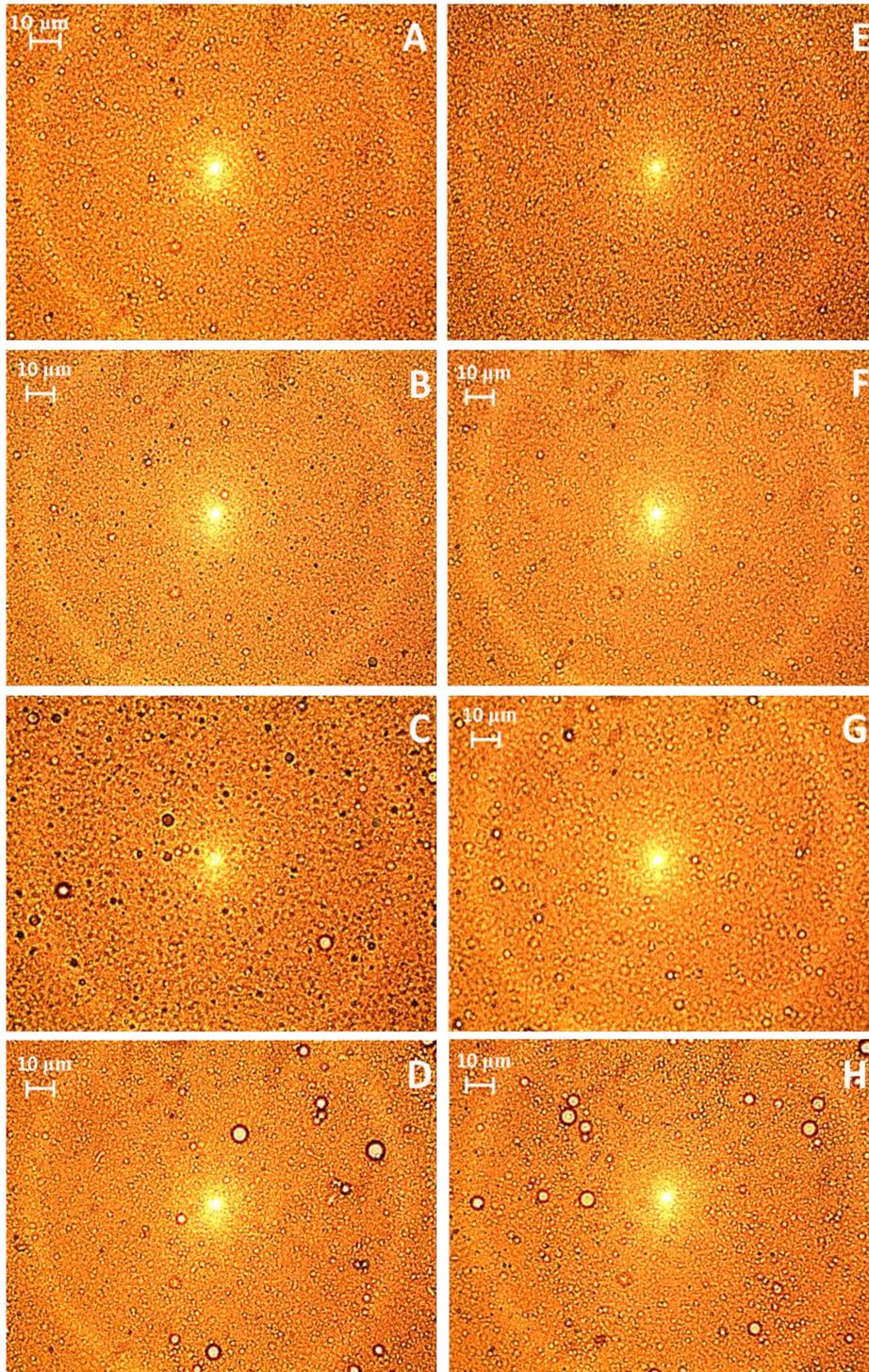


Figura IV.9. Micrografías de las emulsiones (A) GB24hE-Ac , (B) GB48hE-Ac, (C) GB72hE-Ac y (D) GB96hE-Ac inmediatamente luego de ser preparadas y (E), (F), (G) y (H) las respectivas emulsiones a los 7 días de preparadas. Barra de escala igual a 10 μm.

En la Tabla IV.6 se presentan los valores de potencial ζ medidos para las emulsiones de aceite de maíz con GBTT. Por un lado, se puede observar que el potencial ζ de las GBTT disminuye (en valor absoluto) significativamente respecto a la GB sin tratar, y por otro lado, se observa una tendencia a disminuir el potencial ζ con el tiempo de tratamiento.

Tabla IV.6. Potencial zeta de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT.

Emulsión	ζ (mV)
GB10%E-Ac	$-39,97 \pm 0,44^a$
GB24hE-Ac	$-34,85 \pm 0,21^c$
GB48hE-Ac	$-34,00 \pm 0,35^d$
GB72hE-Ac	$-35,60 \pm 0,98^b$
GB96hE-Ac	$-33,20 \pm 0,33^e$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3).
Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0,05), test LSD.

IV.2.6.1.2. Estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.

La estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz con GBTT fue evaluada midiendo el tamaño de gotas de las emulsiones luego de 7 días de almacenamiento mediante DLS, con medidas del equipo Turbiscan y visualmente. En la Figura IV.10 se presentan las distribuciones de tamaños de gota de las emulsiones de aceite de maíz con GBTT a los siete días de almacenamiento a temperatura ambiente. Se observa, como se vio en la medición realizada el día de la preparación, que las emulsiones con GBTT presentan tamaños de gotas más pequeños

que la emulsión con GB no tratada, y no hay diferencias en las distribuciones entre las emulsiones de GBTT. Los valores de Z-average, Pdl y máximo de pico de las emulsiones con GBTT a los 7 días se muestran en la Tabla IV.2. El aumento de tamaño de gota en las emulsiones con GBTT estuvo entre el 1 y el 6%. A simple vista no se observaron signos de desestabilización de las emulsiones (Figura IV.11). Además, todas las emulsiones preparadas con GBTT permanecieron estables por más de 10 meses (no se muestran los datos). La gran estabilidad de las emulsiones de aceite con GBTT se había previsto cuando se observó la disminución de tamaño de gota de estas emulsiones.

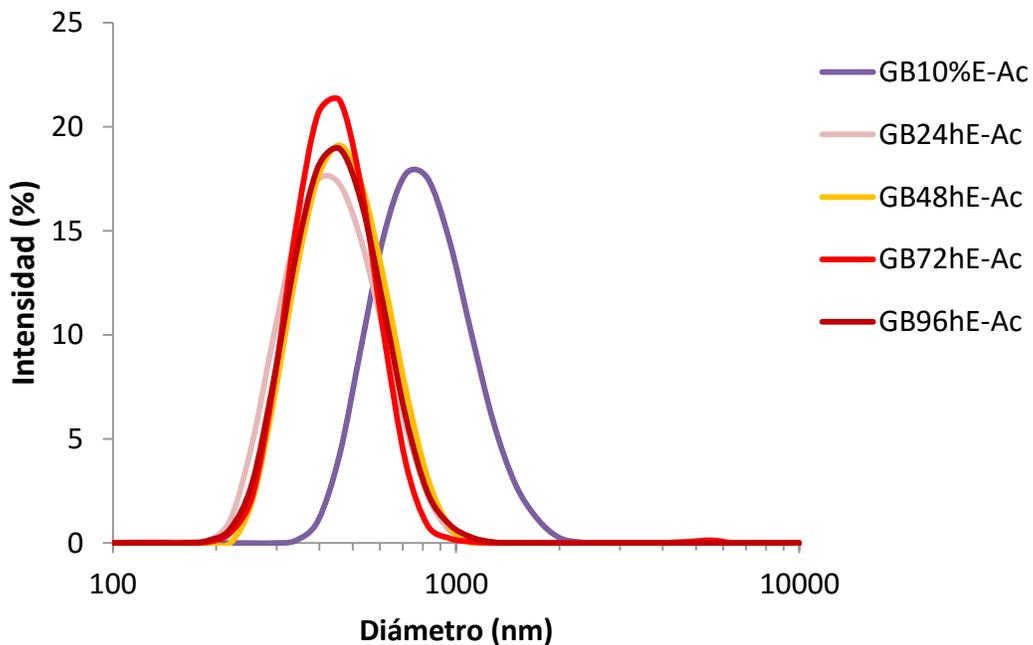


Figura IV.10. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT a los 7 días de almacenamiento.



Figura IV.11. Fotografía de las emulsiones GB24hE-Ac (GB24), GB48hE-Ac (GB48), GB72hE-Ac (GB72) y GB96hE-Ac (GB96) inmediatamente luego de ser preparadas (Día 1) y a los 7 días de preparadas (Día 7).

Resultados y Discusión

En la Figura IV.12 se muestran los perfiles de BS obtenidos para GB24hE-Ac y GB48hE-Ac. Se puede observar que los perfiles no se modificaron a lo largo de los siete días lo que concuerda con lo observado a simple vista y los parámetros de desestabilización (IC y Tiempo de retardo) fueron nulos para las emulsiones preparadas con GBTT. Por lo que se concluye que no hubo indicios de desestabilización de las emulsiones.

Finalmente, el tratamiento térmico realizado mejoró notablemente las propiedades emulsionantes y estabilizantes de la GB, y se puede destacar que 24 horas de tratamiento es suficiente para lograr estas mejoras.

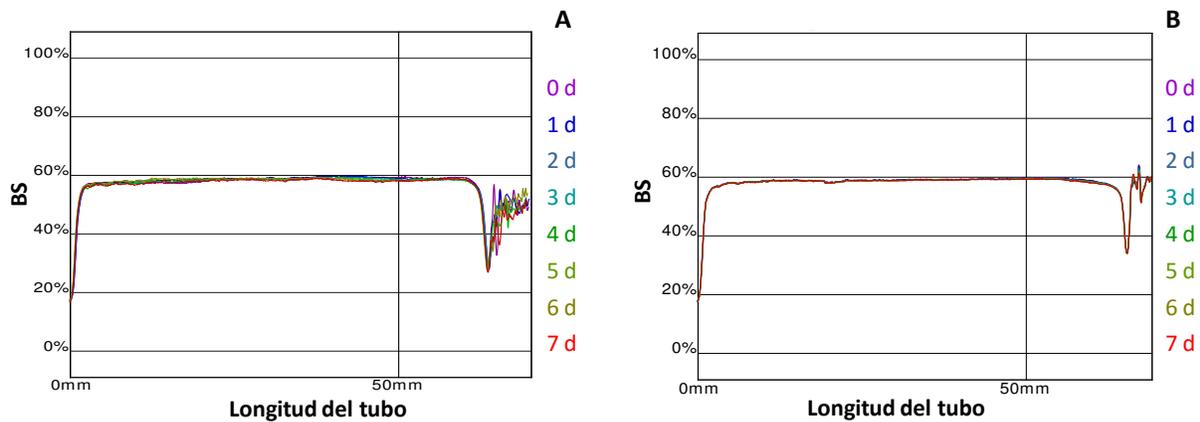


Figura IV.12. Perfiles de *backscattering* (BS%) en función del tiempo y de la altura del tubo de medición de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con soluciones de GB tratadas térmicamente a 110 °C por (A) 24h y (B) 48h.

IV.2.6.1.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.

En la Figura IV.13 se muestran las curvas de η_{ap} en función de la velocidad de deformación de las emulsiones de GBTT. Las emulsiones preparadas con GBTT presentaron η_{ap} superiores a las de GB sin tratamiento aunque no se distingue una tendencia con respecto al tiempo de tratamiento.

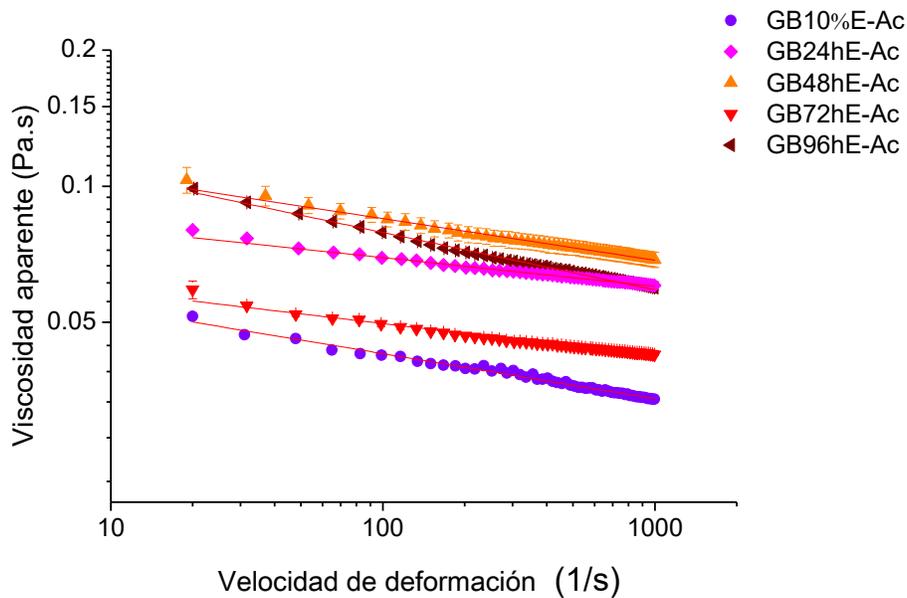


Figura IV.13. Viscosidad aparente de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GB tratadas térmicamente y ajuste al modelo de Sisko: Ecuación 2 (línea roja).

En la Tabla IV.7 se presentan los valores obtenidos por regresión no lineal de los parámetros de la ecuación de Sisko (1958). Se observaron diferencias significativas en todos los

parámetros pero sin una tendencia definida. GB96hE-Ac presentó el valor más alto de k_s indicando una mayor viscosidad de la emulsión como se vio en las curvas de flujo. Todos los valores de n_s fueron inferiores a 1 correspondiéndose con un comportamiento pseudoplástico.

Tabla IV.7. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de aceite de maíz estabilizadas con GBTT.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R^2
GB10E-Ac	$0,08 \pm 0,00^c$	$0,53 \pm 0,01^a$	$0,0316 \pm 0,0004^a$	0,998
GB24hE-Ac	$0,06 \pm 0,00^a$	$0,69 \pm 0,02^c$	$0,0440 \pm 0,0023^c$	0,995
GB48hE-Ac	$0,11 \pm 0,00^d$	$0,74 \pm 0,01^d$	$0,0497 \pm 0,0009^d$	0,998
GB72hE-Ac	$0,07 \pm 0,00^b$	$0,57 \pm 0,01^b$	$0,0395 \pm 0,0003^b$	0,994
GB96hE-Ac	$0,13 \pm 0,00^e$	$0,79 \pm 0,00^e$	$0,0301 \pm 0,0021^a$	0,998

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$), test LSD.

IV.2.6.2. EMULSIONES DE LIMONENO

IV.2.6.2.1. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratadas térmicamente.

En la Figura VI.14 se presentan las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB y las GBTT. Se observa que todas las emulsiones de limoneno

con GBTT presentaron gotas de aproximadamente el doble de tamaño que la emulsión con GB sin tratar. Al comparar estas distribuciones con las de las emulsiones de aceite de maíz (Sección IV.2.6.1), se observa que el tamaño de gota aumentó considerablemente.

Estos resultados indican que existe un comportamiento diferente de las GBTT como emulsionante en función de las características de la fase dispersa. La afinidad de las GBTT con la interface limoneno-agua sería menor, por lo que se forma menor área interfacial total y resultan gotas de mayor tamaño, posiblemente es menor la velocidad con la que GB se posiciona en esta interface y la estabiliza por lo que se produce re-coalescencia de las gotas.

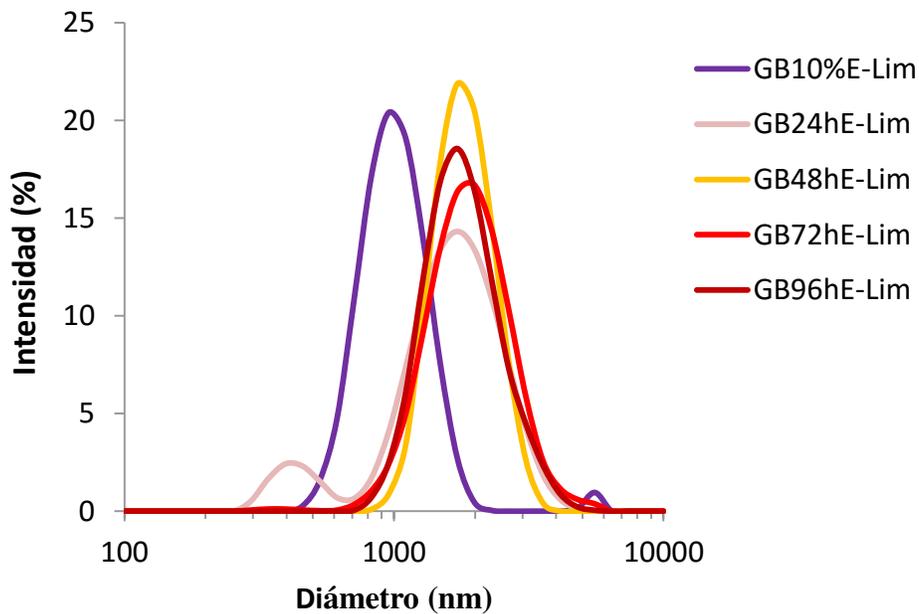


Figura IV.14. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.

Resultados y Discusión

En la Tabla IV.8 se presentan los valores de Z-average, Pdl y máximo de pico de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT. Los valores de Z-average de las emulsiones con GBTT fueron en todos los casos superiores al de la emulsión con GB sin tratar, lo que se corresponde con las distribuciones. Por otro lado, la magnitud del potencial ζ de las emulsiones con GBTT fue menor que la de la emulsión con GB no tratada dando indicios de la menor afinidad con el limoneno (Tabla IV.9).

Tabla IV.8. Parámetros de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT el día de preparación y a los 7 días de almacenado.

Emulsión	Día 1			Día 7		
	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)	Z-average (nm)	Pdl	Máximo del pico (nm)
GB10%E-Lim	631,1 ± 17,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	654,5 ± 18,2 ^a	Inestable	Inestable	Inestable
GB24hE-Lim	1306,0 ± 2,8 ^b	0,3 ± 0,0 ^b	1794,0 ± 58,0 ^b	2259,0 ± 73,5 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	2193,0 ± 90,5 ^b
GB48hE-Lim	1758,0 ± 24,0 ^d	0,1 ± 0,0 ^a	1935,5 ± 105,4 ^b	Inestable	Inestable	Inestable
GB72hE-Lim	1749,5 ± 19,1 ^d	0,1 ± 0,0 ^a	1972,0 ± 41,0 ^b	2648,0 ± 391,7 ^a	0,8 ± 0,3 ^b	2180,5 ± 57,3 ^b
GB96hE-Lim	1646,0 ± 19,8 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	1866,0 ± 21,2 ^b	2307,0 ± 127,3 ^a	1,0 ± 0,0 ^b	1650,5 ± 375,5 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± la desviación estándar entre paréntesis (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0,05), test LSD.

Tabla IV.9. Potencial zeta de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.

Emulsión	ζ (mV)
GB10%E-Lim	$-39,97 \pm 0,44^a$
GB24hE-Lim	$-36,40 \pm 0,42^b$
GB48hE-Lim	$-34,80 \pm 0,67^c$
GB72hE-Lim	$-34,30 \pm 0,27^c$
GB96hE-Lim	$-33,80 \pm 0,64^d$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), test LSD.

En la Figura IV.15 se muestran las micrografías tomadas de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT. En GB24hE-Ac se observan partículas de gran tamaño, aproximadamente de 2 μm , mientras que, en las demás emulsiones se observan aglomeraciones de partículas, prácticamente formando dos fases, lo que indica una temprana desestabilización de las emulsiones.

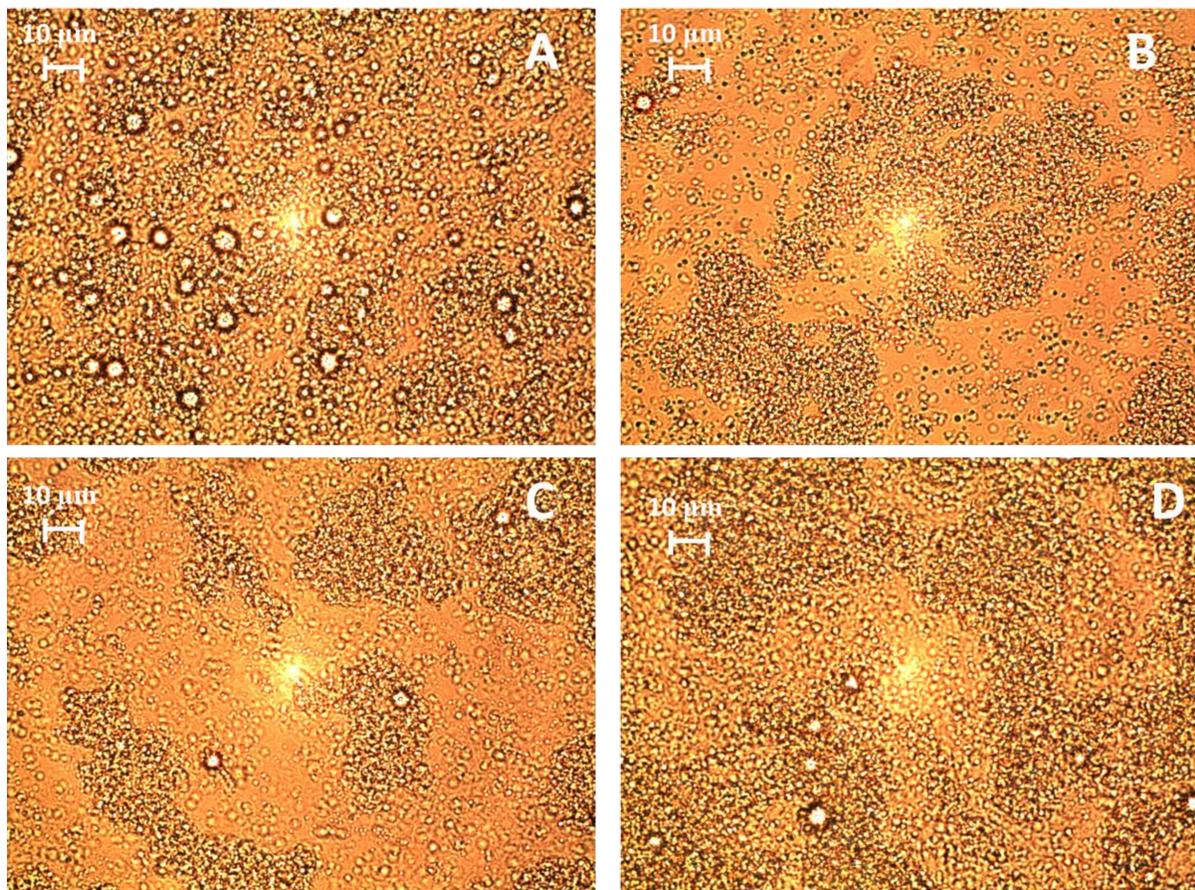


Figura IV.15. Micrografías de las emulsiones de limoneno estabilizadas con soluciones de GBTT. (A) GB24hE-Lim, (B) GB48hE-Lim, (C) GB72hE-Lim y (D) GB96hE-Lim inmediatamente luego de ser preparadas. Barra de escala igual a 10 µm.

IV.2.6.2.2. Estabilidad de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.

La estabilidad de las emulsiones de limoneno con GBTT se analizó evaluando la variación del tamaño de gota por DLS. En la Figura IV.16 se presentan las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT a los siete días de almacenamiento,

y en la Figura IV.17 las fotografías de las emulsiones. Se observa que todas las distribuciones se corrieron hacia tamaños de gota mayores. La distribución de GB48hE-Lim no fue medible mediante la técnica de DLS por presentar marcada separación de fases. Así mismo, las emulsiones de GB72hE-Lim y GB96hE-Lim presentaron valores de Pdl muy altos por lo que las medidas obtenidas no cumplen con el criterio de calidad de la técnica de DLS. Sólo la muestra de GB24hE-Lim presentó un Pdl aceptable.

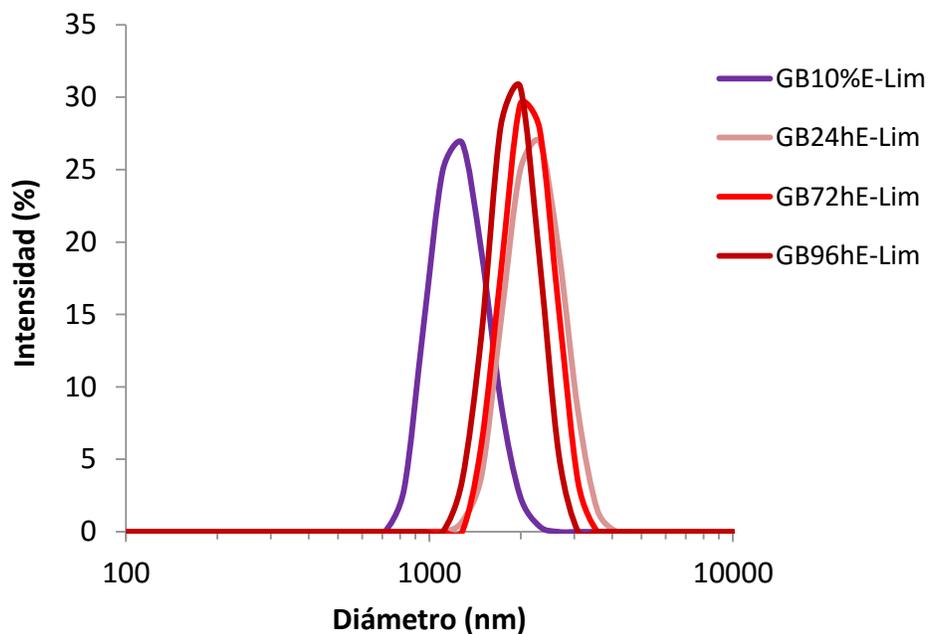


Figura IV.16. Distribución de tamaño de gotas de emulsiones de limoneno estabilizadas con GB tratadas térmicamente a los 7 días de almacenamiento.



Figura IV.17. Foto de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT luego de ser preparadas (Día 1) y a los 7 días de almacenamiento (Día 7).

Al observar las emulsiones a simple vista a los siete días de almacenamiento a temperatura ambiente se pudo ver que todas las emulsiones presentaron desestabilización (Figura IV.17). Particularmente la emulsión GB48hE-Lim fue la más inestable, mostrando una fase de cremado definida, compacta y de gran espesor, mientras que las demás emulsiones presentaron fases de clarificación de poco espesor en el fondo del tubo. La notable desestabilización de estas emulsiones podría deberse entre otros factores al gran tamaño de partícula observado al inicio del almacenamiento. Por otro lado, la viscosidad de estas emulsiones podría ser menor ya que la fase dispersa, limoneno, tiene menor viscosidad que el aceite de maíz, lo que se analizará en la sección siguiente.

IV.2.6.2.3. Comportamiento reológico de las emulsiones de limoneno estabilizadas con goma brea tratada térmicamente.

En la Figura IV.18 se presentan las curvas de flujo de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT. En general, las emulsiones con GBTT presentaron mayor η_{ap} que la emulsión con GB sin tratar, como se vio en las emulsiones de aceite de maíz con GBTT (Figura IV.11). Una excepción a esto fue GB72hE-Lim que presentó una curva de flujo por debajo de la de GB10%E-Lim.

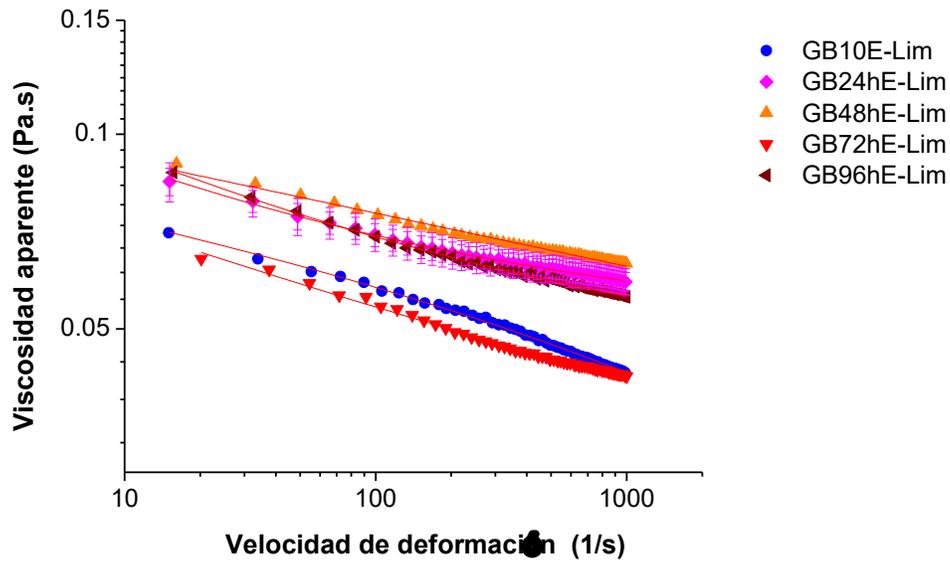


Figura IV.18. Viscosidad aparente de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GB tratadas térmicamente y ajuste al modelo de Sisko: Ecuación 2 (línea roja).

El comportamiento reológico de estas emulsiones también pudo modelarse con la ecuación de Sisko (1958). Los valores de los parámetros se presentan en la Tabla IV.10. El parámetro k_s disminuye en las emulsiones de GBTT en comparación con GB10%E-Lim, lo que está en desacuerdo con lo observado en las curvas de flujo. Pero por otro lado, el parámetro η_∞ aumenta en todas las emulsiones con GBTT con respecto a GB10%E-Lim, con excepción de GB72hE-Lim concordando con lo observado en las graficas de η_{ap} en función de la velocidad de deformación.

Tabla IV.10. Efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (k_s), el índice de comportamiento al flujo (n_s) y en la viscosidad a deformación infinita (η_∞) de las emulsiones de limoneno estabilizadas con GBTT.

Emulsión	k_s (Pa s)	n_s	η_∞ (Pa s)	R^2
GB10%E-Lim	$0,10 \pm 0,00^c$	$0,80 \pm 0,01^c$	$0,0179 \pm 0,0027^a$	0,988
GB24hE-Lim	$0,09 \pm 0,00^b$	$0,71 \pm 0,01^a$	$0,0482 \pm 0,0007^a$	0,996
GB48hE-Lim	$0,09 \pm 0,00^b$	$0,69 \pm 0,01^a$	$0,0517 \pm 0,0005^a$	0,998
GB72hE-Lim	$0,08 \pm 0,00^a$	$0,83 \pm 0,02^d$	$0,0163 \pm 0,0039^a$	0,992
GB96hE-Lim	$0,10 \pm 0,00^c$	$0,74 \pm 0,01^b$	$0,0400 \pm 0,0008^a$	0,998

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$), test LSD.

IV.2.7. Propiedades encapsulantes de goma brea tratada térmicamente.

Para analizar el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades encapsulantes de GB, se obtuvieron microcápsulas en polvo de aceite de maíz y de limoneno con GBTT mediante secado por aspersion de las emulsiones correspondientes. En esta sección utilizaremos las siguientes siglas para nombrar las microcápsulas obtenidas:

GB24hM-Ac, GB48hM-Ac, GB72hM-Ac y GB96hM-Ac microcápsulas de aceite de maíz obtenidas mediante secado por aspersion de emulsiones de aceite (10% p/p) y soluciones de GBTT 24h, 48h, 72h y 96h, respectivamente.

GB24hM-Lim, GB48hM-Lim, GB72hM-Lim y GB96hM-Lim, microcápsulas de limoneno obtenidas mediante secado por aspersión de emulsiones de limoneno (10% p/p) y soluciones de GBTT 24h, 48h, 72h y 96h, respectivamente.

IV.2.7.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno.

En la Figura VI.19 se muestran las micrografías obtenidas por SEM de las microcápsulas de aceite. En general, no se observaron diferencias relevantes entre los distintos polvos de GBTT. Las partículas presentaron morfología cuasi esférica y gran variedad de tamaños (de 1 a 18 μm) dentro de la misma muestra, como se observó en los polvos con GB no tratada (Capítulo III, Figura III.1). No se observaron poros, fisuras ni grietas, indicando que estas partículas presentarían alta retención y protección del material encapsulado. Estas características estarían en concordancia con la óptima estabilidad que presentaron las emulsiones de aceite con GBTT.

Por otro lado, en la Figura IV.20 se muestran las micrografías obtenidas por SEM de las partículas de limoneno preparadas con GBTT. Estas partículas también resultaron ser cuasi esféricas y de tamaños entre 1 y 22 μm . Se observó menor cantidad de partículas grandes que lo visto en los polvos de GBTT con aceite, pero por otro lado estas partículas presentaron fisuras y poros principalmente en las partículas grandes. Estas imperfecciones de las partículas puede deberse a la inestabilidad que presentaron las emulsiones de GBTT con limoneno, como se observó en el Capítulo II, y podrían afectar la capacidad de retención y protección del limoneno encapsulado, lo que se analiza seguidamente.

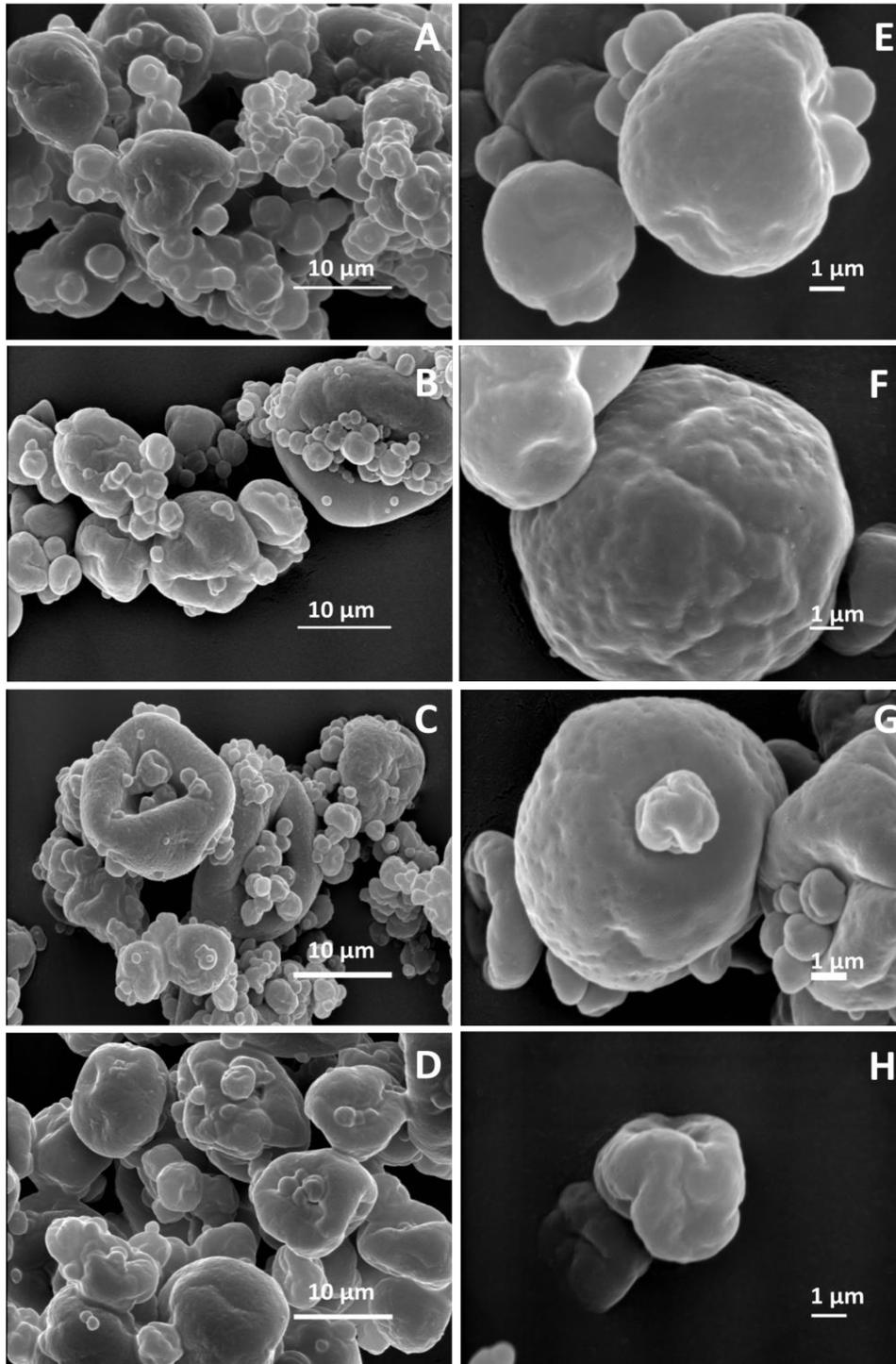


Figura IV.19. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de aceite de maíz en polvo (A) GB24hM-Ac, (B) GB48hM-Ac, (C) GB72hM-Ac y (D) GB96hM-Ac a x3000, y (E) GB24hM-Ac, (F) GB48hM-Ac, (G) GB72hM-Ac y (H) GB96hM-Ac a x10000.

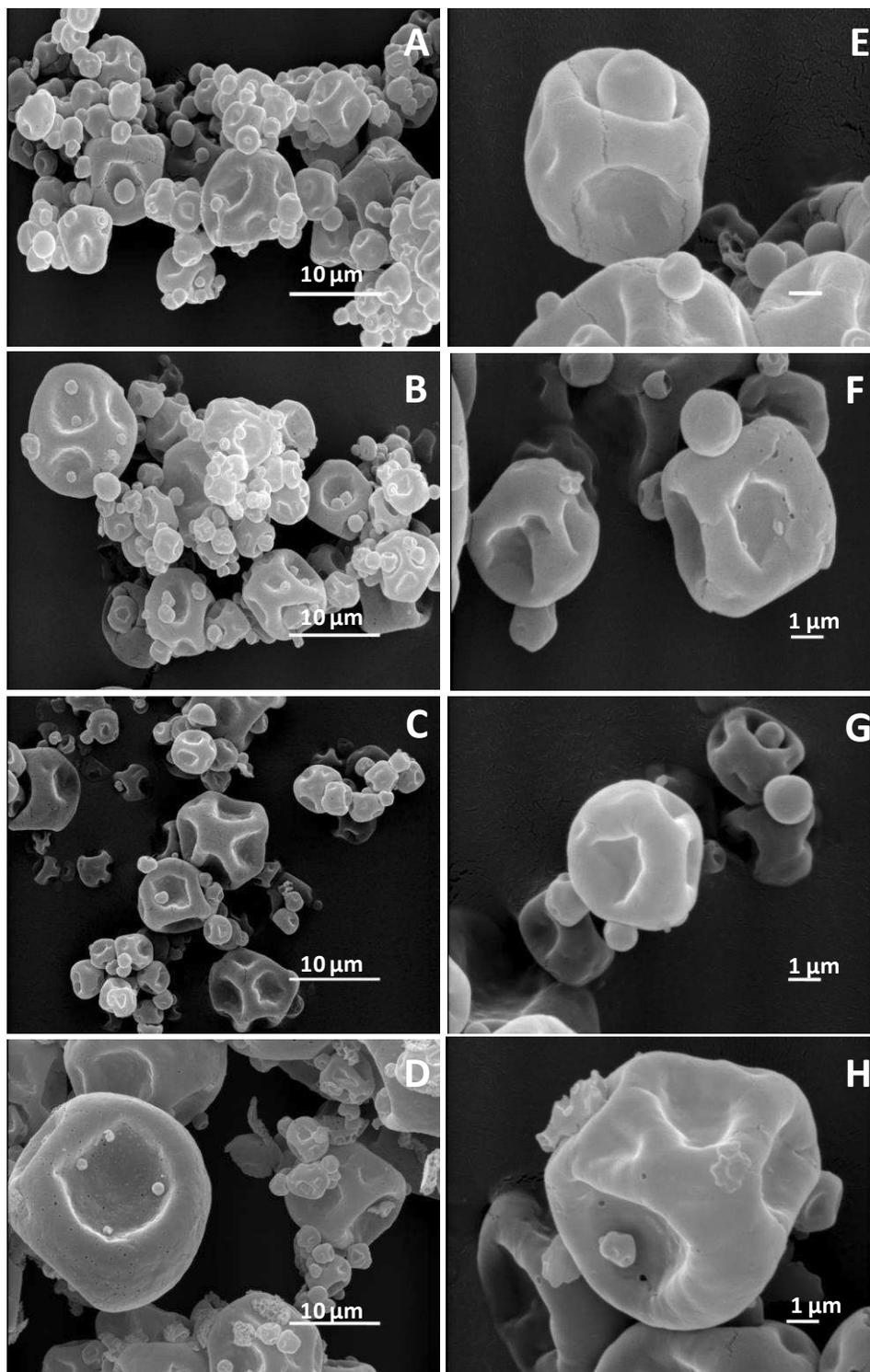


Figura IV.20. Micrografías (SEM) de las microcápsulas de limoneno (A) GB24hM-Lim, (B) GB48hM-Lim, (C) GB72hM-Lim y (D) GB96hM-Lim a x3000, y (E) GB24hM-Lim, (F) GB48hM-Lim, (G) GB72hM-Lim y (H) GB96hM-Lim a x10000.

En la Figura IV.21 se muestra una imagen de micrografía de fluorescencia, tomada en el plano medio de una partícula de GB96hM-Lim, donde se observa gotas de limoneno dispersas en la matriz, lo que evidencia una estructura tipo matriz como se vio anteriormente en las microcápsulas obtenidas con GB sin tratamiento.

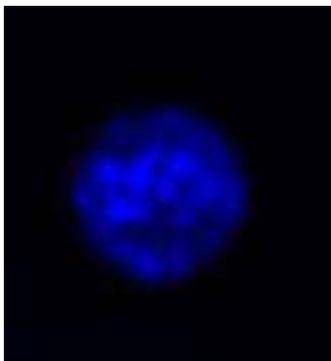


Figura IV.21. Micrografía confocal de fluorescencia de una microcápsula de limoneno (azul) en polvo preparada con GB tratada térmicamente por 96h (negro), tomada en un plano medio de la partícula.

IV.2.7.2. Contenido de Humedad y actividad de agua de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno.

Como se expuso anteriormente, el contenido de agua y la a_w son factores determinantes para la conservación de un alimento, ingrediente o aditivo. Los valores de a_w y los porcentajes de humedad determinados en los polvos de aceite de maíz y limoneno encapsulados con GBTT se presentan en la Tabla IV.11. El porcentaje de humedad de las microcápsulas aceite de maíz con GBTT fue inferior al de las microcápsulas con GB no tratada. Por otro lado, los valores de

humedad de los polvos de limoneno con GBTT fueron muy superiores a los valores de los polvos de aceite, alrededor de 50% más altos. El mismo comportamiento se observó con GB no tratada (Capítulo III), y se indicó la posibilidad de evaporación de limoneno en la determinación.

Por otro lado, no se observaron diferencias entre los porcentajes de humedad de los polvos de GBTT-aceite, con excepción del polvo de GB48hM-Ac que fue significativamente menor al resto. Así mismo, entre los polvos de GBTT-limoneno no se observaron diferencias de porcentajes de humedad a excepción de GB24hM-Lim que presentó mayor valor de este parámetro.

Los valores de a_w de los polvos con GBTT aunque presentaron diferencias significativas entre las muestras, no mostraron una tendencia clara con respecto al tiempo de tratamiento ni a la naturaleza de la fase dispersa. Todos los valores de a_w estuvieron por debajo del límite para el crecimiento de microorganismos.

Tabla IV.11. Contenido de humedad y a_w de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno preparadas con GBTT.

Muestra	Contenido de Humedad (%)		a_w	
	Aceite de maíz	Limoneno	Aceite de maíz	Limoneno
GB10%M-Ac	3,73 ± 0,10 ^c	7,25 ± 0,04 ^b	0,374 ± 0,002 ^b	0,499 ± 0,016 ^c
GB24hM-Ac	3,35 ± 0,01 ^b	7,99 ± 0,07 ^c	0,402 ± 0,002 ^e	0,402 ± 0,003 ^b
GB48hM-Ac	2,76 ± 0,07 ^a	6,25 ± 0,10 ^a	0,381 ± 0,004 ^c	0,342 ± 0,008 ^a
GB72hM-Ac	3,30 ± 0,10 ^b	5,83 ± 0,10 ^a	0,390 ± 0,001 ^d	0,438 ± 0,028 ^b
GB96hM-Ac	3,22 ± 0,15 ^b	6,55 ± 0,39 ^a	0,359 ± 0,001 ^a	0,406 ± 0,001 ^b

Resultados presentados como la media de triplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p < 0,05$ (Test LSD).

IV.2.7.3. Análisis de color de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno con GB tratada térmicamente.

Las muestras de GBTT presentaron un aspecto de pardeamiento, más rojizos y menos luminosos que la GB sin tratamiento, y se observó un aumento de color estuvo a mayor tiempo de tratamiento térmico (Tabla IV.1). Las emulsiones preparadas con las mismas resultaron también más coloreadas hacia un tono más rojo. Al comparar los polvos de aceite de maíz y limoneno preparados con GBTT se observa que, al aumentar el tiempo de tratamiento térmico, los polvos se tornan menos luminosos y con tono café más oscuro (Figura IV. 22 A y B), en concordancia con el color de las GBTT.

Figura IV.22. Microcápsulas en polvo de (A) aceite y (B) limoneno preparadas con GBTT.



En la Tabla IV.12 se presentan los valores de las coordenadas triestímulo determinadas en las microcápsulas de limoneno y aceite de maíz con GBTT.

En primer lugar, las microcápsulas de aceite de maíz preparadas con GBTT resultaron menos luminosa (menor L^*), más rojiza (a^{*+}), más azules (mayor b^*) que las de GB sin tratamiento. Al comparar entre sí las microcápsulas de GBTT-aceite, se observa que el parámetro L^* permanece constante, pero a^* y b^* aumentan con el tiempo de tratamiento térmico, correspondiendo a polvos más rojizos con tonos marrones.

Al comparar las microcápsulas de GBTT-limoneno con las de GB sin tratamiento, se observa que son menos luminosas (menor L^*), más rojizas (mayor $a^* +$) y más azules (mayor b^{*+}). Por otro lado, se observa que los parámetros a^* y b^* aumentan con el tiempo de tratamiento.

En general, las microcápsulas de limoneno en comparación con las de aceite, resultaron más rojizas (mayor a^{*+}) y con mayor tonalidad azul (mayor b^{*+}) y menor luminosidad (menor L^*).

Tabla VI.12. Coordenadas de color de las microcápsulas de aceite de maíz y limoneno con GBTT.

Muestra	Aceite de maíz			Limoneno		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
GB10%M	88,03 ± 0,43 ^b	0,58 ± 0,05 ^a	9,76 ± 0,05 ^a	89,07 ± 0,20 ^e	0,06 ± 0,02 ^a	11,88 ± 0,19 ^a
GB24hM	76,07 ± 0,20 ^a	0,63 ± 0,02 ^a	9,93 ± 0,10 ^a	78,40 ± 0,02 ^c	3,05 ± 0,01 ^c	18,84 ± 0,02 ^b
GB48hM	79,95 ± 0,09 ^a	0,83 ± 0,02 ^b	10,88 ± 0,14 ^b	77,23 ± 0,23 ^b	3,61 ± 0,03 ^d	19,55 ± 0,03 ^c
GB72hM	82,99 ± 0,56 ^a	0,97 ± 0,06 ^c	15,45 ± 0,22 ^c	78,91 ± 0,02 ^d	2,87 ± 0,03 ^b	19,75 ± 0,07 ^d
GB96hM	84,57 ± 0,08 ^a	1,07 ± 0,02 ^c	22,19 ± 0,10 ^d	74,57 ± 0,08 ^a	4,07 ± 0,02 ^e	22,19 ± 0,10 ^e

Resultados presentados como la media de cuadruplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre valores de una misma columna al $p \leq 0.05$ (Test LSD).

IV.2.7.4. Eficiencia de encapsulación de aceite de maíz con GB tratada térmicamente.

Se evaluó la capacidad de las GBTT de encapsular y proteger el aceite de maíz determinando los parámetros de aceite libre, aceite total, aceite recuperado y la eficiencia de encapsulación (EE). En la Tabla IV.13 se presentan los valores obtenidos de estos parámetros. En primer lugar, se observó una importante disminución del aceite libre en las microcápsulas de GBTT en comparación con las GB sin tratar. El aceite libre disminuyó alrededor del 75% del valor obtenido con GB sin tratar y esto produjo un aumento de 50% de la EE aproximadamente en todas las microcápsulas producidas con GBTT. El notable aumento de EE obtenido concuerda con la gran estabilidad de las emulsiones de aceite de maíz con GBTT, como se vio en la Sección IV.2.6.1.2, y con la morfología superficial observada por SEM de estas microcápsulas.

Tabla IV.13. Aceite libre, aceite total, aceite recuperado y eficiencia de encapsulación (EE) de la microencapsulación de aceite de maíz con GB tratada térmicamente.

Muestra	Aceite libre (g/ 100g polvo)	Aceite total (g/ 100g polvo)	Aceite recuperado*(%)	EE (%)
GB10%M-Ac	29,75 ± 2,28 ^b	47,59 ± 1,69 ^c	90,42 ± 2,27 ^c	37,48
GB24hM-Ac	7,65 ± 0,59 ^a	48,90 ± 0,60 ^c	92,91 ± 1,13 ^c	84,35
GB48hM-Ac	7,57 ± 1,64 ^a	43,59 ± 0,72 ^b	82,82 ± 1,20 ^b	82,62
GB72hM-Ac	7,39 ± 3,35 ^a	46,34 ± 0,54 ^c	88,04 ± 0,90 ^c	84,06
GB96hM-Ac	6,23 ± 0,76 ^a	41,33 ± 0,62 ^a	78,54 ± 1,14 ^a	84,94

*Calculado en base a la masa de aceite agregada en la preparación de la emulsión. Resultados presentados como la media de triplicados ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa entre muestras al $p \leq 0,05$.

El tratamiento térmico, como se explico anteriormente, produjo moléculas de alta MM y alta actividad interfacial, productos de la reacción de Maillard, que aumentaron la capacidad emulsionante y encapsulante de la GB con respecto al aceite de maíz. Al-Assaf y col. (2007) estudiaron la modificación de GA por tratamiento térmico y el efecto sobre la capacidad emulsionante, pero hasta nuestro conocimiento, la capacidad encapsulante de la GA tratada térmicamente no fue evaluada hasta el momento. Al comparar los valores obtenidos con las GBTT y los de las microcápsulas de GA-aceite de maíz (Capítulo III, Tabla III.3), se puede decir que, con el tratamiento térmico se logra aproximar la EE de GB96hM-Ac al 10% p/p (84,94%)

con la de GA20%M-Ac (88,66%), o sea, se logra una eficiencia similar con menor cantidad de goma en la preparación.

Por otro lado, no se observaron diferencias entre las distintas GBTT, por lo que se puede concluir que un tratamiento térmico de 24 horas a 110 °C es suficiente para mejorar notablemente las propiedades emulsionantes y encapsulantes de la GB con fases dispersas poco miscibles con agua.

IV.2.7.5. Estabilidad de limoneno encapsulado con GB tratada térmicamente.

Para evaluar la capacidad de las GBTT para encapsular y proteger al limoneno se determinó la concentración de limoneno en los polvos mediante cromatografía gaseosa a lo largo de un tiempo de almacenamiento en condiciones de alta temperatura (50 °C) para acelerar el proceso de oxidación y a diferentes a_w para analizar la influencia de este parámetro sobre la estabilidad de las microcápsulas.

Las curvas de concentración de limoneno en función del tiempo de los polvos de GBTT que fueron almacenados en presencia de soluciones salinas saturadas para obtener diferentes a_w se muestran en la Figura IV.24. Se observa que en todas las condiciones de a_w , las curvas de concentración de limoneno de los polvos de GBTT superan a la curva de GB sin tratamiento térmico en igual concentración. En general, los polvos de GB72hM-Lim y GB96hM-Lim presentan los valores más altos de concentración de limoneno. La disminución de la concentración de limoneno en la primer semana de almacenamiento sólo fue evidente en las muestras de GB24hM-Lim y GB10%M-Lim. En las demás muestras, la disminución de la

concentración de limoneno fue gradual y en algunos casos muy leve. Una excepción a esto se observa en el almacenamiento con $a_w = 0,749$, donde la disminución de la concentración de limoneno fue drástica en todos los polvos.

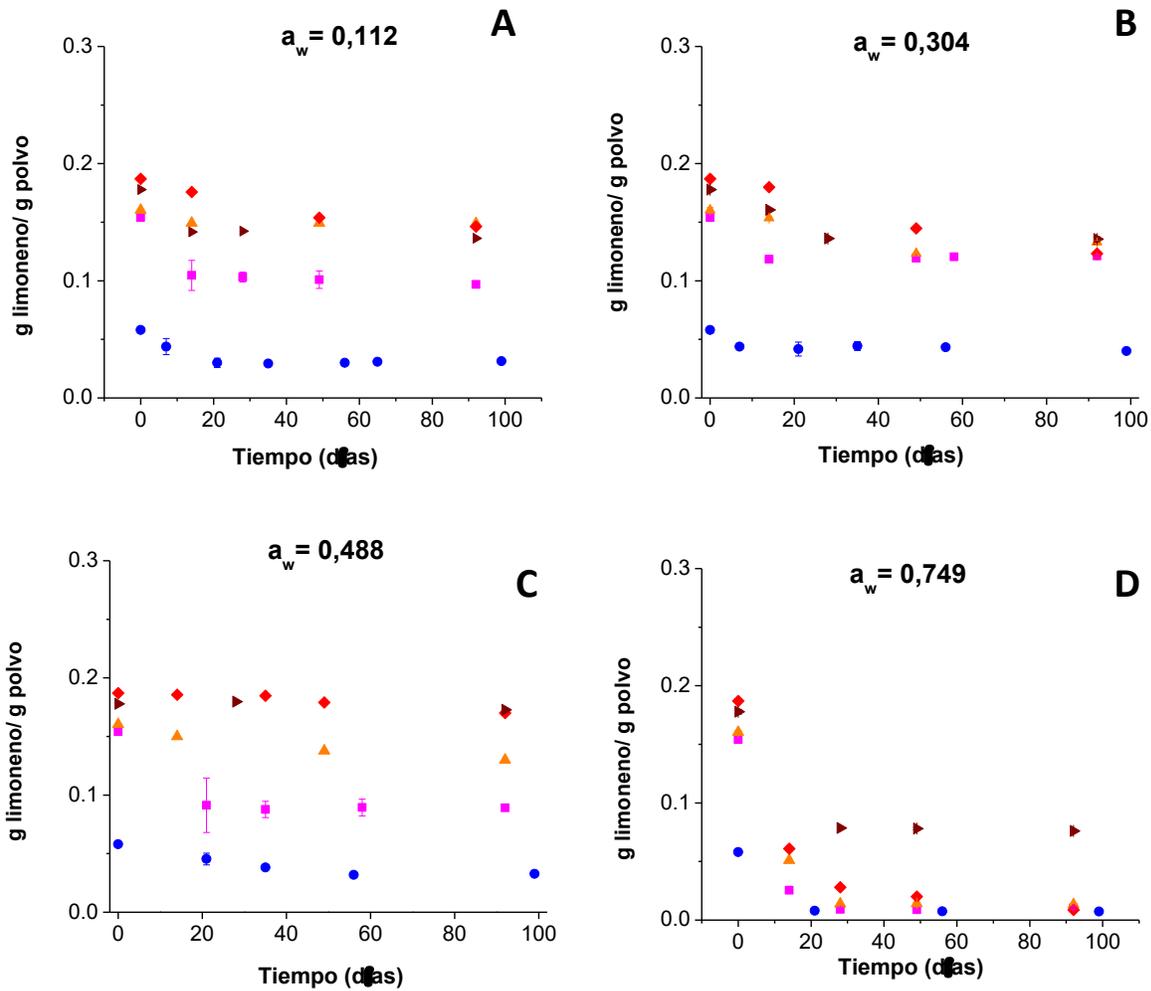


Figura IV.23. Estabilidad de limoneno en el tiempo en las microcápsulas de GB10%M-Lim (◆), GB24hM-Lim (■), GB48hM-Lim (▲), GB72hM-Lim (◆) y GB96hM-Lim (►) en el tiempo de almacenamiento a 50 °C y (A) $a_w=0,112$, (B) $a_w=0,304$, (C) $a_w=0,488$ y (D) $a_w=0,749$.

En la Figura IV.24 se presentan los porcentajes de retención de limoneno iniciales y finales para los distintos polvos de GBTT en las diferentes condiciones de a_w . En todos los casos, la retención inicial de las muestras de GBTT supera a la de GB sin tratamiento térmico en un 20% aproximadamente. GB72hM-Lim (al 10% p/p) fue la muestra que presentó mayor retención inicial (35,5%), superando a la retención de GA20%M-Lim (32,7%) preparada con el doble de concentración de goma (Capítulo III, Figura III.9).

Al final del almacenamiento, las retenciones de limoneno de las GBTT también fueron mayores que las de GB sin tratamiento. La mayor estabilidad del limoneno se presenta en la muestra de GB96hM-Lim a una $a_w = 0,304$, con una retención final de 32,8%, lo que indica una disminución de limoneno encapsulado del 1% en el tiempo de almacenamiento. GB72hM-Lim también presenta una gran estabilidad con una retención final de 32,3% que representa una disminución de 3,2% de limoneno al final del almacenamiento. Las microcápsulas de GB24hM-Lim presentan la mayor estabilidad a un $a_w = 0,488$ y GB48hM-Lim es más estable a un $a_w = 0,112$. La muestra de GA20%M-Lim presentó retenciones finales menores a estas en todas las condiciones de a_w evaluadas, entre 21,7% y 4,8%.

La condición de almacenamiento con $a_w = 0,749$ presentó la estabilidad más bajas, posiblemente por el fenómeno de caking que se observa en las muestras, como se explicó en el Capítulo III.

Finalmente, se concluye que el tratamiento térmico mejoró notablemente la propiedad encapsulante y protectora de limoneno de la GB, logrando superar la capacidad encapsulante de la GA.

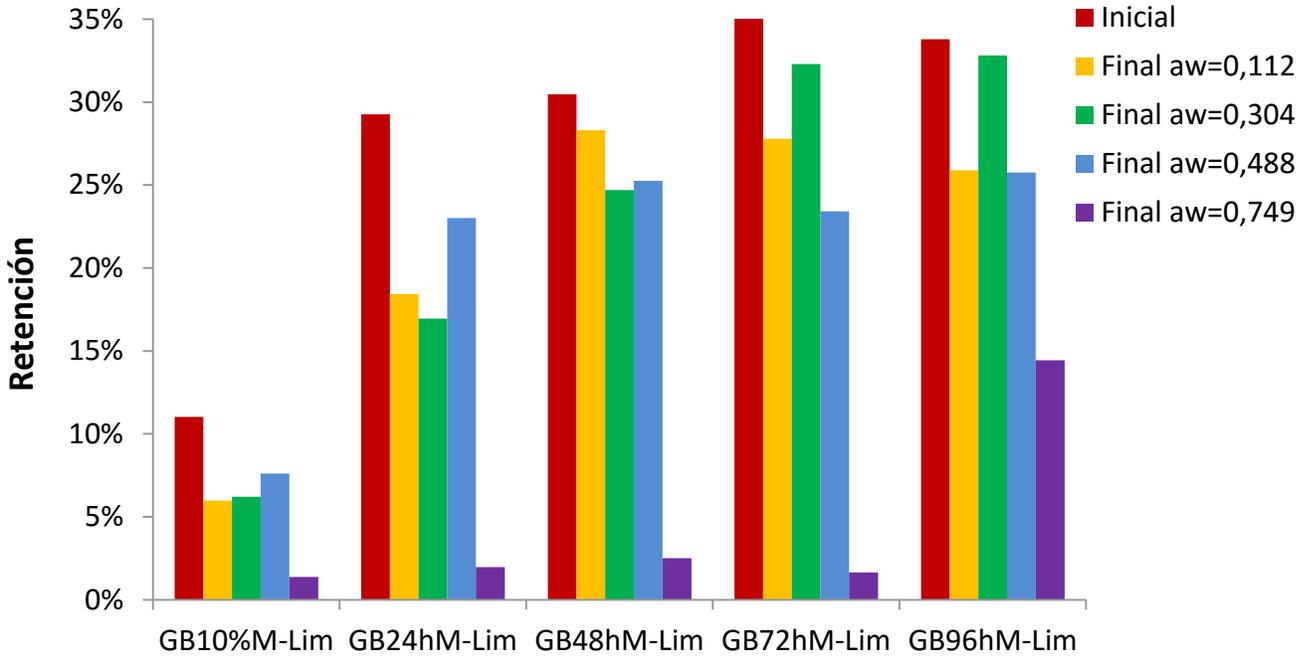


Figura IV.24. Porcentajes de retención de limoneno de las microcápsulas de GBTT al inicio del periodo de almacenamiento a 50 °C y a los 100 días.

5. CONCLUSIONES

En esta tesis, se realizó la primera caracterización química de los componentes moleculares de la Goma Brea. Los resultados mostraron que la Goma Brea de *Cercidium praecox* es un sistema heterogéneo y polidisperso que consistió en 82% de polisacáridos y 7,52% de proteínas en un amplio rango de masas moleculares (6 a 66 kDa). Los polisacáridos de la goma brea presentaron masas molares de $1,92 \times 10^5$ y $2,79 \times 10^3$, siendo esta última la fracción mayoritaria en la goma. También se observó la presencia de complejos proteína-polisacárido, responsables de las propiedades interfaciales de la goma.

La caracterización reológica de las soluciones de Goma Brea reveló que presentan un comportamiento pseudoplástico a bajas velocidades de deformación y un comportamiento de fluido Newtoniano a mayores velocidades de deformación. La viscosidad de las soluciones de goma Brea aumentó con la concentración de goma y disminuyó con la temperatura y el agregado de iones monovalentes, indicando posee grupos cargados que se ven afectados.

La capacidad emulsionante de la Goma Brea dependió de la concentración de goma y de la naturaleza de la fase dispersa. El aumento de la concentración de goma disminuyó el tamaño de gota a la vez que incrementó la estabilidad de las emulsiones. Por otro lado, las emulsiones de aceite de maíz, presentaron gotas de menor tamaño y fueron más estables que las emulsiones de limoneno. Esta diferencia se debió al tamaño de gota relativamente mayor de las emulsiones de limoneno lo que está fuertemente relacionado con la estabilidad. La GB tendría menor afinidad por la interface limoneno-agua favoreciendo la desestabilización de la emulsión por el proceso de maduración de Ostwald.

Por otro lado, se observó que la eficiencia de encapsulación de aceite de maíz fue mayor a mayores concentraciones de GB, como también la capacidad de protección del limoneno contra la oxidación aumentó con la concentración de goma.

La modificación de la GB por tratamiento térmico produjo reacciones de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard, generándose compuestos coloreados de mayor masa molar y actividad interfacial. Esta modificación mejoró la capacidad emulsionante y encapsulante de la goma Brea en lo que respecta a las fases dispersas estudiadas, obteniéndose emulsiones de aceite de maíz estables por varios meses y microcápsulas de limoneno con altos niveles de retención y protección contra la oxidación. Se pudo concluir que un tratamiento térmico de 24 horas a 110 °C es suficiente para mejorar notablemente las propiedades emulsionantes y encapsulantes de la GB. La GB tratada termicamente logró igualar, y superar en ciertas condiciones, a la capacidad emulsionante y encapsulante de la GA.

Actividades futuras

Teniendo en cuenta el avance logrado con los estudios llevados a cabo en este trabajo doctoral con respecto a proveer información sobre las características de la GB y sus aplicaciones, se ha planificado realizar estudios complementarios para profundizar y ampliar la comprensión de ciertos aspectos estudiados:

- Determinación de la composición aminoacídica de la fracción proteica de la GB.
- Análisis térmico de las GB tratadas térmicamente y de las microcápsulas de GB.

Por otro lado, se han propuesto líneas futuras de investigación que abarcan:

- El estudio de la coacervación compleja de la GB y diferentes proteínas.
- La evaluación de la tecnología de coacervación compleja como método para encapsular aceites ricos en Omega-3.
- La incorporación de microcápsulas de aceites ricos en Omega-3 con coacervados de GB/proteína como material de pared a matrices alimentarias.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H. y Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6, 75–83.
- Acedo-Carrillo, J.I., Rosas-Durazo, A., Herrera-Urbina, R., Rinaudo, M., Goycoolea, F.M. y Valdez, M.A. (2006). Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers*, 65, 327–336.
- AEB IBERICA S. A. 2011. La goma arábica en enología. www.aeb-group.com.
- Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L.S., Dalle Ore, F. Benajiba, A. y Puigserver A. (2001). Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems. *Journal of Food Science, Food Chemistry And Toxicology*, 66 (7), 926-931.
- Al-Assaf, S., Phillips, G. O. y Williams, P. A. (2005a). Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of *Acacia senegal* gum exudate. *Food Hydrocolloids*, 19, 647–660.
- Al-Assaf, S., Phillips, G. O. y Williams, P. A. (2005b). Studies on Acacia exudate gums: part II. Molecular weight comparison of the Vulgares and Gummiferae series of Acacia gums. *Food Hydrocolloids*, 19 (4), 661-667.
- Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Aoki, H. y Sasaki, Y. (2007). Characterization and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (A. (sen) SUPER GUM™): Part 1—Controlled maturation of *Acacia senegal* var. *senegal* to increase viscoelasticity,

- produce a hydrogel form and convert a poor into a good emulsifier. *Food Hydrocolloids*, 21, 319-328.
- Alesso S., Araujo P. y Tapias R. (2003a). Aprovechamiento de la Goma de Brea en Bosque Secundarios del Parque Chaqueño Seco. Influencia del Tamaño de las Heridas sobre la Producción. *Quebracho*. 10, 60-70.
- Alesso S., Araujo P. y Tapias R. (2003b). Posibilidades de la Producción de Goma de Brea (*Cercidium Praecox*) en el Noroeste de Argentina. XII Congreso forestal mundial, Québec City, Canadá.
- Anandaraman, S. y Reineccius, G. A. (1987). Analysis of encapsulated orange peel oil. *Perfumer and Flavorist*, 12, 33-39.
- Anderson, D. M. W., Weiping, W. y G. P. Lewis, G. P. (1990). The Composition and Properties of Eight Gum Exudates (Leguminosae) of American Origin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18 (1), 39-42.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis*, 16th ed.. AOAC International, Arlington, VA.
- Armada, M. (2010). Aplicaciones de la goma brea en sustitución de la goma arábica. Facultad de Ingeniería – INIQUI - UNSA, Salta.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108, 463–472.

- Ascheri, D. P. R. y Bastos, S. M. C. (2015). Propiedades de adsorción de agua de dos genotipos de arroz rojo. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering*, 35 (1), 134-143.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarchaya, R., Palmer, M. y Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5353-5356.
- Bae, E. K. y Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25, 549–560.
- Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C. D. y Mercadante, A. Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, 989-994.
- Barteri, M. Fioroni, M., y Gaudio, M.C. (1996). Oxidation of Fe (II) horse heart cytochrome c by ultrasound waves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1296, 35-40.
- Baxter, S., Zivanovic, S. y Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830.
- Becher, P. (2001). *Emulsions: Theory and practice*. Oxford: Oxford University Press.
- Behrend, O., Ax, K. y Schubert, H. (2000). Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7, 77-85.
- Bejosano, F. P. y Corke, H. (1998). Protein quality evaluation of Amaranthus whole meal flours and protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 100-106.

- Bénech, A. (2010). La Goma Arábica. Extraído de http://www.industriaalimenticia.com/Archives_Davinci?article=1242
- Beristain, C. I., Azuara, E. y Vernon-Carter, E. J. (2002). Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis Juliflora*) as wall material. *Food Engineering and Physical Properties*, 67 (1), 206-211.
- Bertolini A., Siani A. y Grosso C. (2001). Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 780-785.
- Bertuzzi A., Armada M. y Gottifredi J. (2006). Caracterización Físico-Química de Soluciones de Goma Brea. Trab. 44d, XXII CIIQ, V CAIQ.
- Bertuzzi, M. A., Slavutsky, A. M. y Armada, M. (2012). Physicochemical characterisation of the hydrocolloid from Brea tree (*Cercidium praecox*). *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 776-782.
- Buffo, R. A. y Reineccius, G. A. (2001). Modeling the rheology of concentrated beverage emulsions. *Journal of Food Engineering*, 51, 267-272.
- Buma, T. J. (1971). Free fat in spray-dried whole milk. 8. The relation between free-fat content and particle porosity of spray-dried whole milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 25, 123-140.
- Bylaite, E., Nylander, T., Venskutonis, R. y Jönsson, B. (2001). Emulsification of caraway essential oil in water by lecithin and b-lactoglobulin: emulsion stability and properties of the formed oil-aqueous interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 327-340.

- Calvo, M. (2011). Gomas de resinas: Goma Arábica. Bioquímica de los alimentos. Extraído el 21/08/2011 de <http://milksoci.unizar.es/bioquimica/temas/azucres/arabiga.html>
- Calzon, M. E. y Chris van Dam. (2007). Recolección de goma brea en comunidades indígenas del Chaco semiárido de la provincia de Salta, Argentina. XXII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Concordia.
- Camino, N. A., Perez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (1978). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1089-1095.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F. y Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combination of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443-451.
- Castel, V., Andrich, O., Netto, F. M., Santiago, L. G. y Carrara, C. R. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of different streams resulting from pilot-plant processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 122, 62-67.
- Cerezo, A., Stacey, M. y Webber, M. (1969). Some structural studies of brea gum (an exudate from *Cercidium australe* jonhst.). *Carbohydrate Research*, 9 (4), 505-517.
- Chapleau, N. y Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17 (3), 273-280.
- Chawla, S. P., Chander, R. y Sharma, A. (2009). Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food Chemistry*, 116, 122- 128.

- Chen, S-L., Yang D-J., Chen H-Y., y Liu S-C. (2009). Effect of hot acidic fructose solution on caramelisation intermediates including colour, hydroxymethylfurfural and antioxidative activity changes. *Food Chemistry*, 114, 582–588.
- Coirini, R. y Zapata, R. (2010). Goma brea: un producto con potencial para el desarrollo de la economía regional. In Ministerio de Agricultura, G. y. P.; Regionales, S. d. D. d. E., Eds. Salta.
- Connolly, S., Fenyo, J. C. y Vandavelde, M. C. (1988). Effect of a proteinase on the macromolecular distribution of *A. senegal* gum. *Carbohydrate Polymers*, 8, 23-32.
- De Pinto, G., Rodriguez, O., Martinez, M. y Rivas, M. (1993). Composition of *Cercidium praecox* gum exudates. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 (2), 297-300.
- Defain-Tesoriero, M. V., Murano, M. y Hermida, L. (2004). Utilización de goma brea para la microencapsulación de fragancias por coacervación compleja. INTI-Química.
- Desai, K. y Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361–1394.
- Dickinson, E. (1992). An introduction to food colloids. Oxford: Oxford University Press.
- Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 347–354.
- Dickinson, E., Galazka, V. B. y Anderson D. M. W. (1991). Emulsifying behaviour of gum Arabic. Part 2: Effect of the gum molecular weight on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14, 385-392.

- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A. y Oleksza, K. (2015). Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food Hydrocolloids*, 44, 49-58.
- Downey, G. (2000). Quality changes in frozen and thawed, cooked pureed vegetables containing hydrocolloids, gums and dairy powders. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (8), 869-877.
- Durand, A., Franks, G. V. y Hosken R. W. (2003). Particle sizes and stability of UHT bovine, cereal and grain milks. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 671-678.
- FAO (1999). Compendium of food additive specifications addendum 7. Food and nutrition paper, No. 52. Add. 7. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Session Held in Rome, 1–10 June 1999. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2002). Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2000 - Informe Principal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Fathi, M., Martin, A. y McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39, 18- 39.
- Floury, J., Legrand, J. y Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, 59, 1285–1294.
- Friberg, E. y Larsson, K. (1997). Food emulsions. New York, USA: Marcel Dekker.

Referencias Bibliográficas

- Fuchs, M., Turchiulli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordannaud, C., Peyrat-Maillard, M.N., Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75 (1), 27–35.
- Furukawa, T. y Ohta, S. (1983). Ultrasonic-induced modification of flow properties of soy protein dispersion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47 (4), 745-750.
- Garlo, P., Grinwald, R., Hikichi, N., Martín, Y. y Cohe, R. (s.f.). Caracterización del tipo de goma producida por la *Acacia aramo*. <http://portal.varela.edu.uy/moodle/login/index.php>
- Garti, N. (1999). What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress?. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 152, 125–146.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., y Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review International. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
- González-Pérez, S., Merck, K.B., Vereijken, J.M., Koningsveld, G.A., Gruppen, H. y Voragen, A.G.J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1713-1719.
- Gracia, O. (s.f.). La goma arábica: Una maravilla natural que nos beneficia a todos. Industria Alimentaria. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/GomaArabiga_1838.pdf
- Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., y Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
- Hayashi, H. (2002). Enhancement method of gum arabic under the atmosphere of 30–100% of relative humidity at over 40 °C. Patent Japan 2002 130212; PCT-JP02/08144; WO03/093324A1; US 2005/0158440.

- Hogan, S. A., McNamee, B. F., O' Riordan, E. D. y O' Sullivan, M. (2001a). Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *International Dairy Journal*, 11, 137–144.
- Hogan, S.A., McNamee, B.F., O' Riordan, E.D., y O' Sullivan, M. (2001b). Microencapsulating properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 66, 675-680
- Huang X., Kakuda Y. y Cui W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15, 533-542.
- Idris, O. H. M., Williams, P. A. y Phillips, G. O. (1998). Characterization of gum from *A. senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, 12, 379-388.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A. y Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (2), 140-160.
- Ikeda, S., Funami, T. y Zhang, G. (2005). Visualizing surface active hydrocolloids by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 62, 192–196.
- Ismail, A., Marjan, Z.M. y Foong, C.W. (2004). Total antioxidant and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87 (4), 581-586.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B. y He, Y. (2008a). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Research International*, 41, 172-183.

Referencias Bibliográficas

- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. y Bhandari, B. (2008b). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22, 1191-1202.
- Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*, 9, 475-485.
- Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82, 478-488.
- Jambrak, A. R. Lelas, V., Mason, T. J. y Kresic, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT -Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.
- Jambrak, A. R. Lelas, V., Mason, T. J., y Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4). 386-393.
- Jayme, M. L., Dunstan, D. E. y Gee, M. L. (1999). Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 13, 459-465.
- Jimenez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A. y Villamiel, M. (2005). Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran, effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry*, 93, 689-695
- Karamalla, K. A., Siddig N. E. y Osman M. E. (1998). Analytical data for *A. senegal* var. senegal gum samples collected between 1993 and 1995 from Sudan. *Food Hydrocolloids*, 12, 373-378.

- Karbstein, H. y Schubert, H. (1995). Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions. *Chemical Engineering and Processing*, 34, 205-211.
- Kardos, N. y Luche, J. L. (2001). Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Research*, 332, 115–131.
- Khouryieh H., Puli, G., Williams K. y Aramouni, F. (2015). Effects of xanthan–locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 167, 340–348.
- Kim, Y. D. y Morr, C. V. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray- dried orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1314-1320.
- Kleiman, E. (2010). Informe reunión técnica “Goma brea: un producto con potencial Para el desarrollo de la economía regional”. Argentina, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Subsecretaría de Desarrollo de Economías Regionales. Universidad Nacional de Salta. Fundación de Altos Estudios (FUNDALTES). Proyecto Promoción de la Goma Brea como Producto Forestal No Maderero, para el Desarrollo Sostenible de las Comunidades Wichí del Chaco Salteño. Salta.
- Klinkerson, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39 (4), 449-457.

- Lepoint, T. y Lepoint-Mullie, F. (1998). Theoretical bases. En J. L. Luche (Ed.), *Synthetic Organic Sonochemistry*, 1-49. New York: Plenum.
- Lertittikul, W., Benjakul, S. y Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100, 669-677.
- Li, R. y Feke, D. L. (2015). Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of xanthan gum in aqueous solution: Effects of pyruvate group. *Carbohydrate Polymers*, 124, 216–221.
- Li, X., Fang Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K. y Zhang H. (2009). Rheological study of gum arabic solutions: Interpretation based on molecular self-association. *Food Hydrocolloids*, 23, 2394–2402.
- Liu, S., Low, N. H. y Nickerson, M. T. (2010). Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 809–815.
- Liu, X. D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M. y Linko, P. (2001). Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. *Drying Technology*, 19, 1361–1374.
- Liu, X. D., Furuta, T., Yoshii, H., Linko, P., y Coumans, W. J. (2000). Cyclodextrin encapsulation to prevent the loss of l-menthol and its retention during drying. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 64 (8), 1608– 1613.
- Lobo, L. y Svereika, A. (2003). Coalescence during emulsification 2. Role of small molecule surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261, 498-507.

- López, E. E., Santos, L. N. y Feltrinelli, M. (2004). Almidones nativos vs. almidones modificados: cómo diferenciarlos y clasificarlos por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H), M. 5° Jornadas de Desarrollo e Innovación. INTI.
- López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J. y Lizardi-Mendoza, J. (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, 26, 159-166.
- López-Franco, Y. L., Valdez, M. A., Hernández, J., Ana M. Calderón de la Barca, A. M., Rinaudo, M. y Goycoolea, F. M. (2004). Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of sonorean mesquite gum. *Macromolecular Bioscience*, 4, 865-874.
- López-Franco, Y., Goycoolea F.M., Valdez M. A. y Calderón de la Barca M. A. (2006). Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. INCI. 31(3).
- Lorenzo, G., Zaritzky, N. E. y Califano, A. N. (2010). Comportamiento viscoelástico de emulsiones alimentarias modificado por adición de biopolímeros. World Congress & Exhibition Engineering-2010-Argentina. IPPIA.
- Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C. y Brookfield, E. A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.
- Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C. y Brookfield, E. A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 2 (1), S55-S57.
- Losano, M. A., Dottori, N. y Cosa, M. T. (2000). Secreciones intravasculares de sustancias gomosas en *Cercidium praecox* (Fabaceae). Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. *Serie Botánica* 71, (1), 1-9.

- Majewska-Sawka, A. y Nothnagel, E. (2000). The multiple role of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology*, 122, 3-9.
- Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M. y Rodrigues, A. E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191–200.
- Mason, T. J. (2011). Therapeutic ultrasound an overview. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18(4), 847-52.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*. 2nd edn. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- McNamee, B.F., O’Riordan, E. y O’Sullivan, M. (1998). Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4551–4555.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K. y Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50, 445–456.
- Miralles, B., Martínez-Rodríguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J. y Heras, A. (2007). The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, 100, 1071-1075.

- Molina Ortiz, S. E., Puppo, M. C. y Wagner, J. R. (2004). Relationship between changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 18, 1045-1053.
- Mothé, C. G. y Rao, M. A. (1999). Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. *Food Hydrocolloids*, 13, 501–506.
- Motlagh, S., Ravines, P., Karamallah, K. A. y Ma, Q. (2006). The analysis of Acacia gums using electrophoresis. *Food Hydrocolloids*, 20, 848–854.
- Muller, H. G. (1973). *An introduction to food rheology*. New York: Crane, Russak & Company, Inc.
- Narsimhan, G. y Goel, P. (2001). Drop coalescence during emulsion formation in a high-pressure homogenizer for tetradecane-in-water emulsion stabilized by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, 420-432.
- Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H. y Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chemistry*, 106 (2), 760-766.
- Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigan, S. y McClements, D. J. (2006). Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Research International*, 39, 78–86.
- Orueta, A. (1992). La Brea, Rev. Desarrollo Agrof. y Com. Campesina, Nº. 1

- Osman, M. E., Menzies, A. R., Martin, B. A., Williams, P. A., Phillips, G. O. y Baldwin, T. C. (1995). Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. *Phytochemistry*, 38, 409-417.
- Oszoy, N., Candoken, E. y Akev, N. (2009). Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (2), 99-106.
- Partanen, R., Raula, J., Seppanen, R., Buchert, J., Kauppinen, E. y Forssell, P. (2008). Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (14), 5717–5722.
- Pasquel, A. (2001). Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1, 1-8.
- Pena, A., Veiga, S., Sapelli, M. A., Martinez, N., Marquez, V., Dellacassa, E. y Bussi, J. (2012). Limonene oxidation by molecular oxygen under solvent-free conditions: the influence of peroxides and catalysts on the reaction rate. *Reaction Kinetics Mechanisms and Catalysis*, 107, 263–275.
- Perrier-Cornet, J. M., Marie, P. y Gervais, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*, 66, 211-217.
- Picton, L., Bataille, I. y Muller, G. (2000). Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. *Carbohydrate Polymers*, 42 (1), 23-31.

- Pinnamaneni, S., Das, N. G. y Das, S. K. (2003). Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization. *Pharmazie*, 58 (8), 554-558.
- Pitron, G. (2011). Goma arábica: el petróleo que EEUU no controla. Recuperado el 28 de agosto de 2011 de <http://www.ousferrats.com/2011/07/06/goma-arabiga-el-petroleo-que-eeuu-no-controla-1/>
- Portenlänger y Heusinger. (1994). Polymer formation from aqueous solutions of α -D-glucose by ultrasound and λ -rays. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2), S125-S129.
- Rabe, E. A. (2007). Un proyecto de ayuda a comunidades aborígenes salteñas. <http://www.santafe-conicet.gov.ar/servicios/comunica/gomabrea.htm>
- Randall, R. C., Phillips, G. O. y Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2 (2), 131-140.
- Randall, R. C., Phillips, G. O. y Williams, P. A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3 (1), 65-75.
- Re, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1126.
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M. C. y Sanchez, C. (2006). *A. senegal* Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, 7, 2637-2649.
- Rinaudo, M., Goycoolea, F. M. y Valdez, M. A. (2008). Emulsifying properties of mesquite gum. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 213, 239-248.

- Rique, T. (1977). Aplicaciones Industriales de Extractivos de Especies Forestales Indígenas de las Zonas Aridas y Semiáridas del País. *IDIA Suplemento*, 34, 222-226.
- Risch, S. J. y Reineccius, G. A. (1988). Spray-dried orange oil: Effect of emulsion size on flavor retention and shelf stability. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius (Eds.), *Flavor encapsulation. ACS Symp. Ser*, 370, 67– 77.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J. y Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111 (1), 102-109.
- Rosenthal, A. J. (2001). Relación entre las medidas instrumentales y sensoriales de la textura de alimentos. En “Textura de los alimentos, Medida y percepción”. Zaragoza: Acribia.
- Rubino, M. I., Arntfield, S. D., Nadon, C. A. y Bernatsky, A. (1996). Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. *Food Research International*, 29, 653-659.
- Saha, D. y Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 587-597.
- Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C. y Lefebvre, J. (2002). Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, 16, 257-267.
- Sanguansri, P. y Augustin, M.A. (2006). Nanoscale materials development- a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 547-556.

- Schmitt, C., Sanchez, C., Banon, D.B. y Hardy, J. (2010). Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8), 689–753.
- Schramm, L. L. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.
- Silva, D. A., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P., Brito, A. C. F., Maciel, J. S. y Paula, H. C. B. (2004). Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 58, 163-171.
- Sinisterra, J. V. y Barrios J. (1990). Proceedings of ultrasonics internacional 1989. Butterworths, London, 1232-1237.
- Sisko, A. W. (1958). The Flow of Lubricating Greases. A relatively simple flow equation is used to fit experimental flow data, and can be applied to other materials as well as greases. *Industrial and Engineering chemistry*, 50 (12), 1789-1792.
- Slavutsky, A. M., Bertuzzi, M. A., Armada, M., García, M. G. y Ochoay, N. A. (2014). Preparation and characterization of montmorillonite/brea gum nanocomposites films. *Food Hydrocolloids*, 35, 270-278.
- Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. y Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6 (1), 107– 114.

- Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M. y Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science*, 68, 2256– 2262.
- Spotti, M. L., Cecchini, J. P., Spotti, M. J. y Carrara, C. R. (2016). Brea Gum (from *Cercidium praecox*) as a Structural Support for Emulsion-Based Edible Films. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 127-134.
- Stang, M., Karbstein, H. y Schubert, H. (1994). Adsorption kinetics of emulsifiers at oil–water interfaces and their effect on mechanical emulsification, *Chemical Engineering and Processing*, 33, 307.
- Stang, M., Schuchmann, H. y Schubert, H. (2001). Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, 1, 151-157.
- Sun, C., Sundaram, G. y Mark, R. P. (2007). Effect of xantham gum on physiochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsion. *Food Hydrocolloids*, 21, 555– 564.
- Tang, C-H., Wang, X-Y., Yang, X-Q. y Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 432-437.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D. yDanner, T. (2004). Role of surfactant type and concentration for the mean drop size during emulsification in turbulent flow. *Langmuir*, 20, 7444-7458.

- Tesch, S. y Schubert, H. (2002). Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*, 52, 305-312.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. y Burne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays forestimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19, 669-675.
- Thimma, R. y Tammishetti, S. (2001). Barium chloride crosslinked carboxymethyl guar gum beads for gastrointestinal drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 3084-3090.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C. y Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 166-178.
- Ubbink, J. y Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 244-254.
- Urban, K., Wagner, G., Schaffner, D., Roglin, D. y Ulrich, J. (2006). Rotor-stator and disc systems for emulsification processes. *Chemical Engineering and Technology*, 29, 24-31.
- Valdez, M. A., Acedo-Carrillo, J. I., Rosas-Durazo, A., J. Lizardi, A. J., Rinaudo, M. y Goycoolea, F. M. (2006). Small-deformation rheology of mesquite gum stabilized oil in water emulsions. *Carbohydrate Polymers*, 64, 205-211.
- Verbeke D., Dierckx S. y Dewettinck K. (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63, 10-21.

- Vernon-Carter E., Beristain C. y Pedroza-Islas R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis* gum). *Developments in Food Science*, 41, 217-238.
- Vernon-Carter, E. J., Gomez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R. y Moreno-Terrazas, R. C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies*, 27, 625-641.
- Vilela, A. y Ravetta, D. (2005). Gum exudation in South-American species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). *Journal of Arid Environments*, 60, 389–395.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161-169.
- Villamiel, M. y de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478.
- Von Müller, A, López, C., Eynard, A. y Guzmán, C. (2006a). Evaluación Toxicológica del PFM Goma Brea (*Parkinsonia Praecox*) para su Incorporación como Aditivo de uso Alimentario. <http://www.gomabrea.com.ar/>
- Von Müller, A. R., Coirini, R. O. y Karlin, U. O. (2006b). Evaluación Socioeconómica de la Producción de Goma de Brea en el Chaco Árido de la Provincia de Córdoba. Asociación Argentina de Economía Agraria.

- Wang, Q. e Ismail, B. (2012). Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal*, 1-11.
- Weiss, J., Takhistov, P., y McClements, J. (2011). Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107-116.
- Wijewickreme, A. N. y Kitts, D. (1997). Influence of Reaction Conditions on the Oxidative Behavior of Model Maillard Reaction Products. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45, 4571-4576.
- Williams, P. A. y Philips, G. O. (2000). *Handbook of Hydrocolloids*. New York: CRC Press.
- Windhab, E. J., Dresslera, M., Feigl, K., Fischera, P. y Megias-Alguacila, D. (2005). Emulsion processing—from single-drop deformation to design of complex processes and products *Chemical Engineering Science*, 60, 2101 – 2113.
- Yáñez-Fernández, J., A-Salazar, J., Montoya, Jiménez, J., Márquez, M., Robles y Ramos-Ramírez, E.G. (2002). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Industria Alimentaria*, 28, 10-12.
- Yaseen, E.I., Herald, T.J., Aramouni, F.M. y Alavi, S. (2005). Rheological properties of selected gum solutions. *Food Research International*, 38, 111–119.
- Yebeyen, D., Lemenih, M. y Feleke, S. (2009). Characteristics and quality of gum arabic from naturally grown *A. senegal* (Linne) Willd. trees in the Central Rift Valley of Ethiopia. *Food Hydrocolloids*, 23 (1), 175-180.

Referencias Bibliográficas

Zhu, D., Damodaran, S., y Lucey, J. A. (2008). Formation of whey protein isolate (WPI)- dextran conjugates in aqueous solutions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7113-7118.

Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonic Sonochemistry*, 17(6), 1075- 1081.