

Tesis Doctoral

Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas

von Staszewski, Mariana

2011

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

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

Cita tipo APA:

von Staszewski, Mariana. (2011). Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

von Staszewski, Mariana. "Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

***IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE
POLIFENOLES DE TÉ VERDE Y PROTEÍNAS DEL
LACTOSUERO SOBRE LAS PROPIEDADES
BIOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LAS MEZCLAS***

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

Lic. Mariana von Staszewski

Directores de tesis: Dra. Ana María Renata Pilosof y Dra. Rosa
Juana Jagus

Consejero de estudios: Dra. Ana María Renata Pilosof

Buenos Aires, 2011.

Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero y su impacto sobre las propiedades funcionales y biológicas de los componentes.

Los estudios realizados muestran que los polifenoles poseen una fuerte afinidad por todas las proteínas del lactosuero estudiadas y a todos los pH analizados. El tamaño de los complejos formados es máximo cercano al punto isoeléctrico de cada proteína por lo que la insolubilidad de los mismos está mayormente determinada por su carga superficial. La presencia de polifenoles aceleró el proceso de gelificación tanto de β -lactoglobulina (β -lg) como de caseinomacropeptido (CMP). Resultados similares se observaron con WPC. A pH 6,0, pudieron utilizarse concentraciones de polifenoles de hasta 0,5% (p/v) sin producir precipitación del sistema y sin afectar negativamente la viscoelasticidad y la textura de los geles de proteína o WPC.

Las variedades de té verde argentino mostraron excelentes capacidades como agentes antioxidantes y antimicrobianos. La formación de complejos entre los polifenoles de té verde y el WPC disminuyó significativamente estas actividades. La actividad antimicrobiana del té verde en presencia de WPC se observó principalmente frente a bacterias gram positivas. Además, el tratamiento previo con té verde mejoró, en la mayoría de los casos, la efectividad de distintas condiciones de estrés aplicadas sobre los microorganismos, sin producir efectos de protección cruzada.

Los polifenoles presentaron un gran potencial como agentes anticancerígenos. Sin embargo, la interacción de los polifenoles con β -lg o CMP tuvo efectos sinérgicos o antagónico dependiendo de la línea celular evaluada.

La elección adecuada de la concentración de polifenoles permitiría obtener los efectos biológicos para la salud presentes en este ingrediente funcional sin afectar negativamente las propiedades funcionales de sistemas lácteos como el WPC y sus proteínas.

Palabras claves: polifenoles de té verde, proteínas del lactosuero, interacciones, propiedades funcionales, propiedades biológicas.

Impact of the interaction between green tea polyphenols and whey proteins on the biological and functional properties of mixed systems

Abstract

The objective of the present work was to study the interaction between green tea polyphenols and whey proteins, and its impact on the functional and biological properties of the components.

The studies revealed that polyphenols have a strong affinity for all whey proteins studied and at all pH evaluated. The size of the complexes formed was maximum close to the isoelectric point of each protein and their solubility was mainly determined by their superficial charge. The presence of polyphenols accelerated the gelation process of both β -lactoglobulin (β -lg) and caseinmacropeptide (CMP). Similar results were observed with WPC. At pH 6.0, polyphenol concentrations up to 0.5% (p/v) can be used without producing precipitation neither affecting negatively the viscoelasticity and the texture of protein or WPC gels.

Argentinean green tea varieties showed very good capacities as antioxidants and antimicrobials. The complexes formation between green tea polyphenols and WPC decreased very significantly these activities. The green tea antimicrobial activity in the presence of WPC was mainly observed against gram positive bacteria. Additionally, the previous treatment with green tea improved, in most of the cases, the effectiveness of different stress conditions applied on the microorganisms, without producing cross-protection effects.

Polyphenols presented a great potential as anticancer agents. However, the interaction between polyphenols and β -lg or CMP had synergistic or antagonistic effects depending on the cell line evaluated.

The right polyphenols concentration would allow obtaining the biological health effects present in this functional ingredient without negatively affecting the functional properties of dairy systems as they are WPC and its proteins.

Keywords: green tea polyphenols, whey proteins, interactions, functional properties, biological properties.

Agradecimientos

A la Dra. Rosa Jagus por darme un lugar en su laboratorio y brindarme el espacio para iniciarme como investigadora. Por sus inagotables ganas de trabajar y su perseverancia en el proyecto de tesis. Por los momentos compartidos.

A la Dra. Ana Pilosof por su inmensa ayuda y dirección en todo el trabajo de investigación. Por sus importantes aportes, ideas y sugerencias. Por demostrarme su confianza y darme ánimos en los momentos difíciles tanto laborales como personales. Por estar siempre presente demostrando generosidad y paciencia.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por su infinito amor y por haberme dado tantas oportunidades en la vida. Por representar un ejemplo de excelentes personas. A mi abuela por su gran cariño. A mis hermanos, sobrinos, tíos y primas que me han apoyado siempre y con quienes comparto los momentos más felices.

A Fede, por ser mi compañero en todo momento, por su amor y su paciencia. Por tantas vivencias juntos.

A mis compañeros de laboratorio, por estar siempre dispuestos a dar una mano, porque cada uno de ellos aportó un granito de arena en la realización de este trabajo. A Sandra, por enseñarme a enseñar. A Oscar, Karina, Nerina, Edith, Carolina y Estefi, por los lindos momentos compartidos y por su excelente compañerismo. A Julia y Víctor, por su amistad y su ayuda incondicional. A Lau, Gise y Pau, por su agradable paso por el labo.

A mis grandes amigas Maru, Maca y Pía, por las charlas, risas y recuerdos vividos. A mis amigos de la facu Pato, Fede, Jota y Mariana, por las épocas de estudio, las meriendas y experiencias comunes. A todos ellos, por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A todos los integrantes del grupo de la Dra. Buera con quienes compartimos muy lindos momentos en cumpleaños, despedidas y congresos.

A todas las personas del plantel no docente de Industrias, en especial a Oscar, Daniel y Marcelo, por su ayuda y la sonrisa diaria de cada uno de ellos.

Al grupo del Dr. Carvalho de Campinas, Brasil por el trabajo compartido sobre la actividad anticancerígena.

A la Dra. Amelia Rubiolo, por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química. Y en especial a Bárbara Meza y a Roxana Verdini, por haberme recibido tan cordialmente.

Al CONICET, por haberme otorgado las becas para la realización de este trabajo y a la Universidad de Buenos Aires y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, quienes han otorgado el financiamiento necesario para el trabajo de investigación.

A todos, de corazón ¡¡muchas gracias!!

*A mis padres,
a Federico.*

Índice

Introducción

| | |
|--|----|
| 1. Alimentos funcionales..... | 1 |
| 1.1. Características de los alimentos funcionales..... | 2 |
| 2. Té..... | 4 |
| 2.1. Producción mundial..... | 5 |
| 2.2. Caracterización de la producción nacional..... | 8 |
| 2.3. Avances tecnológicos..... | 9 |
| 2.4. Polifenoles de té..... | 10 |
| 2.4.1. Propiedades antimicrobianas de los polifenoles..... | 15 |
| 2.4.2. Propiedades antioxidantes de los polifenoles..... | 17 |
| 2.4.3. Propiedades benéficas para la salud de los polifenoles..... | 20 |
| 2.4.4. Impacto sensorial de los polifenoles..... | 21 |
| 3. Suero de queso, WPC y proteínas aisladas del lactosuero..... | 23 |
| 3.1. Producción en Argentina..... | 24 |
| 3.2. Propiedades biológicas del suero..... | 29 |
| 3.3. Propiedades funcionales de proteínas lácteas..... | 32 |
| 3.4. β -lactoglobulina..... | 34 |
| 3.4.1. Propiedades biológicas de la β -Ig..... | 37 |
| 3.4.2. Propiedades funcionales de la β -Ig..... | 38 |
| 3.5. Caseinoglicomacropéptido..... | 38 |
| 3.5.1. Actividades biológicas del CMP..... | 41 |
| 3.5.2. Propiedades funcionales del CMP..... | 42 |
| 4. Interacciones proteína-proteína..... | 43 |
| 5. Referencias..... | 49 |

Objetivos

| | |
|----------------------------|----|
| Objetivo general..... | 61 |
| Objetivos específicos..... | 61 |

SECCION I – IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE POLIFENOLES DE TÉ VERDE Y PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS MEZCLAS

Materiales y métodos

| | |
|--|----|
| 1. Materiales..... | 62 |
| 1.1. Proteínas del lactosuero..... | 62 |
| 1.2. Polifenoles de té verde..... | 62 |
| 1.3. Concentrados proteicos de suero en polvo..... | 63 |
| 2. Métodos..... | 64 |
| 2.1. Medición del tamaño de partícula en sistemas de proteínas del Lactosuero-polifenoles..... | 64 |
| 2.2. Medición del tamaño de partícula en sistemas de WPC-polifenoles | 69 |
| 2.3. Determinación de la carga superficial de las partículas en solución | 71 |
| 2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 74 |
| 2.5. Determinación de polifenoles..... | 76 |
| 2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)..... | 76 |
| 2.7. Microscopía Confocal..... | 78 |
| 2.8. Cinética de precipitación..... | 79 |
| 2.9. Reología Dinámica..... | 80 |
| 2.10. Propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles..... | 82 |
| 3. Referencias..... | 84 |

Resultados

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO Y POLIFENOLES DE TÉ VERDE Y SU EFECTO EN LA ESTABILIDAD COLOIDAL

| | |
|--|-----|
| 1.1. Introducción..... | 86 |
| 1.2. Distribución de tamaño de partícula de soluciones de β -lg y CMP | 90 |
| 1.3. Distribución de tamaño de partícula en mezclas de proteínas del lactosuero y polifenoles..... | 95 |
| 1.4. Potencial zeta..... | 100 |

| | |
|--|-----|
| 1.5. Estabilidad coloidal de mezclas polifenol-proteína..... | 103 |
| 1.6. Microscopía confocal..... | 108 |
| 1.7. Conclusiones..... | 109 |
| 1.8. Referencias..... | 111 |

CAPÍTULO 2 – IMPACTO DE LOS POLIFENOLES DE TÉ VERDE SOBRE LA GELIFICACIÓN DE β -LACTOGLOBULINA Y CASEINOMACROPÉPTIDO

| | |
|---|-----|
| 2.1. Introducción..... | 115 |
| 2.2. Impacto de los polifenoles en la gelificación de β -lg a distintos valores de pH... | 122 |
| 2.3. Apariencia y propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles de β -lg..... | 134 |
| 2.4. Impacto de los polifenoles en la gelificación de CMP a distintos valores de pH.. | 141 |
| 2.5. Conclusiones..... | 150 |
| 2.6. Referencias..... | 151 |

CAPÍTULO 3 – IMPACTO DE LOS POLIFENOLES DE TÉ VERDE SOBRE LA ESTABILIDAD COLOIDAL Y LA GELIFICACIÓN DE WPC

| | |
|---|-----|
| 3.1. Introducción..... | 155 |
| 3.2. Estabilidad coloidal de mezclas de WPC y polifenoles..... | 156 |
| 3.3. Caracterización de los complejos WPC-polifenol | 159 |
| 3.4. Gelificación de los complejos WPC-polifenol..... | 162 |
| 3.4.1. Dinámica de gelificación..... | 162 |
| 3.4.2. Propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles..... | 167 |
| 3.5. Conclusiones..... | 170 |
| 3.6. Referencias..... | 172 |

SECCION II – ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE POLIFENOLES DE TÉ VERDE ARGENTINO: IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE POLIFENOLES Y PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

Materiales y métodos

| | |
|--------------------|-----|
| 1. Materiales..... | 174 |
|--------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| 1.1. Concentrados proteicos de suero en polvo..... | 174 |
| 1.2. Té verde..... | 174 |
| 2. Métodos..... | 175 |
| 2.1. Determinación del porcentaje de polifenoles precipitados en presencia de WPC..... | 175 |
| 2.2. Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres..... | 175 |
| 2.3. Actividad antimicrobiana..... | 176 |
| 2.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento..... | 176 |
| 2.3.2. Determinación del crecimiento microbiano..... | 177 |
| 2.3.3. Condiciones de estrés..... | 177 |
| 2.3.4. Medición de potencial zeta..... | 178 |
| 2.3.5. Determinación de hidrofobicidad de la superficie celular..... | 179 |
| 2.3.6. Respuesta osmótica..... | 179 |
| 2.3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)..... | 180 |
| 2.4. Tratamiento estadístico..... | 181 |
| 3. Referencias..... | 182 |

Resultados

| | |
|---|-----|
| 4.1. Introducción..... | 183 |
| 4.2. Actividad antioxidante de variedades de té verde..... | 189 |
| 4.3. Actividad antimicrobiana de variedades de té verde..... | 194 |
| 4.4. Influencia de la concentración de WPC/proteína y del pH sobre la actividad antimicrobiana de té verde comercial sobre <i>L. innocua</i> | 200 |
| 4.5. Comportamiento de distintos microorganismos tratados con té verde en WPC35 frente a diversas condiciones de estrés..... | 202 |
| 4.6. Respuesta de <i>Listeria innocua</i> a ácidos orgánicos e inorgánicos luego de la aplicación de té verde en WPC35..... | 208 |
| 4.7. Caracterización del impacto del tratamiento con té verde en las propiedades de la membrana y estructura celular de <i>Listeria innocua</i> | 210 |
| 4.7.1. Potencial zeta (ζ)..... | 211 |
| 4.7.2. Hidrofobicidad de la superficie celular..... | 211 |
| 4.7.3. Respuesta osmótica..... | 212 |
| 4.7.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)..... | 212 |
| 4.8. Conclusiones..... | 215 |
| 4.9. Referencias..... | 217 |

SECCION III – ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS TUMORALES DE POLIFENOLES DE TÉ VERDE: IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE POLIFENOLES Y PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

Materiales y métodos

| | |
|---|-----|
| 1. Materiales..... | 223 |
| 1.1. Proteínas del lactosuero..... | 223 |
| 1.2. Polifenoles de té verde..... | 223 |
| 2. Métodos..... | 223 |
| 2.1. Preparación de las muestras..... | 223 |
| 2.2. Actividad anticancerígena..... | 224 |
| 2.2.1. Líneas celulares..... | 224 |
| 2.2.2. Cultivos celulares..... | 225 |
| 2.2.3. Ensayos anti-proliferativos..... | 225 |
| 2.2.4. Determinación de la proliferación celular..... | 226 |
| 3. Tratamiento estadístico..... | 227 |
| 4. Referencias..... | 227 |

Resultados

| | |
|---|-----|
| 5.1. Introducción..... | 228 |
| 5.2. Actividad antiproliferativa de la doxorubicina (DOX) sobre las líneas celulares..... | 233 |
| 5.3. Actividad antiproliferativa de los polifenoles de té verde sobre las líneas celulares..... | 235 |
| 5.4. Actividad antiproliferativa de las proteínas del lactosuero sobre las líneas celulares..... | 238 |
| 5.5. Actividad antiproliferativa de mezclas de polifenoles y proteínas del lactosuero sobre las líneas celulares..... | 239 |
| 5.6. Conclusiones..... | 243 |
| 5.7. Referencias..... | 246 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 249 |
|------------------------------------|------------|

Introducción

1. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (*Vázquez Martínez, 2005*). Se trata de alimentos que pueden tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del cuerpo humano y mejorar con ello el estado de salud y bienestar de los individuos, así como reducir el riesgo de aparición de enfermedades. Un alimento funcional se obtiene por el agregado de componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia y antioxidantes entre otros. Los alimentos funcionales constituyen un campo emergente en la ciencia de los alimentos de mucha actualidad. Entre los logros más mencionados en la literatura científica y en el marketing de los productos alimenticios se encuentra la mejora de las funciones gastrointestinales, el aporte de sistemas rédox y antioxidantes, así como la modificación del metabolismo de macronutrientes (*Roberfroid, 2000*).

El concepto de alimentos funcionales nace en Japón en la década de 1980 cuando las autoridades alimentarias japonesas tomaron conciencia de que para controlar los gastos globales en salud era necesario desarrollar alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población, cubriendo ciertas “deficiencias pandémicas”. En esta época se establece por primera vez en Japón el concepto de "Alimentos para Uso Específico en la Salud" (*Goldberg, 1994*). La posibilidad de modular ciertas funciones de la salud mediante el consumo de alimentos fortificados o enriquecidos con elementos activos ha aumentado la demanda en forma exponencial de este tipo de alimentación en todo el mundo y la aparición de patentes relativas al diseño de alimentos funcionales y su beneficio económico ha disparado el interés por parte de la industria alimentaria. El interés a nivel mundial de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud se vio apoyada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se dieron en la población actual. A la entrada del Siglo XXI, la ciencia atiende a esta nueva perspectiva y se plantea el estudio de la promoción de la salud a través de la

alimentación con horizontes más amplios (*Sastre Gallego, 2005*). Así nace el concepto de “alimentación funcional” en distintos ámbitos científicos de Asia, Europa y América (*Diplock et al., 1999*).

1.1. Características de los alimentos funcionales

Un alimento es funcional si contiene algún componente (sea o no un nutriente) que beneficia una o un número limitado de funcionalidades en el organismo proporcionando salud (entendida como reducción de riesgo de enfermedad) y bienestar. Un alimento o ingrediente funcional puede ser un macronutriente si posee efectos fisiológicos específicos, como puede ser el almidón resistente a los jugos gástricos o un ácido graso o incluso un nutriente esencial. Puede referirse también a un componente alimenticio que a pesar de poseer un valor nutritivo no es esencial, como por ejemplo los oligosacáridos, o incluso puede carecer de valor nutritivo (como pueden ser los organismos vivos o compuestos químicos de plantas) (*Juarez, Olano & Morais, 2005*).

Un alimento puede acabar siendo funcional si durante su procesado se le ha realizado alguna de las siguientes operaciones:

- Eliminación de un componente alimenticio conocido como causante o determinante de una enfermedad. Ejemplos pueden ser las proteínas alergénicas de ciertos alimentos, la eliminación de la lactosa de ciertos productos lácteos.
- Incremento en la concentración de un componente alimenticio. Esta operación de fortificación, o añadidura de un componente activo, hace que la dosis diaria del mismo se acerque a las recomendaciones de los organismos reguladores, lo que a la larga redundará en una disminución de riesgos de enfermedad.

- Adición de un componente que no está presente en la mayoría de los alimentos. No necesariamente debe ser un macronutriente o un micronutriente.
- Reemplazo de macronutrientes, como por ejemplo la grasa.
- Incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente conocido con el objeto de producir un efecto funcional o reducir la aparición de enfermedades.

Los objetivos primarios de la ciencia de la alimentación funcional son identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento concreto y una o más funciones del organismo y, además, obtener evidencias sobre los mecanismos implicados en la interacción. Por ejemplo, algunos de los alimentos funcionales se han diseñado para satisfacer ciertos aspectos como:

- Funciones gastrointestinales. Estas funciones incluyen aquellas que están asociadas a la microflora bacteriana en el colon, a la modulación en la actividad endocrina e inmune del tracto gastrointestinal, al control de la biodisponibilidad de nutrientes (sobre todo de minerales) y al control del tiempo de tránsito (*Cummings et al., 2004*).
- Sistemas rédox y antioxidantes. Estos sistemas requieren un insumo balanceado de antioxidantes y (pro-) vitaminas así como de componentes alimentarios tales como los polifenoles y otros antioxidantes naturales de origen vegetal. Las actividades rédox y la protección antioxidante son muy importantes para las células y tejidos y su desequilibrio se asocia con la aparición de diversas enfermedades (*Espin & Tomás-Barberán, 2005*).
- Ayuda al feto. El alimento de la madre y del feto son objetivos en algunos alimentos funcionales, un ejemplo es el ácido fólico (*Recio & López Fandiño, 2005*).

- Salud mental y rendimiento. Por ejemplo algunos carbohidratos pueden afectar los niveles de serotonina o bien la cafeína, que mantiene el estado de alerta ya que es un competidor antagonista de los receptores de adenosina (*Westenhoefter et al., 2004*).
- Protección contra el cáncer (*Rafter et al., 2004*).
- Salud ósea y osteoporosis. Por ejemplo la fortificación de los alimentos con calcio y vitamina D (*Prentice et al., 2003*).

2. Té

El té es la segunda bebida más consumida del mundo luego del agua. La leyenda nos señala que en el año 2737 a.C., al emperador Shen Nung, que sólo bebía agua hervida, se le cayeron en su recipiente algunas hojas del árbol de té silvestre, junto al cual descansaba. La infusión resultante fue del agrado del emperador y se la denominó Cha. Posteriormente, a comienzo del siglo IV la propagación de la infusión como alimento digestivo, comenzó a ser una bebida muy popular en China y posteriormente en Japón.

Actualmente, el té es consumido no sólo como una bebida popular, sino también porque sus extractos han sido preparados en una variedad de formas (infusiones fuertes, extractos suaves y polvos) y están también disponibles en un amplio rango de alimentos, bebidas y productos de cosmética (*O'Connell & Fox, 2001; Wang, Provan & Helliwell, 2000b*).

El té se produce a partir de las hojas tiernas de dos variedades de la planta *Camellia sinensis*: variedad *assamica* y variedad *sinensis*. Las hojas de té son ricas en una amplia variedad de compuestos, los cuales se encuentran listados en la **Tabla 1**.

Existen tres categorías principales de té que resultan de distintos procedimientos en el procesamiento: verde (no-fermentado), negro (fermentado) y oolong (semi-fermentado).

El té verde se logra mediante la inactivación de las enzimas en las hojas frescas mediante calentamiento o escaldado, para prevenir la oxidación enzimática de las catequinas.

El té negro se produce por la oxidación de las catequinas, reacción catalizada por la enzima polifenol-oxidasa en un proceso denominado fermentación. Este proceso de fermentación resulta en la oxidación de los polifenoles simples, como por ejemplo las catequinas, los cuales se transforman en moléculas condensadas más complejas, las cuales dan al té negro su color y sabor fuerte y astringente típicos.

El té oolong se prepara mediante un calentamiento corto de las hojas luego del enrollado y un posterior secado. La oxidación se termina con el calentamiento, por lo que el té oolong se denomina semi-fermentado. Las características del té oolong se encuentran entre aquellas del té negro y del té verde.

Tabla 1. Composición de las hojas de té (% peso seco)

| | | | |
|-----------------------------|-----|--------------------------|------|
| Polifenoles | 36 | Metilxantinas (cafeínas) | 3,5 |
| Carbohidratos no digeribles | 25 | Lípidos | 2 |
| Proteínas | 15 | Ácidos orgánicos | 1,5 |
| Lignina | 6,5 | Clorofila | 0,5 |
| Minerales | 5 | Carotenoides | <0,1 |
| Aminoácidos | 4 | Volátiles | <0,1 |

Adaptado de *Graham (1992)*.

2.1. Producción mundial

El té es cultivado en muchos países y regiones del mundo, presentando un área cultivada total de 2.600.000 hectáreas. Su empleo como infusión se originó en China y hasta mediados del siglo XIX dicho país monopolizaba el comercio mundial. Cerca de 1850 el té fue plantado en la India y Ceilán (Sri Lanka), en grandes superficies, tomando parte del mercado ocupado por China. Con posterioridad el cultivo se

expandió al sudeste de Asia, a la región este de África y a América del Sur. India y China son aún los mayores productores mundiales, conservando este último país sus tradiciones y costumbres milenarias, siendo asimismo grandes consumidores, por lo que gran parte de su producción es empleada en satisfacer su mercado interno.

Entre 1995 y 2005, la producción mundial total de té se ubicó entre 2,6 y 3,3 millones de toneladas anuales, con un incremento del 22,1%. Los mayores productores son India (28,4%), China (23,4%), Sri Lanka (10,5%), Kenia (8,5%), Turquía (5,9%), Indonesia (5,8 %), Japón (3,1%) y Argentina (1,6%) (**Figura 1**). Algunos de los grandes países productores como Turquía y Japón, consumen todo el té que producen. El volumen de la producción Argentina es de baja incidencia en el mercado internacional, se ubica en el décimo puesto como productor y séptimo como país productor-exportador (**Figura 2**).

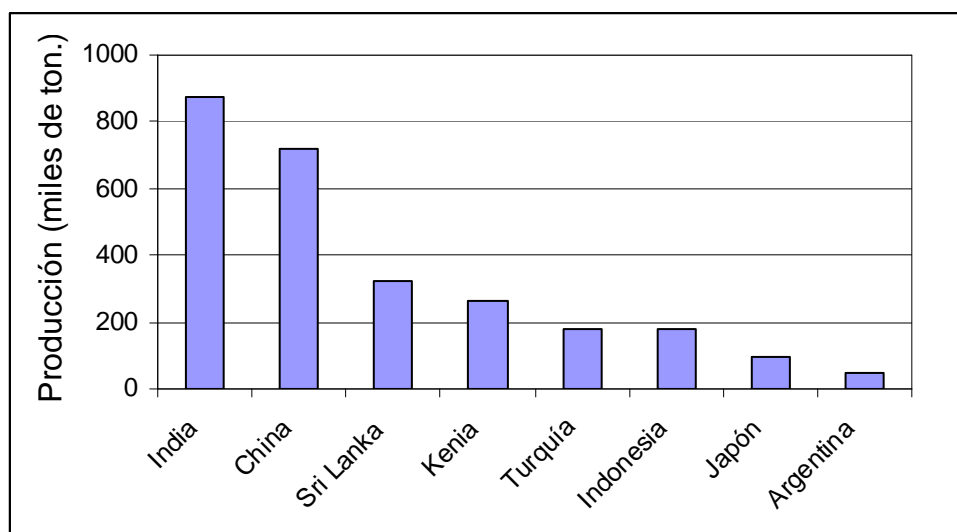


Figura 1. Principales países productores de té (año 2005). Fuente: Dirección de Industria Alimentaria, sobre la base de datos de la FAO.

El volumen exportado por Argentina representa cerca del 95% de la producción anual, y el té verde representó en 2006 casi el 1% del total exportado. Entre los años 1998 y 2005 Argentina ha aumentado los volúmenes de exportación en 134%, registrando 28.890 toneladas en 1998 contra 67.624 toneladas durante 2005. Los ingresos en

valor han seguido la misma tendencia, aumentando un 67% (US\$ 27.050.228 en 1998 y US\$ 45.220.104 en 2005).

Las posibilidades de diferenciación por calidad y las bondades del producto, tales como sus conocidas características nutricionales y efectos antioxidantes, determinan un interesante y permanente crecimiento de los mercados mundiales. En consecuencia el té podría consolidar una posición en su oferta como té negro (fermentado), té Oolong (semifermentado) y té verde (no fermentado).

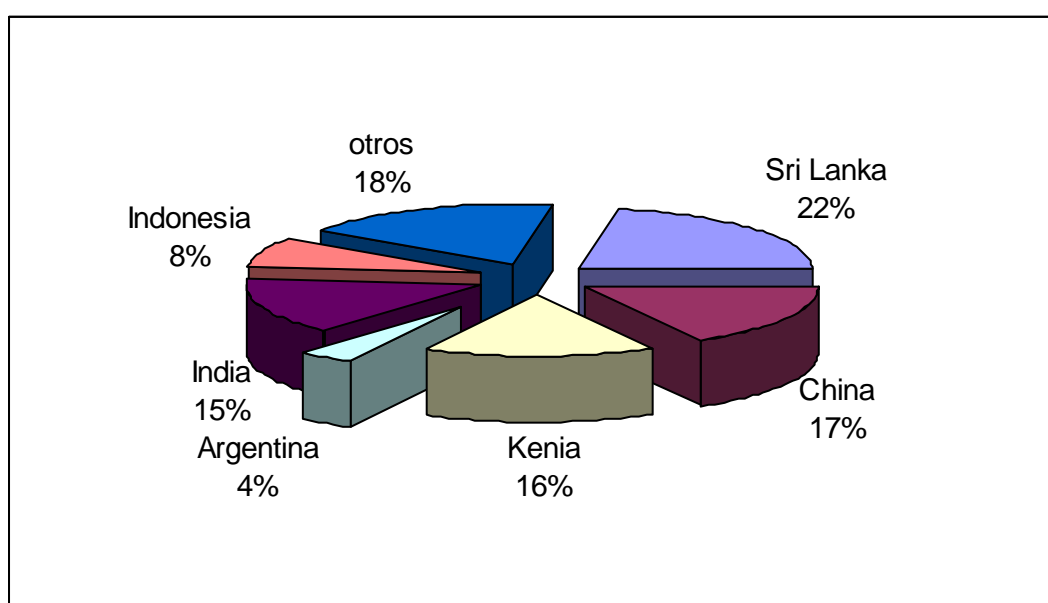


Figura 2. Exportación mundial de té. Fuente: SAGPyA-INTA sobre la base de datos de la International Tea Committee.

En efecto, el té verde tuvo en la última década, un crecimiento del 2,6% anual en su producción y del 9,2% anual en el volumen del mercado internacional. Entre sus principales productores-exportadores se ubican China, Vietnam e Indonesia, en tanto que sus mayores demandantes son Marruecos (24,3%), Japón (8,3%), EE.UU. (5,3%), Alemania (5,1%), Francia (3,6%) y Canadá (1,7%).

2.2. Caracterización de la producción nacional

La región tealera Argentina está comprendida entre los 26° y 28° latitud Sur, constituyéndose en la más austral del mundo, con aproximadamente 45.000 Ha en su momento de máxima expansión (1976-77), de las cuales 41.850 Ha (93%), se encontraban en la provincia de Misiones y 3.150 Ha (7%) en la provincia de Corrientes. En la actualidad el 75% de esa superficie se mantiene bajo cosecha, el 15% está abandonado y el 10% restante se ha eliminado por distintos motivos como bajos rendimientos, aislamiento, bajas densidades y disposición inadecuada, declinamiento por heladas y enfermedades radiculares. En general esas superficies han sido reemplazadas por ganadería, forestales, yerba mate y frutales.

El clima de la región es subtropical húmedo, isohídrico, las precipitaciones van de los 1.800 a 2.200 milímetros anuales. Con estas condiciones el cultivo desarrolla su período de zafra entre los meses de octubre a mayo. Durante el período otoño-invernal, por disminución de las temperaturas medias y la heliofanía diaria, inicia un período de receso fisiológico que se aprovecha para la realización de las podas anuales, periódicas y de formación.

El cultivo se realiza sobre suelos de los órdenes alfisoles y ultisoles con buena aptitud productiva, que si bien en general responden a sus necesidades, presentan limitaciones nutricionales posteriores, que deben ser corregidas por medio de la fertilización en función a su estado nutricional y nivel de extracción.

La producción primaria abarca desde la implantación hasta la obtención de la materia prima. La elaboración consiste en términos generales, en un proceso de secado y operaciones mecánicas combinadas o alternadas con reacciones químicas y enzimáticas. El proceso fundamental dentro de la elaboración es la denominada fermentación, que consiste en una serie de oxidaciones y condensaciones que, a partir de la hoja marchitada, se inicia en el proceso de enrollado. Este proceso tiene como finalidad romper las células del brote, para que queden en libertad ciertos

componentes químicos, los cuales al tomar contacto entre sí y con el oxígeno del aire, desarrollan las cualidades propias del té negro.

Las características de la infusión que se obtiene a partir del producto final, son definidas en mayor medida por los componentes de la hoja, por ejemplo polifenoles, sustancias pépticas, compuestos aromáticos y cafeína, esta última por su particular efecto estimulante.

En Argentina, la mayor empresa elaboradora es el Establecimiento Casa Fuente S.A., con sus secaderos ubicados en la zona centro de la provincia de Misiones, con producción primaria, clasificación y exportación totalmente integrada. Otras firmas importantes en la provincia Misiones son El Vasco S.A., Cooperativa Picada Libertad Ltda., Don Basilio S.A., Cía. Argentina de Té, EXA S.A., Cooperativa de Oberá, Las Treinta S.A., KT S.A., Ceticom S.R.L. y Yerbatera del NE. En Corrientes con una producción totalmente integrada, destinada fundamentalmente al mercado interno encontramos al Establecimiento Las Marías S.A. y Establecimiento Diez Hermanos Hrenuk S.A. Se encuentran fuera de la cuenca productora, empresas fraccionadoras y envasadoras de infusiones como La Virginia S.A. en Santa Fé; Cabrales S.A., Llorente S.A. y IG Padilla S.A. en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires; y en la Provincia de Buenos Aires, se destaca la distribuidora Sol de Acuario, como elaborador del Producto Orgánico Certificado.

El consumo nacional de té fluctúa entre 95 a 250 gramos por persona al año, mientras que en el mundo promedia los 600 gramos.

2.3. Avances tecnológicos

En nuestro país, la investigación aplicada y el desarrollo tecnológico realizado por la EEA Cerro Azul –INTA-, vinculada con la producción tealera del país se iniciaron en 1957 y continua hasta el presente, con avances y logros destacables en variedades clonales, prácticas culturales, manejo de la materia prima y técnicas de elaboración.

En el área de mejoramiento genético, la selección, evaluación y difusión de 11 variedades clonales, ofrecen un amplio rango de posibilidades a productores y empresarios dispuestos a mejorar ese aspecto de la producción. En general, estas variedades ofrecen la posibilidad de rendimientos a campo entre 100 a 300% superiores a las plantaciones comunes, con alta calidad de taza, buen comportamiento ante plagas y enfermedades, rusticidad y tolerancia a bajas temperaturas. La técnica de producción de plantas clonales, ha sido ajustada en sus aspectos culturales y sanitarios, con plantas de alta calidad y bajos costos.

Entre los cultivares más empleados difundidos se encuentran por orden CH 14, CH 732 y CH 112 y entre los nuevos CH 410 y CH 318. Estos cultivares han sido evaluados en su comportamiento durante el proceso de elaboración de té verde y té negro, y en sus contenidos en catequinas, variables importante para la evaluación de la calidad de taza y sus efectos sobre la salud de consumidores por sus probados efectos antioxidantes (*Prat Kricun, 2005*).

2.4. Polifenoles de té

Los polifenoles son un amplio grupo de metabolitos secundarios que abundan en las plantas. Cumplen importantes funciones como agentes de defensa contra estreses bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (radiaciones ultravioletas y sequía).

El té presenta una las concentraciones más altas en polifenoles, hasta un 30% de su peso seco (*Balentine, Wiseman & Bouwens, 1997*). A modo comparativo, el contenido de polifenoles en el té verde se encuentra en un rango de 800 a 2400 mg/L (*Atoui, Mansouri, Boskou & Kefalas, 2005; Rusak, Komes, Likić, Horžić & Kovać, 2008*) mientras el vino tinto posee entre 1000 y 4000 mg/L (*Dreosti, 2000; Simonetti, Pietta & Testolin, 1997*).

Los polifenoles del té verde son principalmente flavonoides, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil

piranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto de dos anillos bencénicos (A y B) unidos mediante una cadena piranosa heterocíclica con oxígeno (C) (**Figura 3**). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 3 al 8, y en el anillo B desde el 2' al 6'. El número y la posición de los grupos hidroxilo y la subsiguiente adición de anillos aromáticos determinarán muchas de sus propiedades. En función de sus características estructurales se pueden dividir en seis clases: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles y antocianinas. Las clases principales de flavonoides encontradas en la planta de té son flavanoles y flavonoles.

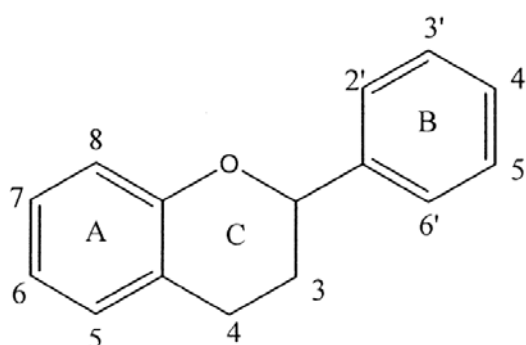


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

Flavanoles: Dentro de éstos se agrupan las catequinas, compuestos hidrosolubles sin color, que imparten amargor y astringencia a las infusiones de té verde (*Balentine et al., 1997*). Las catequinas más abundantes en las hojas frescas de té y en el té verde son (-)-epigallocatequina galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG) y (-)-epicatequina (EC) (**Figura 4**).

Casi todas las características del té manufacturado, incluyendo su sabor, color y aroma están asociadas directa o indirectamente con modificaciones de las catequinas.

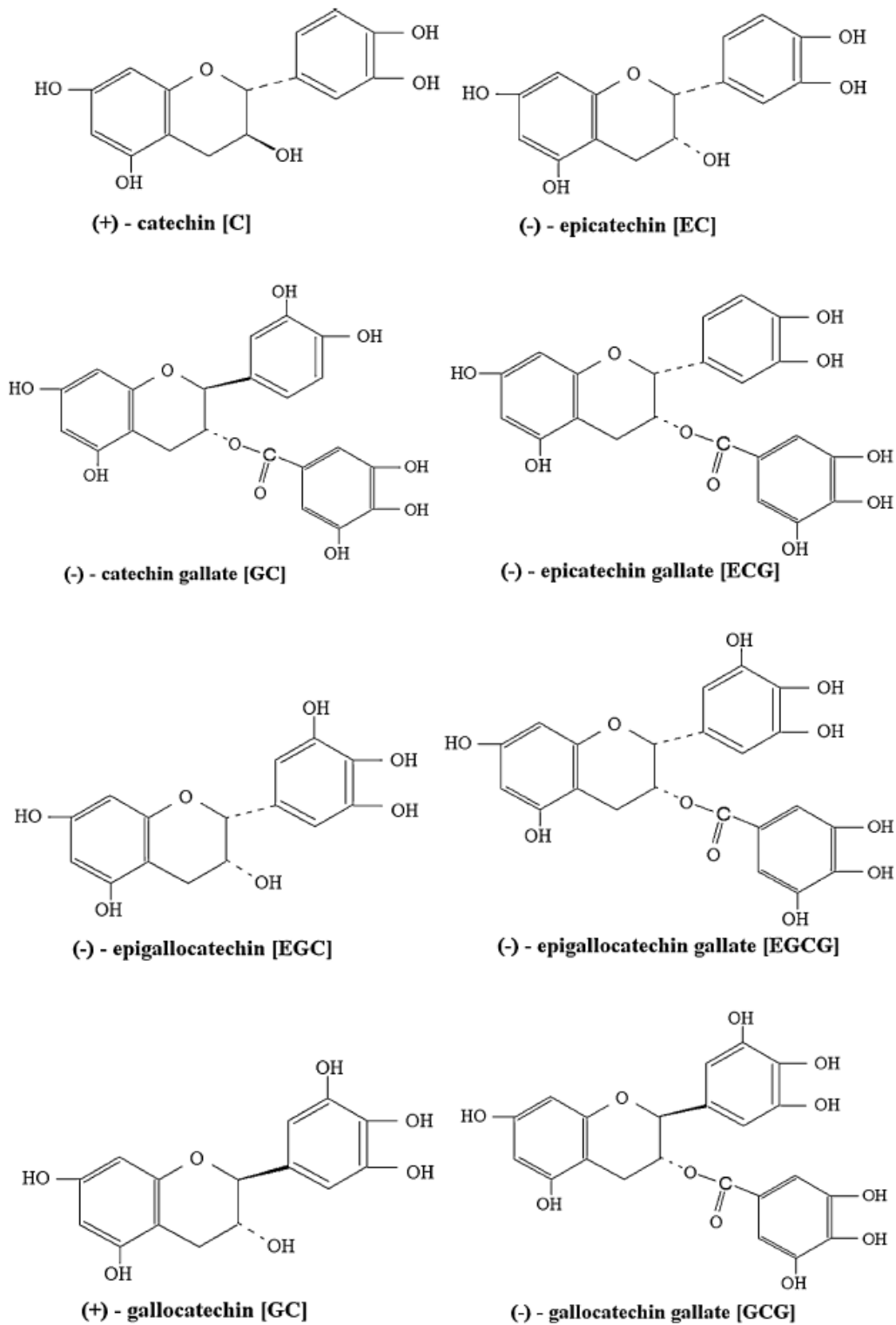


Figura 4. Estructuras químicas de las catequinas mayoritarias del té verde.

De hecho, cuando las catequinas se oxidan se forman polímeros conocidos como teaflavinas y tearrubiginas (**Figuras 5 y 6**). Existen cuatro teaflavinas principales en el té negro: teaflavina, teaflavina 3-galato, teaflavina 3'-galato y teaflavina 3,3'-galato (**Figura 5**). Por su parte, las tearrubiginas son un grupo heterogéneo de pigmentos fenólicos con masas moleculares que van de los 700 a los 40.000 Da (**Figura 6**). El té negro posee las concentraciones más altas de estos compuestos ya que las catequinas se oxidan totalmente durante el proceso de fermentación. El contenido de teaflavinas en el té negro es de 0,3-2% en peso seco, mientras que la fracción de tearrubiginas comprende un 10-20% del peso seco (*Balentine et al., 1997*).

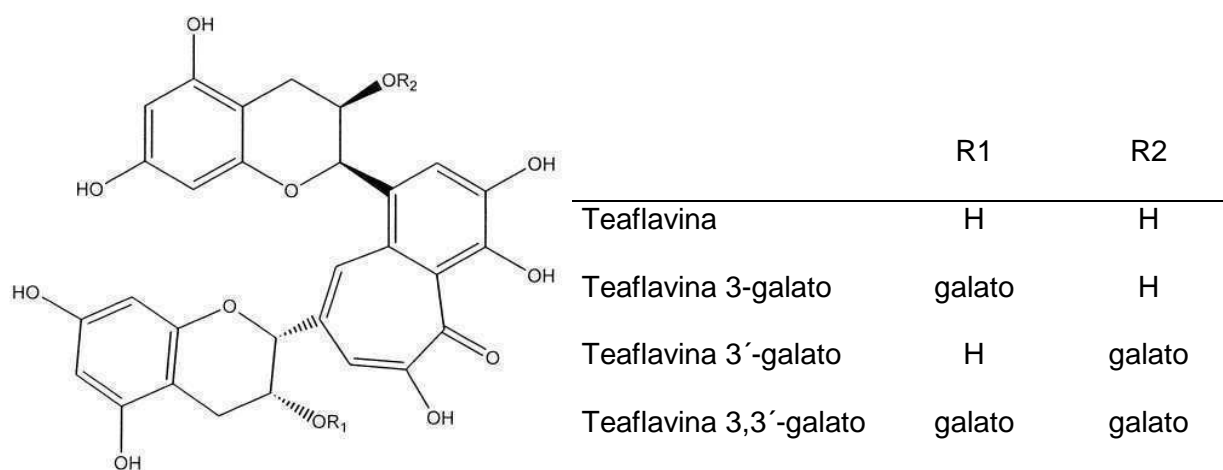


Figura 5. Estructura de las teaflavinas presentes en el té negro.

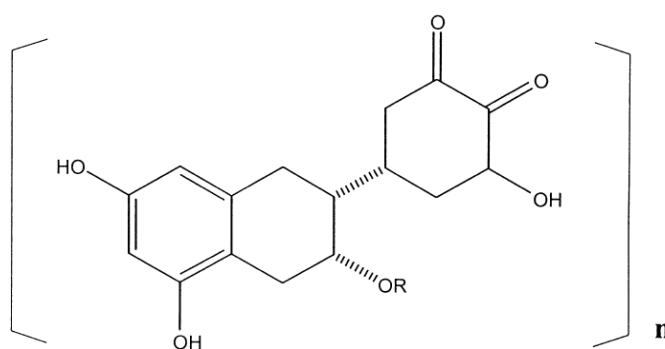


Figura 6. Estructura de las tearrubiginas presentes en el té negro.

Flavonoles: Los flavonoles encontrados en el té son quercitina, kaempferol y miricitina (**Figura 7**), y constituyen hasta un 2-3% del extracto hidrosoluble del té (*Balentine et al., 1997*). Los flavonoles están presentes predominantemente en su forma glicosilada ya que se encuentran unidos a un monosacárido preferentemente en la posición C3 y con menor frecuencia al carbono 7 del anillo A. El residuo azúcar más frecuente es la D-glucosa pero también están presentes L-ramnosa, D-galactosa, L-arabinosa, fructosa, D-xilosa y ácido D-glucorónico (*Wang et al., 2000b*). Se han identificado mono-, di- y tri-glicósidos, los cuales son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que los correspondientes flavonoles sin glicosilar, denominados agliconas.

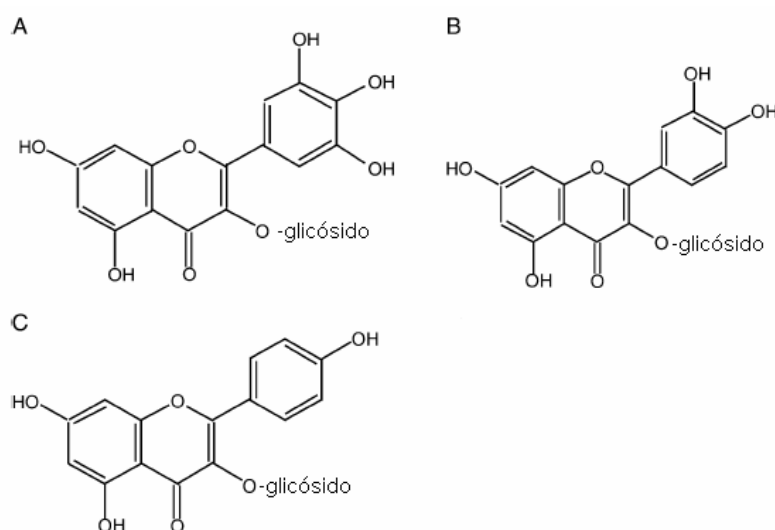


Figura 7. Estructura química de miricitina (A), quercitina (B) y kaempferol (C) con 3, 2 y 1 sustituyentes hidroxilo en el anillo B, respectivamente.

Las diferencias en los constituyentes de la hoja de té se deben a varios factores como: variedad de la planta, época de zafra, edad de la hoja, clima, estado del suelo, prácticas de cultivo, contaminación del ambiente, condiciones de secado y procesos tecnológicos durante la producción del té (*Chu & Juneja, 1997; Fernandez, Pablos, Martin & Gonzales, 2002; Lin, Lin, Liang, Lin-Shiau & Juan, 1998; Wang, Kim & Lee,*

2000c), métodos analíticos y tipo de solvente utilizado en la extracción (Wang, Helliwell & You, 2000a; Wang et al., 2000b).

2.4.1. Propiedades antimicrobianas de los polifenoles

La mayoría de los polifenoles presentan actividad antimicrobiana, en particular sobre patógenos intestinales. La tolerancia de las bacterias a los mismos depende de la especie bacteriana en cuestión y de la estructura del polifenol (Campos, Couto & Hogg, 2003; Taguri, Tanaka & Kouno, 2004). Los polifenoles pueden inhibir el crecimiento de clostridios y de *Helicobacter pylori* pero no de otras bacterias lácticas intestinales (Gramza & Korczak, 2005). También se ha demostrado que los extractos de té inhiben a los microorganismos patógenos contaminantes de alimentos, incluyendo a *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* (Cho, Schiller, Kahng & Oh, 2007; Kim, Ruengwilysup & Fung, 2004; Si et al., 2006; Taguri et al., 2004). Otros microorganismos inhibidos por el té verde son *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida albicans* (Almajano, Carbó, López Jiménez & Gordon, 2008). En general se observa una mayor resistencia de las bacterias Gram negativas comparadas con las Gram positivas y el hecho de que los extractos de té verde inhiban a microorganismos contaminantes de alimentos pero que no afecten a las bacterias intestinales supone una gran ventaja para el uso de este producto como antimicrobiano natural. Con respecto a *Staphylococcus aureus* se ha demostrado que las catequinas de té verde pueden disminuir la resistencia de este patógeno a antibióticos como oxacilina (Stapleton et al., 2004).

Aunque algunos autores han llevado a cabo estudios sobre el mecanismo de acción antibacteriano de los polifenoles del té (Caturla, Vera-Samper, Villalaín, Mateo & Micol, 2003; Zhang & Rock, 2004), el mecanismo de acción exacto aún no está claro. Se ha

sugerido que los flavonoides (polifenoles) pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y afectar la actividad enzimática, particularmente de aquellas enzimas asociadas a la producción de energía. La síntesis de lípidos y proteínas también puede ser afectada aunque en menor medida. También se producen cambios en la expresión de proteínas y en la composición de los lípidos de la membrana (Cho *et al.*, 2007). Adicionalmente, los polifenoles pueden interferir con funciones de la membrana plasmática (transporte de electrones, absorción de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad enzimática) e interactuar con proteínas de la membrana causando deformaciones en la estructura y funcionalidad de la misma (**Figura 8**).

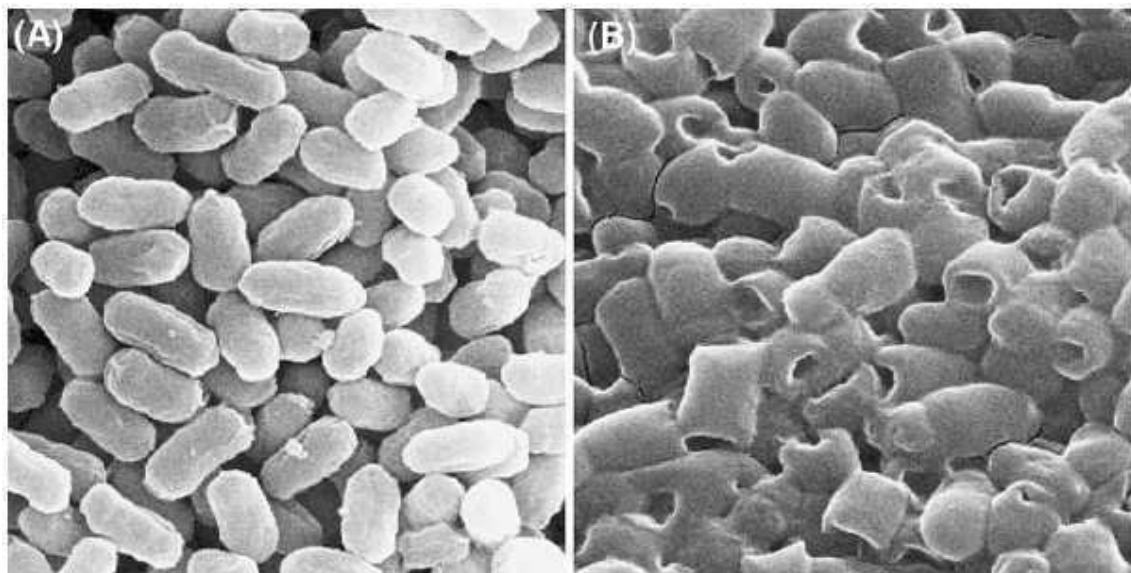


Figura 8. Microfotografía electrónica de barrido de *E. coli* control (A) y tratada con polifenoles de té verde (1% p/v) por 12 horas (B). Tomado de Cho *et al.* (2007).

Ikigai, Nakae, Hara & Shimamura (1993) informaron que las catequinas (polifenoles) actúan principalmente sobre la membrana dañando las bicapas lipídicas, posiblemente por penetración directa y disrupción de la función de barrera. Alternativamente, los polifenoles pueden cambiar la fluidez de la membrana y causar fusiones de membranas, proceso que puede resultar en la pérdida de material intracelular y agregación de células (**Figura 8**). De hecho, Caturra *et al.* (2003) demostraron que las catequinas con grupos galo particionan muy eficientemente en las membranas

biológicas y promueven la formación de estructuras resistentes al detergente o dominios de mayor orden molecular dentro de la empaquetada fosfolipídica. Estos dominios de membrana altamente compactados afectan la actividad enzimática y las funciones de las proteínas, y por lo tanto, afectan la regulación de las funciones de membrana. Estos autores también mostraron que las catequinas con grupos galato produjeron la fuga de material interno desde membranas aisladas de *E. coli*, reforzando la actividad antibacteriana global de estos compuestos. También se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) que células de *L. monocytogenes* tratadas con polifenoles de té verde habían perdido sus propiedades estructurales y presentaban morfologías celulares alteradas (Sivarooan, Hettiarachchy & Johnson, 2008).

2.4.2. Propiedades antioxidantes de los polifenoles

Con más de 5000 especies conocidas, los flavonoides se encuentran entre los más potentes antioxidantes naturales de plantas, y muchos de ellos son agentes reductores más fuertes en base molar que el ácido ascórbico (Lee, Kim, Kim, Lee & Lee, 2003; Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997). Las polifenoles del té pueden actuar como antioxidantes mediante la donación de un átomo de hidrógeno, como aceptores de radicales libres, como interruptores de reacciones de oxidación en cadena o mediante la quelación de metales.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los polifenoles del té son neutralizadores efectivos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, incluyendo los radicales superóxido (Nakagawa & Yokozawa, 2002; Nanjo *et al.*, 1993), oxígeno singulete (Guo *et al.*, 1999), peroxinitrito (Haenen, Paquay, Korthouwer & Bast, 1997; Paquay *et al.*, 2000) y ácido hipocloroso (Scott, Butler, Halliwell & Aruoma, 1993). Diferentes estructuras de las catequinas parecen estar involucradas en su acción antioxidante, incluyendo los grupos catecol (orto-3'-4'-dihidroxilo) o galato

(3'-4'-5'-trihidroxilo) en el anillo B, un grupo galato esterificado en la posición 3 del anillo C, y los grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A (**Figura 9**). Estas características estructurales producen una falta de localización de los electrones entre los anillos A y B, posibilitando la estabilización de radicales formados como consecuencia de la donación de un protón (*Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996*) (**Figura 10**). Esta deslocalización de los electrones es generalmente considerada un factor que aumenta la actividad antioxidante de los flavonoides. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de las catequinas se debe a su alto número de grupos OH en sus estructuras. También se ha propuesto un mecanismo de donación de electrones luego de la desprotonación del polifenol, dado que la capacidad de neutralizar radicales libres aumenta con el aumento del pH cuando predominan las formas aniónicas de las catequinas (*Muzolf, Szymusiak, Gliszczynska-Swiglo, Rietjens & Tyrakowska, 2008*).

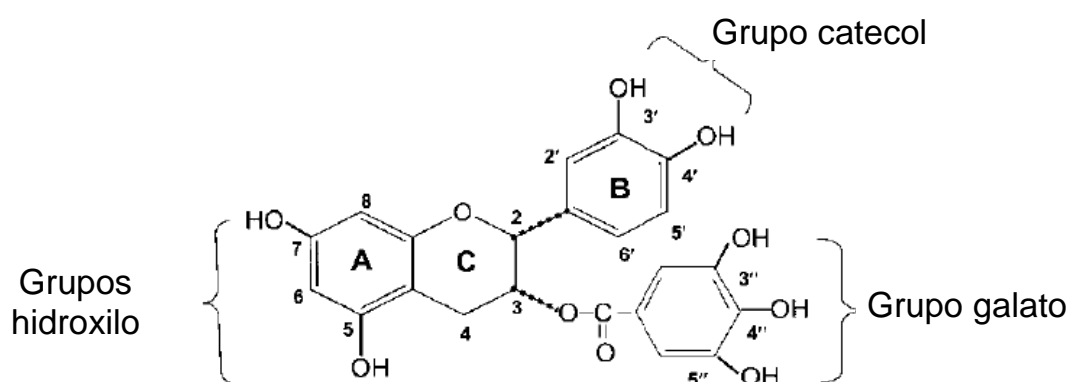


Figura 9. Grupos funcionales importantes para la actividad antioxidante de los polifenoles del té verde. Ejemplo: ECG.

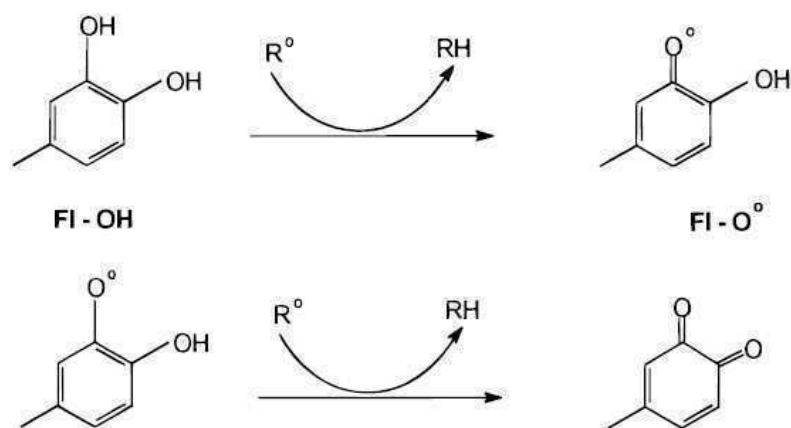


Figura 10. Actividad neutralizante de radicales libres mediante donación de protones y posterior estabilización de la molécula de flavonoide (FI).

Por otro lado, la habilidad de los polifenoles para quelar iones metálicos como el hierro o el cobre también podría contribuir a su actividad antioxidante porque prevendría que los mismos catalicen la formación de radicales libres mediante reacciones redox (Rice-Evans et al., 1997) (Figura 11).

También pueden actuar como antioxidantes indirectos a través de la regeneración de α -tocoferol, estimulación de enzimas antioxidantes e inhibición de factores de transcripción (Pietta, 2000).

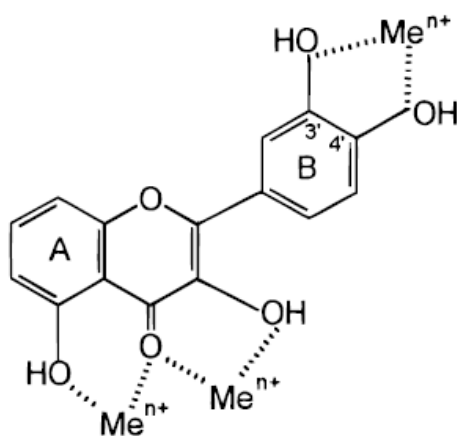


Figura 11. Sitios de unión para los iones metálicos (Me^{n+}) en la molécula de polifenol.

La actividad antioxidante de diferentes polifenoles depende también del tipo de sistema al que es incorporado (sistemas acuosos, aceites o emulsiones). Por ejemplo,

la localización y concentración de los polifenoles en distintas regiones de un sistema polifásico dependerá de su polaridad, solubilidad y afinidad hacia los constituyentes estructurales (micelas, liposomas, etc.) (Gramza & Korczak, 2005).

En relación a la explotación de la actividad antioxidante de las catequinas del té en matrices alimentarias, los polifenoles se han evaluado en sistemas como carnes, pescados y aceites vegetales (Tang, Kerry, Sheehan, Buckley & Morrissey, 2001). Estos alimentos son muy susceptibles a la oxidación de lípidos debido a su alto contenido de grasa. La capacidad antioxidante de las catequinas del té es mucho mayor que la de otros antioxidantes sintéticos y naturales utilizados en la industria de alimentos como BHA, BHT, α -tocoferol, vitamina E y otros extractos vegetales (Yilmaz, 2006).

2.4.3. Propiedades benéficas para la salud de los polifenoles

Los radicales libres son considerados como la mayor causa de enfermedades crónicas y degenerativas como hipertensión, aterosclerosis, alzheimer, Parkinson, diabetes y muchos otros desórdenes relacionados como enfermedades cardiovasculares, cáncer y alergias (Barnham, Masters & Bush, 2004). Esto se debe a que los radicales libres pueden disparar reacciones en cadena que causan daño oxidativo a biomoléculas como el ADN y a estructuras biológicas sensibles como las membranas celulares.

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno en funciones fisiológicas normales. Existen fuertes indicaciones a partir de estudios epidemiológicos y clínicos de que el consumo diario de frutas y vegetales ricos en polifenoles está relacionado con una menor incidencia de las enfermedades (Scalbert, Manach, Morand & Rémésy, 2005). Así, los polifenoles son considerados cada vez más como esenciales para la salud humana debido a que suprimen los efectos nocivos de los radicales libres sobre la fisiología normal (Blokhina, Virolainen & Fagerstedt, 2003).

Recientemente, el té ha atraído más y más atención debido a que representa una rica fuente de antioxidantes naturales, los cuales pueden reducir la oxidación de lípidos y la acumulación de colesterol disminuyendo la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (*Chyu et al., 2004*). Los polifenoles presentes en el té poseen una fuerte actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres, resultando más efectivos que las vitaminas C y E para proteger células del daño de radicales libres (*Henning et al., 2004*).

Paralelamente, se ha informado que también posee propiedades benéficas para la salud como agente anti-mutagénico y anti-carcinogénico ya que estudios con animales indicaron que el consumo de té verde podría tener efectos significativos en la reducción del número de tumores y en su crecimiento (*Yang, Landau, Huang & Newmark, 2001*). Los efectos anticancerígenos se observaron en diversos tejidos y órganos incluyendo boca, estómago, duodeno, colon, hígado, pulmón, mama y piel, entre otros. Además los tres niveles de progresión del cáncer, denominados iniciación, promoción y transformación, se vieron comprometidos.

Impacto sensorial de los polifenoles

El consumo de alimentos ricos en polifenoles está asociado con el sabor amargo pero más precisamente con la sensación oral de astringencia (*Bate-Smith, 1973*). La astringencia es una sensación de sequedad o constricción en la boca que se desarrolla y se disipa lentamente. Las bases moleculares de este fenómeno son las interacciones entre los polifenoles y las glicoproteínas y mucopolisacáridos que conforman la saliva, resultando en agregados insolubles que precipitan y obstruyen la lubricación del paladar, dando la particular sensación áspera de la astringencia (*Haslam & Lilley, 1988*).

En el presente trabajo no se llevó a cabo ninguna evaluación sensorial sobre la incorporación de polifenoles de té verde a un sistema lácteo como el WPC. Sin

embargo, vale la pena realizar una breve recopilación bibliográfica sobre el tema debido al característico sabor amargo y astringencia presentada por estos compuestos, la implicancia sobre el flavour de los alimentos a los que son incorporados y la consecuente aceptabilidad por parte del consumidor (*Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000; Lesschaeve & Noble, 2005*).

La percepción del sabor amargo también tiene una base genética en la población humana. En 1931 se descubrió que existía una marcada variación entre los humanos por lo que respecta a la percepción del gusto amargo. Este hallazgo se realizó con un compuesto orgánico artificial llamado feniltiocarbamida (PTC), el cual puede sentirse con gusto muy amargo, o virtualmente sin sabor, dependiendo del genoma del gustador. Aparte de notar o no el gusto de PTC, existen dentro de ambas categorías una cierta variación individual que hace que algunos individuos tengan una elevada capacidad de detectar el sabor amargo, incluso a niveles muy bajos (*Lesschaeve & Noble, 2005*).

Tanto la astringencia como el sabor amargo son generalmente percibidos como atributos negativos en bebidas y productos de soja, lácteos y jugos. Debido a esto las industrias de alimentos continuamente están quitando los polifenoles y otros compuestos presentes en los productos derivados de plantas. Sin embargo, estos fitoquímicos o fitonutrientes bioactivos siguen siendo prometedores para la creación de alimentos de diseño para la prevención de enfermedades crónicas (*Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000*). Estas demandas competitivas de sabor y salud plantean un dilema para la industria alimentaria.

Mitsumoto, O'Grady, Kerry y Buckley (2005) estudiaron el efecto de la adición de catequinas de té en empanadas de carne y pollo sobre los atributos sensoriales y el color. Estos autores informaron que las concentraciones óptimas de catequinas para lograr una buena actividad antioxidante de los lípidos y una aceptable evaluación sensorial se encuentran entre 0,25 y 1% (p/v).

Una de las soluciones a este problema es intentar enmascarar la astringencia de estos compuestos. Se han reportado resultados satisfactorios mediante el uso de polisacáridos de grado alimentario (gomas guar, xántica y arábica y carboximetilcelulosa) debido a que al aumentar la viscosidad pueden modificar la percepción de astringencia y la liberación de compuestos volátiles y no volátiles (*Troszynska et al., 2010*).

3. Suero de queso, WPC y proteínas aisladas del lactosuero

Aunque se desconoce el verdadero origen del queso, su existencia se remonta a tiempos muy antiguos. Paralelamente, el aprovechamiento (aunque parcial) del suero tendría la misma antigüedad. Se sabe que 500 años a.C., los griegos ya prescribían el suero como bebida terapéutica. Históricamente fue utilizado por médicos de gran renombre como Hipócrates, Galeno y Avicena entre otros, quienes recomendaban la toma regular de suero por sus efectos depurativos y desintoxicantes del organismo, y también fue utilizado como brebaje contra quemaduras y diversas enfermedades. Incluso en el Siglo XVIII, se abrieron sanatorios especializados en las “curas de suero de queso”.

El suero de queso es un residuo líquido rico en proteínas (6 g de proteína/litro de suero) que en Argentina todavía no se aprovecha en forma eficiente. Además, debido a que es un contaminante ambiental, resulta de gran interés recuperar y revalorizar este residuo en un producto de alto valor agregado. Durante muchos años, la forma más común de desechar el suero ha sido sencillamente verterlo en los cursos de agua, lo que es muy perjudicial desde el punto de vista ambiental. De hecho, se puede estimar que una fábrica de queso que procesa 280.000 litros de leche cruda por día, por ejemplo, produce alrededor de 250.000 litros de suero líquido y produce una contaminación equivalente puede contaminar tanta agua como una ciudad de 50000 habitantes (*FAO, 1997*). Una práctica menos perjudicial ha sido y es de uso muy

frecuente: el suministro de suero a los terneros o cerdos como complemento de su alimentación. Sin embargo, esto cubre una pequeña parte del volumen de suero producido.

La producción mundial de suero líquido se estima en 118 millones de toneladas, lo que sería equivalente a 7 millones de toneladas de suero en polvo, pero dado que la producción mundial de este suero es de 4,3 millones de toneladas, las cifras indican que resta un 38 % de suero que se encuentra disponible para su aprovechamiento o que forma parte de los vertidos industriales (*Martin Diana, 2001*).

3.1. Producción en Argentina

El suero líquido proviene de la elaboración de quesos y por lo tanto adquiere gran importancia en países como el nuestro, con una arraigada tradición quesera y niveles de producción significativos. En este marco resulta interesante conocer el volumen producido y los caminos que éste sigue para la elaboración de productos o para dispensarlo como efluente.

En 2008 se procesaron en Argentina con destino a quesos en el orden de 4200 millones de litros de leche, los que habrían generado unos 3800 millones de litros de suero (se generan 90 litros de suero por cada 100 litros de leche cruda aproximadamente). Si todo este volumen de suero se secara en plantas industriales, y utilizando una conversión de 22 litros de suero líquido por cada kilo de suero en polvo, el país podría producir alrededor de 170000 toneladas de suero en polvo y otros productos similares como concentrados y aislados de proteínas del suero (*Schaller, 2009*). En términos teóricos, si se compara esta producción potencial con la elaboración efectiva de suero en polvo se podrá tener una noción aproximada del porcentaje de utilización.

En 2008 se elaboró entre 32 y 36 mil toneladas de suero en polvo y otros productos similares. A grandes rasgos, esto significa que en el país se seca entre el 20 y el 25 %

del suero disponible. Como dato de referencia puede consignarse que, por ejemplo, usando datos oficiales de 1991, una estimación similar arroja un aprovechamiento inferior al 3 % (*Schaller, 2009*).

Estas cifras, aunque aproximadas, permiten extraer dos conclusiones: por un lado, que se ha avanzado mucho en la búsqueda de nuevas alternativas de aprovechamiento de los sueros y en consecuencia en el cuidado del medio ambiente; pero a la vez llama la atención sobre el enorme compromiso que representa seguir explorando y explotando este recurso proteico con gran potencial de desarrollo de cara a la demanda mundial de proteínas.

Las estadísticas oficiales muestran un crecimiento explosivo en la producción de suero en polvo en el último tiempo. En efecto, la producción nacional se duplicó entre 2004 y 2007, y habría alcanzado un nuevo récord en 2008 (*Schaller, 2009*).

En otro orden, se estima que en Argentina existen aproximadamente doce importantes plantas procesadoras de sueros de lechería, la mayor parte localizadas en la zona pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA (Arla Food Ingredients SA, un joint venture al 50 % de la danesa Arla con la argentina Sancor), con una planta en la localidad cordobesa de Porteña; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras son: Mastellone Hnos., Milkaut, García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur.

El gran crecimiento de la producción nacional vino de la mano de un fuerte impulso de las demandas externas. Entre 1999 y 2008 las exportaciones se multiplicaron por once, hasta alcanzar según se estima, un récord del orden de las 36000 toneladas y U\$S 86 millones en 2008. El 84 % del volumen colocado corresponde al lactosuero y el resto a otros componentes naturales de la leche. El precio promedio para 2008 fue de unos 1600 U\$S/tonelada para el suero en polvo y aproximadamente 6500 U\$S/tonelada para los distintos concentrados de proteína (*Schaller, 2009*). Estos

grupos de productos se comercializan con 30 a 40 países de todo el mundo. Brasil, Indonesia, China, Chile y Singapur dan cuenta del 71 % del volumen.

En resumen, queda claro que el proceso de valorización de los sueros de lechería se encuentra en pleno auge y que, a pesar de la crisis de los mercados mundiales que existe en este último año, la senda de permanente innovación en tecnología de procesos y productos seguirá siendo transitada por aquellas industrias líderes que además de buscar la mejora de la eficiencia y una mayor rentabilidad, generan divisas genuinas a través de la exportación de productos de alto valor agregado, a la vez que dan cumplimiento a las normativas ambientales.

En la **Tabla 2** se presenta la composición proteica de la leche bovina observándose que las caseínas son las proteínas más abundantes (80 % del total). Las caseínas de la leche tienen pesos moleculares que oscilan entre 25000 y 40000 Da; las más importantes son la α , β y κ , que representan, respectivamente, el 50, 30 y 15 % del total de las caseínas. En la leche, estas proteínas se asocian entre sí para formar partículas denominadas micelas, que se encuentran estabilizadas gracias a la presencia de la κ -caseína (*Grasselli et al., 1997*).

El tipo de suero y su composición (**Tabla 3**) dependen del método utilizado durante la remoción de la caseína: (i) “suero de queso” o “suero dulce”, es un co-producto obtenido durante la elaboración del queso, proceso en el cual se agregan enzimas coagulantes a la leche, que catalizan la ruptura de un enlace peptídico de la κ -caseína: la unión entre el aminoácido fenilalanina en la posición 105 y la metionina en la 106. Este clivaje de la κ -caseína provoca la desestabilización de las micelas y por lo tanto la precipitación de casi todas las caseínas, las que posteriormente se van a transformar en queso; (ii) “suero ácido”, obtenido después de la acidificación directa o indirecta de la leche para la preparación de caseína ácida y queso cottage.

Tabla 2. Composición proteica de la leche de vaca.

| PROTEÍNA | LECHE DE VACA (g/100 ml) |
|-------------------------|--------------------------|
| Caseína | 2,8 |
| α -lactalbúmina | 0,12 |
| β -lactoglobulina | 0,3 |
| Inmunoglobulinas | 0,05 |
| Lactoferrina | 0,02 |
| Lactoperoxidasa | 0,003 |
| Totales | 3,4 |

Fuente: *Grasselli et al. (1997)*.

La mayoría del suero producido mundialmente es el suero dulce. Se calcula que aproximadamente el 94 % del suero producido en Estados Unidos es suero dulce y el restante 6 % es suero ácido (*Anónimo, 2002*).

Durante el clivaje de la κ -caseína en el proceso de elaboración del queso se forman además diferentes péptidos, entre ellos el caseinoglicomacropéptido (CMP) que no se encuentra naturalmente en la leche pero sí en el suero de queso (**Tabla 3**).

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

Las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son amplísimas. La más usual es la deshidratación, por spray, para obtener suero en polvo o concentrados de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés, "whey protein concentrates"). En el primer caso el suero es deshidratado directamente, mientras que en el segundo el suero es previamente enriquecido en proteína, eliminando sales y lactosa mediante tecnología de membrana.

Tabla 3. Composición proteica del suero dulce y suero ácido.

| | COMPOSICIÓN PROMEDIO (g/l) | |
|--------------------------|----------------------------|-------------|
| | SUERO DULCE | SUERO ÁCIDO |
| β -lactoglobulina | 3,5 | 3,5 |
| α -lactalbúmina | 1,3 | 1,3 |
| Seroalbúmina bovina | 0,1 | 0,1 |
| Inmunoglobulinas | 0,4 | 0,4 |
| Lipoproteínas | 0,2 | – |
| Proteosa-peptona | 0,2 | 0,2 |
| Caseinoglicomacropéptido | 1 | – |
| Proteína de suero total | 6,7 | 5,8 |

Fuente: *Oakenfull, Pearce & Burley (1997)*.

No hay dudas de que este proceso de continua valorización del suero líquido ha sido posible gracias a la evolución permanente de la aplicación de las tecnologías de membranas en la industria láctea. El gran avance de esta rama de la ingeniería se produjo a comienzos de la década del setenta cuando se desarrolló la tecnología de ultrafiltración. La ultrafiltración se caracteriza por poseer un espectro de corte que va de 3000 a 100000 Da. El corte más común para sistemas de lechería es 10000 Da. Éste es el tamaño de poro tradicional para separar las proteínas del suero de la lactosa, para producir WPC desde 35 a 85 % de pureza. Durante el proceso de ultrafiltración las proteínas del suero no se desnaturalizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas.

El paso más reciente en esta notable evolución fue la nanofiltración, que comenzó a aplicarse en el mercado industrial en la década del noventa y que desde entonces ha tenido un gran auge.

Entre los productos proteicos del suero, además de los concentrados con distintas proporciones de proteína, también se encuentran los aislados de proteínas (WPI por sus siglas en inglés, “whey protein isolates”) y proteínas aisladas como la α -

lactalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas. Todos estos productos se obtienen por diafiltración o cromatografía de intercambio iónico.

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

3.2. Propiedades biológicas del suero

Las últimas décadas han sido testigos de un interés creciente en los productos con proteínas del suero, debido a su función nutricional pero mucho más a su activa influencia sobre la salud humana. Numerosas investigaciones sugieren que las proteínas del suero son capaces de brindar diferentes beneficios nutricionales, biológicos y fisiológicos. Algunos de estos incluyen actividad antioxidante, mejora de la inmunidad de inmunodeprimidos, actividad anticancerígena, efectos antitumorales, efectos sobre la movilidad gastrointestinal, actividad bacteriostática, etc (Brody, 2000; Demetriades, Bryant & McClements, 1998; El-Salam, El-Shibiny & Buchheim, 1996; Thomä-Worringer, Sørensen & López Fandiño, 2006). Las principales actividades biológicas de las proteínas del lactosuero se encuentran resumidas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Propiedades biológicas del WPC y de las proteínas aisladas del lactosuero.

| Proteína | Función biológica | Referencias |
|----------|--------------------------------------|---|
| WPC | Prevención del cáncer | <i>Gill & Cross (2000)</i> |
| | * Cáncer de mama y de intestino | <i>Badger, Ronis & Hakkak (2001), MacIntosh, Regester, le Leu, Royle & Smithers (1995),</i> |
| | * Cáncer inducido químicamente | <i>Hakkak et al.(2000), Rowlands, He, Hakkak, Ronis & Badger (2001)</i> |
| | Aumento de los niveles de glutathion | <i>Parodi (1998)</i> |

| | | |
|-------------------------|--|---|
| | * Aumenta la vulnerabilidad de células tumorales | <i>Micke, Beeh & Buhl,(2002), Micke, Beeh, Schlaak & Buhl ((2001)</i> |
| | * Tratamiento de pacientes con HIV | |
| | Propiedades antimicrobianas | <i>Clare, Catignani & Swaisgood (2003)</i> |
| | Aumenta la respuesta de saciedad | <i>Hall, Millward, Long & Morgan (2003)</i> |
| | *Aumenta los niveles en plasma de aminoácidos, colecistoquinina y péptidos tipo glucagon | |
| β -lactoglobulina | Transportador de | |
| | * Retinol | <i>Wu, Pérez, Puyol & Sawyer (1999)</i> |
| | * Palmitato | <i>Puyol, Pérez, Ena & Calvo (1991)</i> |
| | * Ácidos grasos | <i>Wang, Allen & Swaisgood (1997)</i> |
| | * Vitamina D y colesterol | |
| | Activador de la esterasa pregástrica | <i>Perez et al. (1992)</i> |
| | Transferencia de inmunidad pasiva | <i>Warme, Momany, Rumball, Tuttle & Scheraga (1974)</i> |
| | Regulación del metabolismo del fósforo en glándula mamaria | <i>Farrell, Bede & Enyeart (1987)</i> |
| α -lactalbúmina | Prevención del cáncer | <i>de Wit (1998)</i> |
| | Síntesis de lactosa | <i>Markus, Olivier & de Haan (2002)</i> |
| | Tratamiento de enfermedades inducidas por estrés crónico | <i>Ganjam, Thornton, Marshall & MacDonald (1997)</i> |
| Sero albúmina bovina | Unión a ácidos grasos | <i>Walzem, Dillard & German (2002)</i> |
| | Función antimutagénica | <i>Bosselaers, Caessens, Van Boekel & Alink (1994)</i> |
| | Prevención del cáncer | <i>Laursen, Briand & Lykkesfeldt (1990)</i> |
| | Inmunomodulación | <i>Ormrod & Miller (1991)</i> |
| | * Protección frente a enfermedades mediante inmunidad pasiva | <i>Mitra, Mahalanabis, Unicomb, Eechels & Tzipori (1995), Tomita, Todhunter, Hogan & Smith (1995), Loimaranta et al. (1999)</i> |

| | | |
|------------------|--------------------------|--|
| Inmunoglobulinas | Actividad antimicrobiana | <i>Oona et al. (1997), Freedman, Tacket & Delehanty (1998)</i> |
| | * HIV | |
| | Actividad antifúngica | <i>Okhuysen et al. (1998)</i> |
| | Actividad opioide | <i>Sharpe, Gamble & Sharpe (1994)</i> |

Además, el elevado valor biológico de las proteínas del suero (**Tabla 5**) es una de las razones por las que los concentrados de suero se emplean también en formulaciones alimentarias infantiles (*Martin Diana, 2001*).

Tabla 5. Tabla comparativa del valor biológico entre las proteínas del suero y otras proteínas alimentarias.

| PROTEÍNA | VALOR BIOLÓGICO |
|--------------------------|-----------------|
| Proteína de suero | 100 |
| Proteína de huevo | 97 |
| Proteína de leche | 88 |
| Proteína de soja | 71 |
| Caseína | 70 |

Experimentos *in vivo* también han demostrado actividades anticarcinogénicas por parte de WPC debido al incremento en los niveles de glutatión (GSH) en tejidos relevantes. El GSH se encuentra naturalmente en todas las células de mamíferos, donde provee la principal defensa intracelular contra el estrés oxidativo. Cuando el GSH es oxidado, la célula debe restituir los niveles de este péptido en el cual la cisteína, el glutamato y la glicina son los aminoácidos principales de su estructura primaria. Además la incorporación de cisteína es el paso limitante para la biosíntesis del GSH. Dado que las proteínas del lactosuero son ricas en residuos cisteína y glutamato, se ha sugerido que su ingestión podría contribuir al aumento de los niveles de cisteína libre con la consecuente producción de GSH. Las proteínas del lactosuero

son de hecho donoras efectivas de cisteína para la restauración de GSH durante los estados de deficiencia inmunitaria (*Madureira, Pereira, Gomes, Pintado & Xavier Malcata, 2007*) (**Figura 12**).

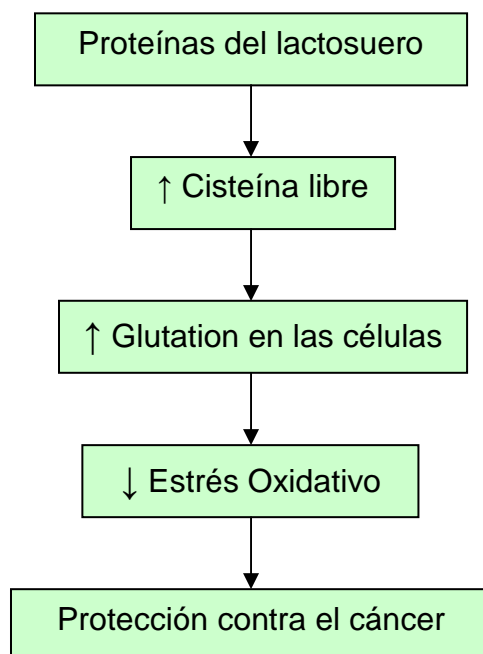


Figura 12. Diagrama esquemático de la síntesis de glutatión luego de la ingesta de proteínas del lactosuero. Adaptado de *Madureira et al. (2007)*.

3.3. Propiedades funcionales de las proteínas lácteas

Para explicar el complejo comportamiento funcional de las proteínas lácteas se presenta un esquema (**Figura 13**) que muestra los diferentes factores que afectan a estas propiedades.

Las proteínas nativas, tal y como son sintetizadas, (parte superior de la **Figura 13**) reflejan un número de propiedades funcionales en solución acuosa (parte central de la **Figura 13**) las cuales son modificadas durante el procesado de los alimentos. En esta secuencia, las propiedades funcionales son el resultado de propiedades intrínsecas de las proteínas nativas y de un número de factores extrínsecos.

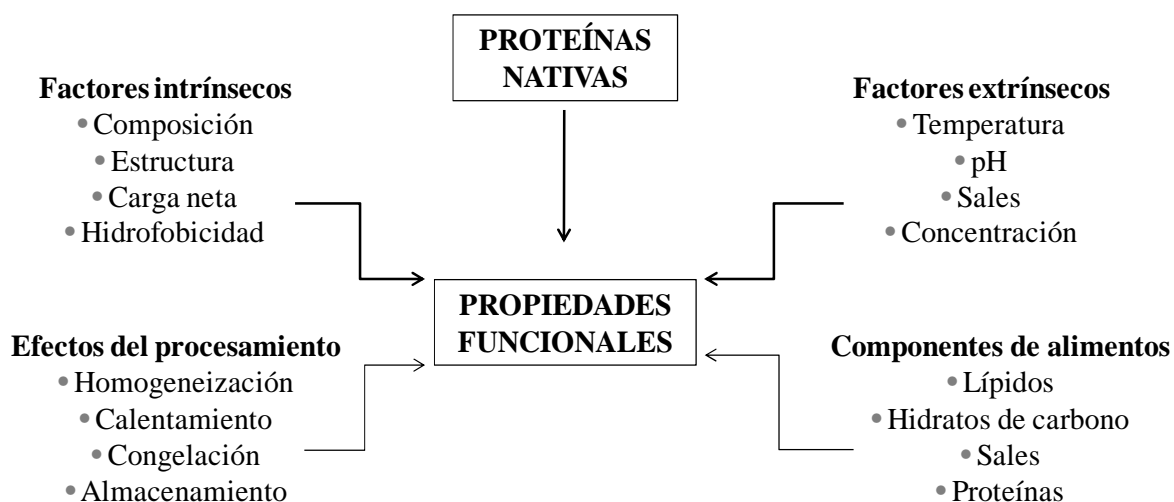


Figura 13. Esquema de los factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (adaptado de *de Wit (1998)*).

El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para determinar y controlar las propiedades funcionales. Estas características funcionales dan información sobre la historia del proceso y la composición del suero proteico. Además, las propiedades funcionales definen el comportamiento de las proteínas del suero en los alimentos y refleja la manera en la cual las proteínas interactúan con otros componentes de un alimento, tales como lípidos, azúcares, sales y otras proteínas, como se indica en la **Figura 13**. Estas interacciones son gobernadas por los efectos del procesado y de las condiciones de almacenamiento. Así, casi todas las aplicaciones requieren atributos funcionales específicos para obtener el comportamiento deseado.

Las proteínas del suero son muy usadas como ingredientes en alimentos debido a sus propiedades funcionales: emulsificación, gelificación, espumado, capacidad de retención de agua, entre otras. En la **Tabla 6** se muestran algunas de las aplicaciones de las proteínas del suero en la industria de alimentos (*Cayot & Lorient, 1996; Damodaran, 1997*). Sin embargo, en la actualidad el interés en estas proteínas no sólo

se basa en sus propiedades funcionales sino también en sus características como ingredientes bioactivos.

Tabla 6. Funcionalidad y aplicación de las proteínas del suero en alimentos.

| FUNCIÓN | MECANISMO | ALIMENTO |
|--------------------------------|--|---|
| <i>Solubilidad</i> | Hidrofilicidad | Bebidas |
| <i>Gelificación</i> | Retención e inmovilización de agua, formación de red | Carnes, geles, tortas, quesos, productos panificados |
| <i>Cohesión–adhesión</i> | Uniones hidrofóbicas, iónicas y puente H | Carnes, salsas, pastas, productos panificados |
| <i>Emulsificación</i> | Adsorción y formación de películas en la interfase | Salsas, sopas, tortas, aderezos |
| <i>Espumado</i> | Adsorción interfacial y formación de películas | Coberturas para tortas, helados, postres, tortas |
| <i>Liga de grasa y flavour</i> | Retención, uniones hidrofóbicas | Roscas rellenas de mermeladas, panificados bajos en grasa |

3.4. β -lactoglobulina

Como se mostró en la **Tabla 3**, la β -lactoglobulina (β -lg) es la proteína más abundante del suero lácteo (50 – 65 % del suero y 7 – 12 % del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de alrededor de 18,4 kDa.

Existen diferentes variantes genéticas de la β -lg, entre ellas las más abundantes son la variante A y la B (*Eigel et al., 1984*). Estas variantes difieren en la sustitución de una glicina en la variante B por un ácido aspártico en la variante A (*Kilara & Vaghela, 2004*). Ambas estructuras están estabilizadas por dos uniones disulfuro (entre Cys 160 – Cys 66 y Cys 119 – Cys 106) y también contienen un grupo sulfidrilo libre (Cys 121). A pesar de diferencias menores en la composición de aminoácidos entre las diferentes variantes genéticas, todas poseen un alto contenido de aminoácidos

esenciales (Phillips, Whitehead & Kinsella, 1994). En la **Figura 14** se muestra la estructura primaria de una de las variantes genéticas de la β -lg, la variante A.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-----|------------|------------|-----|--|
| 1 | Leu | Ile | Val | Thr | Gln | Thr | Met | Lys | Gly | Leu | 11 | Asp | Ile | Gln | Lys | Val | Ala | Gly | Thr | Thr | Trp | |
| 21 | Ser | Leu | Ala | Met | Ala | Ala | Ser | Asp | Ile | Ser | 31 | Leu | Leu | Asp | Ala | Gln | Ser | Ala | Pro | Leu | Arg | |
| 41 | | | | | Gln in Variant D | | | | | | 51 | | | | | | Variant C His | | | | | |
| 61 | Val | Tyr | Val | Glu | Glu | Leu | Lys | Pro | Thr | Pro | 71 | Glu | Gly | Asp | Leu | Glu | Ile | Leu | Leu | Gln | Lys | |
| 61 | | | | Gly in Variants B, C | | | | | | 71 | | | | | | | | | | | | |
| 81 | Asp | Glu | Asn | Asp | Glu | Cys | Ala | Gln | Lys | Lys | 91 | Ile | Ile | Ala | Glu | Lys | Thr | Lys | Ile | Pro | Ala | |
| 81 | Val | Phe | Lys | Ile | Asp | Ala | Leu | Asn | Glu | Asn | 91 | Lys | Val | Leu | Val | Leu | Asp | Thr | Asp | Tyr | Lys | |
| 101 | | | | | | | | | | | 111 | | | | | | Variants B, C Ala | | | | | |
| 121 | Lys | Thr | Leu | Leu | Phe | Cys | Met | Glu | Asn | Ser | 131 | Ala | Glu | Pro | Glu | Gln | Ser | Leu | Val | Cys | Gln | |
| 121 | | | | | | | | | | | 131 | | | | | | | | | | | |
| 141 | Cys | Leu | Val | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Asp | Asp | 151 | Glu | Ala | Leu | Glu | Lys | Phe | Asp | Lys | Ala | Leu | |
| 141 | | | | | | | | | | | 151 | | | | | | | | | | | |
| 161 | Lys | Ala | Leu | Pro | Met | His | Ile | Arg | Leu | Ser | 161 | Phe | Asn | Pro | Thr | Gln | Leu | Glu | Glu | Gln | Cys | |
| 161 | | | | | | | | | | | 162 | | | | | | | | | | | |
| | His | Ile | OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 14. Estructura primaria de la β -lg bovina A. Se indica la ubicación de las sustituciones en las distintas variantes genéticas (Kilara & Vaghela, 2004).

La β -lg ha sido estudiada mediante dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja para determinar de su estructura secundaria y se ha reportado que contiene 10 – 15 % de estructura α -hélice, 43 % de regiones β -planas y 47 % de estructura desordenada (Timasheff, Townend & Mescanti, 1966). Un trabajo más reciente (Verheul, Pedersen, Roefs & de Kruif, 1999) describe al monómero de β -lg como una estructura esférica de 4 nm de diámetro.

La estructura nativa de una proteína es una red tridimensional que resulta de un balance de varias fuerzas atractivas y repulsivas que ocurren entre diferentes partes de la cadena polipeptídica y entre la cadena polipeptídica y las moléculas del solvente (Relkin, 1996). La conformación tridimensional de la β -lg nativa se muestra en la **Figura 15** (Phillips et al., 1994).

La presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre le imparte a la molécula de la β -lg una estructura espacial rígida.

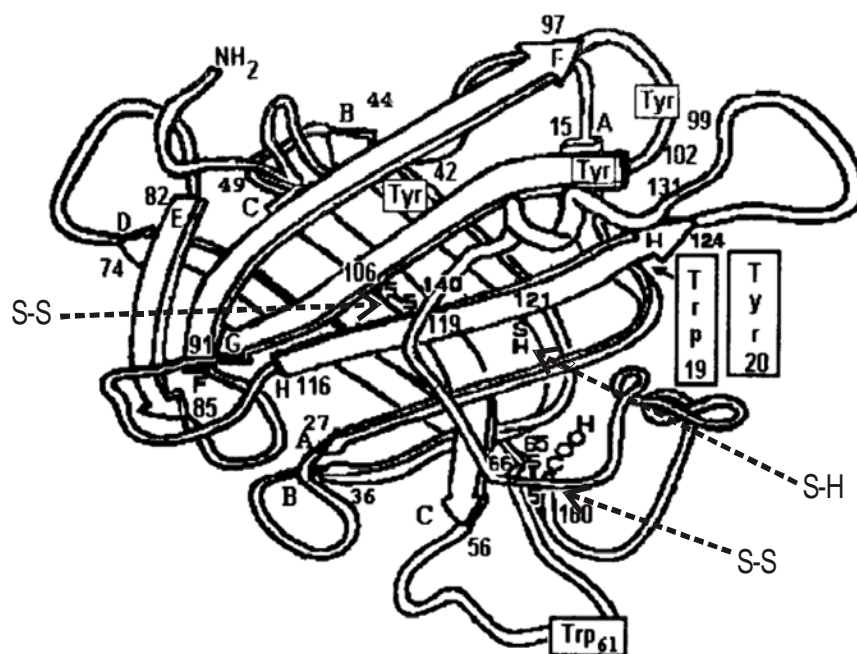


Figura 15. Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina bovina. Las flechas indican las zonas planas β , nominadas con letra. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro y del grupo tiol libre (Phillips et al., 1994).

Existe un acuerdo general sobre la ubicación de uno de los grupos disulfuro (Cys 66 – Cys 160), pero la ubicación del otro no es precisa, pudiendo estar localizado entre los residuos Cys 106 y Cys 119 o Cys 121 (Relkin, 1996). Por último, la posición del grupo tiol libre es también imprecisa, y parece estar repartida entre los residuos Cys 119 y Cys 121. La conformación de la molécula de la β -lg es fuertemente dependiente del pH. Según la conformación, el grupo tiol estará más o menos accesible y podrá participar en los intercambios de uniones disulfuro, que condicionan numerosas características y en particular la solubilidad.

El punto isoeléctrico (pI) de la β -lg se encuentra entre 4,6 y 5,2 según la variante genética (Barnett & Bull, 1960; Bromley, Krebs & Donald, 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat, Pongsawatmanit & McClements, 2006; Haug, Skar, Vegarud, Langsrud & Draget, 2009; Townend, Herskovits, Swaisgood & Timasheff, 1964). Por debajo de pH 3 y por encima de pH 7, la β -lg existe como monómero. Entre pH 3,1 y 5,1 a bajas temperaturas y altas concentraciones de proteína, la β -lg se asocia hasta en forma

octamérica. Esta polimerización se da por medio de los grupos carboxilos, de esta manera, la variante A tiene más posibilidad de formar octámeros que la variante B por la presencia de un ácido aspártico más, en el lugar que la variante B tiene glicina. A otros valores de pH, incluyendo el pH natural de la leche (pH 6,5), la β -Ig se presenta generalmente en forma dimérica (Kilara & Vaghela, 2004). Esta asociación entre monómeros de β -Ig se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp 130 y Glu 134 con los residuos de lisina en la molécula vecina.

La disociación del dímero en monómeros de β -Ig a pH mayor a 7 coincide con un aumento de actividad en el grupo tiol. Por lo tanto, los reactivos que estabilizan la conformación nativa o asociada en dímeros de β -Ig podrían reducir la actividad del grupo tiol libre al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas.

La asociación que se da entre las moléculas de proteína en diferentes condiciones del medio afecta la estabilidad de la misma frente a la desnaturalización irreversible ya que limita la exposición de grupos ocultos (disulfuro y tiol) en las zonas de unión de las moléculas y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre las moléculas parcialmente desplegadas.

3.4.1. Propiedades biológicas de la β -Ig

La leche de todos los rumiantes tiene β -Ig, mientras que la de casi todos los no rumiantes no la tiene. La β -Ig tiene numerosas funciones biológicas entre ellas una alta eficiencia en la unión del retinol (provitamina A) (Sawyer, Brownlow, Polikarpov & Wu, 1998). Es una fuente rica en cisteína, un aminoácido esencial que estimula la síntesis de glutatión que es un tripéptido anticarcinogénico que protege contra tumores intestinales. Además, la estructura globular de la β -Ig la hace muy estable contra las enzimas proteolíticas y los ácidos presentes en el estómago (de Wit, 1998).

Debido a su predominancia en la leche bovina, también domina las propiedades de las proteínas del suero.

3.4.2. Propiedades funcionales de la β -lg

Aunque la β -lg presenta una importante cantidad de residuos hidrofóbicos, es una proteína muy soluble en agua ya que la mayoría de los residuos no polares están ocultos en el interior de la molécula y la mayoría de los grupos polares están expuestos en la superficie (*Mangino, 1984*). Además, relacionado con esta alta solubilidad en agua, la β -lg es muy activa superficialmente, lo que le proporciona buenas propiedades espumantes y emulsificantes. Sin embargo, las propiedades superficiales dependen mucho del estado de desnaturalización que presenta la proteína; por lo tanto, estas propiedades se verán modificados por las condiciones del medio como el pH, fuerza iónica, etc (*Cayot & Lorient, 1996*). La capacidad de ligar agua depende también del estado estructural de la molécula, la β -lg es capaz de ligar agua y estabilizar productos luego de la cocción como por ejemplo, emulsiones cárnicas, salsas, etc. cuando el pH es cercano a la neutralidad. La ausencia de sinéresis en productos hidratados es un criterio muy importante de calidad en la aceptabilidad de un producto por lo tanto esta característica de la β -lg es de suma importancia.

La capacidad gelificante de la β -lg la ubica entre las proteínas más estudiadas. La gelificación de esta proteína puede lograrse por adición de sales y enzimas a una solución de β -lg concentrada (el valor de concentración crítica para gelificación depende del pH), a pH extremos o por calentamiento (*Clark, Kavanagh & Ross-Murphy, 2001; Kilara & Vaghela, 2004*).

3.5. Caseinoglicomacropéptido

El caseinoglicomacropéptido (CMP) es un péptido de 64 aminoácidos que, como se mencionó anteriormente, se forma a partir del clivaje de la κ -caseína por quimosina o

pepsina durante la elaboración del queso (*Delfour, Jolles, Alais & Jolees, 1965*). Es un grupo heterogéneo de péptidos que tienen la misma cadena peptídica pero varían en su contenido de carbohidratos y fósforo. Existen dos variantes genéticas principales del CMP (la variante A y la B) provenientes de las dos variantes genéticas de κ-caseína (A y B) que difieren en dos aminoácidos: en la posición 136 la variante A posee treonina y la B isoleucina, mientras que en la posición 148, la A posee un residuo de ácido aspártico y la B alanina (*Oliva, Escobar & Ponce, 2002*). En la **Figura 16** se muestra un esquema de la estructura primaria del CMP con los sitios potenciales de glicosilación y fosforilación.

El CMP constituye entre el 15 y 20 % de las proteínas en el suero de queso (*El-Salam et al., 1996; Thomä-Worringer et al., 2006; Wang & Lucey, 2003*). Según presente o no carbohidratos unidos a la cadena peptídica el CMP puede ser glicosilado (gCMP) o no glicosilado (aCMP). En el gCMP uno de los carbohidratos más comúnmente presentes es el ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico).

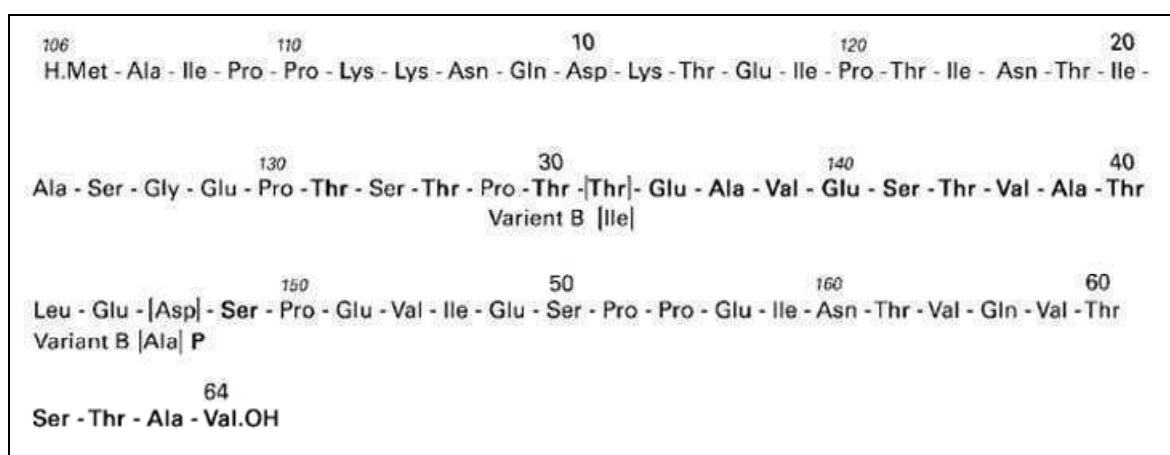


Figura 16. Estructura primaria de la variante genética A y B del CMP (*Eigel et al., 1984; Whitney, 1988*). Los aminoácidos entre paréntesis son los sitios correspondientes a diferencias en la variante B que se indican debajo de cada paréntesis. Los pequeños números en cursiva indican la secuencia de aminoácidos en base a la κ-caseína. Los sitios de glicosilación y fosforilación se señalan en negra.

El valor preciso del pI del CMP depende de la naturaleza y el contenido de cadenas de carbohidratos que presenten y del grado de fosforilación (*Cherkaoui, Doumenc,*

kDa a pH 3,5 (*Kawasaki et al., 1993a; Minkiewicz et al., 1996; Nakano & Ozimek, 2002; Xu, Sleigh, Hourigan & Johnson, 2000*). Estos cambios dependientes del pH fueron atribuidos al autoensamblaje del CMP conducido por la formación de oligómeros a través de interacciones no covalentes a pH neutro y la disociación parcial de estos oligómeros a pH ácido (*Kawasaki et al., 1993b; Xu et al., 2000*), aunque algunos autores no están de acuerdo con estos resultados (*Mikkelsen et al., 2005*). Recientemente *Farías, Martínez y Pilosof (2010)* propusieron un modelo para explicar el autoensamblaje del CMP en función del pH, el mismo será discutido más adelante en el Capítulo 1.

3.5.1. Actividades biológicas del CMP

Las actividades biológicas del CMP han sido muy estudiadas en los últimos años (*Brody, 2000; Dziuba & Minkiewicz, 1996; El-Salam et al., 1996; Kawasaki et al., 1993a; Kawasaki et al., 1992; Manso & López Fandiño, 2004; Oh, Worobo, Kim, Rheem & Kim, 2000; Thomä-Worringer et al., 2006*). Entre ellas se puede resaltar la habilidad del CMP para modular las respuestas del sistema inmune, promover el crecimiento de bifidobacterias, suprimir las secreciones gástricas, regular la circulación de la sangre, inhibir la unión de las toxinas del cólera a los oligosacáridos receptores en las paredes celulares y proteger a las células de la infección por el virus influenza. Otra particularidad del CMP es que tiene poca cantidad de aminoácido metionina, lo que lo hace un ingrediente útil para pacientes con problemas hepáticos. Además, el hecho de que el CMP no tiene fenilalanina en su composición aminoacídica, lo hace adecuado para la nutrición para pacientes con fenilcetonuria. El contenido de ácido siálico también otorga bioactividad, ya que éste contribuye al funcionamiento de las membranas celulares y los receptores de membrana y al normal desarrollo del cerebro.

Todas estas actividades biológicas demuestran que el CMP posee una amplia gama de posibilidades para su utilización en diversos tipos de alimentos. Sin embargo, para poder ser aplicado es muy importante conocer las propiedades funcionales de este péptido.

3.5.2. Propiedades funcionales del CMP

El CMP bovino es muy soluble en agua en un amplio rango de pH, aún en condiciones ácidas y no es afectado por tratamientos térmicos. Otro atributo del CMP es su buena capacidad emulsionante, con una actividad máxima a pH alcalino y mínima en el rango de pH 4,5 – 5,5, sin embargo su estabilidad se deteriora después de 24 h de almacenamiento, principalmente a pH neutro y alcalino (*Chobert, Touati, Bertrandharb, Dalgalorrondo & Nicolas, 1989*). El CMP presenta muy buena capacidad espumante pero la estabilidad no es buena (*Marshall, 1991*). *Thomä Worringer, Siegert & Kulozik (2007)* estudiaron la interacción del CMP con proteínas del suero sobre las propiedades espumantes y encontraron que el CMP y las proteínas del suero se complementan porque mientras el CMP es más eficiente para reducir la tensión superficial y asegurar un alto contenido de gas durante la formación de la espuma, las proteínas del suero son capaces de reducir la permeabilidad del gas y de inhibir la coalescencia de las burbujas debido a la generación de películas estables en la interfase.

Con respecto a las propiedades gelificantes existen escasos y contradictorios estudios. *Burton & Skudder (1987)* encontraron que una solución al 9,3 % de CMP gelificó a pH 4,5 a 20 °C, pero no cuando se calentó a 90 °C. Sin embargo, *Marshall (1991)* no pudo reproducir estos resultados. Por otro lado, *Ahmed y Ramaswamy (2003)* reportaron que una solución de CMP al 12,5 % gelificó a 80 °C a pH 7. Recientemente, un estudio más exhaustivo sobre la gelificación del CMP fue llevado a cabo por *Martinez, Farías y Pilosof (2010)*. En estos trabajos se mostró la gelificación en frío y durante la

aplicación de calor en función del pH. Allí se proponen modelos para explicar la gelificación de este péptido mediante las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que tienen lugar a los distintos valores de pH y llevan al autoensamblaje del CMP.

4. Interacciones proteína-proteína

En muchos alimentos, las proteínas son fundamentales en la determinación de la mayoría de los atributos de calidad del producto final. No sólo el tipo y la concentración de proteína, sino también el método de procesamiento y las condiciones ambientales afectarán la microestructura, textura, apariencia y estabilidad del producto final.

Algunas de las consecuencias prácticas de las interacciones entre proteínas durante el procesamiento de alimentos son bien conocidas; en algunos casos es necesario controlar estas interacciones ya que pueden tener un impacto negativo sobre la calidad del producto. En leche, por ejemplo, las proteínas del suero interactúan con las micelas de caseína durante el calentamiento (*Corredig & Dalgleish, 1999*), y su asociación está relacionada a un menor rendimiento del queso.

Aunque cada proteína es única, las asociaciones e interacciones proteicas en alimentos son moduladas por un balance de fuerzas. El mecanismo que conduce a la asociación de cadenas polipeptídicas en estructuras proteicas tridimensionales es el punto de partida para comprender las interacciones proteína-proteína en gran escala.

En la cadena polipeptídica de la mayoría de las proteínas existen porciones que están organizadas en una estructura definida, y forman cadenas tipo hélices, cadenas tipo láminas o cadenas curvas. Estas porciones constituyen la estructura secundaria de las proteínas y son el resultado de interacciones entre aminoácidos específicos. Las proteínas también se caracterizan por una configuración tridimensional única que es la estructura terciaria. Si se asocian estructuras terciarias independientes por medio de interacciones entre varias cadenas polipeptídicas, la proteína tendrá estructura cuaternaria.

Las proteínas en solución mantienen su conformación mediante un equilibrio de fuerzas hidrofóbicas, uniones hidrógeno, fuerzas van der Waals e interacciones electrostáticas (que pueden ser atractivas o repulsivas). Además, la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína podría estar estabilizada por la presencia de uniones covalentes entre aminoácidos, por ejemplo, uniones por puente disulfuro (*Corredig, 2006; Damodaran, 1997*).

La estructura de una proteína es dinámica, y el equilibrio entre las fuerzas estabilizantes de la estructura tridimensional puede cambiar a partir de cambios en las condiciones ambientales tales como temperatura, calidad del solvente, pH y presión o durante el procesamiento. El potencial de una proteína para modificar su conformación es fundamental para algunas de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas: formación de geles, adsorción a interfases y estabilización de espumas y emulsiones.

Debido a las condiciones ambientales o a las utilizadas durante el procesamiento, una proteína puede cambiar su conformación. Como consecuencia de estos cambios, las fuerzas que la estabilizan pueden debilitarse, permitiendo el desplegamiento o la desnaturalización proteica y exponiendo aminoácidos reactivos antes ocultos en el interior de la estructura proteica. Así estos aminoácidos reactivos pueden interactuar con aminoácidos de otra cadena polipeptídica vecina formando agregados.

La cadena polipeptídica contiene aminoácidos cargados, los cuales interactúan unos con otros causando atracción o repulsión de cadenas laterales. Al cambiar el pH en una solución proteica, ocurre una redistribución de cargas en la cadena polipeptídica, los grupos ácidos tienen una carga negativa a pH neutro mientras que los grupos básicos están cargados positivamente generalmente a este pH debido a que su punto isoeléctrico es alto. Las interacciones electrostáticas no actúan sólo localmente entre grupos específicos estabilizando la estructura terciaria de una proteína, sino también interactúan entre diferentes proteínas. La distribución de las cargas de la proteína

causa atracción o repulsión electrostática. Estas interacciones electrostáticas son las fuerzas principales que actúan a cierta distancia.

Las proteínas no sólo deben exponer sus sitios reactivos, sino también deben tener una orientación óptima para que sean capaces de interactuar unas con otras. Las interacciones de corto rango son específicamente estéricas, y ésta es la razón por la cual la cinética de asociación es determinada por la velocidad de desnaturalización proteica.

A una distancia corta las proteínas pueden interactuar mediante fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas son fuerzas atractivas débiles entre dipolos transientes. Estas fuerzas son inversamente proporcionales a la distancia entre moléculas. Las interacciones electrostáticas no son tan importantes en el equilibrio de fuerzas que involucran la asociación molecular si hay iones presentes en la solución. Los iones apantallan las cargas presentes en las moléculas y disminuyen las fuerzas electrostáticas totales.

La presencia de aminoácidos cargados puede causar una coordinación específica con iones. Algunas proteínas son estabilizadas por puentes de iones específicos. Por ejemplo, la rigidez de la estructura tridimensional de la α -la es aumentada por los puentes de Ca^{+2} (Kuwajima, Harushima & Sugai, 1986). En ausencia de calcio, la proteína tiene una estructura no tan rígida con una menor temperatura de desnaturalización (Boye, Alli & Ismail, 1997). Los puentes iónicos no sólo estabilizan las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína, sino también participan en las interacciones proteína-proteína tales como la asociación de caseínas o la gelificación de proteínas globulares.

Otra fuerza que es importante en la interacción de moléculas proteicas es la unión puente hidrógeno. Las uniones hidrógeno están formadas por dipolos, por ejemplo los grupos amino y carboxilo de una proteína. La asociación de monómeros de β -lg en dímeros es conducida por uniones hidrógeno entre las estructuras lámina β de dos monómeros adyacentes (Brownlow et al., 1997).

Las interacciones hidrofóbicas juegan un rol fundamental en las interacciones proteína–proteína y la presencia de aminoácidos no polares es considerada una característica muy importante en la determinación del potencial de una proteína como ingrediente “funcional”. La hidrofobicidad superficial se emplea como un parámetro para predecir el potencial de una proteína para asociarse bajo calentamiento o bajo cambios de las condiciones ambientales y se relaciona con propiedades funcionales, tales como espumado y gelificación (Nakai, 1983). Sin embargo, una porción de los aminoácidos no polares permanecen ocultos en el interior de la estructura proteica. Por eso, la suma de la contribución de todos los aminoácidos hidrofóbicos en la cadena polipeptídica no es una estimación fiable de la susceptibilidad de la proteína a interactuar con otras proteínas vía interacciones hidrofóbicas. La hidrofobicidad superficial de una proteína y sus cambios bajo calentamiento, cambios de pH y otras condiciones ambientales se pueden determinar mediante espectroscopía de fluorescencia, usando sondas fluorescentes que interactúan selectivamente con los aminoácidos no polares expuestos de una proteína (Nakai, 1983).

Uniones proteína–proteína pueden también formarse por medio de interacciones covalentes entre aminoácidos de diferentes proteínas. La formación de uniones disulfuro entre las gluteninas del trigo es fundamental para determinar la fuerza de la masa de pan (Li & Lee, 2000). También se forman uniones covalentes durante el calentamiento de la leche entre β -lg, α -la y κ -caseína (Corredig & Dalgleish, 1999). La formación de uniones disulfuro aumenta la firmeza y elasticidad en los geles de proteínas de suero formados bajo tratamiento térmico (Vardhanabhuti & Foegeding, 1999).

Algunas proteínas alimentarias están presentes en la naturaleza en ensamblados moleculares complejos. Estas grandes estructuras cuaternarias son el resultado de un balance de varias fuerzas, y su composición es dinámica. Cualquier cambio en el pH, concentración, temperatura y otras condiciones ambientales afectarán el equilibrio

entre interacciones hidrofóbicas, van der Waals, electrostáticas e iónicas (Corredig, 2006).

Algunos ingredientes alimentarios disponibles comercialmente como caseínas, proteínas del suero, proteínas del huevo y proteínas de soja están constituidos por este tipo de agregados moleculares y su utilización podría ser muy aprovechada si se conociera el comportamiento de las diferentes proteínas presentes.

Los monómeros de proteínas pueden interactuar unos con otros creando estructuras supramoleculares constituidas por la misma proteína. β -lg, por ejemplo, forma dímeros mediante uniones hidrógeno. La estructura tipo lámina- β antiparalela se asocia con otra igual de otra molécula de proteína formando doce uniones hidrógeno en la superficie del dímero (Brownlow *et al.*, 1997). El equilibrio de la asociación de β -lg depende de la concentración de proteína, de la temperatura, del pH y de la fuerza iónica; como se mencionó anteriormente β -lg está presente como dímero a pH 6 – 7, mientras que por ejemplo a pH 3,5 la proteína está principalmente en la forma monomérica. Por medio de técnicas de dispersión de luz, se ha demostrado que el equilibrio se desplaza hacia la forma monomérica bajo condiciones que permiten la repulsión electrostática entre monómeros (a baja concentración de proteína, baja fuerza iónica o a temperaturas mayores a 40 °C) (Aymard, Durand & Nicolai, 1996). Además, la disociación del dímero de β -lg parece estar acompañada por una modificación conformacional de la estructura proteica (Qi, Brownlow, Holt & Sellers, 1995).

Otro ejemplo de estructura cuaternaria compleja son las micelas de caseína nativa en la leche. Su estructura es afectada por cambios en el ambiente (Holt & Sawyer, 1993). Pequeñas concentraciones de calcio interactúan con los residuos fosforilados presentes en zonas de α s1- α s2- y β -caseínas formando uniones y causando la precipitación de la proteína. La única caseína que no es afectada por el calcio es la κ -caseína. El caseinato de sodio es el resultado de la precipitación de las micelas por medio de la acidificación y es un ingrediente muy empleado en la industria alimentaria.

Aunque los caseinatos cálcicos o sódicos tienen una composición proteica similar al de las micelas de caseína, sus propiedades funcionales son completamente diferentes debido a que sus interacciones no se asemejan a las presentes en la estructura cuaternaria original de las caseínas. El caseinato de sodio es un muy buen agente emulsificante debido a su flexibilidad en las interfases aire-agua o aceite-agua. Por otro lado, las fuertes interacciones entre caseínas en las micelas causan la formación de películas muy delgadas en la interfase y por lo tanto en este caso se necesitan cantidades muy grandes para preparar una emulsión estable (*Courthaudon et al., 1999; Dalgleish, 1997*).

5. Referencias

- Ahmed, J., & Ramaswamy, H. S. (2003). Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*, *86*, 1535-1540.
- Almajano, M. P., Carbó, R., López Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*, 55-63.
- Anónimo (2002). Reference manual for US whey products. *US Dairy Export Council*. Arlington, VA, Estados Unidos.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, *89*, 27-36.
- Aymard, P., Durand, D., & Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, *19*, 213-221.
- Badger, T. M., Ronis, M. J. J., & Hakkak, R. (2001). Developmental effects and health aspects of soy protein isolate, casein and whey in male and female rats. *International Journal of Toxicology*, *20*, 165-174.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. M. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*, 693-704.
- Barnett, L. B., & Bull, H. B. (1960). Electrophoresis of ribonuclease and of β -lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *89*(2), 167-172.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stresses. *Nature Reviews in Drug Discovery*, *3*, 205-214.
- Bate-Smith, E. C. (1973). Haem analysis of tannins - the concept of astringency. *Phytochemistry*, *12*, 907-912.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation: A review. *Annals of Botany*, *91*, 179-194.
- Bosselaers, I. M., Caessens, P. R., Van Boekel, M. S., & Alink, G. M. (1994). Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food Chemistry and Toxicology*, *32*, 905-911.
- Boye, I., Alli, I., & Ismail, A. A. (1997). Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy on the study of thermal and structural stability of α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 1116-1125.
- Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, *84*(1), S39-S46.
- Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β -lactoglobulin. *Faraday Discussions*, *128*, 13-27.

Brownlow, S., Cabral, J. H., Cooper, R., Fower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bobine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocain. *Structure*, 5, 481-495.

Burton, J., & Skudder, P. J. (1987). Whey proteins. UK patent application GB 2188526 A1.

Campos, F. M., Couto, J. A., & Hogg, T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 167-174.

Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C. R., & Micol, V. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 648-662.

Cayot, P., & Lorient, D. (1996). Structure-function relationship of whey proteins. In: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food Proteins and their applications* (pp. 225-256). New York: Marcel Dekker.

Clare, D. A., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (2003). Biodefense properties of milk, the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1239-1255.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, 383-400.

Corredig, M. (2006). Protein-protein interactions in food. In: A. G. Gaonkar, & A. McPherson, *Ingredient interactions. Effects on food quality* (pp. 283-308). Boca Raton, FL, Estados Unidos: CRC Press Taylor & Francis Group.

Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1999). The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal*, 9, 233-236.

Courthaudon, J. L., Girardet, J. M., Campagne, S., Rouhier, L. M., Campagna, S., Linden, G., & Lorient, D. (1999). Surface active and emulsifying properties of casein micelles compared to those of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 9, 411-412.

Cummings, J. H., Antoine, J.-M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijelaars, S., & Watzl, B. (2004). PASSCLAIM - Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43(S2), 118-173.

Cherkaoui, S., Doumenc, N., Tachon, P., Neeser, J.-R., & Veuthey, J.-L. (1997). Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropeptide determination. *Journal of Chromatography A*, 790(1-2), 195-205.

Cho, Y. S., Schiller, N. L., Kahng, H. Y., & Oh, K. H. (2007). Cellular responses and proteomic analysis of *Escherichia coli* exposed to green tea polyphenols. *Current microbiology*, 55, 501-506.

Chobert, J. M., Touati, A., Bertrandharb, C., Dalgalarondo, M., & Nicolas, M. G. (1989). Solubility and emulsifying properties of κ -casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457-473.

- Chu, D. C., & Juneja, L. R. (1997). General chemical composition of green tea and its infusion. In: T. Yamamoto, L. R. Juneja, D. C. Chu, & K. Mujo, *Chemistry and applications of green tea* (pp. 13-22): New York: CRC Press.
- Chyu, K. Y., Babbidge, S. M., Zhao, X. N., Dandillaya, R., Rietveld, A. G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B., & Shah, P. K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipo-protein E-null mice. *Circulation*, *109*(20), 2448-2453.
- Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, *8*, 1-6.
- Damodaran, S. (1997). Food protein: an overview. In: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food proteins and their applications* (pp. 1-24). New York: Marcel Dekker.
- Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin *Journal of Dispersion Science and Technology*, *10*(1), 77-102.
- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, *81*, 597-608.
- Delfour, A., Jolles, J., Alais, C., & Jolees, P. (1965). Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *19*, 452-455.
- Demetriades, K., Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Optimizing the functional properties of whey proteins to enhance nutritional benefits. *Recent Res. Devel. in Nutrition Res.*, *2*, 131-153.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., & Ruberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, *81*, S1-S27.
- Dreosti, I. E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, *16*, 692-694.
- Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(6), 1424-1435.
- Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (1996). Influence of glycosilation on micelle-stabilizing ability and biological properties of c-terminal fragments of cow's k-casein. *International Dairy Journal*, *6*, 1017-1044.
- Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R., & Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, *67*, 1599-1631.
- El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, *6*(4), 327-341.
- Espin, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2005). Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. In: M. Juarez, A. Olano, & F. Morais, *Alimentos Funcionales* (pp. 101-166). Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).

FAO (1997). Parte III: La agroindustria y el desarrollo económico. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 1997*: FAO.

Farías, M. E., Martínez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.

Farrell, H. M., Bede, M. J., & Enyeart, J. A. (1987). Binding of p-nitrophenyl phosphate and other aromatic compounds by β -LG. *Journal of Dairy Science*, 70, 252-258.

Fernandez, P. L., Pablos, F., Martín, M. J., & Gonzales, A. G. (2002). Study of catechin and xanthine tea profiles as geographical tracers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1833-1839.

Freedman, D. J., Tacket, C. O., & Delehanty, A. (1998). Milk immunoglobulins with specific activity against purified colonisation factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 177, 662-667.

Ganjam, L. S., Thornton, W. H., Marshall, R. T., & MacDonald, R. S. (1997). Antiproliferative effects of yoghurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 80, 2325-2339.

Gill, H. S., & Cross, M. L. (2000). Anticancer properties of bovine milk. *British Journal of Bovine Milk*, 84, 161-165.

Goldberg, I. (1994). *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Springer.

Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21, 334-350.

Gramza, A., & Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 351-358.

Grasselli, M., Navarro del Cañizo, A. A., Fernández Lahore, H. M., Miranda, M. V., Camperi, S. A., & Cascone, O. (1997). ¿Qué hacer con el suero de leche? , *Ciencia Hoy*, vol. 8. Buenos Aires, Argentina: Copyright Asociación Civil Ciencia Hoy.

Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., & Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et biophysica acta*, 1427, 13-23.

Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., & Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 591-593.

Hakkak, R., Korourian, S., Shelnutt, S. R., Lensing, S., Ronis, M. J. J., & Badger, T. M. (2000). Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 2,12-dimethylben(a)anthracene-induced mammary tumours in female rats. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9, 113-117.

Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89, 339-348.

- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Haslam, E., & Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs -a molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27, 1-40.
- Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2287-2293.
- Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., Go, V. L. W., & Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1558-1564.
- Holt, C., & Sawyer, L. (1993). Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of the primary and secondary structures of α_{s2} , β - and κ -caseins. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans*, 89, 2683-2692.
- Holland, J. W., Deeth, H. C., & Alewood, P. F. (2006). Resolution and characterization of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. *Proteomics*, 6(10), 3087-3095.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et biophysica acta*, 1147, 132-136.
- Juarez, M., Olano, A., & Morais, F., eds (2005). *Alimentos Funcionales*. Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., & Idota, T. (1993a). Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemmagglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1214-1215.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., & Ahiko, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and κ -casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 195-198.
- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., & Kotake, M. (1993b). pH-dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 48, 191-196.
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). Whey proteins. In: R. Y. Yada, *Proteins in food processing* (pp. 72-99). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited & CRC Press.
- Kim, S., Ruengwilysup, C., & Fung, D. Y. C. (2004). Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in a food model. *Journal of Food Protection*, 67, 2608-2612.
- Kreuz, M., Krause, I., & Kulozik, U. (2008). Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1208, 126-132.

Kreuß, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1818-1826.

Kuwajima, K., Harushima, Y., & Sugai, S. (1986). Influence of Ca⁺² binding on the structure and stability of α -lactalbumin studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectra. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 27, 18-27.

Laursen, I., Briand, P., & Lykkesfeldt, A. E. (1990). Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Research*, 10, 343-352.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6516-6520.

Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 330S-335.

Li, M., & Lee, T. C. (2000). Effect of extrusion temperature on the solubility and molecular weight of lentil bean flour proteins containing low cysteine residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 880-884.

Lieske, B., Konrad, G., & Kleinschmidt, T. H. (2004). Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multistage ultrafiltration process. III. Influence of pH in the first ultrafiltration-step on the chemical properties of isolated caseinomacropeptide. *Milchwissenschaft*, 59, 408-410.

Lin, J. K., Lin, C. L., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., & Juan, I. M. (1998). Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3635-3642.

Loimaranta, V., Laine, M., Söderling, E., Vasara, E., Rokka, S., & Marnila, P. (1999). Effects of bovine immune- and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. *European Journal of Oral Science*, 107, 244-250.

MacIntosh, G. H., Regester, G. O., Leu, R. K., Royle, P. J., & Smithers, G. W. (1995). Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *Journal of Nutrition*, 125, 809-816.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211.

Mangino, M. E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2711.

Manso, M. A., & López Fandiño, R. (2004). κ -casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20, 329-355.

Markus, C. R., Olivier, B., & de Haan, E. H. (2002). Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino

acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 1051-1056.

Marshall, S. (1991). Casein macropeptide from whey - a new product opportunity *Food Research Quarterly*, 51, 86-91.

Martin Diana, A. B. (2001). Estudio del casinmacropeptido de suero de queseria, procedente de leche de oveja y cabra. *Instituto del Frío, CSIC*, vol. Ph.D. (p. 179). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

Micke, P., Beeh, K. M., & Buhl, R. (2002). Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma GSH levels of HIV-infected patients. *European Journal of Nutrition*, 41, 12-18.

Micke, P., Beeh, K. M., Schlaak, J. F., & Buhl, R. (2001). Oral supplementation with whey proteins increases plasma GSH levels of HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 31, 171-178.

Mikkelsen, T., Frøkiær, C., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., Ferranti, P., & Barkholt, V. (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein *Journal of Dairy Science*, 88, 4228-4238.

Minkiewicz, P., Slangen, C., Lagerwerf, F., Haverkamp, J., Rollema, H., & Visser, S. (1996). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine κ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions. *Journal of Chromatography A*, 743, 123-135.

Mitra, A. K., Mahalanabis, D., Unicomb, L., Eechels, R., & Tzipori, S. (1995). Hyperimmune cow colostrum reduces diarrhoea due to rotavirus, a double-blind, controlled clinical trial. *Acta Paediatrica*, 84, 996-1001.

Mitsumoto, M., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*, 69, 773-779.

Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2008). pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catequins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 816-823.

Nakagawa, T., & Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1745-1750.

Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 676-683.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotechnology Letters*, 22, 1081-1086.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation of glycomacropeptide from sweet whey by gel chromatography on sephacryl s-200 at pH 7.0 and 3.5. *Milchwissenschaft*, 57, 128-130.

Nanjo, F., Honda, M., Okushio, K., Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigami, T., & Hara, Y. (1993). Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation,

and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 16, 1156-1159.

O'Connell, J. E., & Fox, P. F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11, 103-120.

Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. (1997). Protein gelation. In: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food protein and their applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Oh, S., Worobo, R. W., Kim, B., Rheem, S., & Kim, S. (2000). Detection of cholera toxin-binding activity of κ -casein macropeptide and optimization of its production by the response surface methodology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 516-522.

Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J., Valdez, L. M., Douglass, E., & DuPont, H. L. (1998). Prophylactic effect of bovine anti-Cryptosporidium hyperimmune colostrum immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. *Clinical Infectious Diseases*, 26, 1324-1329.

Oliva, Y., Escobar, A., & Ponce, P. (2002). Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. *Rev. Salud Anim.*, 24(2), 73-81.

Ono, T., Yada, R., Yutani, K., & Nakai, S. (1987). Comparison of conformations of κ -casein, para- κ -casein and glycomacropeptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 911, 318-325.

Oona, M., Rägö, T., Maaros, H.-I., Mikelsaar, M., Loivukene, K., & Salminen, S. (1997). Helicobacter pylori in children with abdominal complaints: Has immune bovine colostrum some influence on gastritis? *Alpe Adria Microbiology Journal*, 6, 49-57.

Ormrod, D. J., & Miller, T. E. (1991). The anti-inflammatory activity of a low molecular weight component derived from the milk of hyperimmunized cows. *Agents and Actions*, 32, 160-166.

Paquay, J. B., Haenen, G. R., Stender, G., Wiseman, S. A., Tijburg, L. B., & Bast, A. (2000). Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5768-5772.

Parodi, P. W. (1998). A role for milk proteins in cancer prevention. *Australian Journal of Dairy Science*, 53, 37-47.

Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R., & Calvo, M. (1992). Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1123, 151-155.

Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). Chapter 4: Structural and chemical properties of β -lactoglobulin. In: S. L. Taylor, *Structure-function properties of food proteins* (pp. 75-106). San Diego, California, Estados Unidos: Academic Press, Inc.

Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.

- Prat Kricun, S. D. (2005). Contenido de catequinas en cultivares clonales argentinos de té (*Camellia sinensis*), elaborados como té negro y té verde sencha. *Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales: Universidad Nacional de Misiones*.
- Prentice, A., Bonjour, J.-P., Branca, F., Cooper, C., Flynn, A., Garabedian, M., Müller, D., Pannemans, D., & Weber, P. (2003). PASSCLAIM - Bone health and osteoporosis. *European Journal of Nutrition*, 42(S1).
- Puyol, P., Pérez, M. D., Ena, J. M., & Calvo, M. (1991). Interaction of β -lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 10, 2515-2520.
- Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and pH 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1248, 43-49.
- Rafter, J., Govers, M., Martel, P., Pannemans, D., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Rowland, I., Tuijtelaars, S., & van Loo, J. (2004). PASSCLAIM - Diet-related cancer. *European Journal of Nutrition*, 43(S2), 47-84.
- Recio, I., & López Fandiño, R. (2005). Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. In: M. Juárez, A. Olano, & F. Morais, *Alimentos Funcionales* (pp. 23-100). Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.
- Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 565-601.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660-1664.
- Rowlands, J. C., He, L., Hakkak, R., Ronis, M. J. J., & Badger, T. M. (2001). Soy and whey proteins down regulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *Journal of Nutrition*, 131, 3281-3287.
- Rusak, G., Komes, G., Likić, S., Horžić, D., & Kovać, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110, 852-858.
- Sastre Gallego, A. (2005). Nuevos alimentos. In: M. Serrano Ríos, A. Sastre Gallego, & J. M. Cobo Sanz, *Tendencias en Alimentación Funcional* (pp. 1-14). Madrid: You&Us.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., & Wu, S.-Y. (1998). β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8, 65-72.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., & Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

- Scott, B. C., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1993). Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radical Research Communications*, *19*, 241-253.
- Schaller, A. (2009). Sueros de lechería. Cadenas Alimentarias. Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias.
- Sharpe, S. J., Gamble, G. D., & Sharpe, D. N. (1994). Cholesterol-lowering and blood pressure effects of immune milk. *American Journal of Clinical Nutrition*, *59*, 929-934.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., & Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, *1125*, 204-210.
- Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.
- Simonetti, P., Pietta, P., & Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected italian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1152-1155.
- Sivaroban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with Nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, *71*, 2105-2109.
- Stapleton, P. D., Shah, S., Hamilton-Miller, J. M. T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., & Taylor, P. W. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *24*, 374-380.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(12), 1965-1969.
- Tang, S., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Antioxidant effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry, and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, *34*, 651-657.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., & López Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, *16*, 1324-1333.
- Thomä Worringer, C., Siegert, N., & Kulozik, U. (2007). Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. *Milchwissenschaft*, *62*, 249-252.
- Timasheff, S. N., Townend, R., & Mescanti, L. (1966). The optical rotatory dispersions of the β -lactoglobulins *Journal of Biological Chemistry*, *241*, 1863-1870.
- Tomita, M., Todhunter, D. A., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (1995). Immunisation of dairy cows with an *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine. *Journal of Dairy Science*, *78*, 2178-2185.

- Townend, R., Herskovits, T. T., Swaisgood, H. E., & Timasheff, S. N. (1964). The solution properties of β -lactoglobulin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(12), 4196-4201.
- Troszynska, A., Narolewska, O., Robredo, S., Estrella, I., Hernández, T., Lamparski, G., & Amarowicz, R. (2010). The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, 21(5), 463-469.
- Vardhanabhuti, B., & Foegeding, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3649-3655.
- Vázquez Martínez, C. (2005). *Alimentación y nutrición: Manual teórico-práctico*. Ediciones Díaz de Santos.
- Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin *Bipolymers*, 49, 11-20.
- Walzem, R. L., Dillard, C. J., & German, J. B. (2002). Whey components: Millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 353-375.
- Wang, H., Helliwell, K., & You, X. (2000a). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 68, 115-121.
- Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2000b). Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 152-160.
- Wang, L. F., Kim, D. M., & Lee, C. Y. (2000c). Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4227-4232.
- Wang, Q., Allen, J. C., & Swaisgood, H. E. (1997). Binding of vitamin D and cholesterol to β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80, 1054-1059.
- Wang, T., & Lucey, J. A. (2003). Use of multi-angle laser light scattering and size-exclusion chromatography to characterize the molecular weight and types of aggregates present in commercial whey proteins products. *Journal of Dairy Science*, 86, 3090-3110.
- Warme, P. K. F., Momany, A., Rumball, S. V., Tuttle, R. W., & Scheraga, H. A. (1974). Computation of structures of homologous proteins. α -Lactalbumin from lysozyme. *Biochemistry*, 13, 768-772.
- Westenhofer, J., Bellisle, F., Blundell, J. E., de Vries, J., Edwards, D., Kallus, W., Milon, H., Pannemans, D., Tuijelaars, S., & Tuorila, H. (2004). PASSCLAIM - Mental state and performance. *European Journal of Nutrition*, 43(S2), 85-117.
- Whitney, R. M. (1988). Proteins in milk. In: N. P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, & E. H. Marth, *Fundamentals of Dairy Chemistry* (pp. 89-92). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Wu, S.-Y., Pérez, M. D., Puyol, P., & Sawyer, L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 170-174.

Xu, Y., Sleight, R., Hourigan, J., & Johnson, R. (2000). Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Process Biochemistry*, 36, 393-399.

Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381-406.

Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 64-71.

Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2004). Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 30994-31001.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero y su impacto sobre las propiedades biológicas y funcionales de los sistemas mixtos.

Tanto los polifenoles del té verde como las proteínas del lactosuero poseen diversas propiedades biológicas de interés y constituyen por lo tanto ingredientes de interés para la elaboración de alimentos funcionales. Sin embargo, las propiedades biológicas pueden verse afectadas en las mezclas de acuerdo al grado de interacción entre polifenoles y proteínas.

Así mismo las proteínas del lactosuero son ingredientes tecnológicos muy apreciados por sus excelentes propiedades funcionales, como por ejemplo la gelificación. Las interacciones con los polifenoles pueden disminuir la funcionalidad de las proteínas y por lo tanto afectar las propiedades organolépticas y texturales de los alimentos que los contienen.

Objetivos específicos

- Caracterizar la interacción entre proteínas aisladas del lactosuero y polifenoles de té verde, así como las condiciones y factores que la promueven.
- Estudiar distintas propiedades funcionales (solubilidad, gelificación) de las mezclas de proteínas del lactosuero y de WPC con polifenoles de té verde.
- Estudiar distintas propiedades biológicas de los polifenoles (antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas) y cómo se ven afectadas por su interacción con proteínas del lactosuero.

SECCIÓN I

*Impacto de la interacción entre
polifenoles de té verde y proteínas
del lactosuero sobre las propiedades
funcionales de las mezclas*

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Proteínas del lactosuero

Se utilizaron las siguientes proteínas del lactosuero: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina (β -lg) y caseinoglicomacropéptido (CMP).

El producto comercial conteniendo α -lactoalbúmina es un concentrado proteico de suero en polvo enriquecido en α -lactoalbúmina (Lacprodan® Alpha-10) y fue provisto por Arla Foods Ingredients (Viby, Denmark). Su composición es: 88% de proteína (base seca) siendo α -lactoalbúmina el 45% del total de proteínas, 10% de lactosa, 2% de grasa, 5% de ceniza y 5,5% de humedad.

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

El caseinomacropéptido (CMP) (BioPURE GMP caseinoglicomacropéptido) también fue provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición es: 79,0 % de proteína (en base seca), siendo CMP el 86,3 % del total de proteínas, 0,6 % de grasa, 6,3 % de ceniza y 6,4 % de humedad.

1.2. Polifenoles de té verde

Se utilizó un extracto de polifenoles de té verde en polvo (Sunphenon® 90MD), de Taiyo International, Inc. (Minneapolis, Minnesota). Contiene más de un 95% de polifenoles totales, más de un 75% de catequinas totales, más de un 45% de epigallocatequina galato (EGCG) y menos de un 6,0% de cafeína.

Las soluciones de proteínas del lactosuero y de extracto de té verde se prepararon disolviendo las cantidades apropiadas de cada polvo en buffer citrato (pH 3,0, 0,01M), buffer acetato (pH 4,5, 0,01M) o buffer fosfato (pH 6,0, 0,01M) a temperatura ambiente. Se agitaron durante 30 minutos y de ser necesario, el pH se ajustó con HCl o NaOH. Además a todas las muestras se les agregó 0,02 % de NaN_3 para prevenir el crecimiento bacteriano. Para las mediciones de dispersión dinámica de luz, las soluciones se filtraron a través de microfiltros de 0,45, 0,22 y 0,02 μm (Whatman International Ltd., England) inmediatamente después de ajustar el pH.

Los sistemas mixtos de polifenoles y proteínas se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de cada solución para alcanzar las concentraciones finales deseadas.

1.3. Concentrado proteico de suero en polvo

Se utilizó un concentrado de proteínas de suero (WPC35) el cual fue proporcionado gentilmente por Milkaut S.A (Santa Fé, Argentina). Su composición porcentual es la siguiente: proteína 38,3% (en base seca), lactosa 48,8%, grasa 2,2%, humedad 3,2%, ceniza 7,5%.

Las mezclas de WPC35-polifenoles se prepararon mediante la disolución de WPC35 (8% y 16% p/v) y polifenoles de té verde (0,25-1% p/v) en agua desionizada doble filtrada (0,2nm Millipore). El pH se ajustó a 4,5 o 6,0 con HCl (0,5M) o NaOH (0,5M) según el caso.

2. Métodos

2.1. Medición del tamaño de partícula en sistemas de proteínas del lactosuero-polifenoles

Existen numerosas técnicas para evaluar la presencia de interacciones proteína–proteína y proteína-polifenol en solución. Entre ellas se pueden mencionar: cromatografía, espectroscopía, microscopía, calorimetría diferencial de barrido, técnicas de dispersión de luz, etc. Muchas de estas técnicas han avanzado en precisión y calidad de resultados. Entre ellas se encuentran las técnicas de dispersión de luz que brindan gran cantidad de información.

La técnica de dispersión dinámica de luz láser (DLS, por sus siglas en inglés: dynamic light scattering) proporciona información cuantitativa y cualitativa de los agregados. Esta técnica permite conocer el coeficiente de difusión y el grado de asociación/agregación de una proteína en solución (*Jachimska, Wasilewska & Adamczyk, 2008*). Numerosos trabajos han utilizado satisfactoriamente la técnica de DLS para caracterizar la formación de agregados entre proteínas y polifenoles (*Jöbstl, O'Connell, Fairclough & Williamson, 2004; Lin, Chen, Cheng & Chen, 2004; Poncet-Legrand et al., 2006*).

La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al (diámetro)⁶ de una partícula. Por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas de las proteínas; por la misma razón esta técnica es muy sensible también a las impurezas, aún a bajas concentraciones. DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas.

Una de las ventajas más importantes de esta técnica es el hecho de que es un método no invasivo que permite monitorear el tamaño de partícula en tiempo real y por lo tanto se puede analizar cómo evoluciona una muestra ante diferentes efectos. Además se requiere un volumen muy pequeño de muestra.

Como se dijo anteriormente, la estructura cuaternaria de una proteína puede verse influenciada por el pH y la fuerza iónica. La precisión de las mediciones por DLS es suficiente para distinguir cambios en la estructura cuaternaria de una proteína (*Malvern-Instruments*).

Durante la formulación de productos se puede producir un cambio importante en la densidad de carga superficial y en la fuerza iónica de una solución. Pequeñas variaciones en alguno de estos parámetros pueden significar la diferencia entre una formulación estable o una muestra agregada. Debido a su sensibilidad, DLS es una herramienta útil para monitorear el efecto de la formulación de este tipo de productos sobre la agregación de proteínas.

En la **Figura 1** se muestra un esquema del funcionamiento del equipo de DLS. La fuente de luz láser incide sobre las partículas de la muestra que dispersan la luz en diferentes direcciones y esta luz dispersada es registrada por un detector óptico. La intensidad de dispersión fluctúa de acuerdo al movimiento Browniano que es el movimiento aleatorio de las partículas en el solvente.

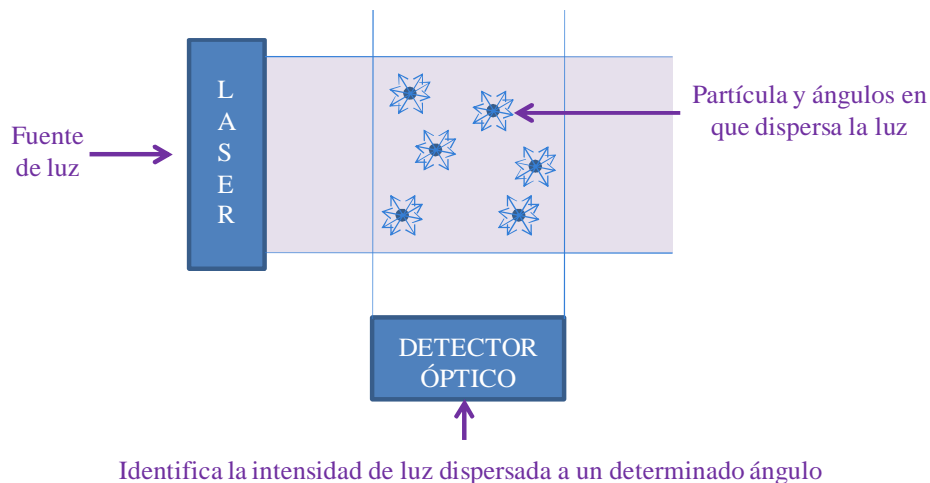


Figura 1. Representación esquemática del equipo de dispersión dinámica de luz. Adaptado de *Mattison, Morfesis & Kaszuba (2003)*.

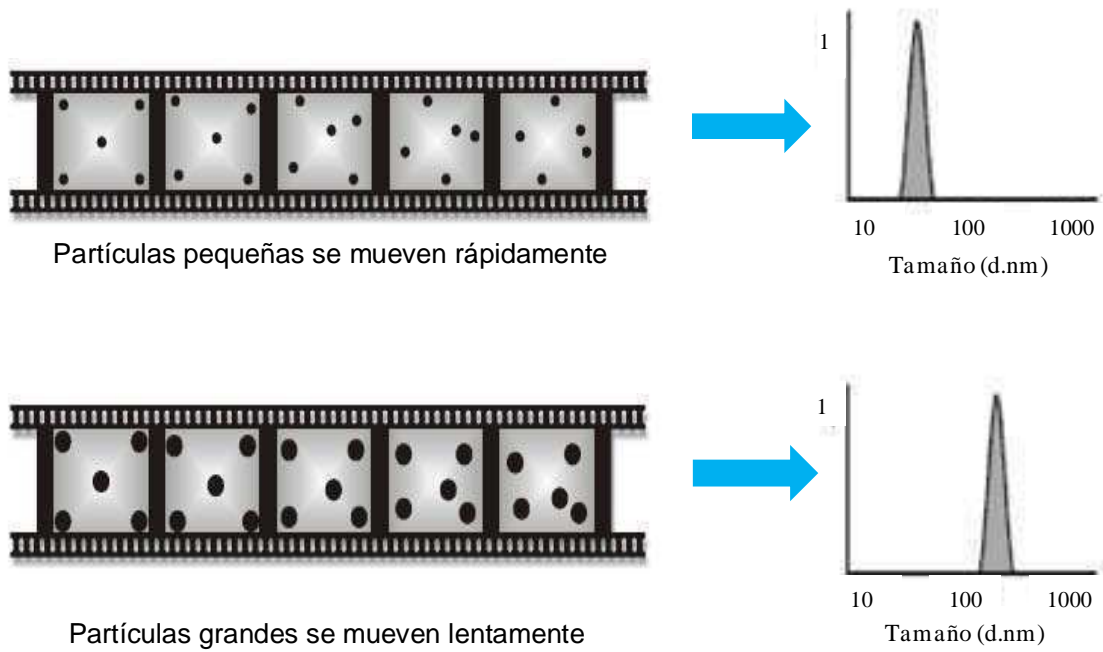


Figura 2. Representación esquemática de las distribuciones a las que dan origen partículas de diferentes tamaños.

Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. A partir de dicha relación se obtienen los gráficos de distribución de tamaño de partícula como se muestra en la **Figura 2**.

Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) láser, Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) como el que se observa en la **Figura 3**, provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas a un ángulo de dispersión de 173 °. El rango de medición del equipo es 0,6 – 6000 nm.

La muestra se coloca en una celda dentro del compartimento que se observa abierto en la **Figura 3**. La celda utilizada fue de poliestireno y las mediciones de tamaño de partícula se realizaron a temperatura ambiente (25°C).

Principio de funcionamiento

En los equipos de dispersión dinámica de luz (DLS), la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las mismas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (D) de la partícula y a partir de éste el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde, $d(H)$: diámetro hidrodinámico (m); D : coeficiente de difusión translacional ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$); k : constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N} \cdot \text{m} \cdot \text{K}^{-1}$); T : temperatura absoluta (K); η : viscosidad ($\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$).



Figura 3. Equipo de dispersión dinámica de luz láser, Zetasizer Nano–Zs, Malvern Instruments.

El tamaño se obtiene a partir de la función de correlación usando varios algoritmos. Se pueden considerar dos aproximaciones:

(i) Análisis de Cumulantes: se ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o “z-average”) y una estimación del ancho de la distribución (índice de polidispersidad). El índice de polidispersidad refleja el grado de asociación (*Haque, Casay, Wilson, Antila & Antila, 1993; Haque & Sharma, 1997*). Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables con propósitos de comparación de un simple valor pero es inadecuado para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.

(ii) Análisis de Contin: se ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener la distribución porcentual de tamaños de partículas (*Stepanek, 1993*). La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas en varias clases de tamaños y por lo tanto se define como distribución de tamaño por intensidad. Aunque la distribución de tamaño fundamental generada por el equipo es la distribución por intensidad, ésta se puede convertir, mediante la teoría de *Mie (1908)*, a distribución por volumen con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman.

Una forma muy simple de describir las diferencias entre las distribuciones de intensidad, volumen y número es considerar por ejemplo dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro presentes en igual cantidad. Si se grafica una distribución de número de estas dos poblaciones de partículas, el gráfico consistirá en dos picos (ubicados a 5 y 50 nm) obteniendo una relación 1:1 (**Figura 4A**). Si en cambio se grafica una distribución en volumen (**Figura 4B**), entonces la relación de estos dos picos cambia a 1:1000 (porque el volumen de una esfera es $4/3\pi(d/2)^3$). Por último si quisiéramos graficar una distribución de intensidad (**Figura 4C**), la relación entre los dos picos sería de 1:1000000 (porque la intensidad de dispersión es proporcional al diámetro a partir de la aproximación de Rayleighs) (*Malvern-Instruments*).

En este trabajo se analizarán en primer lugar las distribuciones en intensidad y luego las distribuciones en volumen, ya que da una visión más realista de la importancia de los picos. La distribución en número no se evaluará ya que arrastra muchos errores a partir de su cálculo y no aporta información extra.

Todos los ensayos de tamaño de partícula se realizaron por triplicado, y se informa un promedio.

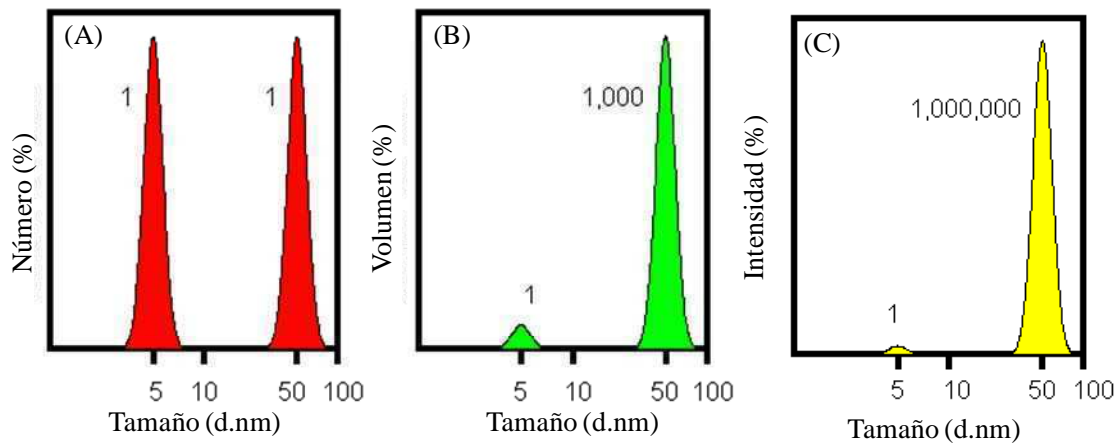


Figura 4. Distribución en (A) número, (B) volumen y (C) intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad.

2.2. Medición del tamaño de partícula en sistemas de WPC-polifenoles

Los diámetros promedio y las curvas de distribución de los agregados formados en los sistemas mixtos WPC-polifenoles se determinaron por dispersión estática de luz en un equipo Mastersizer 2000 provisto con un láser He-Ne (633 nm) y acoplado a una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) (**Figura 5**). El rango de medición del equipo se encuentra entre 0,1 μm a 100 μm . La velocidad de la hélice

se mantuvo a 1800 rpm. Basándose en las características de las proteínas, se utilizó un índice de refracción (RI) para la fase dispersa igual 1,354, mientras que el parámetro de absorción fue igual a cero. El tamaño de la partícula se informa como el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ($D_{32} = \Sigma ni di^3 / \Sigma nidi^2$) y el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro de De Broucker ($D_{43} = \Sigma nidi^4 / \Sigma nidi^3$), donde ni es el número de partículas de diámetro di (Simmons, Jayaraman & Fryer, 2007).

D_{32} brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las partículas. D_{43} está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización (por ejemplo floculación).

El tamaño de partícula se determinó sobre cada muestra luego de 24 horas de almacenamiento a 20°C. Las muestras se agitaron por inversión antes de ser volcadas en el recipiente de la unidad de dispersión. Los parámetros informados corresponden al promedio y la desviación estándar de al menos tres mediciones.

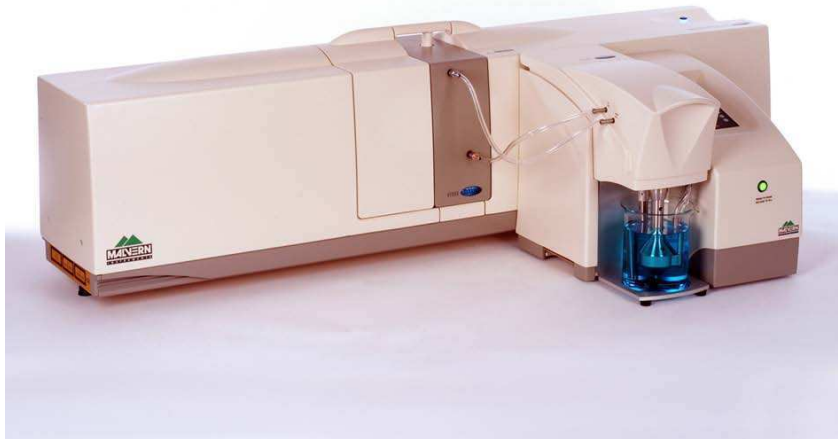


Figura 5. Fotografía del equipo Mastersizer 2000 con su unidad de dispersión Hydro 2000MU

2.3. Determinación de la carga superficial de las partículas en solución

Los estudios para determinar la carga neta superficial de las partículas en solución se realizaron mediante la medición del potencial zeta (ζ) en un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), el mismo que se utiliza para la medición de tamaño de partículas por DLS (**Figura 3**). Las muestras se diluyeron en el buffer apropiado antes de cargarse en las celdas correspondientes para la medición de movilidad electroforética (**Figura 6**) y la temperatura se ajustó a 25°C. El potencial zeta (ζ) se determinó midiendo la dirección y velocidad de las partículas al aplicar un campo eléctrico. Las mediciones de potencial zeta se informan como el promedio y la desviación estándar de al menos tres mediciones.

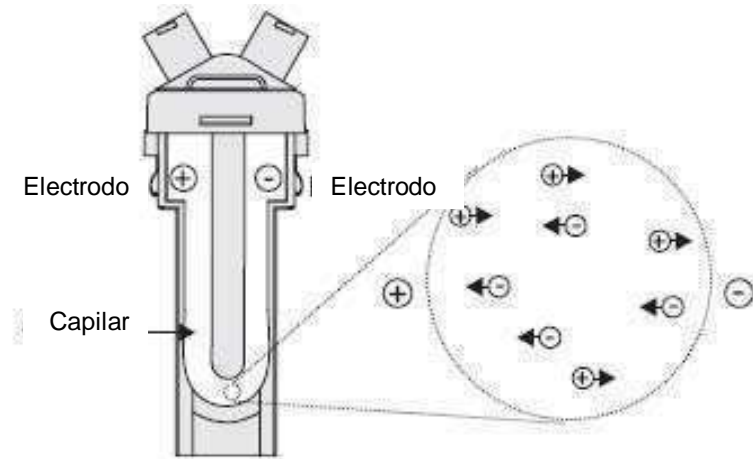


Figura 6. Celda para la medición del potencial zeta. En los electrodos ubicados a cada lado, el equipo aplica el campo eléctrico (Malvern Instruments, 2001).

Principio de funcionamiento

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de

iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula (**Figura 7**).

La capa de líquido que rodea a la partícula se la puede encontrar de dos formas: una región interna, conocida como capa de *Stern* donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados con menos fuerza a la partícula. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (capa de *Stern*).

Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad por ejemplo), lo hace con los iones que conforman la capa *Stern* y la capa difusa. Este límite se conoce como plano *Slipping* y su correspondiente potencial se conoce como *potencial zeta* (**Figura 7**).

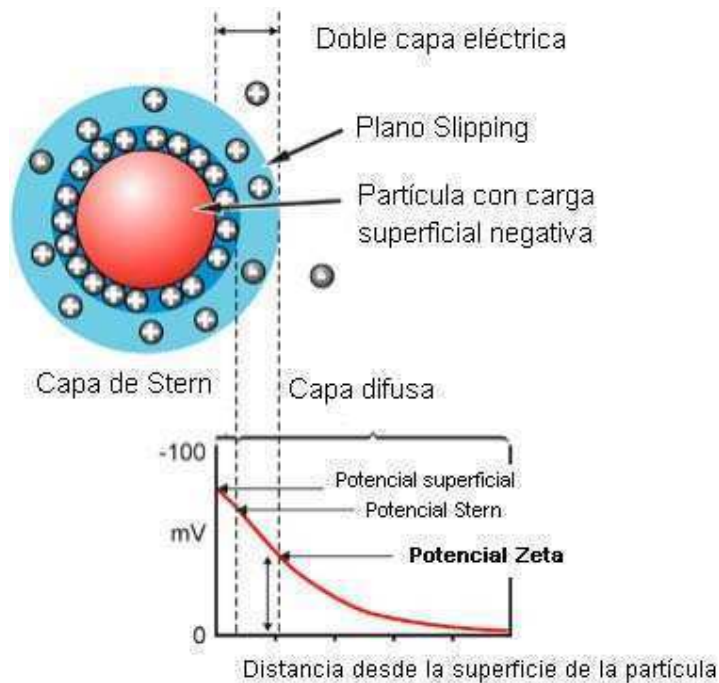


Figura 7. Esquema de una partícula cargada y la doble capa que la rodea (Malvern Instruments, 2001).

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal. Esta técnica es empleada ampliamente para determinar la estabilidad de sistemas coloidales líquidos ya que si todas las partículas en la suspensión tienen un potencial zeta negativo o positivo alto, entonces las mismas tenderán a repelerse evitando así la formación de flóculos o grandes agregados y la precipitación. Si las partículas tienen, en cambio, bajos valores de potencial zeta, las fuerzas que previenen que las partículas se acerquen serán más débiles y la tendencia a agregarse será mayor. Se considera que una suspensión es estable cuando tiene valores de potencial zeta mayores a 30 mV en valor absoluto (+30 mV o -30mV). El factor más importante que afecta el potencial zeta es el pH, especialmente cuando se estudian proteínas. A pH mayores al punto isoeléctrico, el potencial zeta es negativo, a pH menores al punto isoeléctrico es positivo y es cero en el punto isoeléctrico (**Figura 8**).

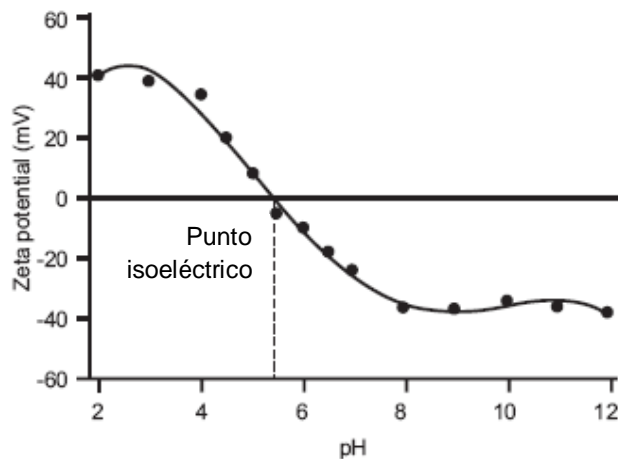


Figura 8. Variación del potencial zeta con el pH para una proteína (Malvern Instruments, 2001).

Una consecuencia importante de la existencia de cargas eléctricas en la superficie de la partícula es que éstas exhiben ciertos efectos cuando se aplica un campo eléctrico. El efecto que se analiza para la determinación del potencial zeta es la electroforesis (movimiento de una partícula cargada en el líquido en el cual está suspendida bajo la influencia de un campo eléctrico).

En la técnica de velocimetría por láser Doppler (LDV), la cual mide en un rango desde 5 nm a 10 μm , se aplica un voltaje a través de un par de electrodos ubicados a ambos extremos de una celda que contiene la dispersión de partículas (**Figura 6**). Las partículas cargadas son atraídas al electrodo de carga opuesta. Las fuerzas viscosas que actúan sobre las partículas tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas dos fuerzas opuestas, la partícula se mueve con una velocidad constante. Esta velocidad se mide y expresa por unidad de campo de fuerza como la movilidad electroforética μ_e . Luego, se calcula el potencial ζ mediante el software provisto por Malvern de acuerdo a la ecuación de Henry:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon F(ka)} \mu_e \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde ζ es el potencial zeta de la muestra, μ_e es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica del agua, $F(ka)$ es la función del parámetro adimensional ka , el cual es igual a 1.5 de acuerdo a la aproximación de Smoluchowski que es usualmente utilizada cuando el radio de la partícula es mucho más grande que la longitud en Debye de la doble capa eléctrica.

2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se estudiaron las transiciones térmicas a pH 3,0 y 6,0 de β -lg sola y sus mezclas con polifenoles mediante un calorímetro diferencial de barrido Mettler TA 4000. La concentración total de proteína, tanto en los sistemas de proteína sola como en los mixtos fue de 15 % p/v, mientras que la concentración de polifenol fue de 1% p/v.

Los termogramas y parámetros térmicos correspondientes a la desnaturalización proteica se obtuvieron mediante el software de análisis TA72. Previamente se calibró el equipo con Indio según *Ross & Karel (1991)*.

Las mediciones se llevaron a cabo en cápsulas de aluminio con una capacidad de 160 μl , herméticamente selladas, donde se colocó un volumen de 60 μl de solución. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde 5 a 100 $^{\circ}\text{C}$.

Los parámetros calorimétricos analizados fueron las temperaturas de inicio (T_o), y de pico (T_p) de desnaturalización.

La temperatura de inicio (T_o) se obtuvo de la intersección de la línea de base con la pendiente descendente de la curva al comenzar la transición térmica (*Class, Dalton & Hancock, 1999; Relkin, 1994*). La temperatura de pico (T_p) de la endoterma, que indica la temperatura aparente de desnaturalización de la proteína, se determina en el punto de máximo flujo calórico para las condiciones de corrida (**Figura 9**).

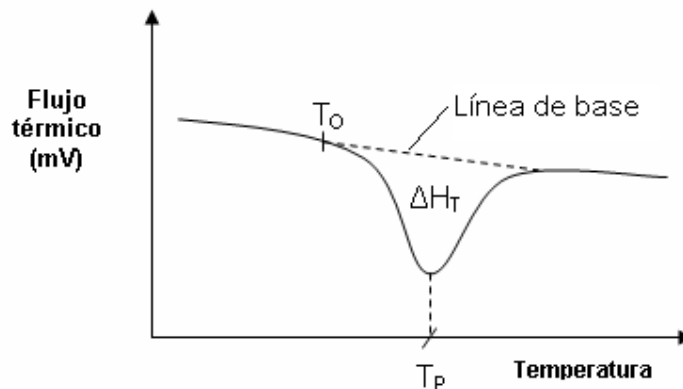


Figura 9. Curva del flujo térmico en función de la temperatura como termograma típico obtenido por el método de DSC y parámetros calorimétricos evaluados.

2.5. Determinación de polifenoles

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965). En el mismo se construye una curva de calibración con ácido gálico (AG) por lo que los resultados obtenidos de cada muestra son expresados como miligramos equivalentes de AG por litro de solución. Las muestras se diluyeron para obtener absorbancias dentro del rango de la curva de calibración y luego se agregaron en forma secuencial el reactivo de Folin-Ciocalteu (Reactivos Carlo Erba, Milán, Italia) y la solución saturada de Na₂CO₃. Luego de incubar las muestras durante 2 horas a 25 °C, se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, Metrolab 330 (Metrolab S.A, Buenos Aires, Argentina).

Para determinar el porcentaje de polifenoles precipitados en presencia de proteínas del lactosuero, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm para precipitar los complejos formados. Luego se determinaron los polifenoles remanentes en el sobrenadante (SN) utilizando el mismo método.

También se centrifugaron y se midieron soluciones de proteínas o WPC según el caso, para descontar cualquier interferencia en la absorbancia. El porcentaje de polifenoles precipitados se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Polifenoles precipitados (\%)} = \frac{\text{Polifenoles totales} - \text{polifenoles en el SN}}{\text{Polifenoles totales}} \times 100 \text{ (ecuación 3)}$$

2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Se realizaron electroforesis en condiciones disociantes de las soluciones de proteínas del lactosuero mediante el procedimiento general de Laemmli (1970) en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos). Todos los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis fueron de Bio Rad.

Las condiciones fueron las siguientes:

Volumen de siembra: 20 µl conteniendo 40 µg de proteína por calle.

Buffer de muestra: 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8); 25 % v/v de glicerol; 0,05 % p/v de azul de bromofenol; 2 % p/v de dodecil sulfato de sodio (SDS).

Buffer de corrida: 0,025 M de Tris-Base (pH 8,3); 0,192 M de glicina; 0,1 % p/v de SDS.

Gel separador: 1,5 M de Tris-HCl (pH 8,8); 15 % de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida); 0,1 % p/v de SDS.

Gel concentrador: 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8); 4 % de acrilamida (30 % p/v acrilamida; 0,8 % p/v de bisacrilamida); 0,1 % p/v de SDS.

La polimerización de los geles se inició por el agregado de 10 % p/v de persulfato de amonio y 0,5 % de N, N, N, 'N'-tetrametil-etilén-diamida (TEMED).

Temperatura: ambiente.

Voltaje: 200 V.

Corriente: 500 mA.

Las muestras fueron mezcladas en una proporción (1:4) con el buffer de siembra.

Las electroforesis tuvieron una duración aproximada de 45 minutos. Luego de terminada la corrida, se tiñeron los geles con una solución de Coomassie Blue R-250 (0,1 % p/v en una mezcla 4,5:4,5:1 metanol (CH₃OH):agua:ácido acético glacial (CH₃COOH)) y luego se destiñó con una mezcla 8:1:1 de metanol:ácido acético glacial:agua (*Bollag & Edelstein, 1991*).

El estándar (Bio-Rad) utilizado fue el siguiente (se informa el peso molecular (kDa) y la proteína a la que corresponde): 200 (miosina); 116 (β-galactosidasa); 97,1 (fosfolipasa B); 66 (sero albúmina bovina); 45 (ovoalbúmina); 31 (anhidrasa carbónica); 21,5 (inhibidor de tripsina); 14,5 kDa (lisozima) y 6,5 kDa (aprotinina).

2.7. Microscopía Confocal

Las soluciones de proteínas del lactosuero puras (6% p/v) y de las mezclas de proteínas (3% p/v)-polifenoles (1% p/v) se marcaron con 100 μ L del fluoróforo Rhodamina B (0,02% p/v) (longitud de onda de excitación 560 nm; emisión máxima 625 nm). Se colocaron alícuotas de 20 μ L de muestra sobre un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos (22 x 22 mm) y se observaron con un equipo de microscopia confocal modelo Olympus FV300 CLSM (microscopio vertical modelo Olympus BX61; fuente de luz láser de fotón Ar/HeNe). Se utilizaron los objetivos Olympus UplanFI 10X/0.3NA/medio seco y UplanFI 10X/0.5NA/medio seco.

Los archivos de las imágenes digitales se adquirieron en un formato multiple.tif con una resolución de 1024 x 1024 y 512 x 512 píxeles mediante un software de adquisición de imágenes FluoViewTM v3.3 (Olympus Corp.).

Principio de funcionamiento

La microscopía confocal es una técnica no invasiva que permite obtener información valiosa sobre la microestructura de los alimentos y otros materiales (Ding & Gunasekaran, 1998). La microscopía confocal brinda además una mayor claridad en las imágenes que la microscopía convencional y permite la generación de imágenes tridimensionales.

La técnica consiste en centrar uno o varios haces de luz láser (de diferentes longitudes de onda) en un punto particular del sistema analizado, excitando uno o más componentes de la muestra, mientras que los detectores miden la intensidad de la luz emitida por dichos componentes. De esta manera, se van generando imágenes bidimensionales al realizar mediciones en diferentes puntos en un plano x-y y luego combinando las mediciones de cada punto (barrido horizontal). Esto puede realizarse de dos maneras: o bien moviendo la muestra y manteniendo el láser estacionario, o bien moviendo dicho láser y manteniendo la

muestra estacionaria (método más utilizado). Luego, las imágenes tridimensionales se obtienen combinando distintas imágenes bidimensionales x-y, obtenidas al centrar el haz láser a diferentes profundidades en la muestra (**Figura 10**).

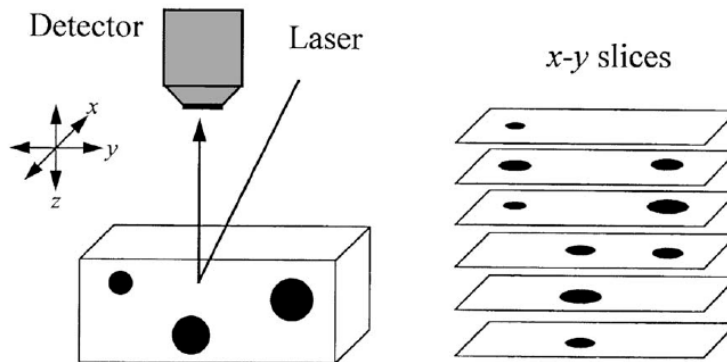


Figura 10. Esquema de la técnica de microscopía confocal (CSLM). Un haz de láser escanea la muestra dentro de un plano x-y particular. Mediante la combinación de sucesivos planos x-y, es posible crear una imagen tridimensional.

2.8. Cinética de precipitación

Para determinar la cinética de precipitación de los sistemas mixtos WPC35 (8% p/v)-polifenol (0,25-1% p/v), las muestras se colocaron en tubos graduados de 5 mL y se almacenaron a 20°C durante 8 días. El volumen de la fase superior resultante de la precipitación se determinó visualmente a lo largo del tiempo. Cada muestra se preparó por duplicado.

2.9. Reología Dinámica

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Paar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado (**Figura 11**). Se utilizó un sistema de platos paralelos (PP30/S) separados por un espacio (“gap”) de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,7 ml de muestra, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. La temperatura del plato inferior fue controlada mediante un sistema Peltier y un baño termostatzado (Viscotherm VT2, Paar Physica).



Figura 11. Reómetro oscilatorio con sistema de platos paralelos.

La muestra se cubrió con silicona líquida con el objetivo de prevenir la evaporación de agua y evitar la adherencia de la muestra.

Las mediciones se realizaron en la región viscoelástica lineal:

- (i) Frecuencia: 1 Hz
- (ii) Deformación: 0,01 %.

Las muestras fueron calentadas desde una temperatura inicial de 25°C hasta 90°C a una velocidad de 10°C/min. Luego se mantuvieron a 90°C durante 15 minutos y por último se disminuyó la temperatura de 90°C a 35°C a una velocidad de 25°C/min.

Se registró la evolución del módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G''), y la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$).

La $\tan \delta$ indica la viscoelasticidad relativa del material y fue calculada como la relación entre el módulo viscoso y el elástico:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{(ecuación 4)}$$

La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento es determinada por el punto de cruce entre el módulo viscoso (G'') y el elástico (G'), momento en el cual el ángulo de defasaje es de 45° y la $\tan \delta$ es igual a 1. Luego de este punto de cruce o "punto gel", G' asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de $\tan \delta$.

Los sistemas estudiados incluyen soluciones de β -lg sola (15% p/v), mezclas de β -lg (15% p/v) con polifenoles (0,25-1% p/v), WPC solo (30% p/v) y mezclas de WPC (30% p/v) con polifenoles (0,25-1% p/v), a diferentes pH entre 3,0 y 6,0.

En algunos casos se observó que la gelificación ocurría durante la etapa de calentamiento entonces pudo obtenerse la temperatura de gelificación (T_{gel}), sin embargo hubo casos en los que el cruce de G' y G'' ocurrió en la etapa de temperatura constante, entonces el parámetro obtenido fue el tiempo de gelificación (t_{gel}) a la temperatura de calentamiento (90 °C). Los valores informados son el promedio de dos determinaciones con una diferencia menor al 10 %. Una vez enfriado el gel a 25 °C se le realizó un barrido de frecuencia a una deformación de 1 %, entre 0,01 y 5 Hz.

2.10. Propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles

Se prepararon geles de WPC (30% p/v), β -lg (15% p/v) y de sus mezclas con polifenoles (0,25-1% p/v) en tubos cilíndricos de vidrio (diámetro 13 mm; altura 55 mm) conteniendo 4 ml de la respectiva muestra. Estas muestras se calentaron durante 20 minutos a $90 \pm 0,1^\circ\text{C}$ en un baño seco (Thermolyne Dry Bath modelo db 2812026). Luego se almacenaron a 4°C durante 24 hs. El análisis de perfil de textura (TPA, Texture Profile Analysis) se realizó a temperatura ambiente (25°C) en un analizador de textura (modelo TAXT2i, Stable Microsystems, Godalming, UK) utilizando una sonda cilíndrica (modelo P/36R; diámetro 36 mm).

El TPA es uno de los análisis realizados en el campo de la ingeniería de alimentos a fin de representar el comportamiento mecánico del alimento durante la masticación. Técnicamente el método consiste en que una muestra sólida o semisólida de aproximadamente 1cm de arista es comprimida 2 veces hasta como máximo un 80 % de su altura original. Las 2 compresiones representan 2 mordidas realizadas durante la masticación.

La **Figura 12** muestra una curva típica de fuerza (F) en función del tiempo (t), que se obtiene mediante el análisis de perfil de textura (TPA). Los principales parámetros que pueden obtenerse de estas gráficas son los siguientes,

Fracturabilidad: Fuerza máxima antes de producirse una caída en la curva de fuerza.

Dureza : Máxima fuerza de compresión en la primera mordida.

Adhesividad: Término representativo del área 3.

Elasticidad: Corresponde a la relación distancia 1/distancia 2.

Cohesividad: Razón entre las áreas 1 y 2.

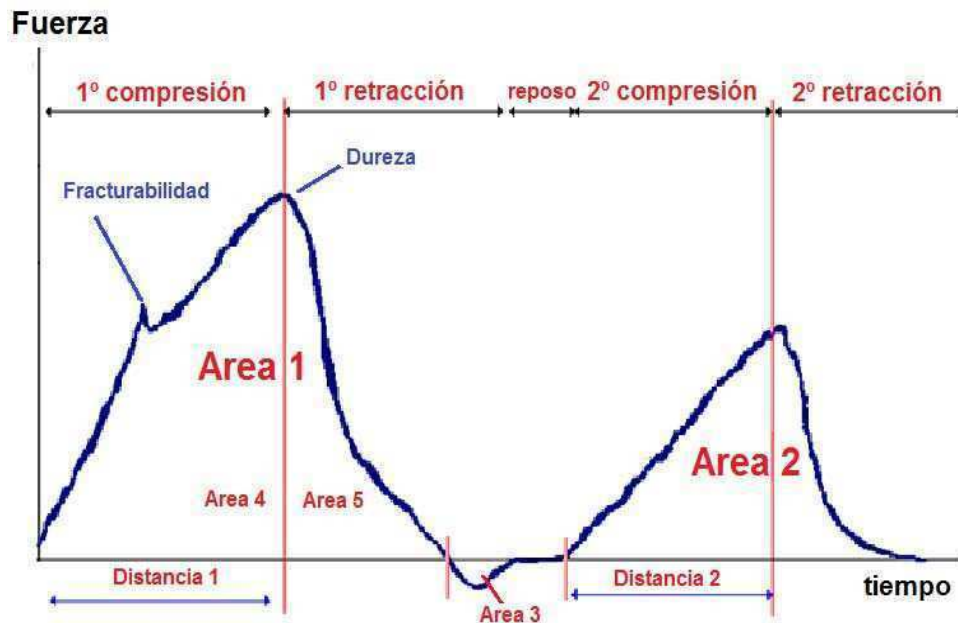


Figura 12. Diagrama de la curva Fuerza vs. Tiempo, obtenida en un TPA.

En este trabajo, los geles cortados en forma de cilindros de 13 mm de diámetro y 20 mm de altura, se comprimieron hasta un 20% de su tamaño a una razón de compresión de 0,5 mm/s. El ensayo se realizó por triplicado. Para cada muestra se determinaron los parámetros de dureza, adhesividad, elasticidad y cohesividad.

3. Referencias

- Bollag, D. M., & Edelman, S. J. (1991). Gel electrophoresis under denaturing conditions. In: D. M. Bollag, & S. J. Edelman, *Protein Methods* (pp. 95-141). New York: Wiley-Liss, Inc.
- Class, S. D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmacology Science and Technology Today*, 2(8), 311-319.
- Ding, K., & Gunasekaran, S. (1998). Three-Dimensional Image Reconstruction Procedure for Food Afficrrostructure Evaluation. *Artificial Intelligence Review*, 12, 245-262.
- Haque, Z. U., Casay, G. A., Wilson, W. W., Antila, P., & Antila, V. (1993). Effect of casein hydrolyzates on association properties of milk proteins as seen by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 203-207.
- Haque, Z. U., & Sharma, M. (1997). Thermal gelation of β -lactoglobulin AB purified from cheddar whey. 1. Effect of pH on association as observed by dynamic light scattering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2958-2963.
- Jachimska, B., Wasilewska, M., & Adamczyk, Z. (2008). Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility and viscosity measurements. *Langmuir*, 24, 6866-6872.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P. A., & Williamson, M. P. (2004). Astringency - A molecular model for polyphenol/protein binding. *Fibre Diffraction Review*, 12, 66-69.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-687.
- Lin, H.-C., Chen, P.-C., Cheng, T.-J., & Chen, R. L. C. (2004). Formation of tannin-albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical Biochemistry*, 325, 117-120.
- Malvern-Instruments Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. *Technical Note*, www.malvern.co.uk, 1-8.

Malvern-Instruments Protein characterization using dynamic and static light scattering. *Application Note*, www.malvern.co.uk, 1-4.

Mattison, K., Morfesis, A., & Kaszuba, M. (2003). A primer on particle sizing using dynamic light scattering. *Application Note, Malvern Instruments* www.malvern.co.uk, 1-3.

Mie, G. (1908). Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Annalen der Physik*, 25(3), 377-345.

Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J. L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20, 687-697.

Relkin, P. (1994). Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. *Thermochimica Acta*, 246, 371-386.

Ross, Y., & Karel, M. (1991). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49-53.

Simmons, M. J. H., Jayaraman, P., & Fryer, P. J. (2007). The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey proteins and its implications for milk fouling. *Journal of Food Engineering*, 79, 517-528.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Stepanek, P. (1993). Data analysis in light scattering. In: W. Brown, *Dynamic light scattering. The Methods and Some Applications* (pp. 177-241). London, UK: Clarendon Press.

Resultados

CAPÍTULO 1

Caracterización de la interacción entre proteínas del lactosuero y polifenoles de té verde y su efecto en la estabilidad coloidal

El objetivo de este capítulo fue estudiar las interacciones a nivel molecular entre las proteínas del lactosuero (β -lg, CMP y α -la-WPC) y polifenoles de té verde a diferentes valores de pH y su impacto en la estabilidad coloidal de los sistemas.

1.1. Introducción

Se sabe comparativamente poco sobre las interacciones de componentes fenólicos menores con los mayores constituyentes de los alimentos como las proteínas, aunque estas interacciones ocurran muy frecuentemente. Es más, las interacciones entre compuestos fenólicos y los constituyentes principales de los alimentos ocurren durante la preparación diaria de comidas y bebidas y, en algunos casos, las propiedades funcionales de los alimentos también pueden ser influenciadas. Se ha reportado que los polifenoles de té verde pueden interactuar con numerosas proteínas alimentarias como gelatina (He, Lv & Yao, 2006), gliadina, lisozima, papaína (Siebert, Troukhanova & Lynn, 1996), BSA (Frazier, Papadopoulou & Green, 2006; Hatano, Hori, Hemingway & Yoshida, 2003), β -lactoglobulina (Shpigelman, Israeli & Livney, 2010), α -lactoalbúmina (Prigent et al., 2009), β -caseína (Jöbstl, O'Connell, Fairclough & Williamson, 2004), y con enzimas digestivas como α -amilasa, pepsina, tripsina y lipasa (He et al., 2006).

En solución, los polifenoles como las catequinas pueden formar complejos insolubles (Liang & Xu, 2003) mediante la interacción con proteínas ricas en prolina como la β -caseína, la proteína más abundante de la leche. La afinidad de unión de los polifenoles por las proteínas aumenta con el tamaño molecular de los mismos (de Freitas & Mateus, 2001). Aquellos polifenoles más grandes, como los que están presentes en el té negro (teaflavinas, tearubiginas) debido a los procesos fermentativos de oxidación y polimerización de los monómeros de catequinas, son más propensos a unirse a las proteínas.

La formación de complejos proteína-polifenol puede dar lugar a partículas solubles o insolubles, resultando estas últimas en la formación de sedimentos. Muchos autores han propuesto modelos para explicar la formación de complejos proteína-polifenol y su precipitación (*Charlton et al., 2002; Jöbstl et al., 2004; Lin, Chen, Cheng & Chen, 2004; Poncet-Legrand et al., 2006; Richard, Lefeuvre, Descendit, Quideau & Monti, 2006; Siebert et al., 1996*). La mayoría de estos modelos proponen que los complejos de proteína y polifenol se forman por múltiples interacciones débiles (principalmente hidrofóbicas) entre las cadenas laterales de los aminoácidos y los anillos aromáticos de los polifenoles, indicando que la asociación de polifenoles con proteínas es principalmente un fenómeno de superficie. A veces estas interacciones pueden ser complementadas por enlaces puente hidrógeno, los cuales pueden jugar un rol importante en la estabilización de los complejos (*Frazier et al., 2006; Haslam, 1996*). La formación del complejo ocurre entonces debido al carácter hidrofóbico de ambas moléculas y en segundo lugar, cuando se da la posibilidad de formación de enlaces puente hidrógeno, éstos pueden estabilizar el complejo pero sin alterar las modificaciones fundamentales obtenidas en el primer paso (*Jöbstl et al., 2004; Richard et al., 2006*). Otros autores también proponen cambios en la conformación tridimensional de la proteína como procesos de desnaturalización y renaturalización, los cuales estarían acompañados por el complejamiento con el polifenol (*Hatano et al., 2003*). Debido a esto, la flexibilidad de la proteína en cuestión y el balance hidrofílico/hidrofóbico del polifenol resultarían parámetros a tener en cuenta a la hora de caracterizar la interacción de estas moléculas.

La capacidad de formación de complejos proteína-polifenol está entonces profundamente influenciada por la naturaleza de la proteína (secuencia y disponibilidad estérica de aminoácidos, tamaño y estructura molecular), la hidrofobicidad del polifenol (la cual aumenta con el número de anillos aromáticos) (*Poncet-Legrand et al., 2006*), la temperatura (*Prigent et al., 2003*) y la presencia de otros componentes como polisacáridos que puedan afectar la interacción (*de Freitas,*

Carvalho & Mateus, 2003). Con respecto al efecto del pH en dicha interacción, *Frazier et al. (2006)* mostraron que el pH no afecta la interacción entre la proteína seroalbúmina bovina y (-)-epicatequina. *Charlton et al. (2002)* sugirieron que las interacciones electrostáticas no son un factor principal en la formación de complejos entre polifenoles y proteínas. Es decir que los polifenoles se adsorben preferentemente de manera “no específica” a la superficie de las proteínas más que presentar uniones a receptores específicos.

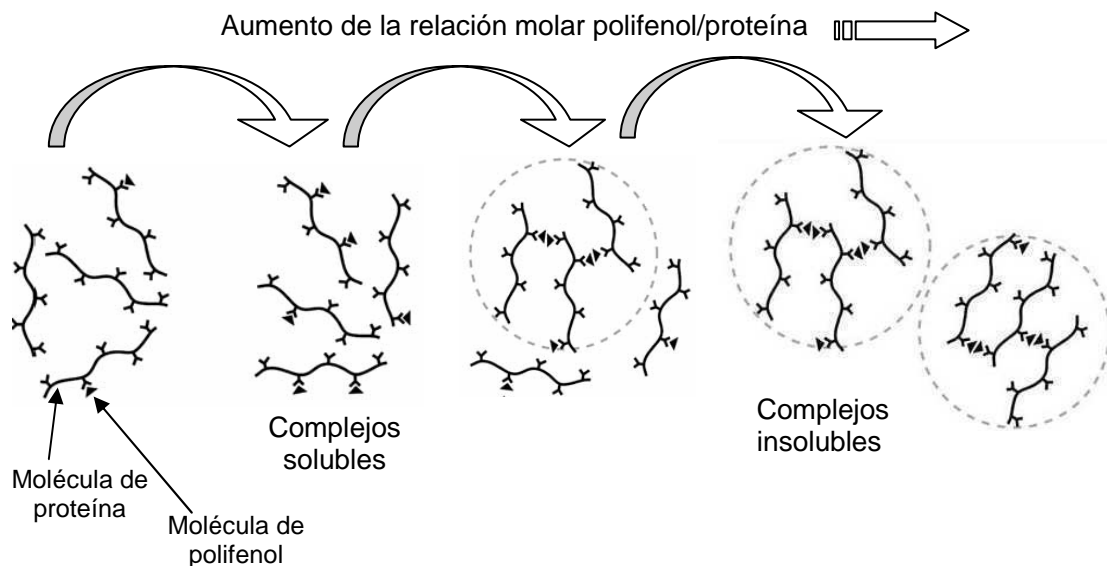


Figura 1.1. Representación esquemática de la formación de complejos insolubles en base a la relación molar polifenol/proteína. Adaptado de *Siebert et al. (1996)* y *Poncet-Legrand et al. (2006)*.

Los modelos propuestos por *Siebert et al. (1996)* y *Poncet-Legrand et al. (2006)* explican la solubilidad de los complejos en base a las concentraciones relativas de proteína y polifenol (**Figura 1.1**). Según estos modelos, la precipitación de los complejos ocurre entonces en un proceso de tres pasos. En un primer paso, los polifenoles se asocian de manera reversible con las proteínas para formar agregados solubles. En el segundo paso, cada proteína recubierta de polifenoles comienza a

unirse a otros complejos solubles, donde las interacciones débiles cooperativas intermoleculares también son llevadas a cabo por los polifenoles. Esto lleva a la insolubilidad de los complejos. Finalmente, la agregación espontánea de los agregados insolubles lleva a la separación de fases.

Los factores importantes que regulan la precipitación son la concentración relativa de proteína y polifenol, la composición del solvente, la fuerza iónica y el pH (*Naczka, Oickle, Pink & Shahidi, 1996; Poncet-Legrand et al., 2006; Prigent et al., 2009*).

La solubilidad de un material proteico describe la capacidad de formar soluciones coloidales y depende del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos. Por otro lado, el estado físico-químico de las moléculas de proteína también puede afectar su solubilidad, las mismas pueden ser alteradas por calentamiento, secado y condiciones de almacenamiento (*Pilosof, 2000*).

Como se introdujo previamente, la solubilidad de sistemas compuestos por proteínas y polifenoles estará afectada, entre otras cosas, por las concentraciones relativas de ambos compuestos. Se ha propuesto que la proteína en cuestión puede tener un número determinado de sitios de unión para los polifenoles y que cuando la concentración de polifenoles alcanza el nivel necesario, las proteínas quedan unidas entre sí por medio de los polifenoles formando grandes agregados que dispersan la luz y que son propensos a sedimentar (*Siebert et al., 1996*).

Naczka, Oickle, Pink & Shahidi (1996) evaluaron la precipitación de proteínas por parte de polifenoles de canola en función del pH y de la concentración de polifenoles y proteínas. Estos autores observaron que el pH óptimo para la precipitación de una dada proteína por los polifenoles ocurre cercano al punto isoeléctrico de la misma. Además, la precipitación dependía no sólo de la disponibilidad de grupos fenólicos no ionizados para la generación de puentes de hidrógeno con las proteínas sino también del tipo de proteína presente en la mezcla de reacción, dado que evaluaron diversas proteínas como BSA, gelatina, lisozima y pepsina.

Otro factor que afecta la solubilidad de estos sistemas es la fuerza iónica ya que a medida que aumenta la concentración de iones, aumenta la solubilidad de los complejos proteína-polifenol. Dos posibles explicaciones pueden darse: la adsorción o fijación de los iones, mayormente aniones cloruro, sobre las superficies hidrofóbicas de los polifenoles, lo cual restringiría las interacciones proteína-polifenol, en particular las uniones puente hidrógeno; o bien la fijación de los iones sobre la superficie de los complejos dando lugar a la formación de una monocapa iónica, lo que resultaría en complejos más hidrofílicos y por ende más solubles (*de Freitas et al., 2003*).

En general, la presencia de carbohidratos en la solución restringe la formación de agregados insolubles (*Luck et al., 1994; Ozawa, Lilley & Haslam, 1987*). Salvo para el caso del dextrano, para el cual la cantidad de agregados precipitados se mantiene constante o aumenta levemente, la adición creciente de otros carbohidratos como glucosa, goma arábica, pectina, ácido poligalacturónico, goma xántica y β -ciclodextrinas disminuye linealmente el porcentaje de agregados insolubles (*de Freitas et al., 2003*).

1.2. Distribución de tamaño de partícula de soluciones de β -lg y CMP

Las distribuciones de tamaño de partícula de soluciones de β -lg (3% p/v, pH 3,0, 4,5 y 6,0) basadas en la intensidad de luz dispersada se muestran en la **Figura 1.2 A**. A pH 3,0 y 4,5 las distribuciones son bimodales con picos predominantes de menor tamaño de 3,1 y 7,5 nm, respectivamente. La β -lg es muy sensible a los cambios de pH y la auto-asociación de esta proteína a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico está muy bien documentada en la literatura (*Hoffmann, Roefs, Verheul, van Mil & de Kruif, 1996; Majhi et al., 2006; Verheul & Roefs, 1998*). Como se mencionó en la Introducción, el punto isoeléctrico (pI) de la β -lg se encuentra entre 4,6 y 5,2,

dependiendo de la variable genética (Bromley, Krebs & Donald, 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat, Pongsawatmanit & McClements, 2006). Cercano al punto isoeléctrico, la β -lg se asocia formando principalmente tetrámeros y octámeros.

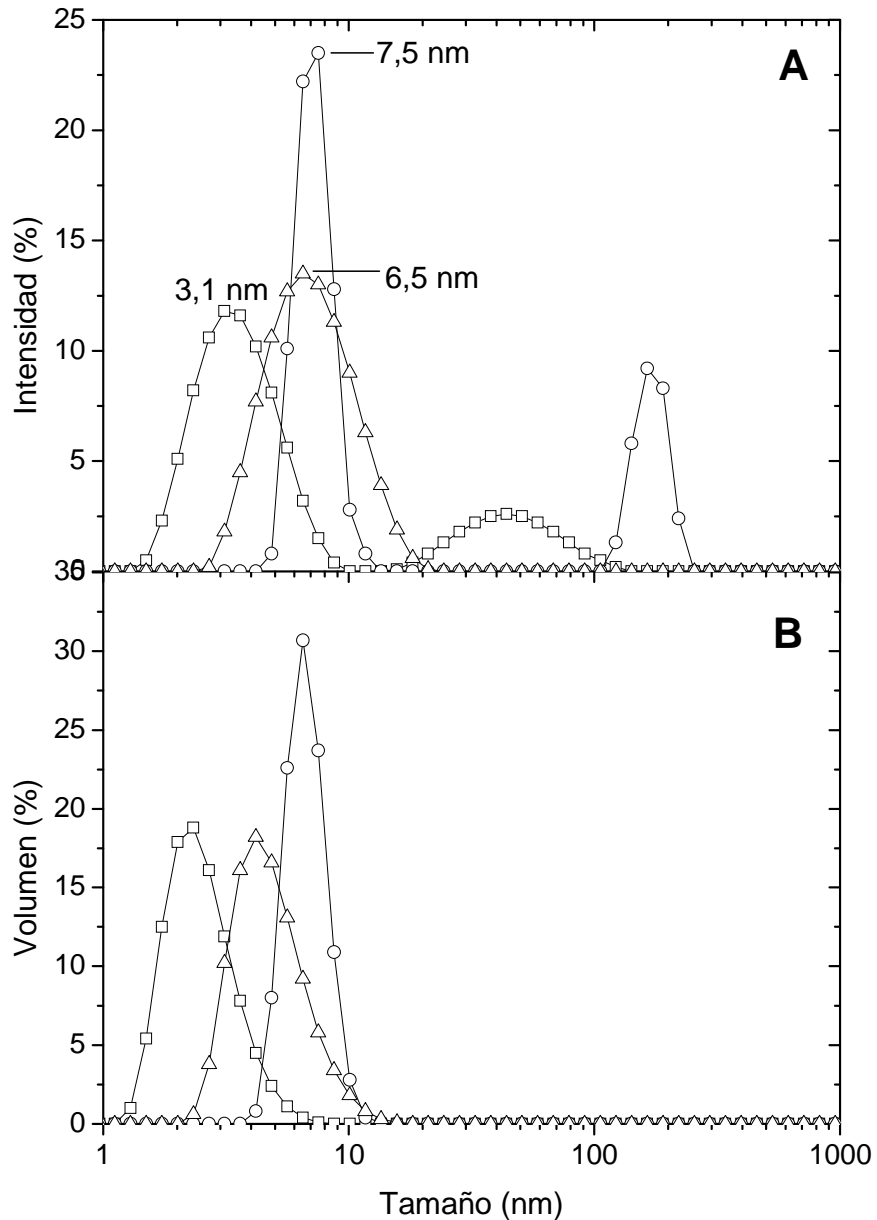


Figura 1.2. Distribuciones de tamaño en intensidad (A) y volumen (B) para soluciones de β -lg (3% p/v) a 25°C y pH 3,0 (\square), 4,5 (\circ) y 6,0 (Δ).

La forma octamérica tendría un peso molecular de 148,8 kDa, mientras que a la forma tetramérica le corresponden valores de entre 64 y 76,5 kDa, dependiendo del pH (Martinez, 2010). De acuerdo a la curva de calibración para proteínas globulares del equipo de medición de dispersión de luz láser Malvern Nano ZS, a estos PM le

corresponden diámetros hidrodinámicos, $d(H)$, de 10,1 nm para el caso de los octámeros y de 7 a 7,6 nm para el caso de los tetrámeros. Por lo tanto, el pico de 7,5 nm en la **Figura 1.2 A** correspondería a la forma tetramérica. *Jones, Decker y McClements (2009)* también observaron por DLS que la β -lg tiende a formar grandes agregados cuando el pH se reduce por debajo de 5,3.

La fuerza que conduce a la asociación de la proteína cerca de su punto isoeléctrico es probablemente una combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y atracciones electrostáticas localizadas entre grupos positivos de una proteína y grupos negativos de otra (*Harnsilawat et al., 2006*).

A pH 3,0, la β -lg existe como monómero, lo cual es consistente con el diámetro hidrodinámico del pico predominante de menor tamaño (3,1 nm) observado en la **Figura 1.2 A**. También aparecen agregados de aproximadamente 45 nm (pH 3,0) y 160 nm (pH 4,5), pero su número es despreciable como puede deducirse de las distribuciones de tamaño en volumen (**Figura 1.2 B**). A pH 6,0 se observa una sola población en el rango de 3 a 15 nm (**Figura 1.2 A**). El máximo de este pico fue de 6,5 nm, lo cual es consistente con la forma dimérica de la β -lg que predomina a pH neutro (*Martinez, 2010; Mc Kenzie & Sawyer, 1967*). Sin embargo, la población dentro del pico también incluiría monómeros y otras estructuras oligoméricas de β -lg, en menor proporción. *Griffin y Griffin (1993)* reportaron un diámetro hidrodinámico de 6,19 nm para la forma dimérica de la β -lg.

Las distribuciones de tamaño para las soluciones de CMP (3% p/v, pH 3,0, 4,5 y 6,0), basadas en la intensidad de luz dispersada (**Figura 1.3 A**), fueron bimodales con picos predominantes de menor tamaño en 5,6, 4,8 y 3,1 nm para pH 3,0, 4,5 y 6,0, respectivamente.

El PM del CMP depende del grado de glicosilación, siendo de aproximadamente 7 kDa para la forma aglicosilada (aCMP) y 11 kDa para la forma más glicosilada (gCMP) (*Kreuz, Krause & Kulozik, 2008*). La estimación del peso molecular del CMP realizada

con el software del equipo Nano-Zetasizer indica que las formas monoméricas del CMP deberían tener un $d(H)$ de aproximadamente 2,6 nm. Así, los $d(H)$ correspondientes a los picos en la **Figura 1.3 A** sugieren la predominancia de oligómeros de CMP (dímeros, trímeros y tetrámeros) a los valores de pH estudiados. En la **Figura 1.3 A** también se observan agregados de aproximadamente 100 nm a los tres pH evaluados. Sin embargo, su número es despreciable como puede deducirse de los gráficos de distribución de tamaño en volumen (**Figura 1.3 B**).

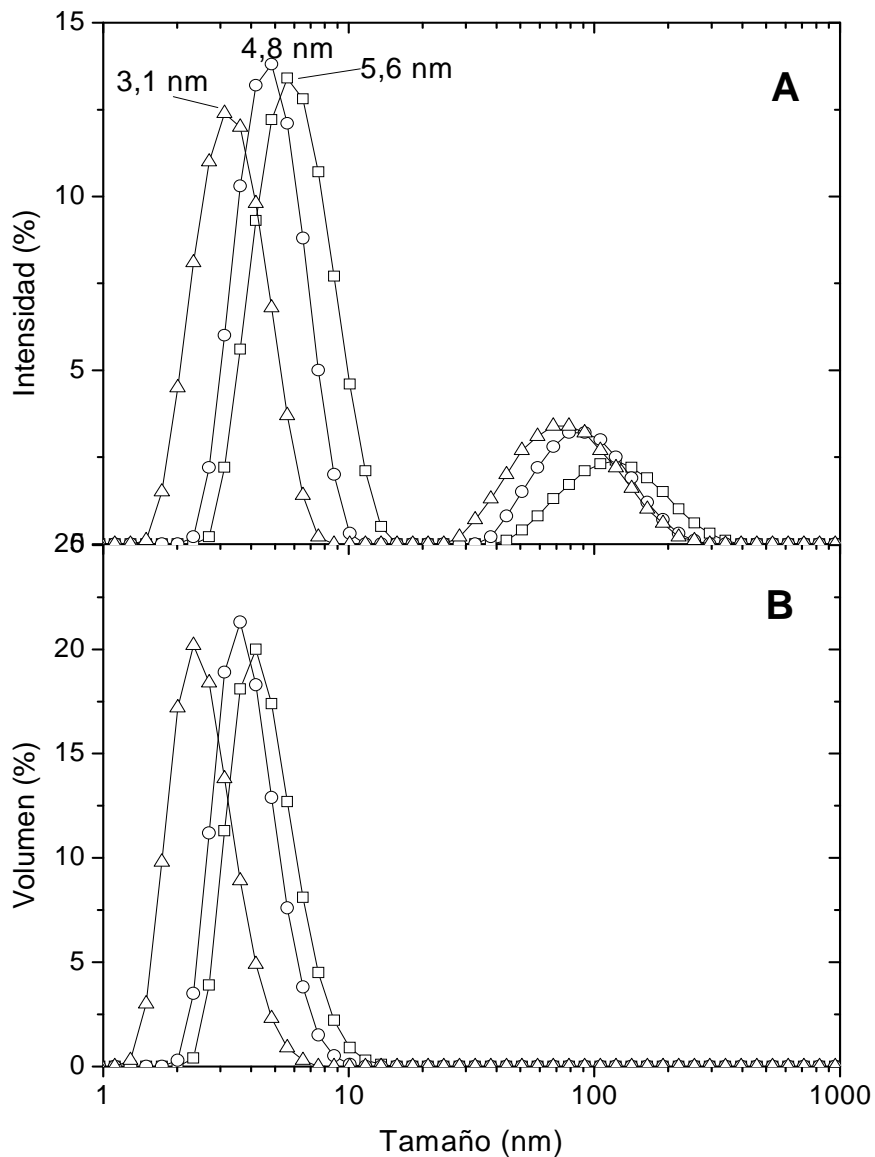


Figura 1.3. Distribuciones de tamaño en intensidad (A) y volumen (B) para soluciones de CMP (3% p/v) a 25°C y pH 3,0 (\square), 4,5 (\circ) y 6,0 (Δ).

Debido al efecto de la carga neta, el pH tiene una influencia muy importante sobre las interacciones entre las moléculas de CMP (*Kreuz, Strixner & Kulozik, 2009*) y por lo tanto sobre la distribución de tamaño en intensidad del CMP al ajustar el pH (**Figura 1.3**). El diámetro hidrodinámico del pico predominante de menor tamaño de la distribución de tamaño del CMP incrementó cuando el pH disminuyó de 6,0 a 3,0. De acuerdo con la estimación de peso molecular mediante el software del equipo Nano-Zetasizer, el corrimiento de los picos hacia tamaños mayores a valores de pH por debajo de 6,0 podría corresponder a formas auto-ensambladas de CMP como dímeros, tetrámeros, hexámeros y otros oligómeros. Recientemente, en un trabajo de *Farías, Martínez y Pilosof (2010)* se propone un modelo para explicar el auto-ensamblaje del CMP dependiente del pH así como su gelificación en frío. El CMP es afectado por los cambios de pH debido a que contiene dos residuos Asp, siete u ocho Glu (dependiendo de la variante genética), un fosfo-Ser y tres Lys. Adicionalmente, la presencia de ácido siálico (pK del ácido siálico es 2,2) en la forma glicosilada juega un rol importante en la carga neta del esqueleto aminoacídico. La mayoría de los dominios hidrofóbicos del CMP están enmascarados por la fuerte densidad de carga de los residuos Glu y Asp dentro de un amplio rango de pH básico y neutro, tanto para la fracción glicosilada (gCMP) como para la no glicosilada (aCMP), por lo que estos dominios hidrofóbicos no pueden interactuar. Cuando el pH disminuye por debajo de 6,0, las cargas negativas comienzan a disminuir y permiten que los dominios hidrofóbicos comiencen a interactuar fuertemente. El mecanismo de autoensamblaje del CMP se muestra en la **Figura 1.4**. El primer paso de auto-ensamblaje del CMP conlleva a la formación de dímeros, los cuales son estables a ulteriores cambios de pH. El segundo paso de auto-ensamblaje ocurre mediante interacciones electrostáticas por debajo de pH 4,5 entre los dímeros del aCMP que poseen una carga neta positiva y el gCMP que se encuentra cargado negativamente. A pH 4,0 el gCMP llega a su estado isoeléctrico (*Kreuz et al., 2009*); sin embargo, debido al bajo pK de los residuos de ácido siálico, se localizan cargas negativas en los grupos

glicosilados hasta pH 2,2, lo que permite que puedan seguir interactuando con cargas positivas. Así el auto-ensamblaje mediante uniones electrostáticas puede proceder en el rango de pH 2-4,5 y eventualmente llevar a la gelificación a temperatura ambiente (Farías et al., 2010).

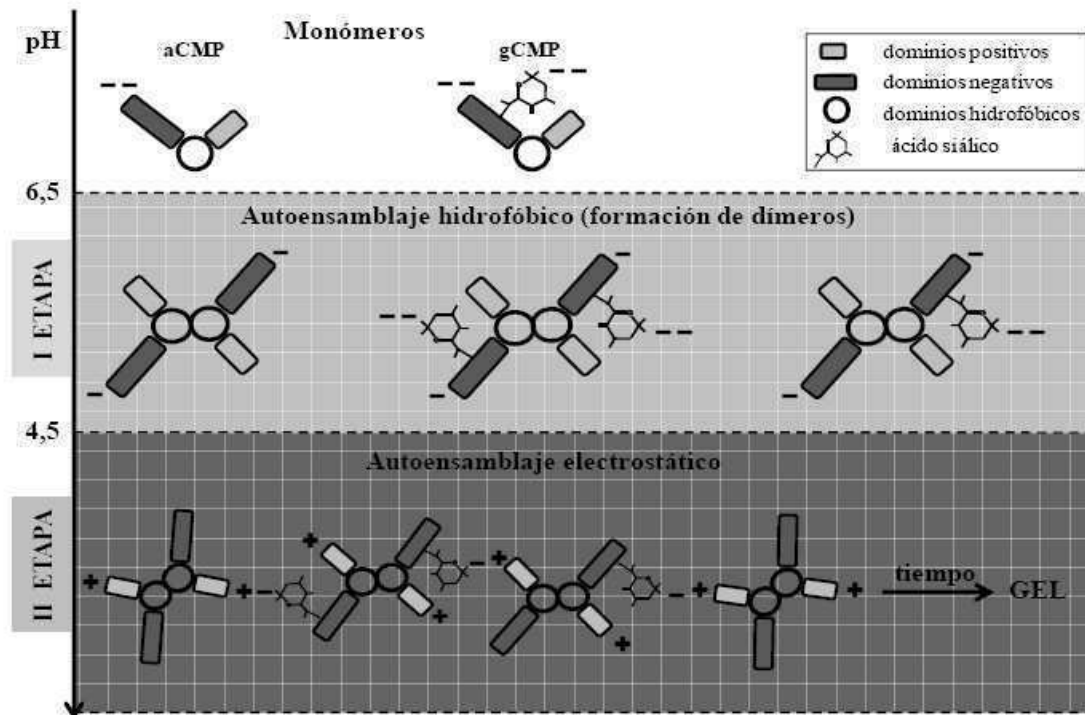


Figura 1.4. Esquema del modelo propuesto para explicar el autoensamblaje de CMP dependiente del pH y la formación de geles a temperatura ambiente (Farías et al., 2010).

1.3. Distribución de tamaño de partícula en mezclas de proteínas del lactosuero y polifenoles

Los polifenoles puros no pueden ser caracterizados por DLS porque son moléculas muy pequeñas ($PM < 500$) y dan soluciones coloreadas. Las mezclas de polifenol-proteína debieron diluirse para poder determinar el tamaño de partícula dado que en DLS no se pueden analizar suspensiones opacas. Esto conlleva un cambio en el grado de agregación ya que los tamaños de los agregados pueden ser afectados por la

concentración total del sistema aún cuando la relación polifenol/proteína se mantenga igual.

Tan pronto como las muestras se diluyeron se volvieron traslúcidas. Esto se debería al propio efecto de dilución o a que el proceso de agregación es dependiente de la concentración y tiene un carácter reversible. Los polifenoles se unen inicialmente de forma reversible y relativamente débil a cada sitio de unión (Charlton *et al.*, 2002).

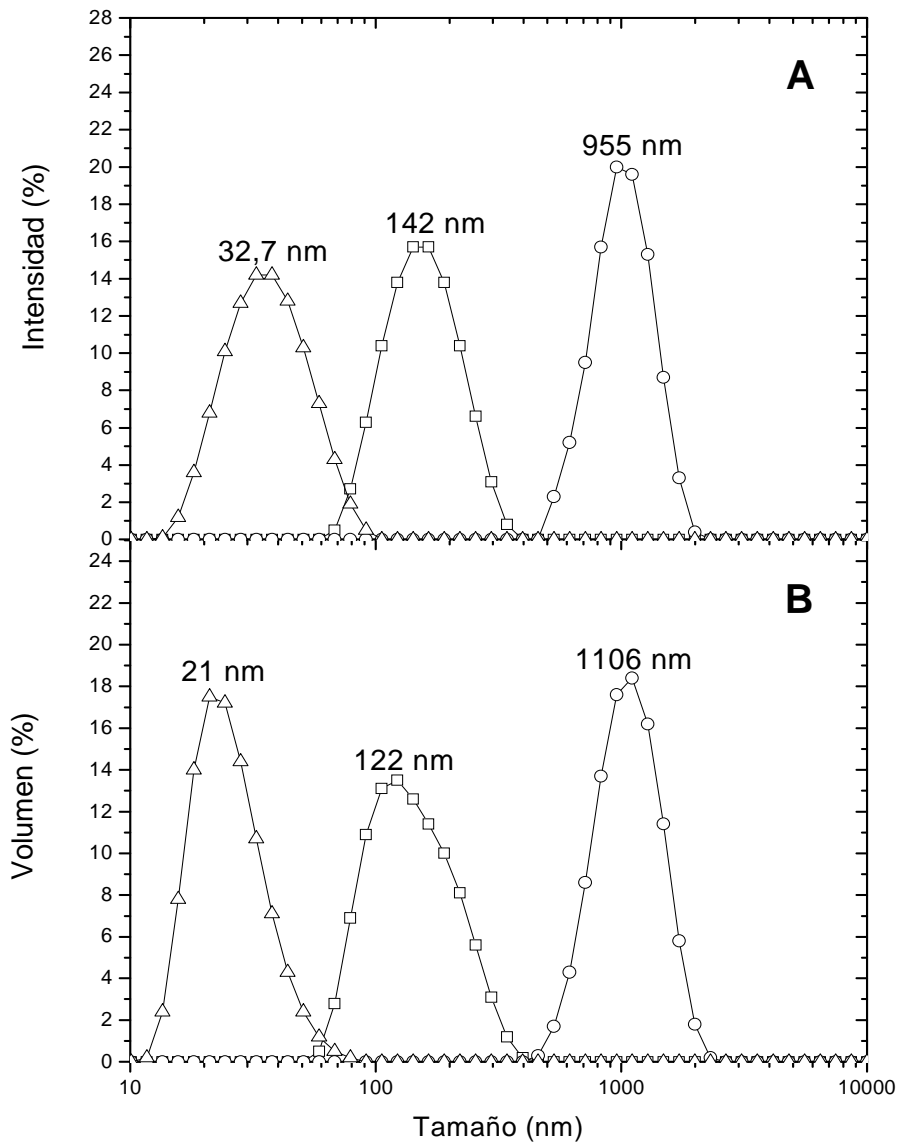


Figura 1.5. Distribuciones de tamaño en intensidad (A) y volumen (B) para mezclas de β -Ig (0,3% p/v) y polifenol (0,1% p/v) a 25°C y pH 3,0 (\square), 4,5 (\circ) y 6,0 (Δ).

Las distribuciones de tamaño en intensidad de las mezclas de β -Ig (0,3% p/v)-polifenol (0,1% p/v) a pH 3,0, 4,5 y 6,0 se muestran en la **Figura 1.5 A y B**. Puede verse que

las mismas son monomodales con máximos de pico a 32,7 nm a pH 6,0, 142 nm a pH 3,0 y 955 nm a pH 4,5. Estos valores son mucho mayores que los correspondientes a la β -lg (**Figura 1.2**) por lo cual corresponden a agregados o complejos proteína-polifenol. Además se observa que la proteína presente pasó mayoritariamente a formar parte de los agregados con el polifenol ya que el pico correspondiente a la β -lg sola ya no es visible ni siquiera en la distribución en volumen (**Figura 1.5 B**). Los agregados más grandes se formaron a pH 4,5, el cual es cercano al punto isoeléctrico de la β -lg.

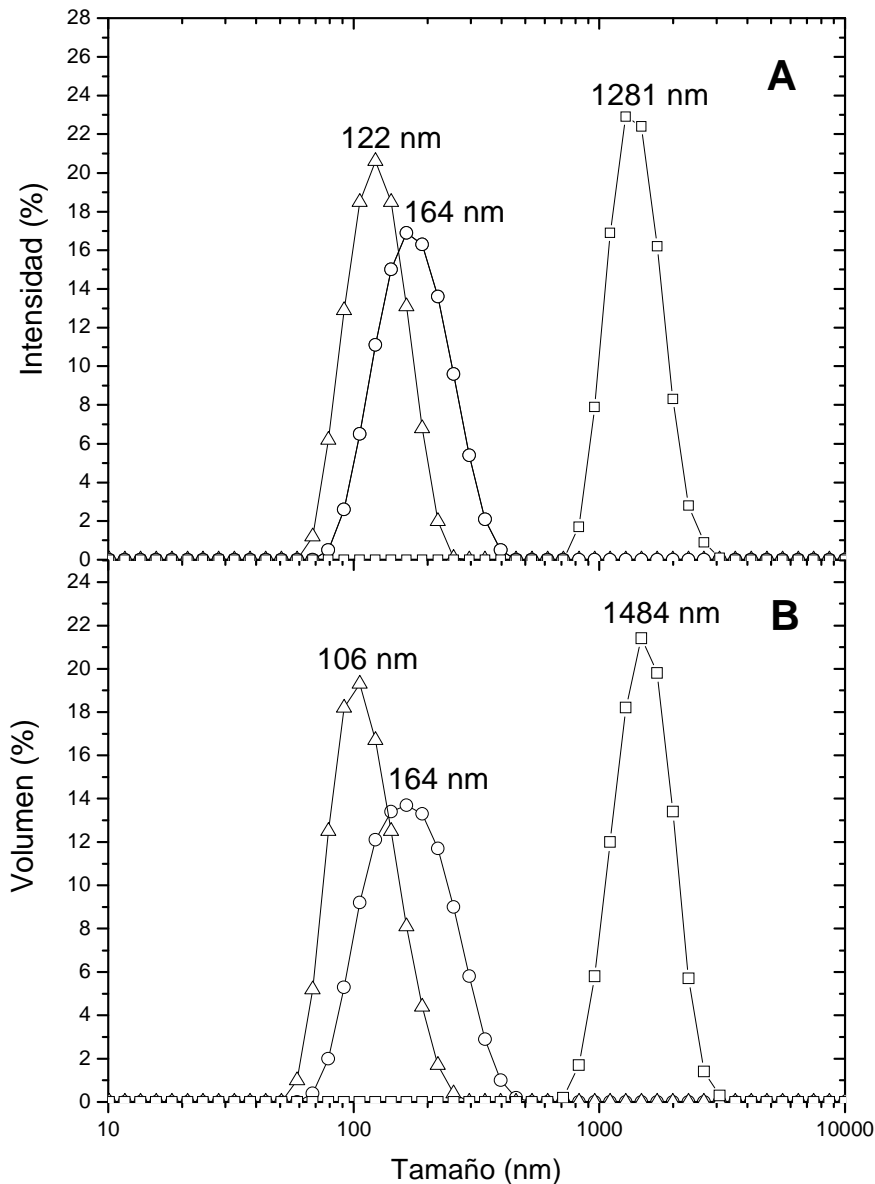


Figura 1.6. Distribuciones de tamaño en intensidad (A) y volumen (B) para mezclas de CMP (0,3% w/v) y polifenol (0,1% p/v) a 25°C y pH 3,0 (□), 4,5 (○) y 6,0 (Δ).

La **Figura 1.6 A y B** muestra las distribuciones de tamaño en intensidad y volumen para los sistemas mixtos de CMP (0,3% p/v)-polifenol (0,1% p/v) afectados por el pH. Al mezclar el CMP con los polifenoles, se observó una distribución monomodal para los tres valores de pH evaluados. El pico correspondiente al CMP puro (**Figura 1.3**) ya no se observa ni en las distribuciones de tamaño en intensidad ni en las de volumen, sugiriendo que el CMP pasó a formar parte de los complejos. Estas distribuciones presentaron picos con máximos en 1281, 164 y 122 nm para los valores de pH de 3,0, 4,5 y 6,0, respectivamente. El mayor tamaño se observó a pH 3,0 cercano al pI del CMP.

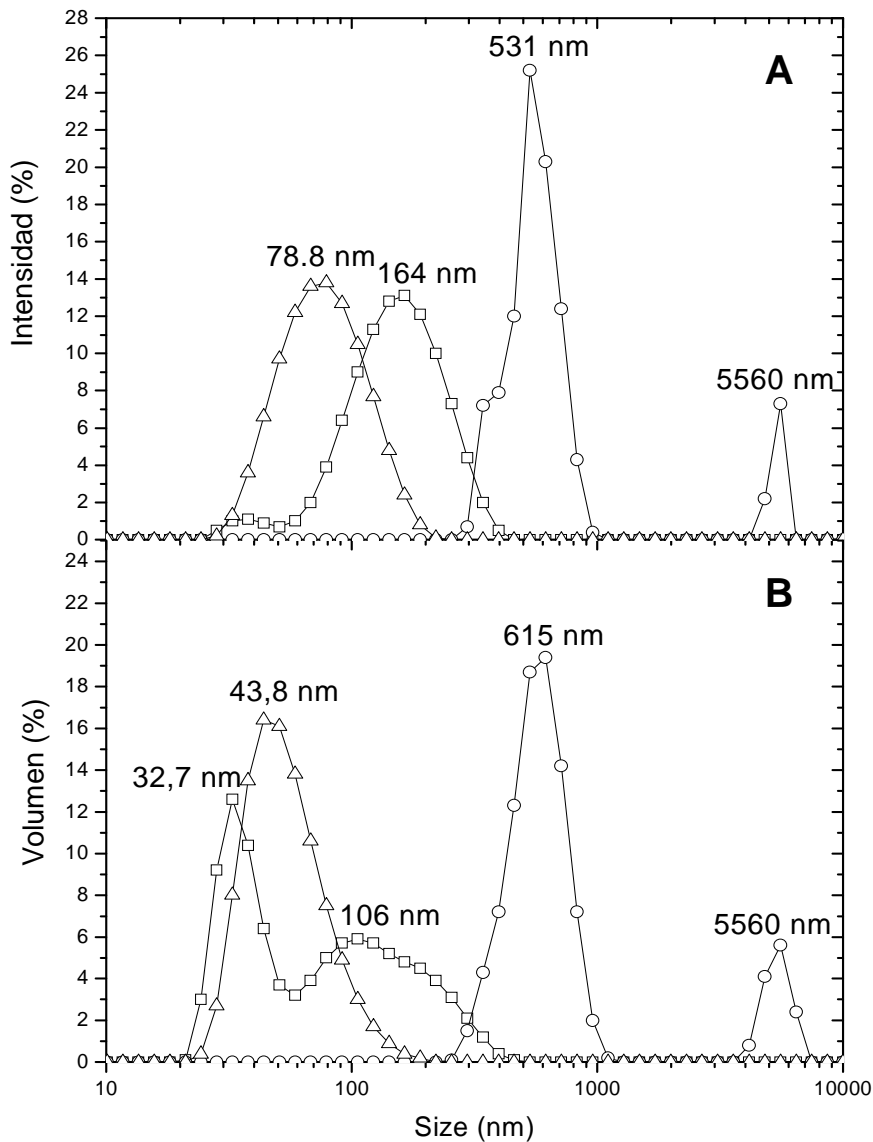


Figura 1.7. Distribuciones de tamaño en intensidad (A) y volumen (B) para mezclas de α -la-WPC (0,3% p/v) y polifenol (0,1% p/v) a 25°C y pH 3,0 (□), 4,5 (○) y 6,0 (Δ).

La **Figura 1.7 A** y **B** muestra las distribuciones de tamaño para las mezclas de α -la-WPC (0,3% p/v) y polifenol (0,1% p/v) afectadas por el pH. Allí también se observa la formación de complejos. Los agregados de mayor tamaño fueron aquellos formados a pH 4,5, el cual es un pH cercano al punto isoeléctrico de la α -la y de β -lg, donde la agregación está promovida debido a la disminución de la repulsión electrostática. Cabe destacar que α -la-WPC es un WPC enriquecido en α -la (45%), pero contiene también β -lg. A pH 3,0 se observa una distribución bimodal para este sistema mixto pero los agregados más grandes (164 nm) son muy pocos en número como puede verse en la distribución de tamaño en volumen (**Figura 1.7 B**). Los agregados más pequeños (32,7 nm) se observan mejor en la distribución de tamaño en volumen debido a que son enmascaradas por las partículas de mayor tamaño en la señal de intensidad. A pH 6,0 se observa una distribución de tamaño monomodal con un máximo a 78,8 nm.

La **Figura 1.8** muestra el diámetro hidrodinámico promedio (Z_{av}) para las mezclas de polifenol-proteínas del lactosuero a pH 3,0, 4,5 y 6,0 de manera de comparar los tamaños promedio de los agregados formados con cada proteína. Cercano al punto isoeléctrico de cada proteína, el potencial de agregación de los polifenoles fue máximo. A pH 6,0 las tres proteínas formaron los agregados de menor tamaño.

Si bien el tamaño de los complejos proteína-polifenol varía con el pH, debe destacarse que las proteínas fueron complejadas por los polifenoles a todos los pH estudiados. Esto coincide con datos previos de *Frazier et al. (2006)*, quienes mostraron que el pH no afecta la interacción entre la proteína seroalbúmina bovina y (-)-epicatequina; y por *Charlton et al. (2002)*, quienes sugirieron que las interacciones electrostáticas no son un factor principal en la formación de complejos y proteínas.

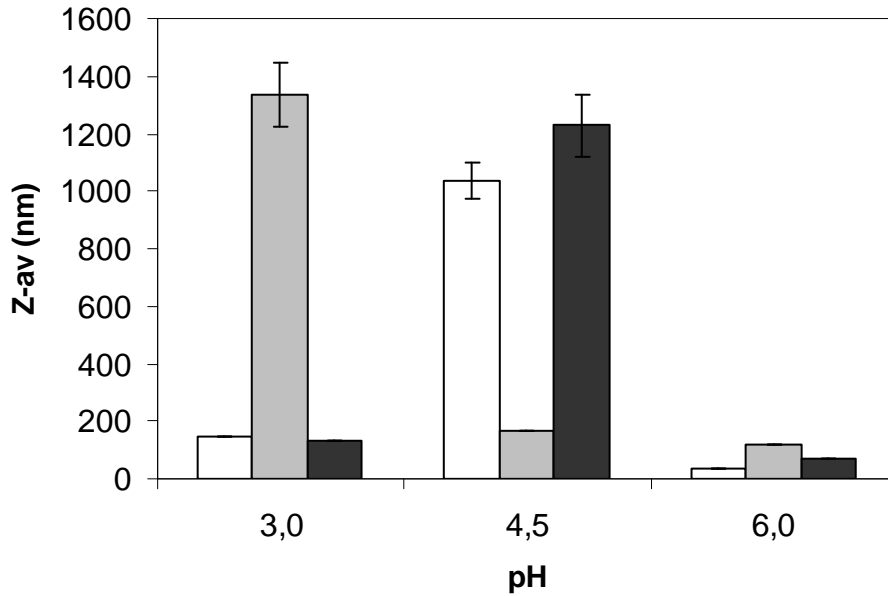


Figura 1.8. Diámetro hidrodinámico promedio (Z_{av}) en función del pH a 25°C. Los sistemas mixtos proteína-polifenol tienen concentraciones finales de 0,3% (p/v) y 0,1% (p/v), respectivamente. Barra blanca (β -lg), barra gris (CMP) y barra negra (α -la-WPC).

1.4. Potencial zeta

Las **Figuras 1.9, 1.10 y 1.11** muestran el potencial ζ de las proteínas del lactosuero (0,3% p/v) con y sin polifenoles (0,1% p/v) en función del pH. De las curvas correspondientes a las proteínas solas pudieron estimarse los puntos isoeléctricos de las mismas cuando el potencial ζ es igual a cero, siendo 5,1, 3,6 y 4,3 para β -lg, CMP y α -la-WPC, respectivamente. Los valores reportados para β -lg se encuentran entre 4,6 y 5,2, mientras que para α -la están entre 4,2 y 4,5, ambas dependiendo de la variante genética (*Barnett & Bull, 1960; Bromley et al., 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat et al., 2006; Haug, Skar, Vegarud, Langsrud & Draget, 2009; Townend, Herskovits, Swaisgood & Timasheff, 1964*). Estos datos están de acuerdo con la estimación del presente trabajo (**Figuras 1.9 y 1.11**).

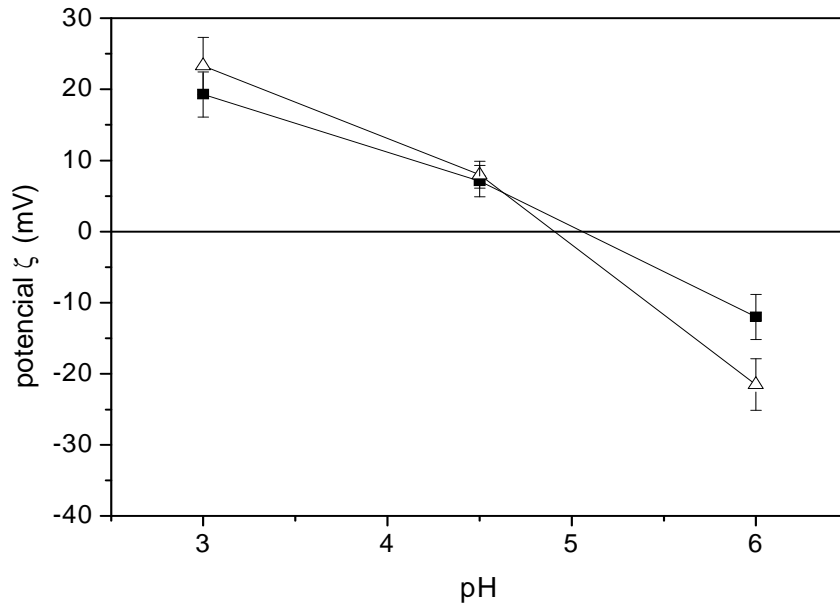


Figura 1.9. Potencial ζ en función del pH a 25°C para β -lg (0,3% p/v) pura (■) y mezclas de β -lg (0,3% p/v)-polifenoles (0,1% p/v) (Δ).

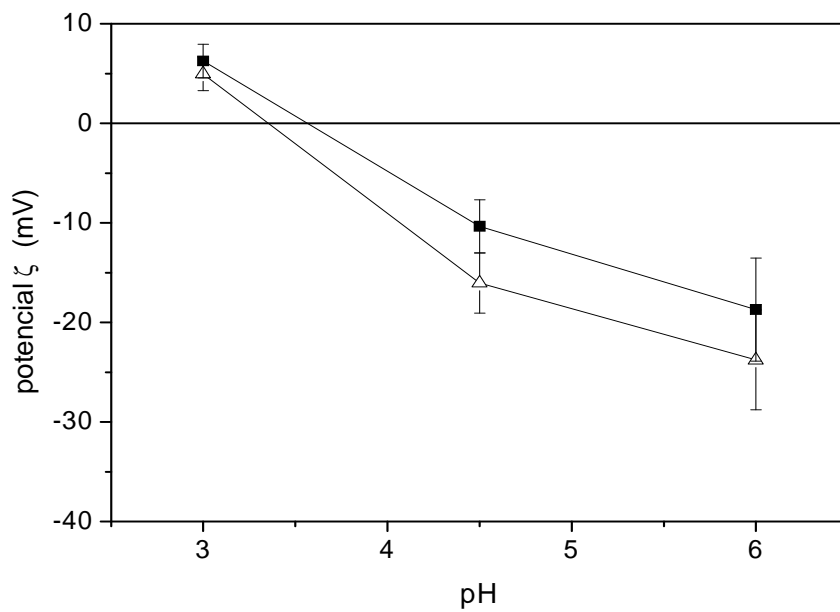


Figura 1.10. Potencial ζ en función del pH a 25°C para CMP (0,3% p/v) puro (■) y mezclas de CMP (0,3% p/v)-polifenoles (0,1% p/v) (Δ).

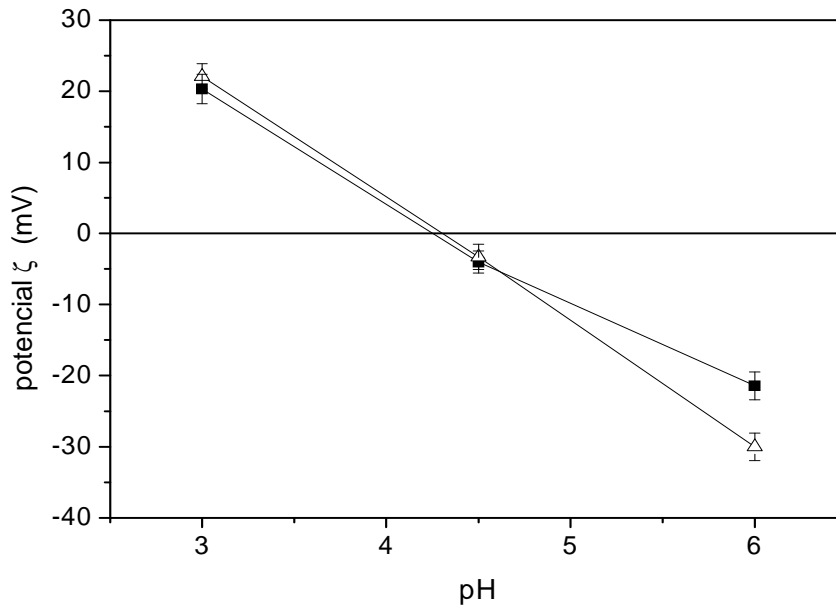


Figura 1.11. Potencial ζ en función del pH a 25°C para α -la-WPC (0,3% p/v) pura (■) y mezclas de α -la-WPC (0,3% p/v)-polifenoles (0,1% p/v) (Δ).

El CMP es un péptido heterogéneo debido a las variantes genéticas y a los distintos grados de glicosilación. Las formas glicosiladas y fosforiladas del CMP (gCMP) representan alrededor de un 50% del CMP total. El punto isoeléctrico de la forma no glicosilada es cercano a 4,1, mientras que el pI de la forma glicosilada es 3,15 ya que la carga negativa de los residuos de ácido siálico (el carbohidrato predominante; pK del ácido siálico: 2,2) reduce la carga neta de la cadena de aminoácidos (Kreuz *et al.*, 2009). Así, el valor experimental obtenido (3,6) se encuentra entre estos valores de pI (Figura 1.10), reflejando la existencia de ambas formas, aCMP y gCMP, en el aislado proteico utilizado en el presente estudio.

La adición de polifenoles afectó muy poco el potencial ζ de cada proteína como podría esperarse debido a su naturaleza fenólica. Se han reportado valores de pKa de las catequinas (polifenoles mayoritarios presentes en el té verde) que se encuentran entre 7,6 y 8,5, debido a la desprotonación de sus grupos hidroxilo (Muzolf, Szymusiak, Gliszczynska-Swiglo, Rietjens & Tyrakowska, 2008). Así, las mezclas de proteínas del lactosuero y polifenoles presentaron valores de potencial ζ similares a las proteínas

puras, indicando que las proteínas retienen sus grupos funcionales cargados y confirmando la naturaleza hidrofóbica de la interacción polifenol-proteína.

1.5. Estabilidad coloidal de mezclas polifenol-proteína

Al mezclar las proteínas y los polifenoles, la formación de agregados insolubles comienza inmediatamente, pero la separación de fases es dependiente del tiempo. Por lo tanto, la separación de fases se aceleró por centrifugación. Sin embargo, como la precipitación no es un fenómeno absoluto, algunos complejos pueden quedar solubles. En el sobrenadante, luego de centrifugar las mezclas de proteína (3% p/v) y polifenol (1% p/v) a pH 3,0, 4,5 y 6,0, se determinó la cantidad de polifenoles a fin de evaluar el porcentaje de polifenol que precipita con las proteínas (**Tabla 1.1**), y las proteínas que permanecieron en el sobrenadante mediante SDS-PAGE.

Tabla 1.1. Polifenoles precipitados (% promedio \pm desvío estándar) con proteínas del lactosuero a diferentes valores de pH luego de almacenamiento (24 horas) y posterior centrifugación. Composición de las mezclas: 3% (p/v) de proteína y 1% (p/v) de polifenol.

| | pH 3,0 | pH 4,5 | pH 6,0 |
|------------------|------------|------------|------------|
| α -la-WPC | 15 \pm 4 | 84 \pm 1 | 77 \pm 3 |
| β -lg | 23 \pm 1 | 77 \pm 1 | 7 \pm 1 |
| CMP | 60 \pm 1 | 32 \pm 2 | 2 \pm 1 |

Las bandas correspondientes a las proteínas del lactosuero (β -lg, CMP y α -la-WPC) en los geles SDS-PAGE, en el sobrenadante, en ausencia y presencia de polifenoles de té verde a pH 3,0, 4,5 y 6,0 se muestran en las **Figuras 1.12, 1.13 y 1.14**, respectivamente. Es posible observar en la calle **A**, correspondiente a la α -la-WPC la presencia de α -la (14,2 kDa) y cantidades apreciables de β -lg (18,3 kDa). En la calle **B**, correspondiente a β -lg, la banda mayoritaria corresponde a β -lg. En ambas calles, **A**

y **B**, también están presentes proteínas minoritarias del lactosuero. La calle **C**, correspondiente a CMP, presentó una banda mayoritaria irregular de 23-28 kDa la cual corresponde a formas agregadas de CMP (Nakano, Ikawa & Ozimek, 2007) y una banda minoritaria ubicada entre la aprotinina (6,5 kDa) y la lisozima (14,4 kDa), correspondiente a la forma monomérica del CMP (Farías et al., 2010). La amplitud e irregularidad de la banda mayoritaria ha sido atribuida a las variaciones en el grado de glicosilación del CMP (Nakano & Ozimek, 2000; Silva-Hernández, Nakano & Ozimek, 2002). Sin embargo, la concentración real del CMP monomérico podría ser mucho mayor que la que es aparente a partir de la densidad de las bandas debido a la baja afinidad del Coomassie Blue por el CMP (Farías et al., 2010).

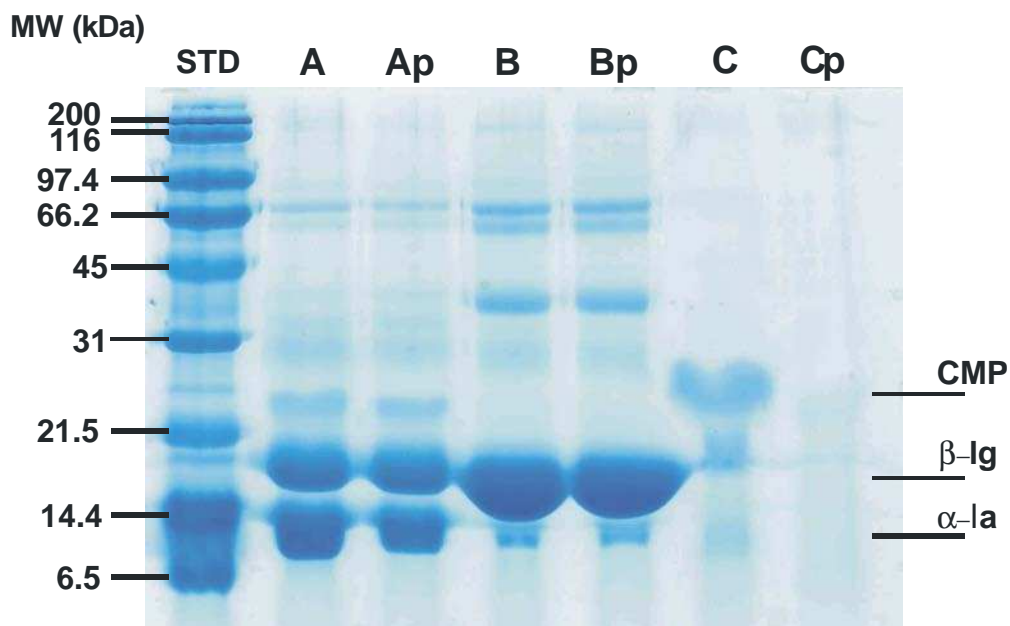


Figura 1.12. SDS-PAGE de los sobrenadantes de muestras incubadas a pH 3,0. (STD) estándar de peso molecular de proteínas, (A) WPC enriquecido en α -la, (Ap) mezcla de polifenol-WPC enriquecido en α -la, (B) β -lg, (Bp) mezcla de polifenol- β -lg, (C) CMP, (Cp) mezcla de polifenol-CMP.

En presencia de polifenoles a pH 3,0, se observó una leve precipitación (15 y 23%) de los polifenoles en las mezclas con β -lg y α -la-WPC (**Tabla 1.1**), lo cual está relacionado con la poca variación en la intensidad de las bandas de la **Figura 1.12** (calles **Ap** y **Bp**). El bajo grado de precipitación puede ser atribuido a la alta carga neta

superficial (>20 mV) de los complejos de proteína-polifenol (**Figuras 1.9 y 1.11**) lo cual previene que estas partículas se asocien en grandes agregados. *Naczki, Oickle, Pink y Shahidi (1996)* mostraron que el pH óptimo para la precipitación de proteínas por parte de los polifenoles ocurre cercano a su punto isoeléctrico.

A pH 3,0 las mezclas de CMP-polifenol se separaron en fases muy rápidamente, aún antes de la centrifugación. Como puede verse en la electroforesis, las bandas correspondientes al CMP ya no son más visibles en la calle **Cp** (**Figura 1.12**). Sin embargo, un 40% de los polifenoles totales presentes en la muestra se mantuvieron solubles en el sobrenadante (**Tabla 1.1**) lo cual indica que se necesita menos de un 1% (p/v) de polifenoles para precipitar el CMP (3% p/v) a pH 3,0. Esta gran precipitación puede ser relacionada con el hecho de que a pH 3,0 los agregados formados tienen un potencial ζ muy cercano a la neutralidad (**Figura 1.10**) lo que permite que se formen grandes agregados que precipitan.

A pH 4,5 se observó una fuerte precipitación de los polifenoles tanto para α -la-WPC-polifenol como para β -lg-polifenol y en menor medida para las mezclas de CMP-polifenol (**Tabla 1.1**). Esto concuerda con lo observado en la **Figura 1.13**, donde las bandas correspondientes a α -la desaparecieron casi completamente (calle **Ap**) y las de β -lg se redujeron notablemente (calle **Bp**), mientras que las de CMP disminuyeron sólo levemente en intensidad (calle **Cp**). A pH 4,5, cercano al punto isoeléctrico de los complejos de β -lg-polifenol y α -la-WPC-polifenol (**Figuras 1.9 y 1.11**), la carga neta de estos complejos es mínima y las interacciones entre las partículas promueven la rápida separación de fases. Por el contrario, los complejos CMP-polifenol poseen una carga neta negativa moderada (-16 mV) a este pH (**Figura 1.9**), lo cual produce repulsión entre las partículas y, por ende, una mínima precipitación luego de la centrifugación (**Figura 1.13, calle Cp**).

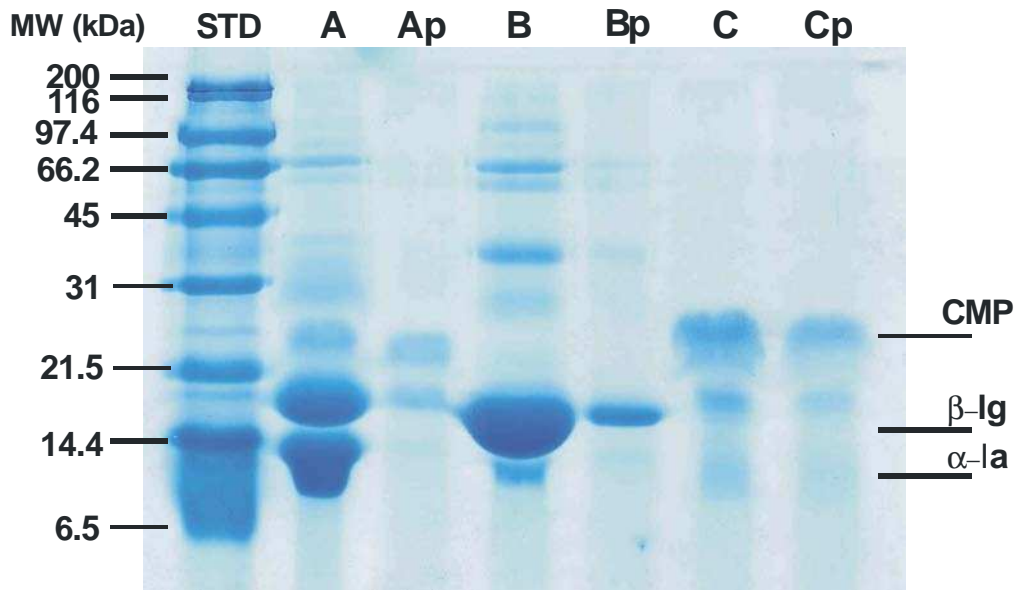


Figura 1.13. SDS-PAGE de los sobrenadantes de muestras incubadas a pH 4,5. (STD) estándar de peso molecular de proteínas, (A) WPC enriquecido en α -Ia, (Ap) mezcla de polifenol-WPC enriquecido en α -Ia, (B) β -Ig, (Bp) mezcla de polifenol- β -Ig, (C) CMP, (Cp) mezcla de polifenol-CMP.

A pH 6,0, los sistemas mixtos β -Ig-polifenol y CMP-polifenol no presentaron precipitaciones apreciables de polifenol como se muestra en la **Tabla 1.1** ni de proteínas (**Figura 1.14**). Nuevamente, la solubilidad de las partículas puede ser atribuida a la carga neta negativa de los complejos formados (**Figuras 1.9** y **1.10**). La mezcla α -Ia-WPC-polifenol también mostró una leve precipitación de la proteína (**Figura 1.14**, calle **Ap**) debido a que los complejos presentaron una fuerte carga neta negativa (**Figura 1.10**). Sin embargo, se observó una notable precipitación (77%) de los polifenoles (**Tabla 1.1**) no relacionable a la proteína. A pH 6,0, cercano al pKa, los polifenoles pueden quelar iones divalentes como el Ca^{2+} que estabiliza a la α -lactalbúmina (O'Connell, Fox, Tan-Kintia & Fox, 1998).

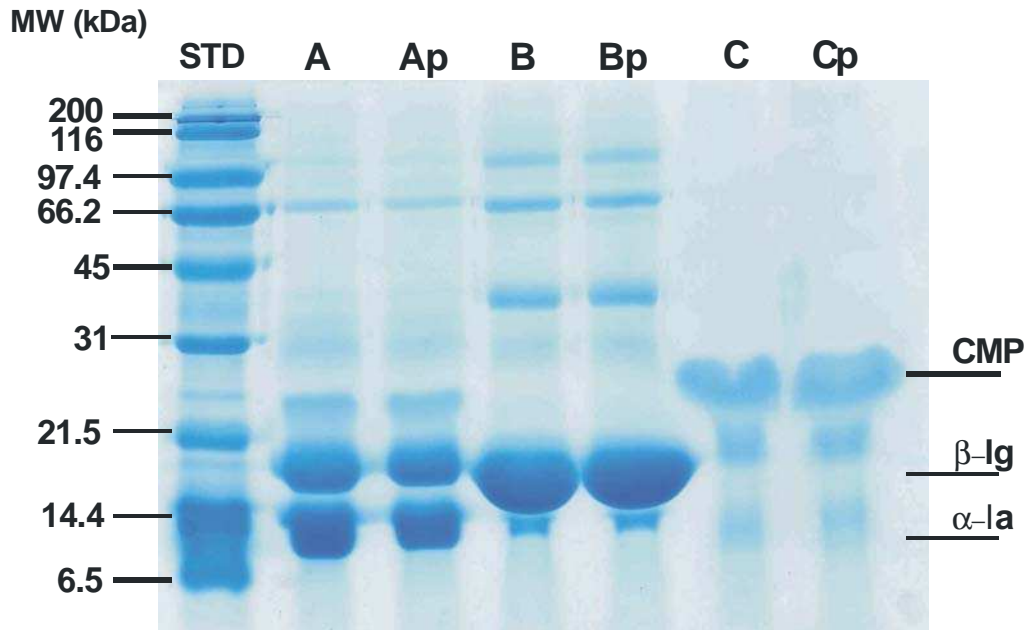


Figura 1.14. SDS-PAGE de los sobrenadantes de muestras incubadas a pH 6,0. (STD) estándar de peso molecular de proteínas, (A) WPC enriquecido en α -Ia, (Ap) mezcla de polifenol-WPC enriquecido en α -Ia, (B) β -Ig, (Bp) mezcla de polifenol- β -Ig, (C) CMP, (Cp) mezcla de polifenol-CMP.

El grupo fenólico protonado no es particularmente un buen ligando para cationes metálicos, pero si se desprotona se genera un centro de oxígeno el cual posee una alta densidad de carga negativa, y puede ocurrir, entonces, la quelación de metales por parte del fenol a valores de pH fisiológicos (*McDonald, Mila & Scalbert, 1996*). El ion Ca^{2+} cargado positivamente tiene la habilidad de compensar estas cargas negativas; así podría entonces inducir la auto-asociación de los polifenoles mediante puentes entre grupo polares y promover la precipitación de los mismos (*Jöbstl, Fairclough, Davies & Williamson, 2005*). De hecho, *Jackson y Lee (1988)* observaron un aumento en la solubilidad del calcio cuando se disminuía el pH de infusiones de té verde por el agregado de jugo de limón y entonces el mineral era liberado de los complejos polifenol-calcio. Así, los complejos formados entre los polifenoles y los iones de calcio resultarían insolubles (**Tabla 1.1**).

Para corroborar esta hipótesis, al sistema α -la-WPC-polifenol a pH 6,0 se agregaron concentraciones crecientes de EDTA, y se determinó la cantidad de polifenoles que permanecieron en el sobrenadante luego de la centrifugación. La **Figura 1.15** muestra que el porcentaje de polifenol precipitado disminuye conforme aumenta la concentración de EDTA. El EDTA tiene la habilidad de secuestrar iones metálicos como el Ca^{2+} , evitando que los polifenoles quelen el calcio y precipiten.

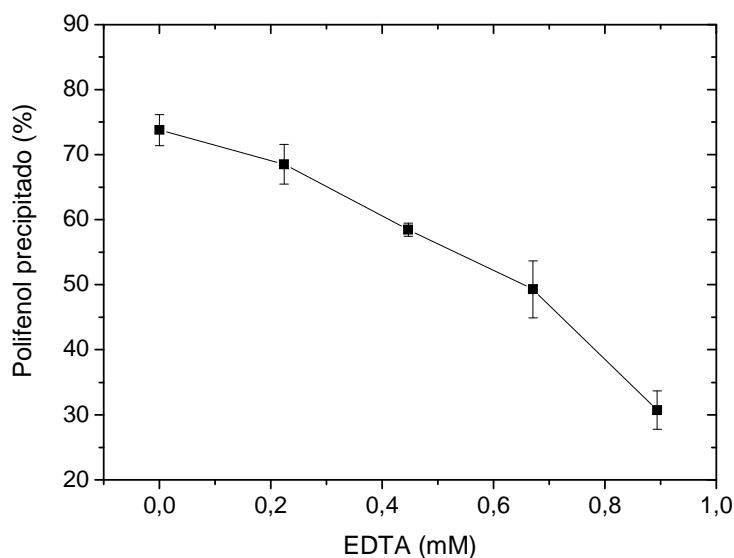


Figura 1.15. Polifenol precipitado con α -la-WPC y concentraciones crecientes de EDTA a pH 6,0, luego de almacenamiento (24 horas) y posterior centrifugación. Composición de las mezclas: 3% (p/v) de proteína y 1% (p/v) de polifenol.

1.6. Microscopía confocal

A fin de visualizar la forma y estructura de los agregados de proteína-polifenol formados principalmente cerca del punto isoeléctrico de las proteínas, se utilizó la técnica de microscopía confocal (CSLM). Esta técnica fue previamente utilizada con éxito para analizar sistemas acuosos mixtos de WPC e hidroxipropilmetilcelulosa a temperatura ambiente (Jara, Pérez & Pilosof, 2010). Las imágenes se muestran en la

Figura 1.16. La β -lg pura mostró agregados a pH 4,5 (**Figura 1.16 A**) debido a la cercanía al pl. Sin embargo, en presencia de los polifenoles se observó una extensa agregación (**Figura 1.16 B**). Para poder obtener estas imágenes se trabajó con concentraciones 10 veces más altas que en los experimentos de DLS.

El CMP puro a pH 3,0 presentó agregados de aspecto amorfo y desorganizado en ausencia de los polifenoles (**Figura 1.16 C**). Recordemos que el CMP tiende a gelificar incluso a temperatura ambiente y a concentraciones bajas.

En presencia de polifenoles el CMP precipita rápidamente y muestra agregados densos y muy compactos, los cuales son mucho mayores en tamaño en comparación a lo observado en DLS, debido a la alta concentración utilizada en este experimento (**Figura 1.16 D**).

1.7. Conclusiones

Los polifenoles de té verde poseen una fuerte afinidad por todas las proteínas del lactosuero estudiadas (β -lg, CMP y α -la-WPC) a todos los pH analizados. A las concentraciones relativas estudiadas (proteína:polifenol, 3:1) las proteínas son complejadas mayoritariamente por los polifenoles. El tamaño de los complejos formados es máximo cercano al punto isoeléctrico de cada proteína. Aunque la unión inicial de los polifenoles a las proteínas es esencialmente una interacción hidrofóbica no selectiva, la insolubilidad de los complejos formados está mayormente determinada por su carga superficial. En el punto isoeléctrico de las proteínas, el complejamiento procede hasta formar grandes partículas que pueden fácilmente precipitar. Lejos del punto isoeléctrico de las proteínas, los complejos son solubles debido al alto potencial ζ que impide la formación de grandes partículas.

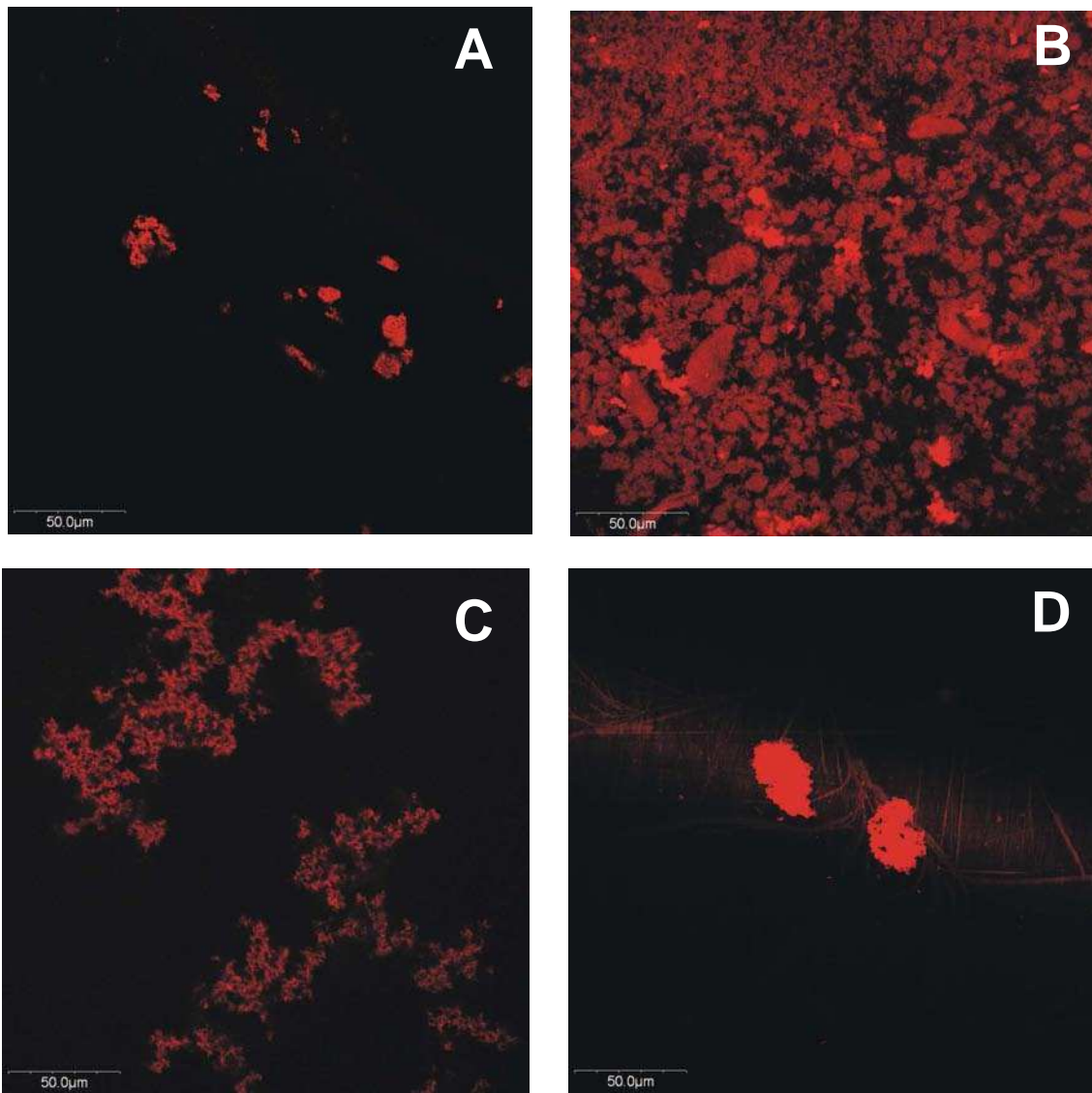


Figure 1.16. Imágenes de microscopía confocal de (A) β -lg 6% (p/v) pH 4,5, (B) mezclas de β -lg 3% (p/v)-polifenol 1% (p/v) a pH 4,5, (C) CMP 6% (p/v) pH 3,0 y (D) mezclas de CMP 3% (p/v)-polifenol 1% (p/v) a pH 3,0, a 25°C, (ancho de la imagen 200 mm).

1.8. Referencias

- Barnett, L. B., & Bull, H. B. (1960). Electrophoresis of ribonuclease and of β -lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 89(2), 167-172.
- Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β -lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13-27.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Lokman Khan, M., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1593-1601.
- Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10(1), 77-102.
- de Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81, 503-509.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.
- Farías, M. E., Martínez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.
- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., & Green, R. J. (2006). Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1602-1605.
- Griffin, W. G., & Griffin, M. C. A. (1993). Time-dependent polydispersity of growing colloidal aggregates: predictions from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.*, 89, 2879-2889.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- Hatano, T., Hori, M., Hemingway, R. W., & Yoshida, T. (2003). Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes. *Phytochemistry*, 63, 817-823.
- Haug, I. J., Skar, H. M., Vegarud, G. E., Langsrud, T., & Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2287-2293.
- He, Q., Lv, Y., & Yao, K. (2006). Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101, 1178-1182.

- Hoffmann, M. A. M., Roefs, S. P. F. M., Verheul, M., van Mil, P. J. J. M., & de Kruif, K. G. (1996). Aggregation of β -lactoglobulin studied by in situ light scattering. *Journal of Dairy Research*, 63, 423-440.
- Jackson, L. S., & Lee, K. (1988). Chemical forms of iron, calcium, magnesium and zinc in black, oolong, green and instant black tea. *Journal of Food Science*, 53(1), 181-184.
- Jara, F. L., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2010). Impact of phase separation of whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures on gelation dynamics and gels properties. *Food Hydrocolloids*, 24, 641-651.
- Jöbstl, E., Fairclough, P. A., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2005). Creaming in black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7997-8002.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P. A., & Williamson, M. P. (2004). Astringency - A molecular model for polyphenol/protein binding. *Fibre Diffraction Review*, 12, 66-69.
- Jones, O. G., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 1312-1321.
- Kreuz, M., Krause, I., & Kulozik, U. (2008). Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1208, 126-132.
- Kreuz, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1818-1826.
- Liang, Y., & Xu, Y. (2003). Effect of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 37-45.
- Lin, H.-C., Chen, P.-C., Cheng, T.-J., & Chen, R. L. C. (2004). Formation of tannin-albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical Biochemistry*, 325, 117-120.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357-371.
- Majhi, P. R., Ganta, R. R., Vanam, R. P., Seyrek, E., Giger, K., & Dubin, P. L. (2006). Electrostatically driven protein aggregation: beta-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir*, 22, 9150-9159.
- Martinez, M. J. (2010). Impacto de la interacción entre β -lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*, vol. PhD. (p. 216). Buenos Aires, Argentina.
- Mc Kenzie, H. A., & Sawyer, W. H. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulin. *Nature*, 214, 1101-1104.
- McDonald, M., Mila, I., & Scalbert, A. (1996). Precipitation of metal ions by plant polyphenols: optimal conditions and origin of precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 599-606.

Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2008). pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catequins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 816-823.

Naczek, M., Oickle, D., Pink, D., & Shahidi, F. (1996). Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of pH, tannin, and protein concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 2144-2148.

Nakano, T., Ikawa, I., & Ozimek, L. (2007). Detection of sialylated phosphorylated κ-casein glycomacropeptide electrophoresed on polyacrylamide gels and cellulose acetate strips by the thiobarbituric acid and malachite green dye reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2714-2726.

Nakano, T., & Ozimek, L. (2000). Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzable sweet whey by anion-exchange chromatography at different pH values. *Biotechnology Letters*, *22*, 1081-1086.

O'Connell, J. E., Fox, P. D., Tan-Kintia, R., & Fox, P. F. (1998). Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk. *International Dairy Journal*, *98*, 689-693.

Ozawa, T., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1987). Polyphenol interaction: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, *26*, 2937-2942.

Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. In: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 31-40). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.

Poncet-Legrand, C., Edelman, A., Putaux, J. L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, *20*, 687-697.

Prigent, S. V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., Van Koningsveld, G. A., De Jong, G. A. H., & Voragen, A. G. J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5088-5095.

Prigent, S. V. E., Voragen, A. G. J., van Koningsveld, G. A., Baron, A., Renard, C. M. G. C., & Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, *92*, 5843-5853.

Richard, T., Lefeuvre, D., Descendit, A., Quideau, S., & Monti, J. P. (2006). Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochimica et biophysica acta*, *1760*, 951-958.

Shpigelman, A., Israeli, G., & Livney, Y. D. (2010). Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, *24*, 735-743.

Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., & Lynn, P. Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 80-85.

Silva-Hernández, E., Nakano, T., & Ozimek, L. (2002). Isolation and analysis of κ-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2034-2038.

Townend, R., Herskovits, T. T., Swaisgood, H. E., & Timasheff, S. N. (1964). The solution properties of β -lactoglobulin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(12), 4196-4201.

Verheul, M., & Roefs, S. (1998). Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4909-4916.

CAPÍTULO 2

*Impacto de los polifenoles de té verde
sobre la gelificación de
 β -lactoglobulina y caseinomacropéptido*

El objetivo de este capítulo fue estudiar en forma comparativa la gelificación de β -lg y CMP en ausencia y presencia de polifenoles en el rango de pH 3,0 – 6,0.

2.1. Introducción

Como se expuso en el **Capítulo 1**, dado que los polifenoles son ligandos multidentados son capaces de unirse simultáneamente a muchos sitios en una o varias moléculas de proteína a través de sus diferentes grupos fenólicos. La disociación de los complejos proteína-polifenol por agregado de urea o detergentes indica la presencia de uniones no covalentes, mayormente puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas.

El complejamiento de proteínas y polifenoles se ha estudiado ampliamente en solución mediante técnicas enzimáticas, espectroscópicas, colorimétricas y cromatográficas entre otras. Sin embargo, existen muy pocos estudios relacionados con el efecto de estas interacciones sobre las propiedades funcionales de las proteínas, por ejemplo sobre la solubilidad, el espumado, la gelificación o la emulsificación. De hecho, la mayoría de los estudios se limitan a estudiar la interacción entre una proteína en particular y un acotado número de polifenoles. Por lo tanto, resulta necesario elucidar los efectos que los compuestos polifenólicos puedan causar sobre las propiedades funcionales de las proteínas durante el procesamiento de los alimentos.

Los polifenoles de té verde pueden mejorar la capacidad de espumado y la estabilidad de la espuma de proteínas de la albúmina del huevo (*Wu, Clifford & Howell, 2007*). De hecho, se observaron importantes mejoras en presencia de 0,25 y 0,4% (p/v) de té verde instantáneo, pero al superar una concentración de 0,5% (p/v) el efecto resulta negativo dado que tanto la expansión de la espuma como su estabilidad disminuyen notablemente. El fenómeno se atribuye a que un exceso de moléculas de polifenol bloquea los sitios de interacción entre las proteínas. Con respecto a la gelificación, el té verde (1% p/v) aumenta el valor de G' luego del enfriamiento a 20 °C en un 30% con respecto a la albúmina de huevo sin té verde, indicando que los polifenoles inducen la

formación de una red proteica más fuerte y ordenada. A su vez, los geles formados en presencia de té verde tienen más dureza pero también retienen menos agua, probablemente debido a un aumento en la exposición de grupos hidrofóbicos y a la excesiva agregación. Los polifenoles también inducen la desnaturalización de las proteínas a menores temperaturas, con lo cual su estabilidad térmica se ve disminuida (*Wu et al., 2007*).

Otros autores mostraron que catequinas de té verde aumentan el volumen y mejoran la estabilidad de espumas de β -lactoglobulina, las cuales fueron desestabilizadas intencionalmente mediante la adición de Tween 20 (*Sarker, Wilde & Clark, 1995*). Se ha propuesto que la habilidad de las catequinas para mejorar las propiedades de espumado de β -lactoglobulina se debe a al hecho de que forma uniones hidrofóbicas y tipo puente hidrógeno entre las proteínas adsorbidas en la interfase.

Los polifenoles también aumentan marcadamente la estabilidad térmica de la leche debido a que estos compuestos tienen la habilidad, durante la aplicación de calor, de oxidarse a quinonas, las cuales son extremadamente electrofílicas e interactúan con residuos de aminoácidos nucleofílicos (ej. Lisina, cisteína). De esta manera mantienen la integridad de las micelas durante el calentamiento (*O'Connell, Fox, Tan-Kintia & Fox, 1998*).

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas que puede ser inducida por tratamiento térmico es la gelificación. Bajo calentamiento y condiciones ambientales particulares y a una concentración suficiente, las proteínas forman redes tridimensionales en las cuales el agua está estrechamente unida o asociada en los espacios intersticiales (*Hermansson, 1979*). El mecanismo de gelificación proteica varía dependiendo de la proteína. La gelificación puede ocurrir durante el calentamiento (proteínas de soja, clara de huevo, proteínas de lactosuero) o luego del

enfriamiento (gelatina, lisozima) dependiendo de la proteína y condiciones de gelificación.

Sin embargo, la gelificación proteica también puede ser promovida por otro tipo de condiciones como cambios en el pH, presencia de sales (por ejemplo adición de iones Ca^{+2} en micelas de caseína), hidrólisis enzimática moderada, altas presiones, etc.

Las características típicas de muchos alimentos están determinadas por la propiedad de gelificar de las proteínas durante el calentamiento. Por ejemplo, la textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de productos como frankfurters, quesos, yogurt, tofu, huevo duro, postres de gelatina, etc. están vinculadas a la formación de un gel proteico (*Pilosof, 2000*).

La gelificación térmica de proteínas involucra el calentamiento a distintas temperaturas y distintos tiempos de dispersiones proteicas de concentración apropiada. Las condiciones de temperatura y tiempo a utilizar son propias de cada proteína y estarán determinadas en función de la temperatura de desnaturalización de la misma en las condiciones del ensayo.

La concentración de proteína es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de los geles. La mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican, a esta concentración se la denomina “concentración crítica”. El tipo y las propiedades de los geles se ven afectados por el pH, tipo y concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos (*Pilosof, 2000*).

Gelificación por calor de proteínas globulares

La **Figura 2.1** muestra un esquema del proceso de gelificación para proteínas globulares. Se pueden caracterizar varias etapas (*Foegeding & Hamann, 1992*):

- i) La proteína se desnaturaliza por acción del calor.

- ii) Las moléculas proteicas desnaturalizadas interaccionan entre sí generando agregados.
- iii) Luego de un cierto tiempo se llega al “punto gel” donde la interacción entre agregados es suficientemente importante como para generar una matriz primaria que exhibe propiedades de sólido viscoelástico. Estas propiedades pueden ir cambiando con el tiempo y con el enfriamiento hasta formar la matriz de equilibrio o sea la estructura final del gel.

Existen básicamente dos teorías para describir la gelificación: la teoría de *Flory–Stockmayer* (1953, 1974), y la teoría de la percolación atribuida a *De Gennes* (1979). Según el modelo de Flory–Stockmayer, la gelificación es un evento súbito que ocurre cuando es alcanzado un cierto grado de entrecruzamiento entre el polímero, valor crítico llamado punto gel, en el cual la viscosidad diverge a infinito. En la teoría de la percolación se asume que los monómeros forman agregados pequeños y que en un cierto punto se llega al punto gel en el cual los agregados se entrecruzan.

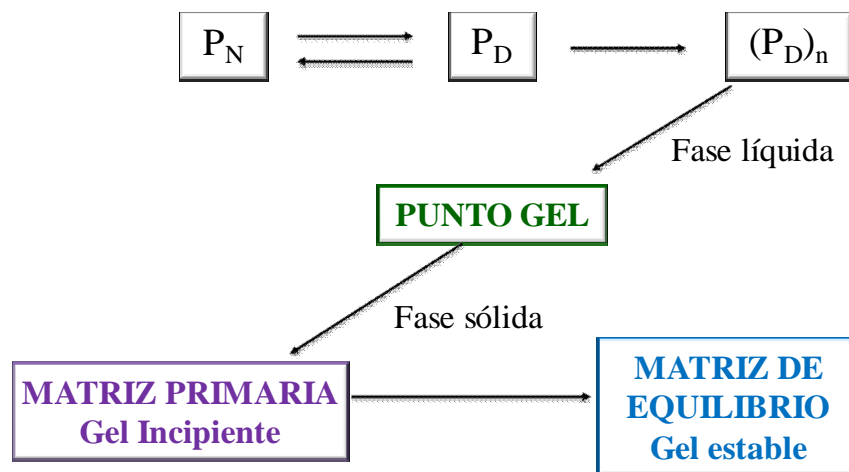
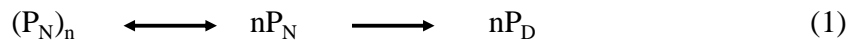


Figura 2.1. Esquema del proceso de gelificación, involucrando la desnaturalización y la agregación proteica.

El proceso mostrado en la **Figura 2.1** puede ser visto desde el punto de vista reológico como el pasaje de una solución (sol) que va aumentando su viscosidad mientras se forman los agregados proteicos, a la formación de un sólido viscoelástico (gel) (Baeza, 2003).

La desnaturalización de la proteína mayoritaria del lactosuero (β -lg) se puede describir como un proceso de dos etapas: i) un desplegamiento de la molécula de proteína, el cual puede ser reversible o irreversible, y ii) una agregación irreversible (de Wit & Klarenbeek, 1984; Mulvihill & Donovan, 1987).

El mecanismo aceptado clásicamente para describir la desnaturalización y agregación de proteínas globulares es el siguiente (Morr & Ha, 1993):

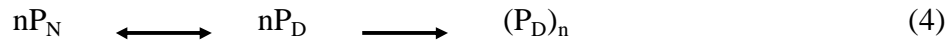


Donde P_N es la proteína nativa, P_D es la proteína desnaturalizada y n es un número pequeño de subunidades o monómeros de proteína.

Las reacciones iniciales (1) de este proceso implican un debilitamiento y ruptura de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo de alterar la conformación nativa de la proteína y disociar agregados proteicos.

La segunda etapa (2) (si el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína son suficientes) es una polimerización de moléculas de proteína disociadas y desplegadas para producir una estructura tridimensional (gel) mediante la formación de enlaces intermoleculares de tipo disulfuro, hidrofóbicos o electrostáticos (Mangino, 1992; Morr & Ha, 1993).

Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína principalmente desnaturalizada, $(P_D)_n$, no se sabe ciertamente cuál de las siguientes reacciones está implicada:



Según se produzca una u otra reacción el tipo de uniones que forman los agregados y el tamaño y forma de los mismos será diferente, produciendo así diferentes tipos de geles.

La reacción (3) se da en condiciones que favorecen las interacciones proteína-proteína en solución. Estas condiciones pueden ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales, o a bajas temperaturas de calentamiento (*Verheul, Pedersen, Roefs & de Kruif, 1999*). Este tipo de reacción puede dar lugar a la formación de agregados de proteína previamente a la desnaturalización (*Baeza, 2003; Stading & Hermansson, 1990*) y luego se dará la desnaturalización de los agregados formados.

La reacción (4) se da por calentamiento en condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína que a la agregación de la misma (pH por encima del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles, presencia de ciertos iones, presencia de agentes disociantes como la urea o detergentes, altas temperaturas de calentamiento). En estas condiciones, durante el calentamiento se exponen los grupos tiol internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. El calentamiento además favorece las interacciones hidrofóbicas ya que también se activan grupos hidrófobos antes ocultos en el interior de la molécula proteica. La

formación de la red tridimensional final implica también enlaces puente hidrógeno que se favorecen durante el enfriamiento.

Desde el punto de vista microestructural los geles se pueden clasificar en geles formados por una red de filamentos finos y geles agregados o particulados (*Pilosof, 2000*). El hecho de que se forme uno u otro tipo de gel se relaciona con que las condiciones mencionadas anteriormente den lugar a la reacción (4) y (3), respectivamente. Así, los geles de filamentos finos están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño de tal forma que estos geles son transparentes. Mientras que los geles agregados se forman a partir de una agregación desordenada, son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua.

Las diferencias en las interacciones moleculares y en el equilibrio de las fuerzas atractivas y repulsivas dependientes de las condiciones del medio mencionadas anteriormente se reflejan en la apariencia microscópica de los geles de proteínas globulares.

En la **Figura 2.2** se muestra un esquema de los dos tipos de geles mencionados anteriormente. La esencia del proceso de gelificación es sin duda el punto gel, es decir el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requerimientos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del rango de la respuesta lineal, debe proveer magnitudes físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica (*Pilosof, 2000*).

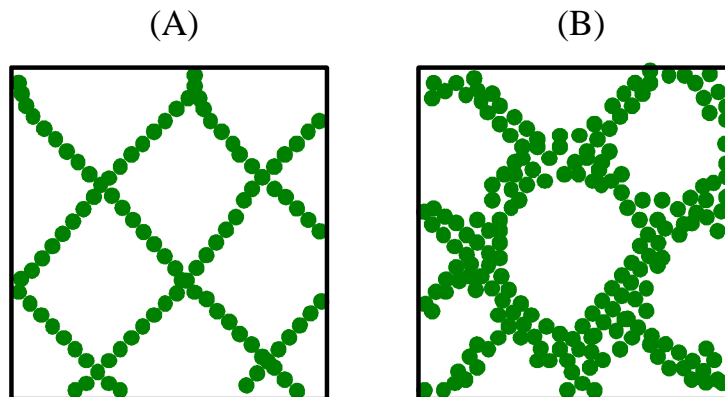


Figura 2.2. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos, (B) geles agregados o particulados (adaptado de *Pilosof (2000)*).

Estos requerimientos eliminan a los métodos transientes como las mediciones de “creep” o de relajación del esfuerzo, quedando solamente los métodos reológicos dinámicos en los cuales se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria como la única alternativa de seguimiento de la gelificación (*Pilosof, 2000*); dichos métodos son los que utilizaremos en el presente trabajo.

Aún cuando un sistema compuesto por proteínas y polifenoles no presente precipitación de los complejos, las interacciones entre ambos componentes pueden afectar positiva o negativamente las propiedades funcionales de las proteínas.

2.2. Impacto de los polifenoles en la gelificación de β -Ig a distintos valores de pH.

En la **Figura 2.3** se muestra la dinámica de gelificación de soluciones de β -Ig al 15 % p/v a pH 3,0 sola y en presencia de polifenoles (0,25, 0,5 y 1 % p/v). El cruce de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') indica el punto de gelificación; a partir del mismo

se obtienen los valores de tiempo y temperatura de gelificación (t_{gel} y T_{gel} , respectivamente) (Clark, 1992).

Luego del punto gel y durante el período de temperatura constante a 90 °C, se produjo en todos los casos un gran incremento del valor de G' y G'' . Finalmente, durante el enfriamiento desde 90 a 35 °C, se observó un nuevo incremento de los valores de estos módulos. Este último incremento de los módulos G' y G'' durante el enfriamiento se ha observado para muchas proteínas entre ellas para proteínas del lactosuero y de soja (Ould Eleya & Turgeon, 2000) y se debe a una reducción en la entropía, que consolida las fuerzas de atracción (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals) entre las partículas proteicas en el gel.

En la **Figura 2.4** se muestra la dinámica de gelificación de β -lg 15% (p/v) y sus mezclas con polifenol a pH 4,5. Puede observarse que a este pH, más cercano al punto isoeléctrico, el módulo de almacenamiento G' posee previo al calentamiento un comportamiento diferente al observado a pH 3,0. La solución de β -lg en ausencia de polifenol presenta inicialmente un G' similar al G'' , indicando que la contribución del componente elástico no es despreciable en relación al componente viscoso. Esto se debe a que a este pH la proteína se encuentra en su región isoeléctrica debido a la disminución de la repulsión electrostática y se promueve la asociación (tetrámeros, octámeros) y la formación de flóculos a estas altas concentraciones que favorecerían la formación de una estructura de líquido viscoelástico. Sin embargo, tan pronto como empieza a subir la temperatura, el módulo G' disminuye y no vuelve a aumentar hasta no alcanzarse el punto gel (**Figura 2.4**).

A medida que aumenta la concentración del polifenol en las muestras a pH 4,5 el efecto se hace más pronunciado, manteniéndose el módulo G' al mismo nivel que el G'' durante todo el período previo al punto gel, lo cual refleja que la presencia de polifenoles induce la agregación de la proteína. Sólo en el caso de 1% p/v de polifenoles se observa muy al comienzo que el módulo elástico es despreciable con

respecto al viscoso (**Figura 2.4**). Esto se debería a que el exceso de polifenoles genera un recubrimiento total de las moléculas de proteína y por ende no son capaces de interactuar entre sí para formar agregados. Con el aumento de la temperatura las interacciones entre polifenoles y β -lg se ven debilitadas y las proteínas comienzan nuevamente a interactuar entre sí por lo que aumenta el G' hasta un nivel similar al G'' donde se mantiene hasta el punto gel. Luego como en todos los casos el G' supera al G'' indicando el desarrollo del gel.

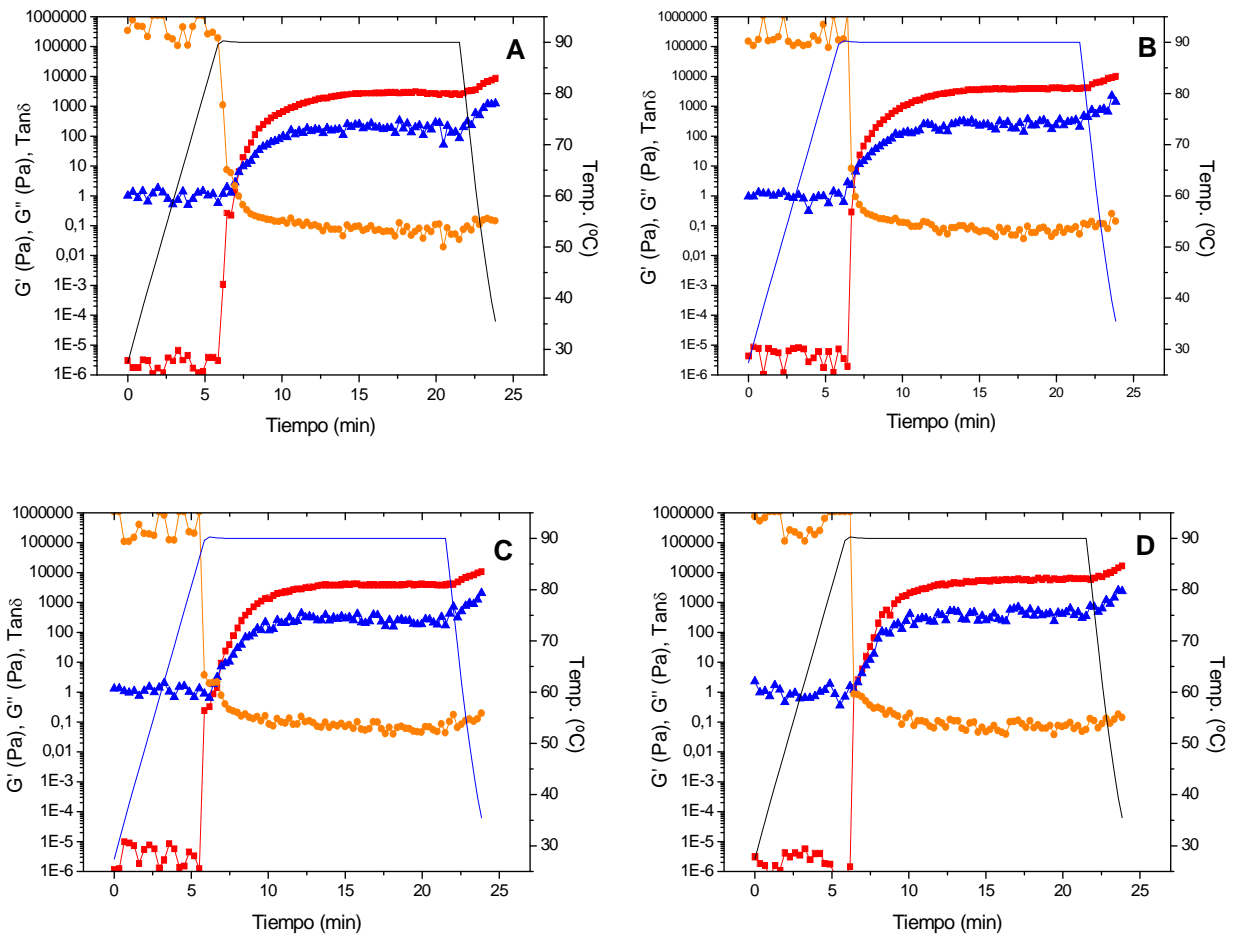


Figura 2.3. Evolución de los parámetros reológicos durante el calentamiento y enfriamiento de β -lg (15 % p/v) a pH 3,0 en presencia de polifenoles (A) 0%, (B) 0,25%, (C) 0,5% y (D) 1% p/v. (■) G' , (▲) G'' , (●) $\tan\delta$, (—) Temperatura.

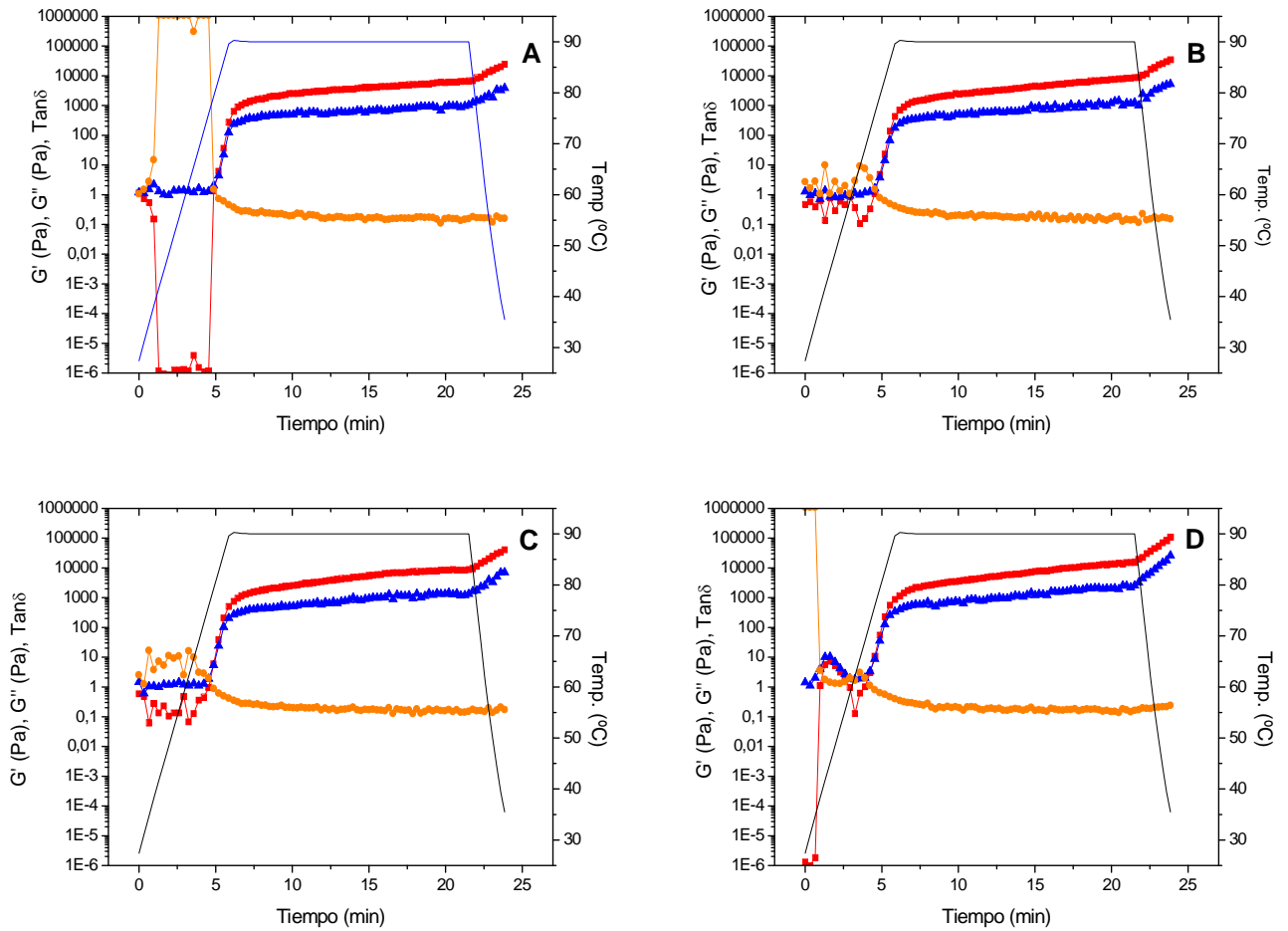


Figura 2.4. Evolución de los parámetros reológicos durante el calentamiento y enfriamiento de β -Ig (15 % p/v) a pH 4,5 en presencia de polifenoles (A) 0%, (B) 0,25%, (C) 0,5% y (D) 1% p/v. (■) G' , (▲) G'' , (●) $\tan\delta$, (—) Temperatura.

A pH 6,0 se observa que en ausencia de polifenol las soluciones de β -Ig no presentan contribuciones del módulo elástico previo al punto gel, pero en presencia de los polifenoles se hace evidente que los mismos contribuyen a un estado de mayor agregación de la proteína (**Figura 2.5**). Sin embargo, en todos los casos en los que el polifenol induce una agregación inicial, la misma es rápidamente revertida con el aumento de la temperatura, lo cual es diferente a lo observado a pH 4,5, debido a una mayor repulsión electrostática.

En las **Figuras 2.3, 2.4 y 2.5** se muestra además el comportamiento de $\tan \delta$ durante todo el proceso de gelificación. La viscoelasticidad relativa ($\tan \delta$) es la relación entre G'' y G' .

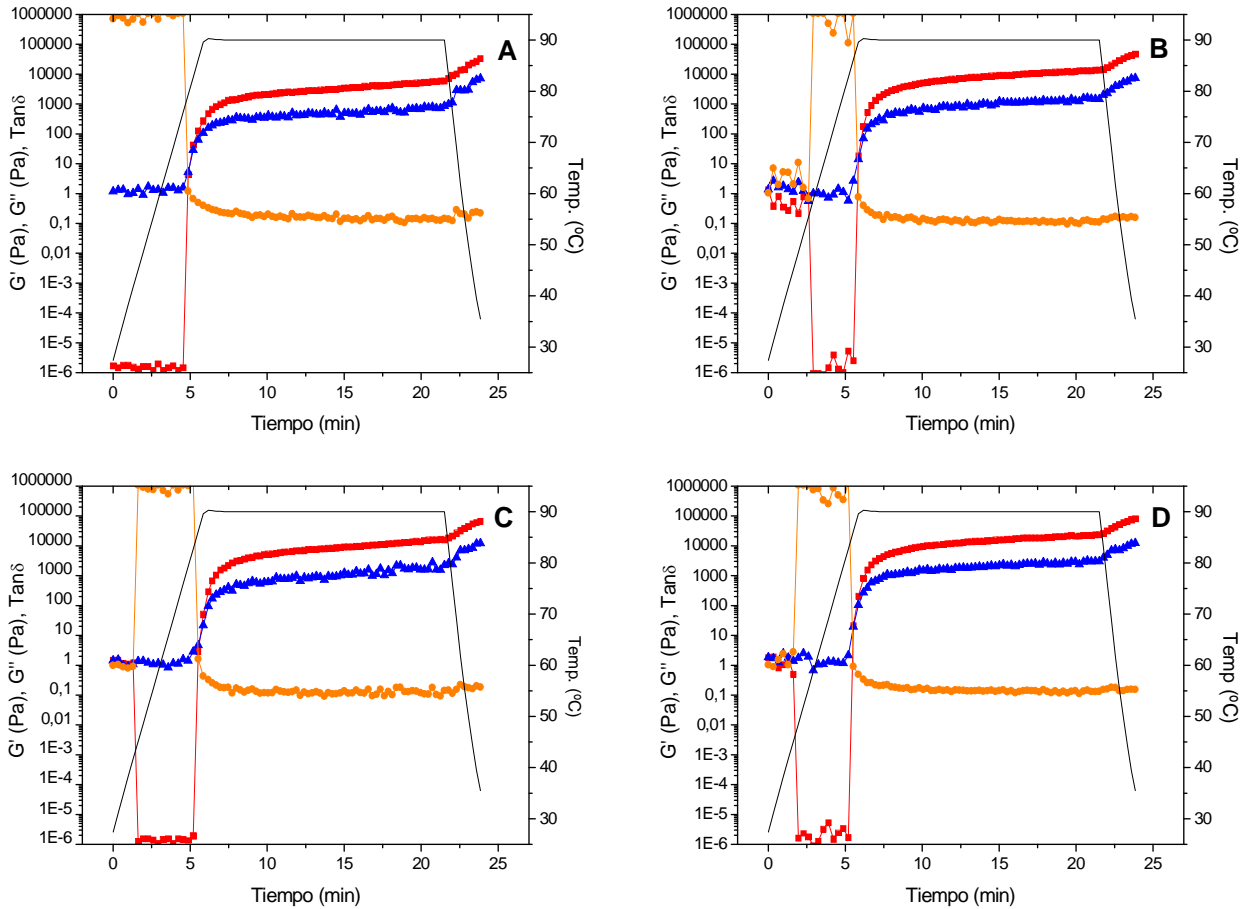


Figura 2.5. Evolución de los parámetros reológicos durante el calentamiento y enfriamiento de β -lg (15 % p/v) a pH 6,0 en presencia de polifenoles (A) 0%, (B) 0,25%, (C) 0,5% y (D) 1% p/v. (—■—) G' , (—▲—) G'' , (—●—) $\tan \delta$, (—) Temperatura.

En la **Figura 2.6** se muestran los valores de tiempo (t_{gel}) de gelificación (cruce de G' con G'') de β -lg en función de la concentración de polifenoles a distintos valores de pH. A pH 3,0 se requieren mayores tiempos para gelificar que a pH 6,0. A pH 3,0, la β -lg retiene una mayor cantidad de grupos hidrofóbicos ocultos y por lo tanto posee una mayor temperatura de desnaturalización que a pH 6,0 (*Relkin, 1996*). Esto se traduce

en mayores tiempos (t_{gel}) y temperaturas (T_{gel}) de gelificación, proceso posterior a la desnaturalización proteica. A pH 4,5 los tiempos de gelificación (t_{gel}) se reducen todavía más que a pH 6,0 debido a la agregación preexistente entre las moléculas de proteína.

Con el agregado de los polifenoles el valor de t_{gel} disminuyó conforme aumentó la concentración de los mismos (**Figura 2.6**). Aunque las diferencias no son tan marcadas, se observó esta tendencia en los tres valores de pH evaluados. Teniendo en cuenta que los polifenoles pueden promover la unión entre distintas moléculas de proteína dando lugar a la agregación, es esperable una disminución del punto gel (T_{gel} y/o t_{gel}) en los sistemas mixtos. Resultados similares fueron obtenidos por *Harbourne, Jacquier & O'Riordan (2010)*, quienes evaluaron los efectos de la adición de polifenoles en la gelificación ácida de la leche.

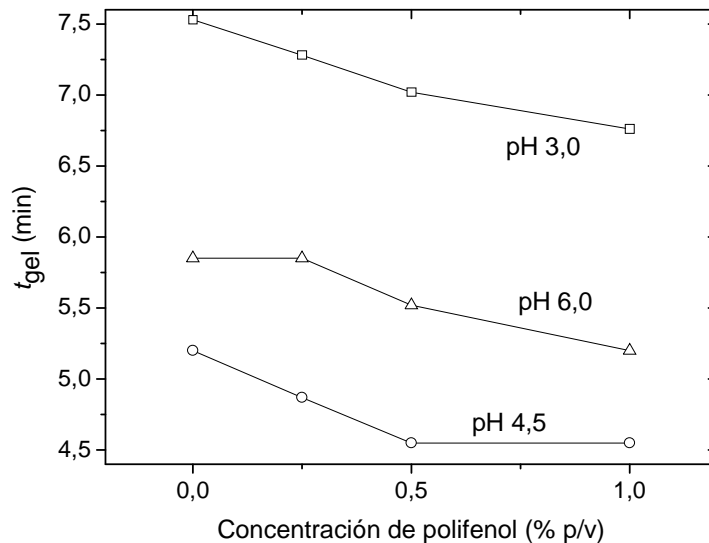


Figura 2.6. Tiempos de gelificación para β -lg (15% p/v) con concentraciones crecientes (0,25-1% p/v) de polifenol a distintos valores de pH.

La T_{gel} de la β -lg sola (**Tabla 2.1**) mostró una correlación con el tiempo de gelificación (**Figura 2.6**) en cuanto disminuyó en el orden pH 3,0 > pH 6,0 > pH 4,5.

La presencia de polifenoles produjo una disminución significativa en la T_{gel} . A fin de determinar si la disminución en T_{gel} se debe a un aumento de la agregación debido a la formación de complejos proteína-polifenol o bien a una disminución de la estabilidad térmica de la β -lg, se midió la temperatura de desnaturalización de la β -lg en presencia y ausencia de polifenoles utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Tabla 2.1. Parámetros reológicos que describen la gelificación de β -lg (15% p/v) afectados por la presencia de polifenoles de té verde. Se informan el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la viscoelasticidad relativa ($\tan\delta$) a 1Hz, luego del enfriamiento a 35°C. La dependencia de G' con la frecuencia (n) se evaluó a 25°C según la ecuación 1.

A: pH 3,0

| Polifenol | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\tan\delta$ | n | R^2 |
|-----------|----------------|-------------|------------|--------------|--------|--------|
| 0 | 90,0 ± 0,3 | 8845 ± 62 | 1190 ± 33 | 0,13 ± 0,01 | 0,1062 | 0,9753 |
| 0,25 | 90,0 ± 0,1 | 10205 ± 84 | 1420 ± 21 | 0,14 ± 0,02 | 0,1110 | 0,9656 |
| 0,5 | 90,0 ± 0,2 | 10840 ± 178 | 2095 ± 26 | 0,19 ± 0,01 | 0,1318 | 0,9683 |
| 1 | 90,0 ± 0,2 | 17000 ± 297 | 2390 ± 39 | 0,15 ± 0,02 | 0,1264 | 0,992 |

B: pH 4,5

| Polifenol | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\tan\delta$ | n | R^2 |
|-----------|----------------|--------------|-------------|--------------|--------|--------|
| 0 | 79,3 ± 0,3 | 24300 ± 283 | 3850 ± 42 | 0,16 ± 0,01 | 0,0909 | 0,9982 |
| 0,25 | 75,9 ± 0,1 | 34950 ± 318 | 5320 ± 37 | 0,15 ± 0,03 | 0,102 | 0,9871 |
| 0,5 | 72,5 ± 0,2 | 41250 ± 134 | 7095 ± 52 | 0,17 ± 0,06 | 0,1159 | 0,9968 |
| 1 | 72,5 ± 0,2 | 110500 ± 212 | 26150 ± 148 | 0,24 ± 0,01 | 0,1563 | 0,9794 |

C: pH 6,0

| Polifenol | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\tan\delta$ | n | R^2 |
|-----------|----------------|-------------|-------------|--------------|--------|--------|
| 0 | 86,2 ± 0,1 | 33150 ± 311 | 5255 ± 92 | 0,16 ± 0,03 | 0,0777 | 0,9903 |
| 0,25 | 86,2 ± 0,2 | 47650 ± 289 | 7420 ± 71 | 0,16 ± 0,01 | 0,0898 | 0,9967 |
| 0,5 | 82,8 ± 0,1 | 67150 ± 399 | 12250 ± 192 | 0,18 ± 0,01 | 0,1130 | 0,9960 |
| 1 | 79,3 ± 0,4 | 70700 ± 610 | 12400 ± 127 | 0,18 ± 0,02 | 0,1379 | 0,9955 |

Los valores indican el promedio ± la desviación estándar (al menos 2 réplicas).

T_{gel} es la temperatura de gelificación.

Las transiciones térmicas correspondientes a la β -lg y sus mezclas con polifenoles se reportan en la **Tabla 2.2**. Los cambios entálpicos correspondientes a la disociación de los dímeros y al proceso de desnaturalización (ambos endotérmicos) se encuentran superpuestos con aquellos asociados al proceso de agregación (exotérmico) durante las mediciones en la escala de tiempo del DSC (*Baeza & Pilosof, 2002*).

A pH 3,0, la β -lg pura presentó una temperatura de desnaturalización mayor que a pH 6,0, lo que está de acuerdo con los datos reportados en la literatura (*Baeza & Pilosof, 2002*). A pH 6,0, la mayoría de los residuos aminoacídicos hidrofóbicos de la β -lg se encuentran inicialmente ocultos dentro de la molécula, pero cuando éstos entran en contacto con la solución mediante el calentamiento, las interacciones hidrofóbicas se verían perturbadas. Sin embargo, a pH ácido, la β -lg todavía retiene una cantidad significativa de superficie hidrofóbica oculta (*Relkin, 1996*). Por lo tanto, la desnaturalización de la β -lg a pH 3,0 requerirá de una mayor temperatura de lo que requiere a pH 6,0.

La presencia de los polifenoles promueve una disminución significativa de la temperatura de desnaturalización de la β -lg a ambos valores de pH. *Wu, Clifford y Howell (2007)* encontraron resultados similares en mezclas de polifenoles de té verde y proteínas de la albúmina del huevo.

Es importante notar que la disminución de la temperatura de desnaturalización a pH 6,0 (aproximadamente 6°C) fue mucho más pronunciada que a pH 3,0 (aproximadamente 3°C). Esto refleja la fuerte interacción que ocurre a pH 6,0 debido a una mayor exposición de los residuos aminoacídicos hidrofóbicos de la β -lg que podrían interactuar con los polifenoles.

Tabla 2.2. Temperatura de inicio (T_0) y temperatura de pico (T_p) durante la desnaturalización de β -lg (12%) pura y mezclas de β -lg (12%)-polifenol (1%).

| | T_0 (°C)* | T_p (°C)* |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| β -lg pH 3 | 79,55 \pm 0,1 | 84,76 \pm 0,1 |
| β -lg + polifenol pH 3 | 76,63 \pm 0,1 | 81,75 \pm 0,2 |
| β -lg pH 6 | 74,39 \pm 0,1 | 77,95 \pm 0,1 |
| β -lg + polifenol pH 6 | 64,70 \pm 0,2 | 71,97 \pm 0,1 |

* Promedio \pm desviación estándar de al menos dos replicados

En la **Tabla 2.1** se presentan los módulos elástico y viscoso de los geles de β -lg luego del enfriamiento a 35 °C, afectados por el contenido de polifenoles. Los valores de G' resultaron para todas las muestras mayores a los de G'' , indicando una naturaleza preponderantemente elástica, típica de los geles proteicos. Los valores de G' , G'' y $\tan\delta$ aumentaron gradualmente con el incremento de la concentración de polifenoles, lo cual estaría asociado a la agregación inducida por los polifenoles (**Capítulo 1**). *Harbourne et al. (2010)* también observaron incrementos en G' con la adición de polifenoles a leche acidificada. Estos autores proponen que este comportamiento se debe a un aumento en el número de interacciones puente hidrógeno en presencia de los polifenoles.

La viscoelasticidad relativa ($\tan\delta$) de los geles de β -lg disminuyó en presencia de polifenoles dado que $\tan\delta$ (G''/G') aumentó.

En la **Figuras 2.7, 2.8 y 2.9** se muestran los barridos de frecuencia de los geles de β -lg obtenidos a los distintos pH a 25 °C. Se observa que no existe cruce de los módulos G' y G'' en todo el rango de frecuencia estudiado, evidenciando la existencia de un gel verdadero.

El valor de G' de un material elástico es independiente de la frecuencia. Sin embargo, los geles alimentarios tienen, aunque pequeña, cierta contribución de la componente viscosa (G'') lo que resulta en valores de G' dependientes de la frecuencia reflejando la relajación de estos componentes (Clark & Ross-Murphy, 1987). Así, la dependencia de G' con la frecuencia es un parámetro característico del tipo de gel.

Como se puede ver el valor de G' de los geles de β -lg aumentó levemente con el incremento de la frecuencia.

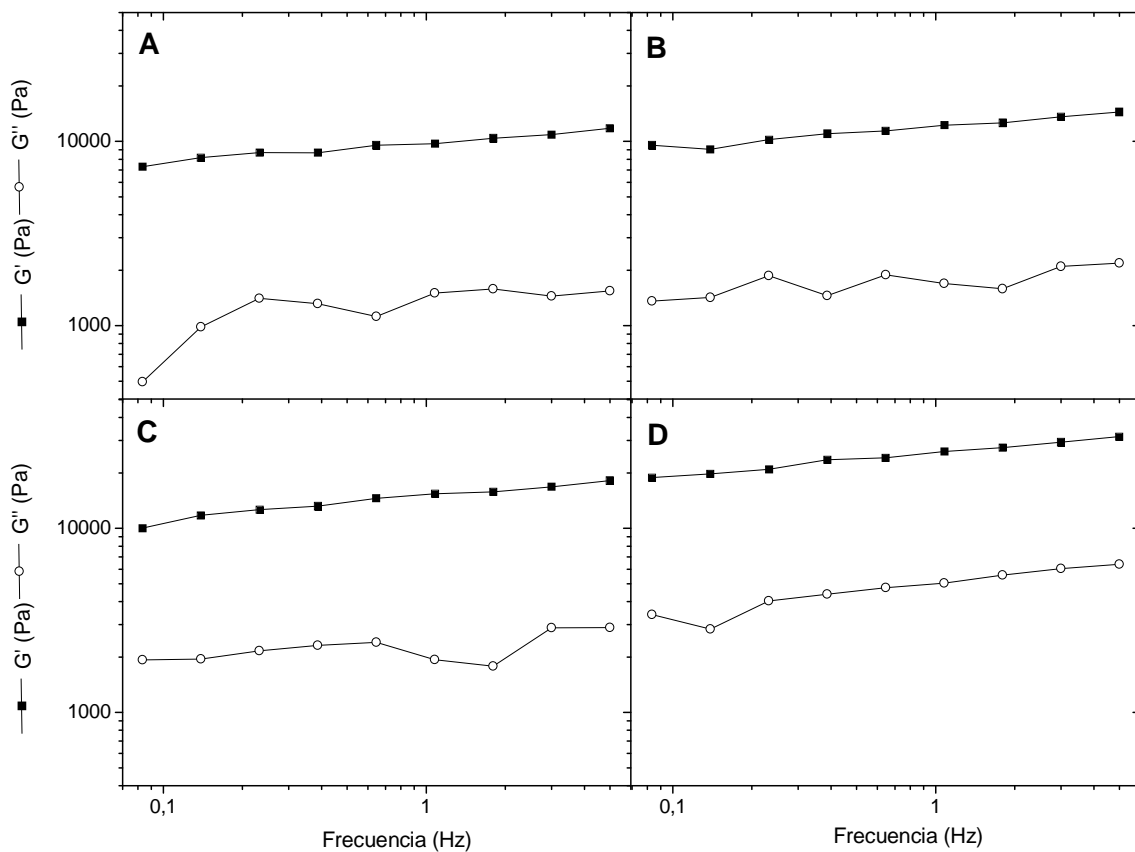


Figura 2.7. Barrido de frecuencia de los geles de β -lg (15 % p/v) a pH 3,0 afectados por la presencia de polifenoles (A: 0%, B: 0,25%, C: 0,5% y D: 1% p/v). Temperatura 25 °C.

La dependencia del módulo elástico con la frecuencia da información sobre el tipo de estructura que presenta el gel (Stading & Hermansson, 1992). El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n según la **ecuación 1**:

$$\log G' = n \cdot \log f + K \quad (\text{ecuación 1})$$

donde, G' es el modulo elástico, f la frecuencia de oscilación y K una constante. El valor de n se considera un indicador de la naturaleza viscoelástica de los geles: este valor es cero en geles puramente elásticos y aumenta su valor con el incremento de la contribución de la componente viscosa (menos elástico) (Ikeda & Foegeding, 1999).

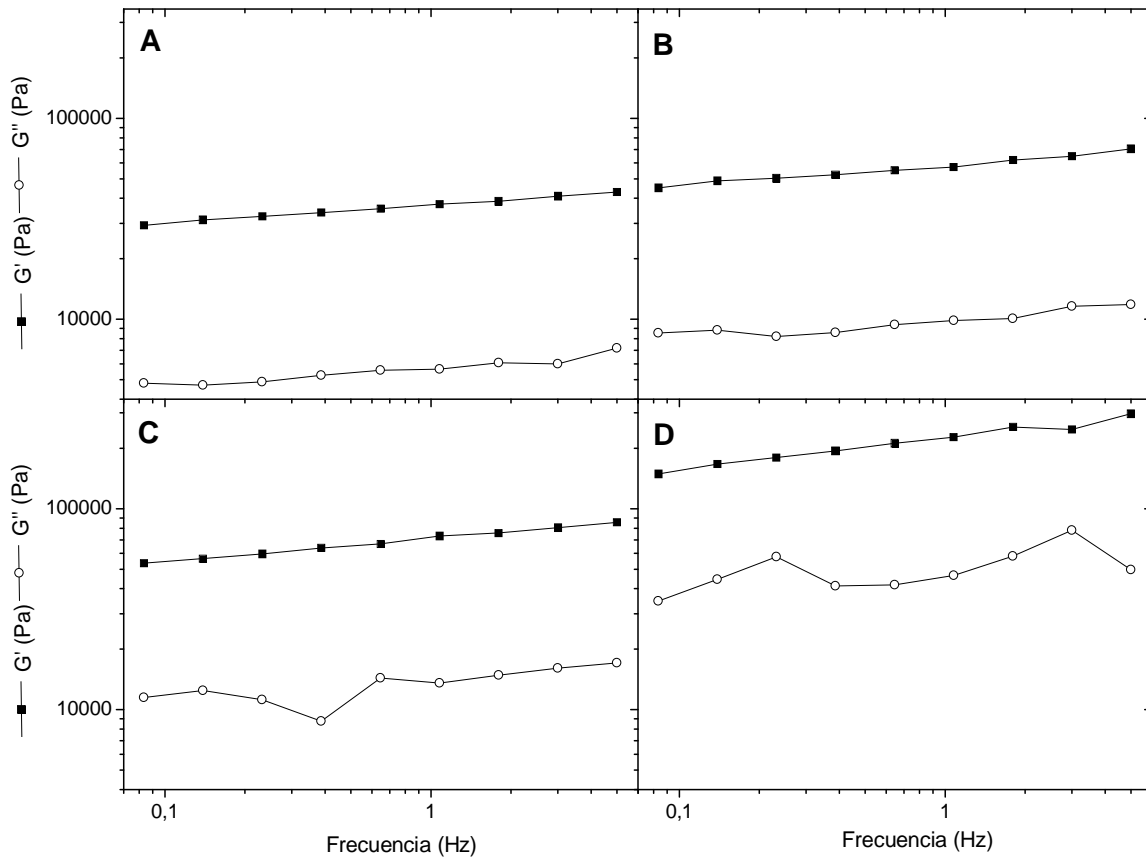


Figura 2.8. Barrido de frecuencia de los geles de β -Ig (15 % p/v) a pH 4,5 afectados por la presencia de polifenoles (A: 0%, B: 0,25%, C: 0,5% y D: 1% p/v). Temperatura 25 °C.

En la **Tabla 2.1** se muestran los valores de n obtenidos a 25°C a los distintos pH en función de la concentración de polifenoles. Se indican también los coeficientes de correlación (R^2) los cuales surgen del cálculo de n por regresión lineal.

Como puede observarse, a medida que aumenta la concentración de polifenol aumentan los valores de n a todos los pH evaluados. Esto indicaría que la presencia de polifenoles genera un cambio en las propiedades mecánicas que resultan en geles con menor naturaleza elástica (**Tabla 2.1**). Estos resultados se corresponden con la menor viscoelasticidad relativa (mayor $\tan \delta$) observada conforme aumenta el contenido de polifenoles (**Tabla 2.1**) y se debería a la formación de agregados de mayor tamaño promovidos por los polifenoles (**Capítulo 1**).

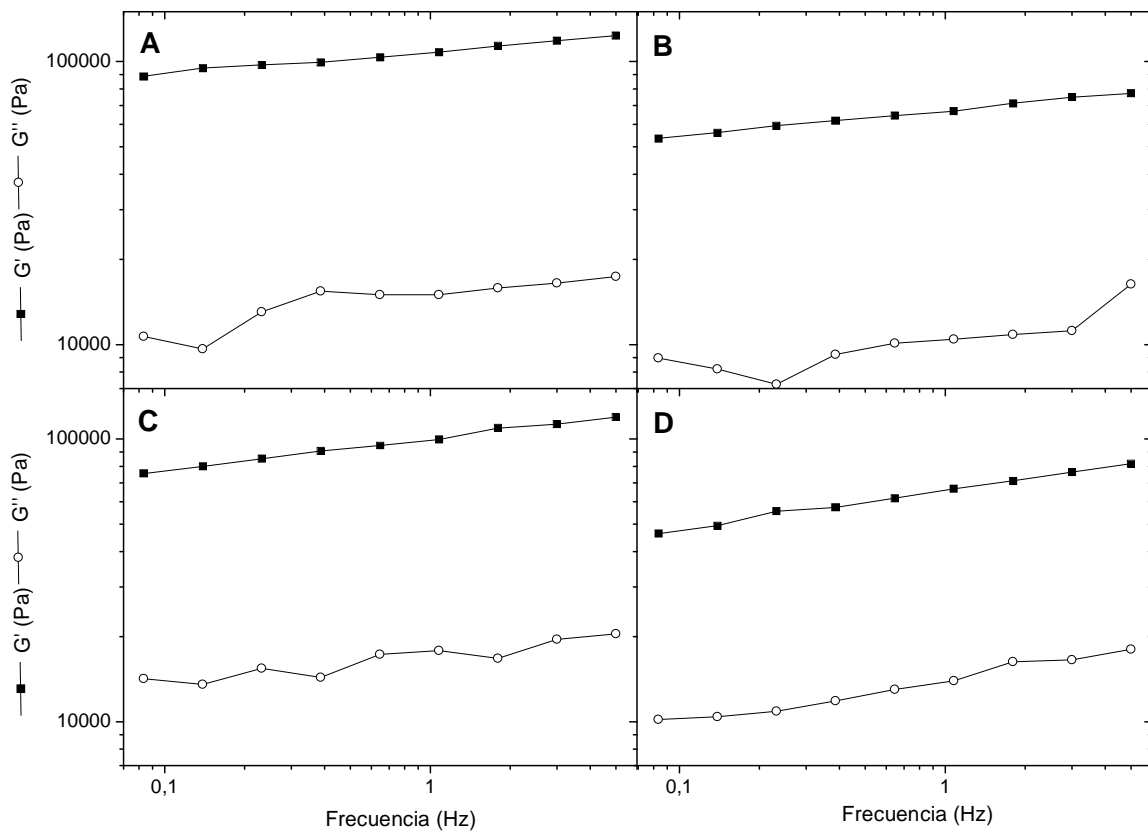


Figura 2.9. Barrido de frecuencia de los geles de β -lg (15 % p/v) a pH 6,0 afectados por la presencia de polifenoles (A: 0%, B: 0,25%, C: 0,5% y D: 1% p/v). Temperatura 25 °C.

2.3. Apariencia y propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles de β -Ig

Se evaluó la apariencia macroscópica de los geles de β -Ig (15% p/v). Éstos fueron transparentes a pH 3,0 y 6,0 y blancos a pH 4,5 (**Figura 2.10**). Los geles de β -Ig a pH lejos del punto isoeléctrico tienen una microestructura de filamentos finos y cerca del pI son particulados. Sin embargo, la estructura de los geles de filamentos finos es diferente a bajos y altos pH (*Ikeda & Morris, 2002; Langton & Hermansson, 1992; Stading & Hermansson, 1991; Stading & Hermansson, 1990*).

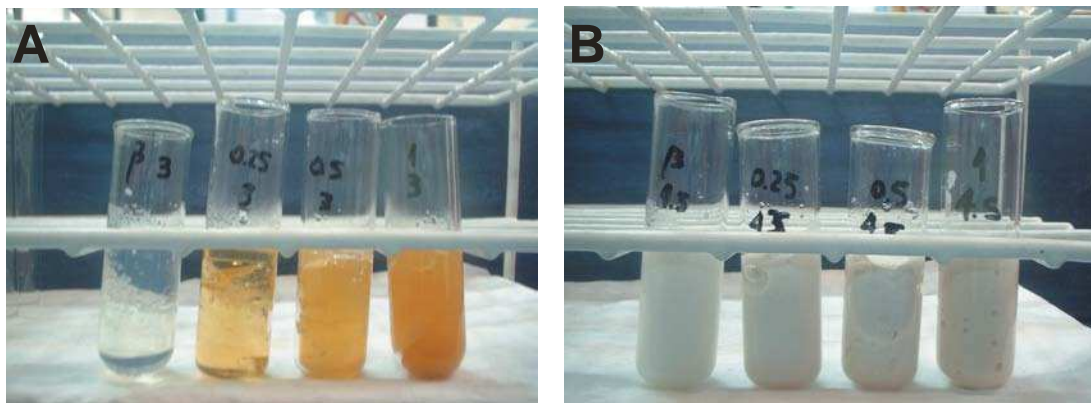


Figura 2.10. Apariencia macroscópica de geles de β -Ig (15% p/v) a pH 3,0 (A) y 4,5 (B) con concentraciones crecientes de polifenoles.

Los geles formados a pH 3,0 resultaron duros y quebradizos, por lo tanto no pudieron ser desmoldados para evaluar su textura. Por el contrario los geles a pH 4,5 y 6,0 presentaron más elasticidad por lo que pudieron ser desmoldados para observar su apariencia (**Figuras 2.11 y 2.12**) y posteriormente realizarles los correspondientes

análisis de textura. Los geles a pH 4,5 con 1% (p/v) de polifenoles no fueron auto-soportables por lo tanto tampoco resultaron aptos para los análisis de textura. También se observó la particularidad de que los geles a pH 6,0 con 1% (p/v) de polifenoles tuvieron una apariencia opaca, similar a aquellos a pH 4,5. Esto puede deberse al extenso grado de agregación inducido por la alta concentración de polifenoles, lo que lleva al desarrollo de un gel muy particulado.

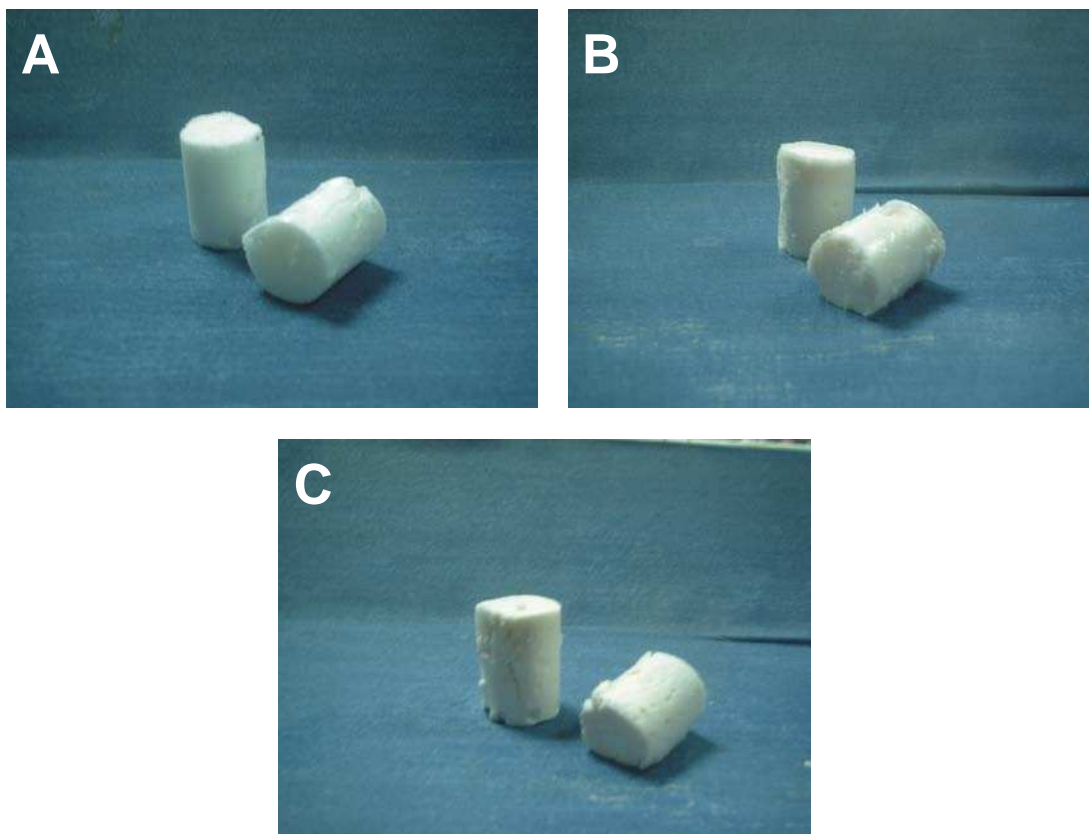


Figura 2.11. Apariencia macroscópica de geles de β -lg (15% p/v) a pH 4,5 con concentraciones crecientes de polifenoles (A: 0%, B: 0,25% y C: 0,5% p/v).

Además pudo observarse que cuando los geles presentaron apariencia translúcida, el agregado de polifenoles produjo un marcado cambio en el color de los mismos

(Figuras 2.10 y 2.12). Esto no se observó en los geles de apariencia opaca, donde el agregado de polifenoles produjo sólo un leve cambio del color. Esto está relacionado al porcentaje de polifenoles “precipitados” en la formación de complejos con β -lg a diferentes pH (Tabla 1.1). A pH 4,5 un 77% de los polifenoles se encuentra formando grandes agregados que precipitan. Sin embargo, sólo un 23% y un 7% de los polifenoles precipita a pH 3,0 y 6,0, respectivamente. Esto indica que los polifenoles en estos sistemas quedan en solución contribuyendo por lo tanto al color rojizo de los geles.

Bajo calentamiento a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico y a alta fuerza iónica, se forman grandes agregados al azar de proteína desnaturizadas por calor y se obtienen entonces los geles opacos llamados particulados o agregados (Aymard, Gimel, Nicolai & Durand, 1996; de Kruif et al., 1995; Gimel, Durand & Nicolai, 1994; Griffin & Griffin, 1993; Griffin, Griffin, Martin & Price, 1993; Harwalkar & Kalab, 1985; Langton & Hermansson, 1992; Le Bon, Nicolai & Durand, 1999; Renard, Axelos & Lefebvre, 1995; Stading & Hermansson, 1991; Stading, Langton & Hermansson, 1992). En condiciones de gran repulsión electrostática entre moléculas de β -lg, a valores de pH lejos del punto isoeléctrico y a baja fuerza iónica, se forman pequeños agregados lineales de moléculas de β -lg desnaturizada y se obtienen geles transparentes llamados de filamentos finos (estructura “fine strands”) (Aymard, Nicolai, Durand & Clark, 1999; Doi, 1993; Kavanagh, Clark & Ross-Murphy, 2000; Langton & Hermansson, 1992; Mudgal, Daubert & Foegeding, 2009; Stading & Hermansson, 1991; Stading & Hermansson, 1990; Stading et al., 1992) con un diámetro inferior a 4 – 5 nm, valor similar al de un monómero de β -lg (Langton & Hermansson, 1992). Pequeñas variaciones en el pH pueden tener un efecto drástico sobre la estructura de los geles y sobre las propiedades reológicas (Sagis et al., 2002).

Stading & Hermansson (1991) reportaron que los geles particulados son muy diferentes a los de filamentos finos en varios aspectos, ya que los primeros presentan valores de G' más altos y formaron estructuras gelificadas a temperaturas muy por

debajo de la temperatura de desnaturalización. La red del gel particulado se compone de agregados casi esféricos unidos entre sí formando los filamentos de la red.

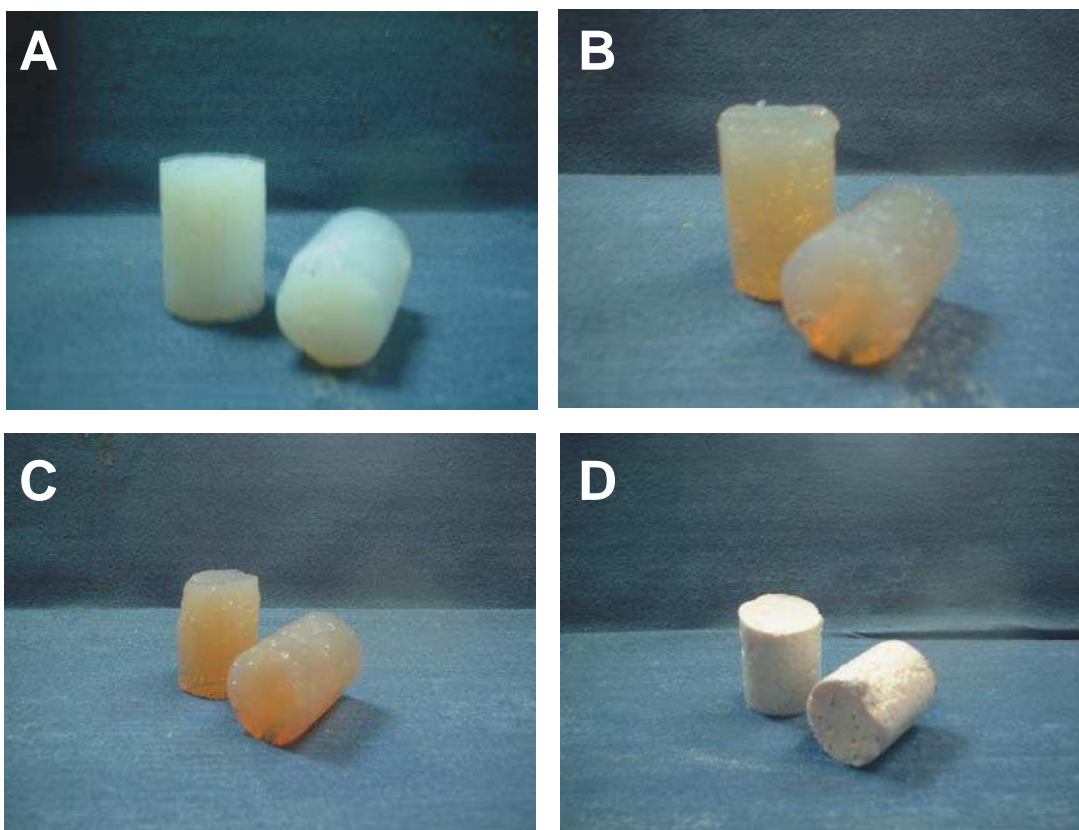


Figura 2.12. Apariencia macroscópica de geles de β -lg (15% p/v) a pH 6,0 con concentraciones crecientes de polifenoles (A: 0%, B: 0,25%, C: 0,5% y D: 1% p/v).

Además, los geles particulados formados a pH 4,5 son geles con estructura irregular (Langton & Hermansson, 1992). Los geles con microestructura particulada se forman cuando las condiciones permiten a las proteínas asociarse rápidamente en agregados grandes y desordenados (Foegeding, Bowland & Hardin, 1995). Estos resultados coinciden con los mostrados en la **Tabla 2.1**. Además, los mismos autores reportaron también que los geles particulados presentaron menor concentración crítica de gelificación que los geles de filamentos finos.

Se observaron también importantes diferencias en cuanto a la estructura de los geles de filamentos finos obtenidos a pH neutro y a pH ácidos. De hecho, según la bibliografía los filamentos pueden ser rígidos, semi-flexibles, o ramificados. A pH muy por encima del punto isoeléctrico (en el rango 6,5 – 9) los filamentos parecen ser más largos y más flexibles que a pH ácidos, aunque la densidad parece ser más o menos la misma (*Langton & Hermansson, 1992*). Mientras que por ejemplo, a pH 2 y a una fuerza iónica de 13 mM, la β -Ig forma largos filamentos rígidos después de calentar a 80 °C durante 10 h (*Aymard et al., 1999*). También *Langton & Hermansson (1992)* encontraron que a pH ácidos (3,5) la red estuvo formada por filamentos finos y fue regular, muy densa y con poros muy pequeños. Además, *Stading & Hermansson (1991)* reportaron que los geles de filamentos finos son frágiles a valores bajos de pH y más elásticos o gomosos a valores altos de pH. Esto coincide con lo observado en el presente trabajo, como se explicó previamente.

Harwalker (1980b) descubrió que el mecanismo de desnaturalización de β -Ig a pH 3 es diferente al que ocurre a pH neutro y sugirió que las interacciones disulfuro tendrían poca contribución sobre la agregación a pH bajo. La reacción de intercambio tiol-disulfuro depende del pH. La dependencia de la estabilidad térmica de la β -Ig con el pH está fuertemente relacionada con la carga electrostática y con la actividad del grupo tiol (*Donovan & Mulvihill, 1987*). Durante la transición conformacional de β -Ig en el rango de pH 6 – 9 ocurre un aumento de la actividad del grupo tiol, debido a que el pK del grupo tiol es ~ 8 (*Dunnill & Green, 1966*); por lo tanto, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son más probables en este rango de pH. En las soluciones de β -Ig a pH ácido, la formación de puentes disulfuro intra e inter-moleculares estaría suprimida debido a la baja reactividad de los grupos tiol en ese rango de pH (*Harwalker, 1980a, b; Kella & Kinsella, 1988; Liu, Relkin & Launay, 1994; Mills & Creamer, 1975; Relkin, Eynard & Launay, 1992; Wada, Fujita & Kitabatake, 2006*) o quizás también porque a pesar de que la conformación de β -Ig cambia bajo calentamiento a pH ácido, el grupo tiol no se expone completamente a la superficie de

la molécula y la reacción de intercambio tiol–disulfuro intermolecular parece que revierte a su forma original en el enfriamiento (*Wada et al., 2006*). Estas podrían ser al menos algunas de las razones por las cuales se observan grandes diferencias macroscópicas en los tipos de geles obtenidos por encima y por debajo de la zona isoeléctrica.

La presencia de polifenoles, que disminuyen la solubilidad del sistema mediante el incremento de las interacciones intermoleculares de las proteínas, podría tener un efecto similar al efecto del pH isoeléctrico sobre la microestructura de los geles. Esto indica que los polifenoles adicionados en un pH cercano al punto isoeléctrico promueven la agregación de las proteínas y la formación de geles particulados con el calentamiento.

Los análisis del perfil de textura de los diferentes geles de β -lg se muestran en las **Figuras 2.13** y **2.14**. La dureza de los geles de β -lg a pH 4,5 no se vio significativamente afectada por la adición de los polifenoles (**Figura 2.13 A**). Tampoco hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de elasticidad y cohesividad de estos geles con el aumento de la concentración de polifenoles, a pesar de que se observa una leve tendencia descendente (**Figura 2.14**). Por el contrario, se observaron diferencias significativas ($p = 0,0057$) en la adhesividad de los geles de β -lg a pH 4,5 en presencia de polifenoles dado que esta propiedad aumenta más del doble con 0,25 y 0,5% de polifenoles (**Figura 2.13 B**).

A pH 6,0 la dureza disminuyó con el aumento de la concentración de polifenoles, especialmente a la concentración más alta (**Figura 2.13 A**). Resultados similares se observaron para el resto de los parámetros evaluados (adhesividad, elasticidad y cohesividad), ya que en todos los casos se obtuvieron diferencias significativas cuando la concentración de polifenoles alcanzó el 1% p/v. Una marcada disminución en la elasticidad y cohesividad indicarían un gel de menor calidad, o uno donde aquellos

atributos deseables en un gel de proteínas se ven negativamente afectados (**Figura 2.14 A y B**).

De esta manera, la adición de polifenoles como compuestos bioactivos podría efectuarse hasta una concentración máxima de 0,5% p/v sin afectar negativamente las propiedades de textura de los geles tanto a pH 4,5 como 6,0.

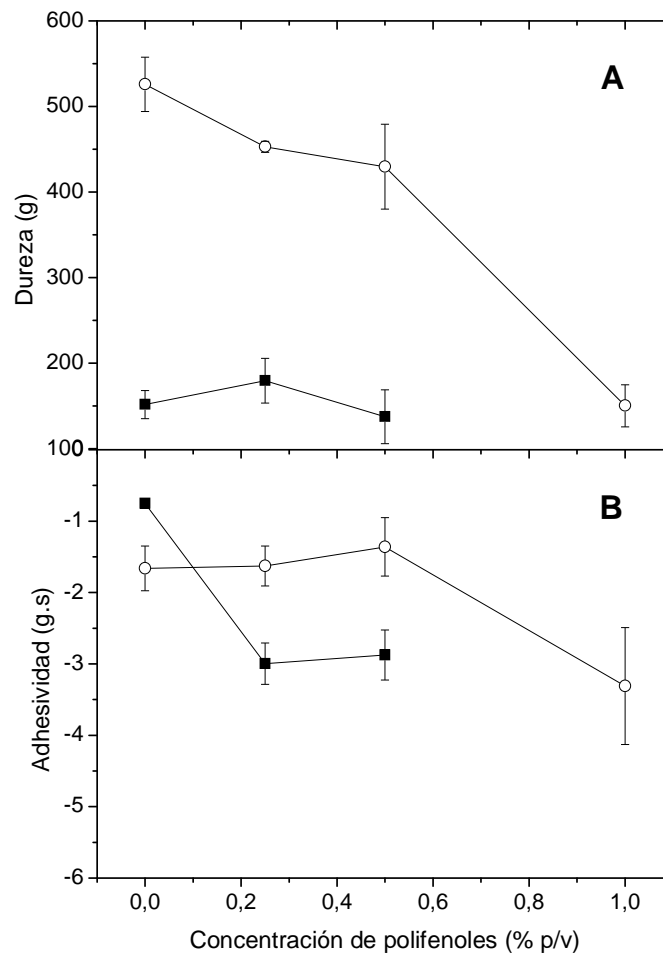


Figura 2.13. Dureza y adhesividad de geles de β -lg (15% p/v) con concentraciones crecientes de polifenoles (0,25-1% p/v) a pH (■) 4,5 y (○) 6,0.

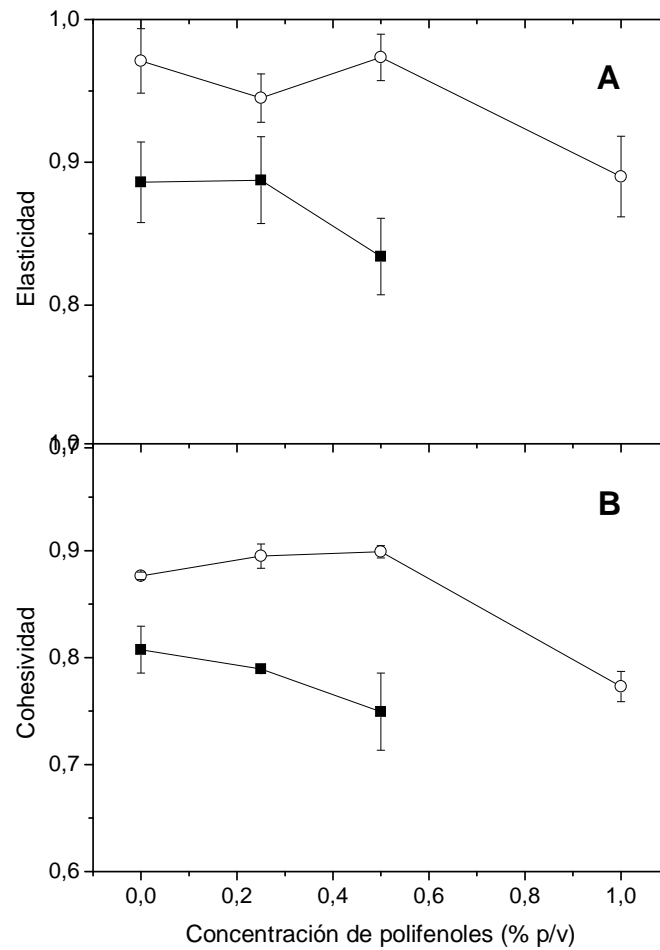


Figura 2.14. Elasticidad y cohesividad de geles de β -Ig (15% p/v) con concentraciones crecientes de polifenoles (0,25-1% p/v) a pH (■) 4,5 y (○) 6,0.

2.4. Impacto de los polifenoles en la gelificación de CMP a distintos valores de pH.

Existen pocos estudios sobre la gelificación del CMP. La concentración mínima para que se produzca la gelificación de CMP en frío es dependiente del pH. Por debajo de pH 4, CMP gelifica, incluso a bajas concentraciones (3 % p/v), pero los tiempos

necesarios para la gelificación son largos (150 – 370 h). Cuando la concentración de CMP es mayor a 7 – 8 % p/v, el tiempo de gelificación es más corto (< 50 h) (Farías, Martínez & Pilosof, 2010). Sin embargo, existe un pH umbral por encima del cual no se produce la gelificación del CMP: Farías et al. (2010) observaron que en el rango de pH 4 - 7 el CMP no gelifica, ni siquiera a concentraciones tan altas como 40 % p/v. Estas observaciones disienten de las de Burton & Skudder (1987), quienes encontraron que una solución de CMP a pH 4,5 y 20 °C gelifica al 9,3 % p/v. Las diferencias en estas observaciones pueden deberse a la fuerza iónica del medio.

Como se mostró en el **Capítulo 1**, el CMP a pH 3,0 se asocia a temperatura ambiente lo cual, en el tiempo, conduce a la formación de geles opacos. El modelo propuesto por Farías et al. (2010) para explicar el autoensamblaje del CMP y la formación de una estructura gelificada a temperatura ambiente incluye un primer paso de asociación hidrofóbica para formar dímeros que interactúan después, en una segunda etapa, por enlaces electrostáticos para formar geles. Además, al aumentar la temperatura se produce un aumento de la velocidad de la primera etapa del proceso de autoensamblaje que implica interacciones hidrofóbicas entre monómeros de CMP, lo cual aumentaría la velocidad global de gelificación, sin cambiar el mecanismo (Martínez, Farías & Pilosof, 2011).

La **Figura 2.15 A** muestra la dinámica de gelificación del CMP a pH 3,0, durante el calentamiento hasta 90 °C, manteniendo la muestra en estas condiciones durante 15 minutos y enfriando finalmente hasta 35 °C.

El punto de cruce entre G' y G'' permite estimar el tiempo y la temperatura de gelificación de CMP. Después de ese tiempo, el valor de G' continuó aumentando hasta alcanzar los 90 °C, donde se estabilizó. Es de notar que, el valor de G' no continuó aumentando durante el enfriamiento, o al menos no en la medida en que suele ocurrir en general para otras proteínas, cuyas estructuras se ven reforzadas por

un mayor número de uniones puentes de hidrógeno, al descender la temperatura (Bryant & McClements, 1998). Esto revela que en la consolidación de la estructura gelificada no participarían uniones puente hidrógeno (Martínez et al., 2011).

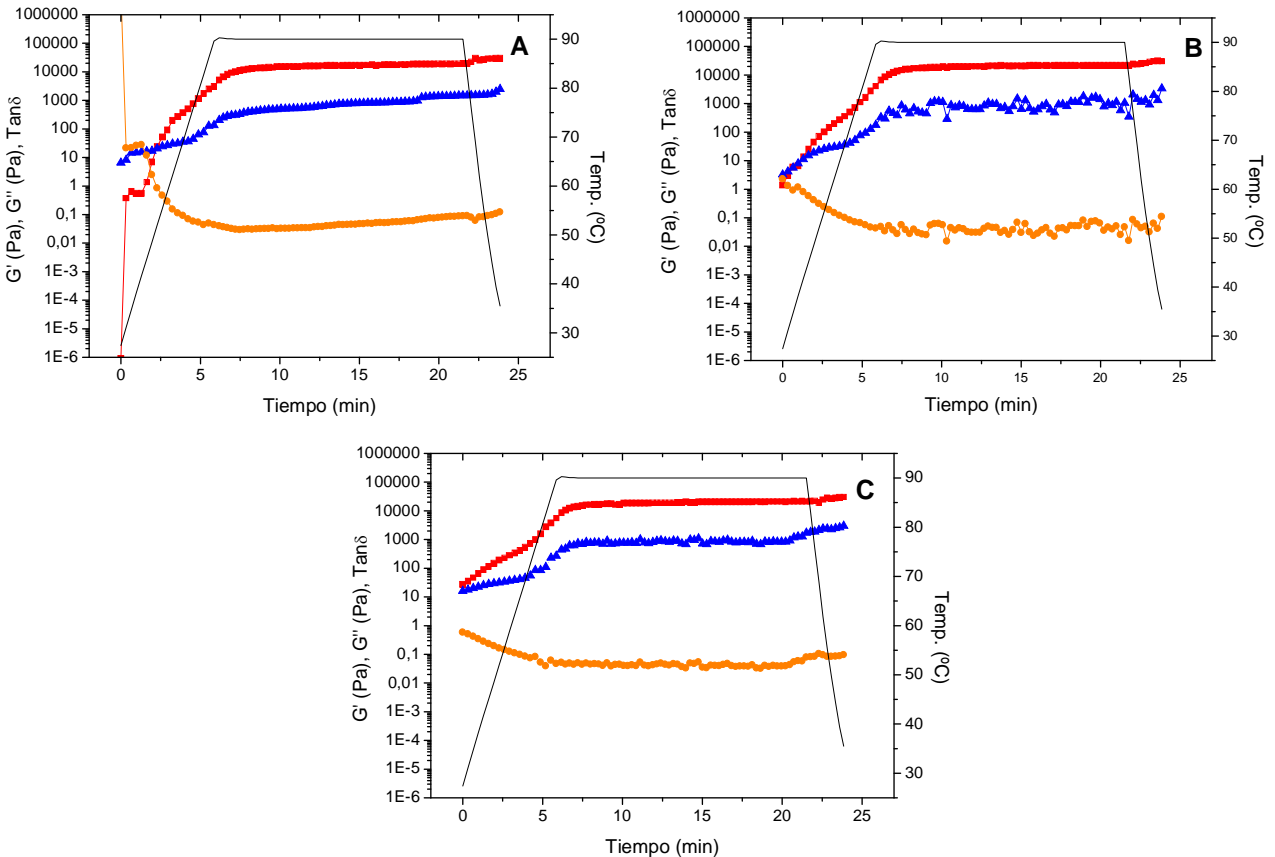


Figura 2.15. Evolución de los parámetros reológicos durante el calentamiento y enfriamiento de CMP (15 % p/v) a pH 3,0 en presencia de polifenoles (A) 0%, (B) 0,25% y (C) 0,5% p/v. (—■—) G' , (—▲—) G'' , (—●—) $\tan\delta$, (—) Temperatura.

En los sistemas mixtos CMP-polifenoles se observó un menor tiempo para que ocurra el cruce entre G' y G'' , es decir la gelificación es más rápida a mayor concentración de polifenoles (Figura 2.15 B y C). De hecho, el sistema CMP con 1% p/v de polifenoles no pudo medirse porque al ajustar el pH, éste gelificó en tan sólo unos segundos y fue imposible pipetearlo para colocarlo en el reómetro. Los tiempos de gelificación se

traducen en este caso también en menores temperaturas de gelificación. Los datos se encuentran resumidos en la **Tabla 2.3**.

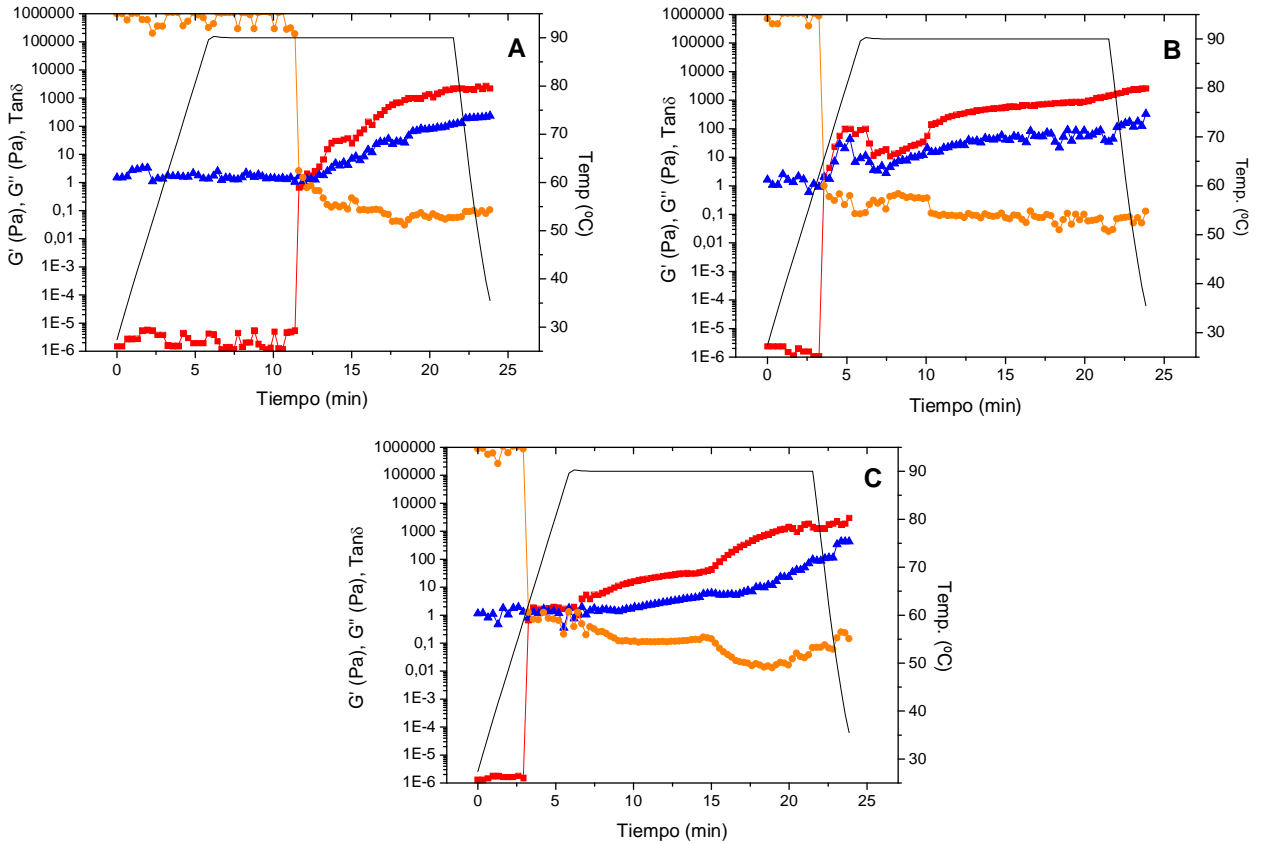


Figura 2.16. Evolución de los parámetros reológicos durante el calentamiento y enfriamiento de CMP (15 % p/v) a pH 4,5 en presencia de polifenoles (A) 0%, (B) 0,25% y (C) 0,5%.

(-■-) G' , (-▲-) G'' , (-○-) $\tan\delta$, (-) Temperatura.

A pH 4,5, estaríamos ya en una situación de compromiso dado que en algunos casos el CMP gelifica y en otros no (*Burton & Skudder, 1987; Farías et al., 2010*). En este trabajo y para este pH en particular, se utilizó siempre CMP en buffer acetato (10 mM, pH 4,5) y lo que se observó es que el CMP gelifica pero a tiempos largos (12,2 minutos) (**Figura 2.16 A**). Sin embargo, este comportamiento se ve revertido en presencia del polifenol ya el punto gel se observa a un tiempo mucho más corto, tanto con 0,25 como con 0,5% p/v de polifenoles (**Figura 2.16 B y C**). La dinámica de gelificación con 1% p/v de polifenoles no se muestra porque en este caso no se

observó gelificación alguna. Estos resultados podrían explicarse mediante la capacidad que tienen los polifenoles para unirse al CMP y formar grandes agregados que inducen una gelificación más rápida. Sin embargo, cuando la concentración de polifenoles es muy alta, los péptidos estarían cubiertos por las moléculas de polifenol y ya no serían capaces de interactuar entre sí para formar un gel.

A pH 6,0 no se observó gelificación alguna ya que no se observó cruce entre G' y G'' . A este pH no se logró gelificación del CMP ni siquiera en presencia polifenoles (datos no mostrados).

En la **Tabla 2.3** se puede observar que la viscoelasticidad relativa de los geles de CMP fue en todos los casos mayor (menor $\tan\delta$) a la de los geles de β -lg. Además, a pH 3,0 el gel de CMP presentó valores de G' casi tres veces mayores que los correspondientes a los geles de β -lg (**Tabla 2.1**). Los valores de G' a pH 4,5 son muy pequeños indicando un bajo carácter sólido a este pH.

Pudo observarse que a ambos valores de pH los sistemas mixtos con 0,25% y 0,5% (p/v) de polifenoles gelificaron mucho más rápido y a menor temperatura que los sistemas con CMP solo, lo que sugiere que existe una interacción sinérgica entre CMP y polifenoles. Además a pH 4,5 se observó que el carácter sólido de los geles aumentó ligeramente conforme se incrementó el contenido de polifenoles en la mezcla (**Tabla 2.3**). Sin embargo, también aumentó el componente viscoso G'' , con lo cual viscoelasticidad relativa disminuyó con el aumento de los polifenoles, es decir que $\tan\delta$ aumentó (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Parámetros reológicos que describen la gelificación de CMP (15% p/v) afectados por la presencia de polifenoles de té verde. Se informan el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la viscoelasticidad relativa ($\tan\delta$) a 1Hz, luego del enfriamiento a 35°C. La dependencia de G' con la frecuencia (n) se evaluó a 25°C según la ecuación 1.

A: pH 3,0

| Polifenol | t_{gel} (min) | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | Tan δ | n | R^2 |
|-----------|-----------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|--------|--------|
| 0 | 2,6 | 52,0 \pm 0,2 | 30445 \pm 1068 | 2470 \pm 33 | 0,08 \pm 0,03 | 0,0526 | 0,9665 |
| 0,25 | 1,5 | 39,9 \pm 0,1 | 30950 \pm 754 | 3390 \pm 198 | 0,11 \pm 0,02 | 0,0537 | 0,9783 |
| 0,5 | < 0,3 | <27,4 | 30900 \pm 1159 | 2975 \pm 389 | 0,10 \pm 0,01 | 0,0521 | 0,989 |

B: pH 4,5

| Polifenol | t_{gel} (min) | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | Tan δ | n | R^2 |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------|--------|
| 0 | 12,2 | 90,0 \pm 0,2 | 2220 \pm 118 | 232 \pm 31 | 0.10 \pm 0,01 | 0,035 | 0,9012 |
| 0,25 | 3,9 | 65,6 \pm 0.1 | 2600 \pm 282 | 329 \pm 72 | 0,13 \pm 0.01 | 0,0786 | 0,9349 |
| 0,5 | 3,9 | 65,6 \pm 0.3 | 3020 \pm 214 | 429 \pm 25 | 0,14 \pm 0,02 | 0,0974 | 0,8383 |

Los valores indican el promedio \pm la desviación estándar (al menos 2 réplicas).
 T_{gel} es la temperatura de gelificación.

Luego de terminado el tratamiento térmico y el enfriamiento, se realizaron los barridos de frecuencia de los geles obtenidos a pH 3,0 y 4,5. En todos los casos se observó que el valor de G' fue superior al de G'' en todo el rango de frecuencia aplicada (**Figuras 2.17 y 2.18**).

El valor de G' de los geles CMP y CMP con polifenoles aumentó levemente con el incremento de la frecuencia aplicada en todas las relaciones estudiadas.

A pH 3,0 los sistemas de CMP solo y con polifenoles presentaron los mayores valores de G' en todo el rango de frecuencia estudiado lo que se corresponde con los resultados observados en la **Tabla 2.3**.

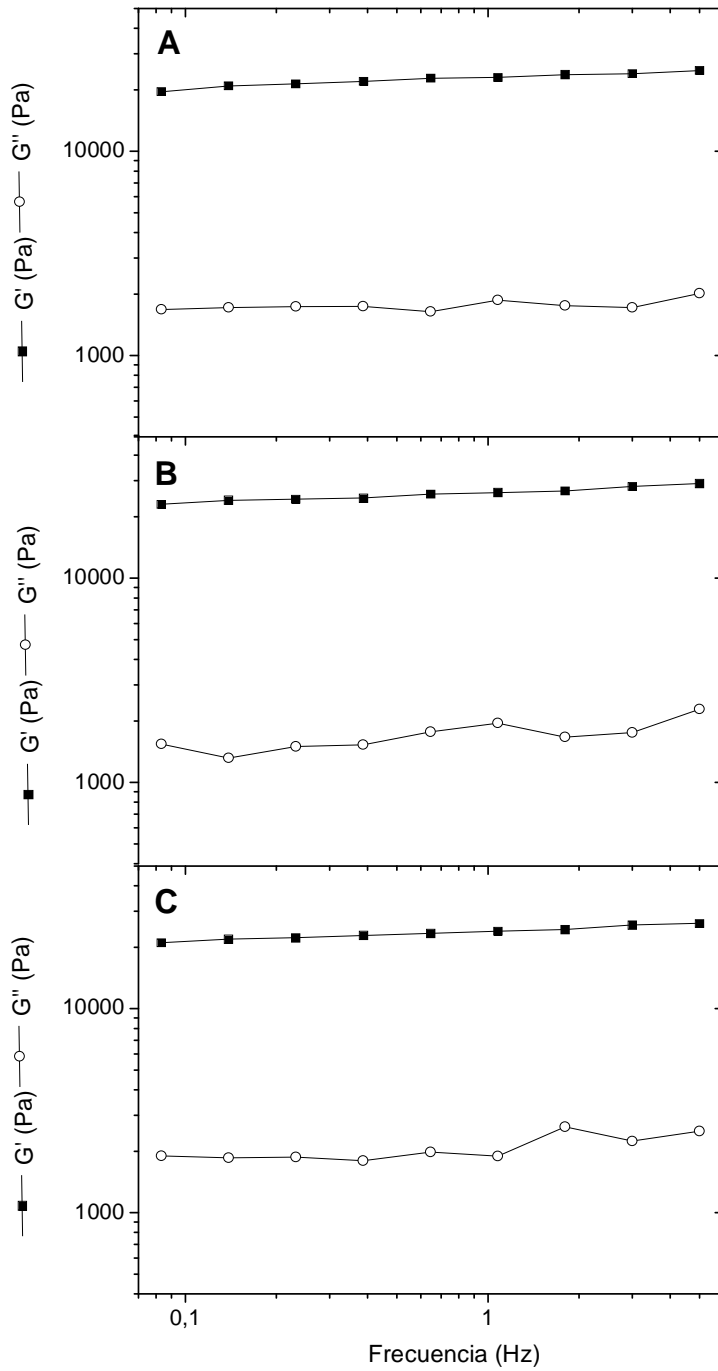


Figura 2.17. Módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia de oscilación de geles de CMP (15% p/v) a pH 3,0 en presencia de polifenoles. (A) 0%, (B) 0,25% y (C) 0,5% p/v. Temperatura 25 °C.

A pH 4,5 los valores de G' fueron menores que a pH 3,0 en todo el rango de frecuencia aplicada, pero en este caso sí se evidenció un aumento del G' conforme aumentó el contenido de polifenoles tal como se informó en la **Tabla 2.3**.

En la **Tabla 2.3** se muestran los valores de n correspondientes a la pendiente de las rectas en las **Figura 2.17** y **2.18** de acuerdo a la **ecuación 1**. Se obtuvieron valores de n en el orden de 10^{-2} , indicando la predominancia de la naturaleza elástica.

El comportamiento durante la gelificación de mezclas de CMP y polifenoles se puede explicar a partir de la existencia de interacciones no covalentes entre CMP y polifenoles a temperatura ambiente, a ambos valores de pH (3,0 y 4,5). La asociación entre CMP y polifenoles a pH 3,0 probablemente involucraría interacciones más fuertes que a pH 4,5 debido a que el CMP es muy afectado por cambios en el pH. Como se explicó previamente, el CMP contiene dos residuos de Asp, siete u ocho de Glu (dependiendo de la variedad genética B o A, respectivamente), uno de fosfo-Ser y tres de Lys (*Dziuba & Minkiewicz, 1996*). Por debajo de su pI, las moléculas de CMP pierden la carga negativa de los residuos de Glu y Asp, también el grupo carboxilo en el C-terminal y el residuo de ácido siálico en el gCMP. A pH 3,0, la forma no glicosilada del CMP (aCMP) se encuentra por debajo de su pI (4,15) y presenta un valor de potencial zeta de alrededor de +5 mV, mientras que la forma glicosilada del CMP (gCMP) se encuentra por encima de su pI (3,15) con un valor de potencial zeta de -5 mV, debido a que la carga negativa de los residuos de ácido siálico (pK del ácido siálico: 2,2) reduce la carga neta de la cadena de aminoácidos (*Kreuz, Strixner & Kulozik, 2009*).

La asociación entre CMP y polifenoles sería por interacciones hidrofóbicas. CMP podría interactuar a través del dominio hidrofóbico N-terminal del CMP (AA 1-5), el

cual no está cubierto por una carga negativa primero, seguido por los dominios hidrofóbicos ubicados en el centro de la cadena peptídica.

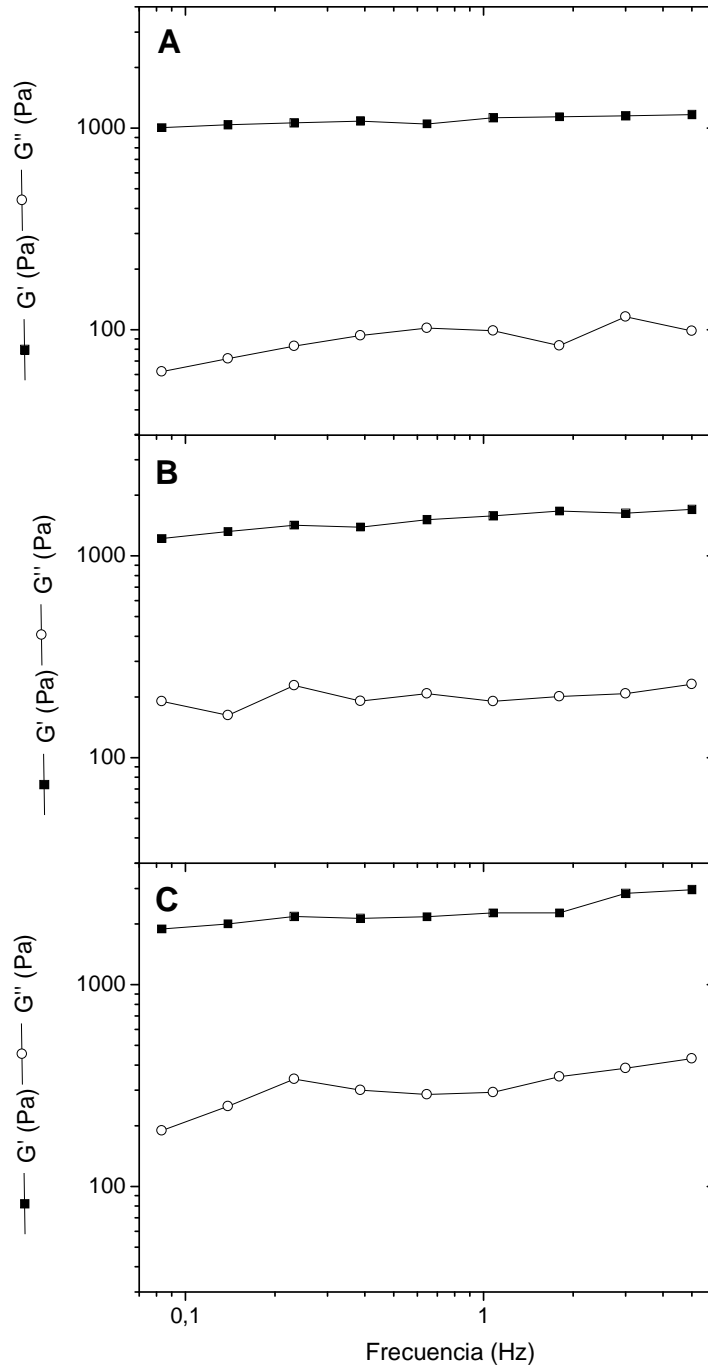


Figura 2.18. Módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia de oscilación de geles de CMP (15% p/v) a pH 4,5 en presencia de polifenoles. (A) 0%, (B) 0,25% y (C) 0,5% p/v. Temperatura 25 °C.

Como fue explicado, el mecanismo de la gelificación en frío del CMP, incluye una primera etapa de asociación hidrofóbica para formar dímeros, la cual comienza a pH por debajo de 6,5, seguida por interacciones a través de uniones electrostáticas a pH 4,5, para formar geles en el tiempo. El autoensamblaje del CMP a ambos valores de pH estaría promovido por la presencia de polifenoles, los cuales pueden complejarse con el CMP y de este modo acelerar su posterior gelificación, con un claro aumento en el valor de G' de los geles mixtos (**Tabla 2.3**).

Por otro lado, a pH 4,5 y con una alta concentración de polifenoles (1% p/v), la gelificación de CMP estaría prevenida estéricamente debido al mayor bloqueo de los dominios hidrofóbicos, con lo cual no están disponibles para interactuar durante el calentamiento. Como resultado de estas complejas interacciones, los geles mixtos exhiben un comportamiento sinérgico hasta 0,5% de polifenoles y luego se vuelve antagónico al superar esta concentración. Este comportamiento es distinto a pH 3,0 donde con 1% (p/v) de polifenoles el sinergismo resultó aún mayor y el sistema gelificó en tan sólo unos segundos.

2.5. Conclusiones

La presencia de polifenoles acelera el proceso de gelificación tanto de la β -lg como del CMP. Esto se evidencia en menores tiempos y temperaturas de gelificación. En el caso de β -lg, el complejamiento de la misma con los polifenoles (**Capítulo 1**) facilita tanto su desnaturalización como su agregación. En el caso de CMP, su gelificación no está mediada por una etapa de desnaturalización (de hecho el péptido no presenta transición térmica). El complejamiento del CMP con los polifenoles (**Capítulo 1**) promueve la agregación del mismo. En los geles de β -lg el componente elástico

aumenta muy significativamente con el incremento en la concentración de polifenoles, mientras que en el caso de CMP no se observan cambios significativos. En ambos casos la viscoelasticidad relativa de los geles disminuye con el agregado de polifenoles (aumenta $\tan\delta$). La textura de los geles de β -lg y su apariencia visual también se vio notablemente afectada por la adición de polifenoles.

2.6. Referencias

Aymard, P., Gimel, J. C., Nicolai, T., & Durand, D. (1996). Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β -lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 93, 987-997.

Aymard, P., Nicolai, T., Durand, D., & Clark, A. (1999). Static and dynamic scattering of β -lactoglobulin aggregates formed after heat-induced denaturation at pH 2. *Macromolecules*, 32(8), 2542-2552.

Baeza, R. (2003). Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. PhD* (p. 253). Buenos Aires, Argentina.

Baeza, R. I., & Pilosof, A. M. R. (2002). Calorimetric studies of thermal denaturation of β -lactoglobulin in the presence of polysaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 393-399.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trend in Food Science and Technology*, 9, 143-151.

Burton, J., & Skudder, P. J. (1987). Whey proteins. UK patent application GB 2188526 A1.

Clark, A. H. (1992). Gels and gelling. In: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, *Physical chemistry of foods* (pp. 263-305). New York: Marcel Dekker.

Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.

De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Ithaca, New York: Cornell University Press.

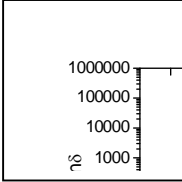
de Kruif, K. G., Hoffmann, M. A. M., van Marle, M. E., van Mil, P. J. J. M., Roefs, S. P. F. M., Verheul, M., & Zoon, N. (1995). Gelation of protein from milk. *Faraday Discussions*, 101, 185-200.

de Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701-2710.

Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 1-5.

- Donovan, M., & Mulvihill, D. M. (1987). Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 87-100.
- Dunnill, P., & Green, D. W. (1966). Sulphydryl groups and the N ↔ R conformational change in β -lactoglobulin. *Journal of Molecular Biology*, 15, 147-151.
- Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (1996). Influence of Glycosylation on Micelle-Stabilizing Ability and Biological Properties of C-terminal Fragments of Cow's κ -Casein. *International Dairy Journal*, 6, 1017-1044.
- Fariás, M. E., Martínez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79-88.
- Flory, P. J. (1953). *Principles of polymer chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Flory, P. J. (1974). Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57, 7-18.
- Foegeding, E. A., Bowland, E. L., & Hardin, C. C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), 237-249.
- Foegeding, E. A., & Hamann, D. D. (1992). Physicochemical aspects of muscle tissue behaviour. In: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, *Physical Chemistry of Foods* (pp. 423-441). New York: Marcel Dekker.
- Gimel, J. C., Durand, D., & Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, 27, 583-589.
- Griffin, W. G., & Griffin, M. C. A. (1993). Time-dependent polydispersity of growing colloidal aggregates: predictions from dynamic light scattering. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.*, 89, 2879-2889.
- Griffin, W. G., Griffin, M. C. A., Martin, S. R., & Price, J. (1993). The molecular basis of thermal aggregation of bovine β -lactoglobulin A. *Faraday Transactions*, 89, 3395-3406.
- Harbourne, N., Jacquier, J. C., & O'Riordan, D. (2010). Effects of addition of phenolic compounds on the acid gelation of milk. *International Dairy Journal, In Press, Accepted Manuscript*.
- Harwalkar, V. R. (1980a). Kinetics of thermal denaturation of β -lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of Dairy Science*, 63, 1052-1053.
- Harwalkar, V. R. (1980b). Measurement of thermal denaturation of β -lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of Dairy Science*, 63, 1043-1051.
- Harwalkar, V. R., & Kalab, M. (1985). Thermal denaturation and aggregation of β -lactoglobulin in solution. Electron microscopic study. *Milchwissenschaft*, 40(2), 65-68.
- Hermansson, A. M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal American Oil Chemistry Society*, 56, 272-279.

- Ikeda, S., & Foegeding, E. A. (1999). Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 245-254.
- Ikeda, S., & Morris, V. J. (2002). Fine-stranded and particulate aggregates of heat denatured whey protein visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 3, 382-389.
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH β -lactoglobulin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 41-50.
- Kella, D., & Kinsella, J. E. (1988). Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH. A possible mechanism. *Biochemical Journal*, 255, 113-118.
- Kreuz, M., Strixner, T., & Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropptide. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1818-1826.
- Langton, M., & Hermansson, A. M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.
- Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Growth and structure of aggregates of heat-denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 451-465.
- Liu, T. X., Relkin, P., & Launay, B. (1994). Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta*, 246, 387-403.
- Mangino, M. E. (1992). Gelation of whey protein concentrates. *Food Technology*, 46, 114-119.
- Martinez, M. J., Farías, M. E., & Pilosof, A. M. R. (2011). Casein glycomacropptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food Hydrocolloids*, In Press, Corrected Proof.
- Mills, O. E., & Creamer, L. K. (1975). A conformational change in bovine β -lactoglobulin at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 379, 618-6126.
- Morr, C., & Ha, Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
- Mudgal, P., Daubert, C. R., & Foegeding, E. A. (2009). Cold-set thickening mechanism of β -lactoglobulin at low pH: Concentration effects. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1762-1770.
- Mulvihill, D. M., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.
- O'Connell, J. E., Fox, P. D., Tan-Kintia, R., & Fox, P. F. (1998). Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk. *International Dairy Journal*, 98, 689-693.



Ould Eleya, M. M., & Turgeon, S. L. (2000). Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 29-40.

Pilosof, A. M. R. (2000). Gelificación. In: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 75-95). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.

Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 565-601.

Relkin, P., Eynard, L., & Launay, B. (1992). Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. A DSC study of denaturation by heating. *Thermochimica Acta*, 204, 111-121.

Renard, D., Axelos, M. A. V., & Lefebvre, J. (1995). Investigation of sol-gel transitions of β -lactoglobulin by rheological and small-angle neutron scattering measurements In: E. Dickinson, & D. Lorient, *Food Macromolecules and Colloids* (pp. 390-399). Cambridge, UK: Royal Society Chemistry.

Sagis, L. M. C., Veerman, C., Ganzevles, R., Ramaekers, M., Bolder, S. G., & van der Linden, E. (2002). Mesoscopic structure and viscoelastic properties of β -lactoglobulin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 16(3), 207-213.

Sarker, D. K., Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1995). Control of surfactant-induced destabilization of foams through polyphenol-mediated protein-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 295-300.

Stading, M., & Hermansson, A.-M. (1991). Large deformation properties of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 339-352.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin structures. *Food Hydrocolloids*, 4(2), 121-135.

Stading, M., & Hermansson, A. M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 5, 455-470.

Stading, M., Langton, M., & Hermansson, A.-M. (1992). Inhomogeneous fine-stranded β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 455-470.

Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin *Bipolymers*, 49, 11-20.

Wada, R., Fujita, Y., & Kitabatake, N. (2006). Effects of heating at neutral and acid pH on the structure of β -lactoglobulin A revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 841-847.

Wu, W., Clifford, M., & Howell, N. K. (2007). The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1810-1819.

CAPÍTULO 3

*Impacto de los polifenoles de té verde
sobre la estabilidad coloidal y la
gelificación de WPC*

El objetivo de este capítulo fue estudiar la estabilidad coloidal y la gelificación de un sistema lácteo real como es el WPC en presencia de polifenoles y comparar su comportamiento con lo descrito en los Capítulos 1 y 2 para las proteínas aisladas.

3.1. Introducción

Los derivados del suero de queso como el WPC son utilizados en la fabricación de alimentos lácteos (helados, yogures fortificados, cremas, leches fermentadas, untables), productos cárnicos (carnes procesadas embutidos), panificados (bases para pasteles, galletitas, barras nutritivas), productos de confitería (chocolates, coberturas, caramelos) y bebidas (mezclas con cacao, crema para café, bebidas para deportistas) (de Wit, 1998; González-Martínez et al., 2002).

En general, los derivados del suero de queso han sido agregados en alimentos como contenido sólido, sustituyente de azúcares, estabilizante para productos cárnicos, aditivo para leches fermentadas y para productos de quesería, aditivo y espesante en sopas preparadas y pasta de tomates, y como sustituto de grasa láctea en productos lácteos dietéticos. También puede sustituir el agregado de leche descremada en polvo, aportando proteínas de alta calidad a casi la mitad del costo y reduce el agregado de endulzantes que son reemplazados por la lactosa. Los WPC además de contener como proteínas mayoritarias a la β -lg, α -la y eventualmente CMP, contienen BSA, inmunoglobulinas, lactosa, sales y grasa residual, todos ellos en distintas proporciones dependiendo del proceso de fabricación del WPC. Por ello, de utilizar WPC y polifenoles en la formulación de un alimento funcional, cabe preguntarse cómo serán las interacciones entre polifenoles y un sistema complejo como WPC, así como su impacto en las propiedades tecnológicas del WPC.

Debido a esto se decidió continuar los estudios con un WPC35, el cual es un producto comercial. Su composición porcentual es la siguiente: proteína 38,3% (en base seca), lactosa 48,8%, grasa 2,2%, humedad 3,2%, ceniza 7,5%.

3.2. Estabilidad coloidal de mezclas de WPC y polifenoles

La **Figura 3.1** muestra la evolución del volumen de la fase superior acuosa debido a la precipitación de los complejos de WPC-polifenol en mezclas de WPC (8% p/v) y diferentes concentraciones de polifenoles (0,25-1% p/v). El comportamiento del WPC solo también se incluyó a modo de comparación. A pH 4,5, se observó una separación de fases muy rápida en los dos primeros días de almacenamiento para todas las concentraciones de polifenol (**Figura 3.1 A**), mientras que a pH 6,0 sólo la mezcla con 1% de polifenoles mostró un comportamiento similar (**Figura 3.1 B**). A pH 4,5, cerca del punto isoeléctrico de las principales proteínas del lactosuero (β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y seroalbúmina bovina), la carga neta de los complejos es mínima (**Capítulo 1**) y la interacción entre ellos es promovida mediante “puentes” de polifenol (*Charlton et al., 2002*). Como resultado, estas partículas más grandes, de solubilidad reducida aumentan la floculación.

La cantidad de polifenoles que permaneció soluble en las fases superiores de las mezclas de WPC-polifenoles luego de 24 horas de incubación se determinó como una estimación del grado de precipitación de los polifenoles por las proteínas del suero (**Tabla 3.1**). Adicionalmente, las proteínas de las fases superiores también se analizaron mediante SDS-PAGE.

Tabla 3.1. Polifenoles precipitados (% Promedio \pm desvío estándar) por WPC35 (8% p/v) luego de 24 horas de incubación.

| Concentración de polifenoles (% p/v) | pH 4,5 | pH 6,0 |
|--------------------------------------|------------|------------|
| 0,25 | 36 \pm 1 | 5 \pm 1 |
| 0,5 | 51 \pm 3 | 11 \pm 1 |
| 1 | 83 \pm 5 | 70 \pm 2 |

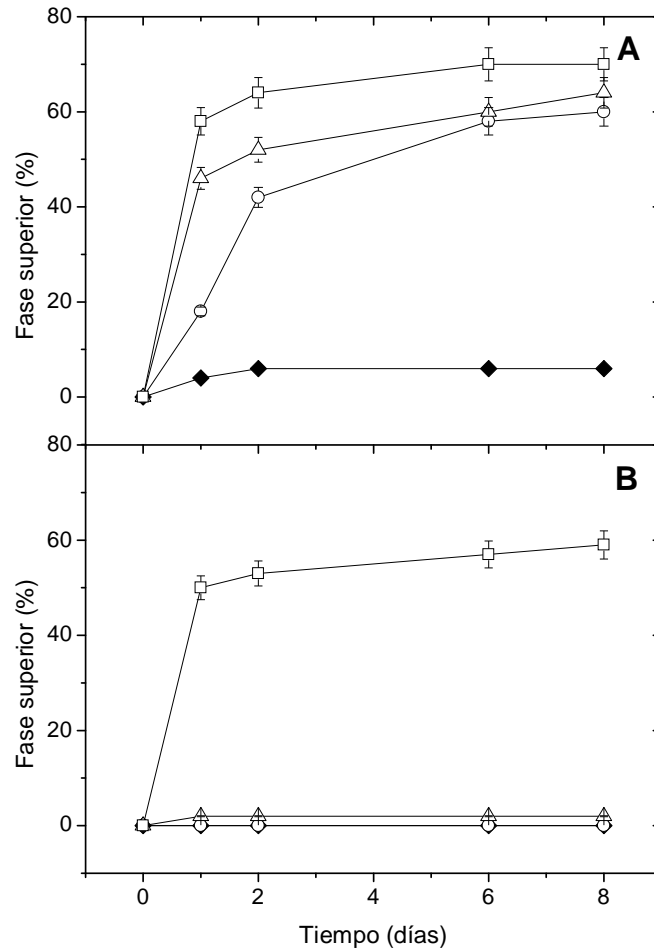


Figura 3.1: Volumen de la fase superior en el tiempo de almacenamiento de WPC (8% p/v) (◆) y mezclas de WPC (8% p/v)-polifenoles a (A) pH 4,5 y (B) pH 6,0. Las concentraciones de polifenoles son (○) 0,25%, (△) 0,5% y (□) 1% p/v.

El perfil proteico correspondiente al WPC solo (0% polifenol) en la **Figura 3.2** mostró dos bandas principales correspondientes a β -lactoglobulina (18.3 kDa) y a α -lactoalbúmina (14.2 kDa). También la banda correspondiente a agregados de caseinomacropéptido (CMP) pudo identificarse con un peso molecular cercano a 31 kDa (Nakano, Ikawa & Ozimek, 2007). La banda denominada B I con un peso molecular de aproximadamente 36 kDa, y las bandas con pesos moleculares por encima de 90 kDa, denominadas B II podrían corresponder a cadenas pesadas de inmunoglobulinas (Kinghorn, Norris, Paterson & Otter, 1995; Pessela et al., 2006).

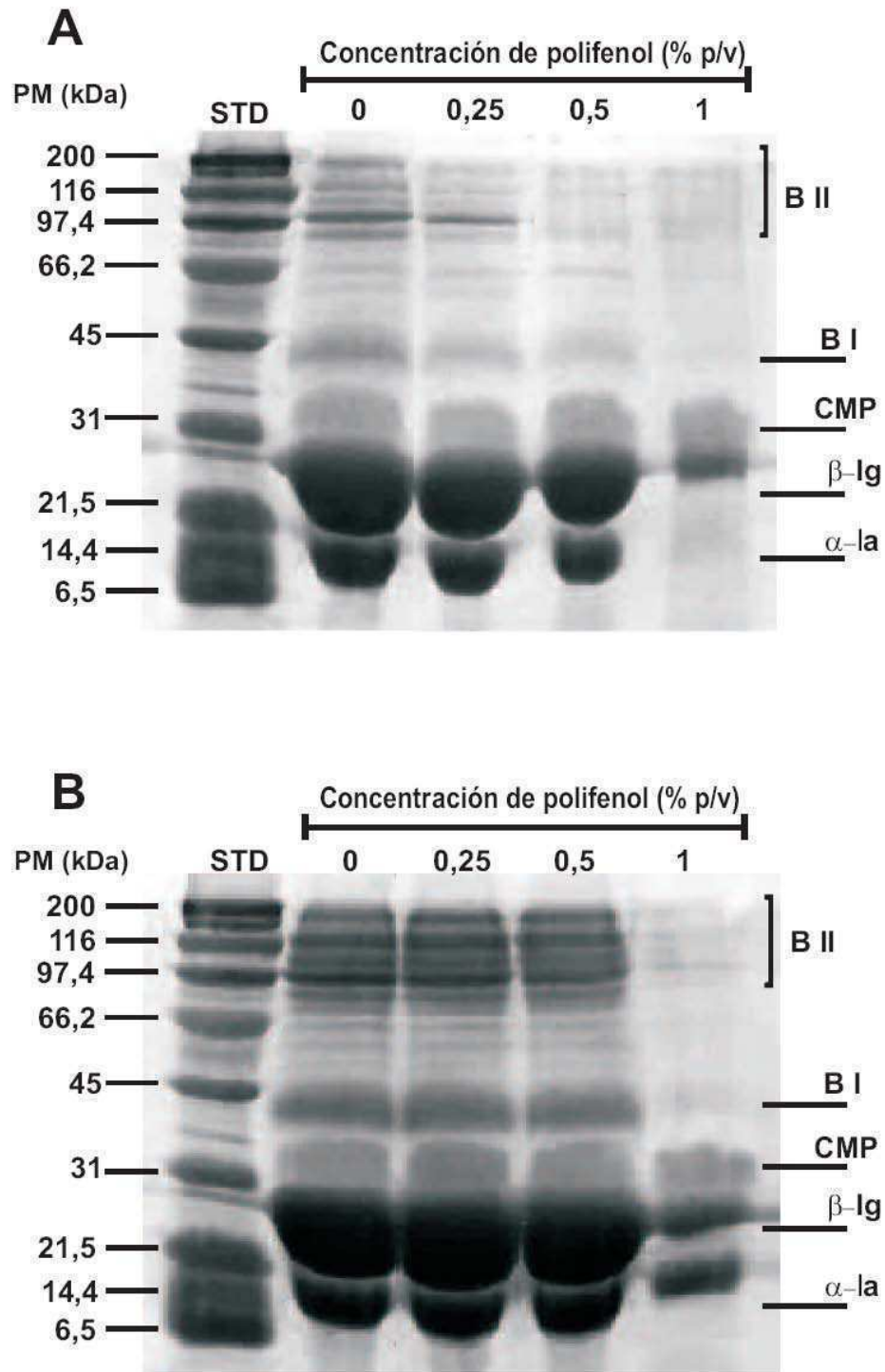


Figura 3.2. Patrones de SDS-PAGE para las fases superiores de sistemas mixtos de WPC (8% p/v)-polifenoles luego de 24 horas a (A) pH 4,5 y (B) pH 6,0.

A pH 4,5, la intensidad de las bandas correspondientes a β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, B I y B II disminuyó gradualmente con el incremento de la concentración de polifenoles (**Figura 3.2 A**), mientras que a pH 6,0 la intensidad de las bandas no cambió hasta que se alcanzó una concentración de 1% (p/v) de polifenoles (**Figura 3.2 B**). La misma tendencia se observó para el porcentaje de polifenoles precipitados dado que a pH 4,5 pudo observarse un incremento gradual desde 36 ± 1 hasta 83 ± 5 , mientras que a pH 6,0 sólo con la concentración más elevada (1% p/v) se obtuvo un gran porcentaje de polifenoles precipitados (70 ± 2) (**Tabla 3.1**). Así, tanto el pH como la concentración de polifenoles tienen una función importante en la estabilidad coloidal del WPC. Esto parece indicar la existencia de una concentración umbral de polifenoles dependiente del pH por sobre la cual los complejos se vuelven insolubles y precipitan. Es más, los polifenoles no presentaron especificidad de unión por ninguna fracción proteica en particular. En el Capítulo 1 se mostró que el polifenol se puede complejar a β -lg, α -la y CMP independientemente del pH. Sin embargo, la cantidad de polifenol o proteína precipitada, como también el tamaño de partícula analizado por dispersión de luz fueron dependientes del pH. De esta manera, el estudio del tamaño y la carga de los complejos primarios formados entre polifenoles y WPC, podría ser de utilidad para explicar la subsiguiente floculación y precipitación del sistema.

3.3. Caracterización de los complejos WPC-polifenol

El tamaño de las partículas WPC-polifenol durante el almacenamiento fue analizado mediante dispersión de luz, determinándose los diámetros promedio D_{32} y D_{43} . D_{32} brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las partículas. D_{43} está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización (floculación).

A pH 4,5, el valor D_{32} fue mayor a $0,35 \mu\text{m}$ desde el principio porque a valores de pH cercanos al pI, la asociación de las proteínas del lactosuero se ve favorecida (**Figura 3.3 A**). La adición de concentraciones crecientes de polifenol (0,25 y 0,5% p/v) produjo un leve incremento del D_{32} ; sin embargo, el valor D_{43} , el cual es un índice de la agregación/floculación de partículas fue en todos los casos mayor a $1 \mu\text{m}$ lo cual explica la rápida separación de fases observada en la **Figura 3.1 A**. En particular, con 1% de polifenoles los agregados formados son mucho mayores (D_{32} mayor a $0,5 \mu\text{m}$ y D_{43} de casi $4 \mu\text{m}$), lo que llevó a una precipitación aún más rápida (**Figura 3.1 A y 3.2 A**).

A pH 6,0, el WPC solo mostró un valor de D_{32} de $0,31 \mu\text{m}$ casi constante a lo largo del tiempo (**Figura 3.3 C**). En presencia de polifenoles (0,25% y 0,5% p/v) este valor aumentó levemente en el tiempo, pero se mantuvo siempre menor a $0,35 \mu\text{m}$. Estas partículas de pequeño tamaño se mantendrían solubles por largos períodos de tiempo como puede verse en la **Figura 3.1 B**. Por el contrario, la presencia de 1% de polifenoles promovió la formación de agregados más grandes que continuaron creciendo en el tiempo, alcanzando un D_{32} de casi $0,4 \mu\text{m}$ (**Figura 3.3 C**). La **Figura 3.3 D** muestra que la formación de agregados es más importante en presencia de 1% (p/v) de polifenoles y, luego de largos períodos de almacenamiento, se pueden obtener partículas de $1 \mu\text{m}$ las cuales precipitarían como se vio en la **Figura 3.1 B**.

Las mediciones de potencial zeta indicaron que el WPC a pH 4,5 tiene un potencial ζ de $-0,37 \text{ mV}$ (**Figura 3.4**) el cual es muy cercano a su estado isoeléctrico. Este valor prácticamente no se vio modificado por la adición de polifenoles. El bajo potencial ζ también explica la baja estabilidad de estos sistemas a este pH, donde las partículas tienden a flocular y precipitar. A pH 6,0 el WPC tiene un potencial ζ de $-34,9 \text{ mV}$ el cual disminuye aún más con la adición de los polifenoles (un promedio de -50 mV) (**Figura 3.4**).

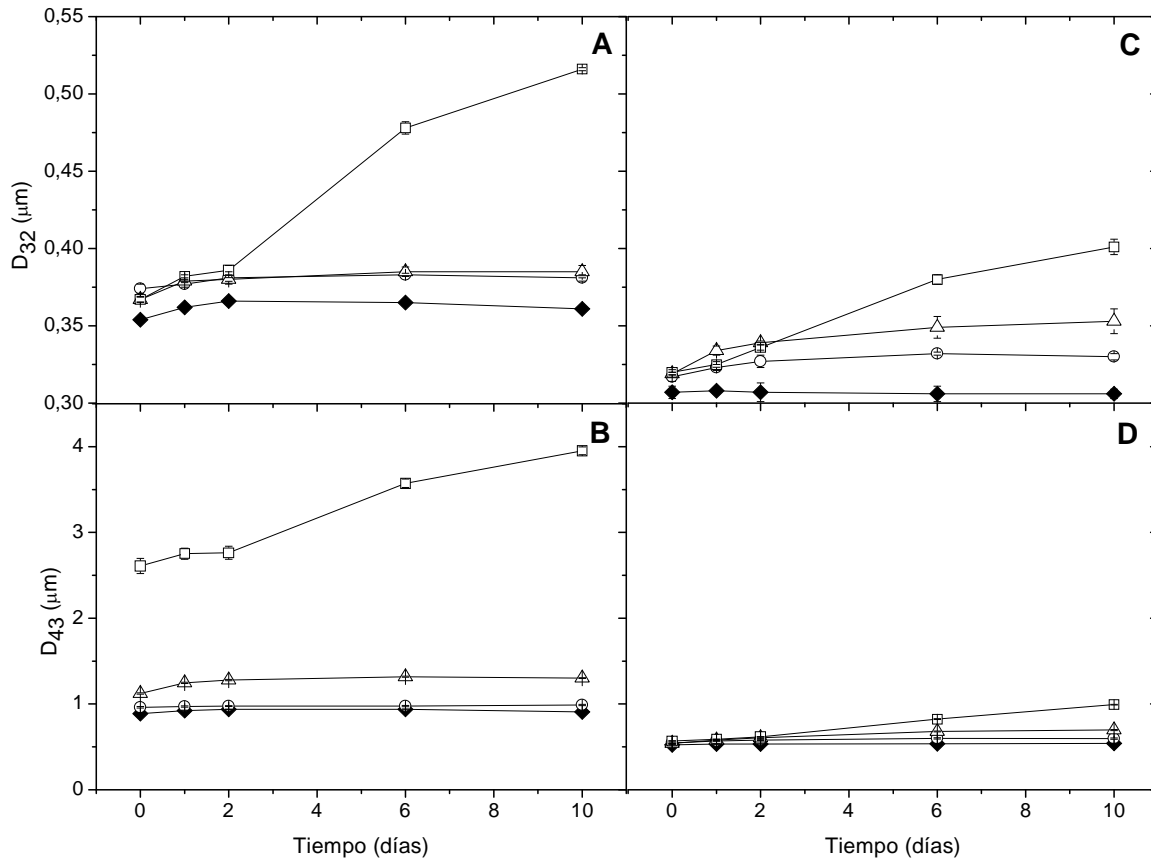


Figura 3.3: Diámetro promedio superficial (D_{32}) y de volumen (D_{43}) de WPC (8% p/v) (♦) y sistemas mixtos de WPC (8% p/v)-polifenoles a (A-B) pH 4,5 y (C-D) pH 6,0. Las concentraciones de polifenoles son (○) 0,25%, (△) 0,5% y (□) 1% p/v.

A pH 6,0, cerca del pKa, los grupos fenólicos protonados de los polifenoles pueden desprotonarse y generar un centro de oxígeno que imparte una alta densidad de carga negativa, la cual disminuye aún más el valor de potencial ζ de los complejos. Una disminución del potencial ζ por unión con los polifenoles a β -lg, CMP y α -la-WPC también se observó a pH 6,0 en el **Capítulo 1**. Esta alta carga neta de las partículas juega un rol importante en prevenir la floculación (**Figura 3.1 B**); sin embargo con 1% (p/v) de polifenoles se observó una separación de fases a pesar de la fuerte carga negativa. Esto indica que existen otros factores, además de la carga neta, que afectan la formación de flóculos como ser la concentración relativa polifenoles a WPC. De

hecho con 1% (p/v) de polifenoles se observó una fuerte precipitación del sistema independientemente del potencial ζ de la partículas como se muestra en las **Figuras 3.1 y 3.2**, lo cual correlaciona con la formación de partículas (flóculos o agregados) de 1 a 3,5 μm (**Figura 3.3 B y D**).

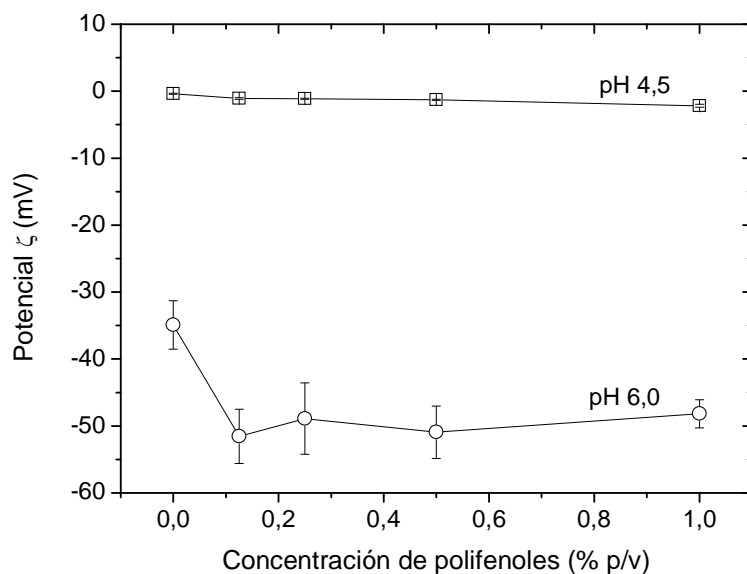


Figura 3.4. Potencial zeta de sistemas mixtos de WPC (8% p/v)-polifenoles en función de la concentración de polifenoles a pH 4,5 y 6,0 y 25 °C.

3.4. Gelificación de los complejos WPC-polifenol

3.4.1. Dinámica de gelificación

Los ensayos se realizaron en las mezclas luego de 24 horas de almacenamiento para reflejar el desarrollo de la estructura de geles a partir de mezclas de WPC y polifenoles a pH 4,5 y 6,0. Para estos experimentos se utilizó WPC al 30% (p/v) debido a que la gelificación del WPC35 requiere una concentración mínima de proteína del 10% (p/v). Las concentraciones de polifenol estudiadas fueron de 0,25 a 1% (p/v).

Tabla 3.2. Parámetros reológicos que describen la gelificación de WPC35 (30% p/v) afectados por la presencia de polifenoles de té verde. Se informan el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la viscoelasticidad relativa ($\tan\delta$) a 1Hz, luego del enfriamiento a 35°C. La dependencia de G' con la frecuencia (n) se evaluó a 25°C según la ecuación 1.

A: pH 4,5

| Polifenol | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\tan\delta$ | n | R^2 |
|-----------|----------------|-----------|------------|--------------|--------|--------|
| 0 % | 86,2 ±0,3 | 4160 ±40 | 1009 ±67 | 0,24 ±0,02 | 0,1413 | 0,9971 |
| 0,25 % | 86,2 ±0,1 | 4685 ±89 | 1199 ±15 | 0,26 ±0,02 | 0,1617 | 0,9892 |
| 0,5 % | 86,2 ±0,2 | 6327 ±252 | 1919 ±86 | 0,30 ±0,01 | 0,2181 | 0,9970 |
| 1 % | 86,2 ±0,2 | 8110 ±437 | 2738 ±75 | 0,34 ±0,01 | 0,1944 | 0,9989 |

B: pH 6,0

| Polifenol | T_{gel} (°C) | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\tan\delta$ | n | R^2 |
|-----------|----------------|-----------|------------|--------------|--------|--------|
| 0 % | 90,0 ±0,4 | 2710 ±471 | 575 ±16 | 0,21 ±0,03 | 0,1539 | 0,9790 |
| 0,25 % | 87,9 ±0,2 | 3417 ±415 | 790 ±31 | 0,23 ±0,01 | 0,1536 | 0,9942 |
| 0,5 % | 86,2 ±0,1 | 3800 ±59 | 879 ±38 | 0,23 ±0,02 | 0,1641 | 0,9971 |
| 1 % | 86,2 ±0,1 | 4605 ±177 | 1297 ±19 | 0,28 ±0,01 | 0,2320 | 0,9927 |

Los valores indican el promedio ± la desviación estándar ($n = 3$).

T_{gel} es la temperatura de gelificación.

El punto gel (T_{gel}) se determinó como la temperatura a la cual el componente elástico rápidamente comienza a subir y cruza al componente viscoso. En la **Tabla 3.2 A y B** se muestran los T_{gel} para el WPC con y sin polifenoles a pH 4,5 y 6,0, respectivamente. Puede verse que la temperatura de gelificación para el WPC a pH 4,5 fue de 86,2 °C, mientras que a pH 6,0 fue 4 grados mayor (90,0 °C). Esto se debe a que la agregación está favorecida a valores de pH cercanos al punto isoelectrico de las proteínas del suero. *Pérez, Wargon y Pilosof (2006)* observaron que soluciones de WPC (con 78% de contenido proteico) al 12% (p/v) y a pH neutro presentaron una temperatura de gelificación de 82 °C. Esta variación puede deberse a la diferente composición del material, por ejemplo el WPC35 posee un mayor contenido de lactosa (48,8%) que el WPC80 (5,2%). La formación, mediante tratamiento térmico, de una estructura de gel a partir de proteínas del lactosuero puede ser afectada por la

presencia de varios azúcares incluyendo la lactosa (*Bordenave-Juchereau, Almeida, Piot & Sannier, 2005; Garrett, Stairs & Annett, 1988*).

Teniendo en cuenta que los polifenoles pueden promover la unión entre distintas moléculas de proteína dando lugar a la agregación (**Capítulo 1**), es esperable una disminución del punto gel (T_{gel}) en los sistemas mixtos en base al WPC. Sin embargo, esto fue observado sólo en las muestras a pH 6,0, donde el incremento de la concentración de polifenoles llevó a una disminución gradual de la temperatura de gelificación. A pH 4,5 no se observaron cambios en T_{gel} . Esto difiere a lo observado en el **Capítulo 2** con la β -lg y el CMP, donde a pH 4,5 sí se observaron disminuciones en las T_{gel} . Sin embargo, con las proteínas aisladas en presencia y ausencia de polifenol, los valores de T_{gel} resultaron en general menores a los obtenidos con WPC. Esto puede deberse a que en el WPC se encuentran todas las proteínas mezcladas y sólo representan un 35% del material. Como se mencionó previamente, la alta concentración de lactosa puede afectar la gelificación de las proteínas del lactosuero.

La **Figura 3.5** muestra la evolución en el tiempo de G' para todas las muestras. A pH 4,5, la adición de polifenoles modificó significativamente la evolución de G' (**Figura 3.5 A**), sin embargo ésta no se vio afectada a pH 6,0 (**Figura 3.5 B**). A pH 4,5, excepto con 0,5% (p/v) de polifenoles, la evolución de G' disminuyó con la adición de polifenoles. Sin embargo, al finalizar el período de calentamiento y enfriamiento, todos los sistemas mostraron valores de G' del mismo orden.

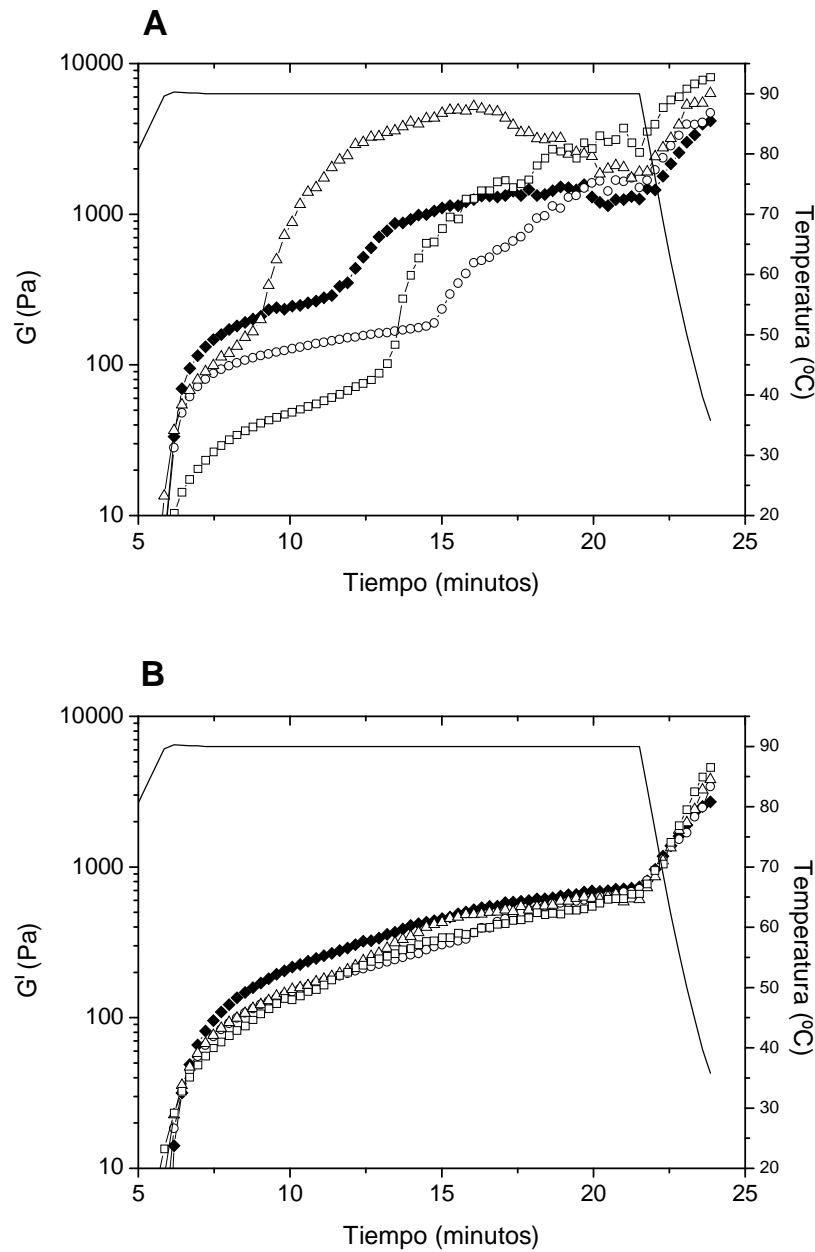


Figura 3.5. Evolución en el tiempo de G' de WPC (30% p/v) (\blacklozenge) y sistemas mixtos de WPC (30% p/v)-polifenoles a (A) pH 4,5 y (B) pH 6,0. Las concentraciones de polifenoles son (\circ) 0,25%, (Δ) 0,5% y (\square) 1% p/v.

La **Tabla 3.2 A y B** también muestra los módulos elástico y viscoso de los geles luego del enfriamiento a 35 °C, afectados por el contenido de polifenoles. Los valores de G' resultaron para todas las muestras mayores a los de G'' , indicando una naturaleza preponderantemente elástica, típica de los geles proteicos. Adicionalmente, tanto G'

como G'' mostraron valores mayores a pH 4,5 que a pH 6,0. La estructura de los geles de proteínas del lactosuero está mayormente determinada por β -lactoglobulina y depende del pH (Capitani, Pérez, Bertoldo Pacheco & Pilosof, 2007). La disminución de la reactividad de los grupos sulfhidrido (-SH) de β -lg ocurre cercano al punto isoeléctrico. Por lo tanto, en la estructura de estos geles están involucradas mayormente interacciones no-covalentes. A pH neutro los puentes intermoleculares disulfuro están favorecidos (Schokker, Singh & Creamer, 2000).

Los parámetros de gelificación (G' , G'' y $\tan\delta$) luego del enfriamiento a 35 °C, aumentaron gradualmente con el incremento de la concentración de polifenoles. Wu, Clifford y Howell (2007) encontraron resultados similares para geles de albúmina de huevo en presencia de 1 y 2% (p/v) de té verde instantáneo.

Se considera que $\tan\delta$ representa la viscoelasticidad relativa dentro de la red del gel (Aguilera, Xiong & Kinsella, 1993). Así, los geles formados en presencia de polifenoles presentaron una menor viscoelasticidad relativa porque exhibieron valores de $\tan\delta$ mayores. Esto se condice con lo observado para la gelificación de β -lg y CMP observado en el **Capítulo 2**.

El grado de dependencia de G' con la frecuencia expresado mediante la constante n según: $\log G' = n \log f + K$

donde G' es el modulo de almacenamiento, f es la frecuencia de oscilación y K es una constante se considera una indicación de la naturaleza viscoelástica de los geles: n es cero para geles puramente elásticos y se vuelve más grande con el incremento de la contribución relativa del componente viscoso (menos elástico).

Los menores valores de n obtenidos fueron para el WPC sin polifenoles para ambos pH (**Tabla 3.2**), lo cual es esperado dado que estos sistemas también poseen los menores $\tan\delta$, corroborando su naturaleza predominantemente elástica. Puede observarse que los valores de n aumentan gradualmente con el incremento de la

concentración de polifenoles, reflejando un cambio en las propiedades mecánicas que resultan en geles más agregados con menor naturaleza elástica (**Tabla 3.2**). Estos resultados también están de acuerdo con lo expuesto en el **Capítulo 2**, aunque con el WPC los valores de n son mayores que con las proteínas aisladas indicando que la lactosa y los demás componentes del suero también disminuyen la calidad del gel.

3.4.2. Propiedades mecánicas asociadas a la textura de los geles

Las propiedades de textura de los geles se muestran en las **Figuras 3.6** y **3.7**. La dureza y adhesividad de los geles de WPC a pH 4,5 no se vio significativamente afectada por la adición de los polifenoles (**Figura 3.6 A y B**). Sin embargo, tanto la elasticidad como la cohesividad de estos geles presentaron valores más bajos cuando se agregó 0,5% (p/v) de polifenoles (**Figura 3.7 A y B**). Esto indicó que niveles mayores a 0,25% (p/v) de polifenoles a pH 4,5 afecta negativamente la calidad del gel. Adicionalmente, los geles formados a este pH resultaron ser muy pastosos, lo que dificultó su desmolde. *Mleko, Li-Chan y Pikus (1997)* obtuvieron resultados similares al evaluar geles de WPI a pH 4,0 y 5,0. El pH tiene una importante influencia en la capacidad gelificante del WPC porque dentro del rango isoeléctrico de las proteínas del lactosuero, la falta de fuerzas repulsivas conduce a la formación de geles particulados. De hecho, cuando los polifenoles se adicionaron en una concentración de 1% (p/v) no se obtuvieron geles auto-soportables, los cuales resultaron inapropiados para mediciones de textura.

Los geles con microestructura particulada se forman cuando las condiciones permiten a las proteínas asociarse rápidamente en agregados grandes y desordenados (*Foegeding, Bowland & Hardin, 1995*). La presencia de polifenoles, que disminuyen la solubilidad del sistema mediante el incremento de las interacciones intermoleculares de las proteínas, podría tener un efecto similar sobre la microestructura de los geles. Esto indica que los polifenoles adicionados en un pH cercano al punto isoeléctrico

promueven la agregación de las proteínas y la formación de geles particulados con el calentamiento.

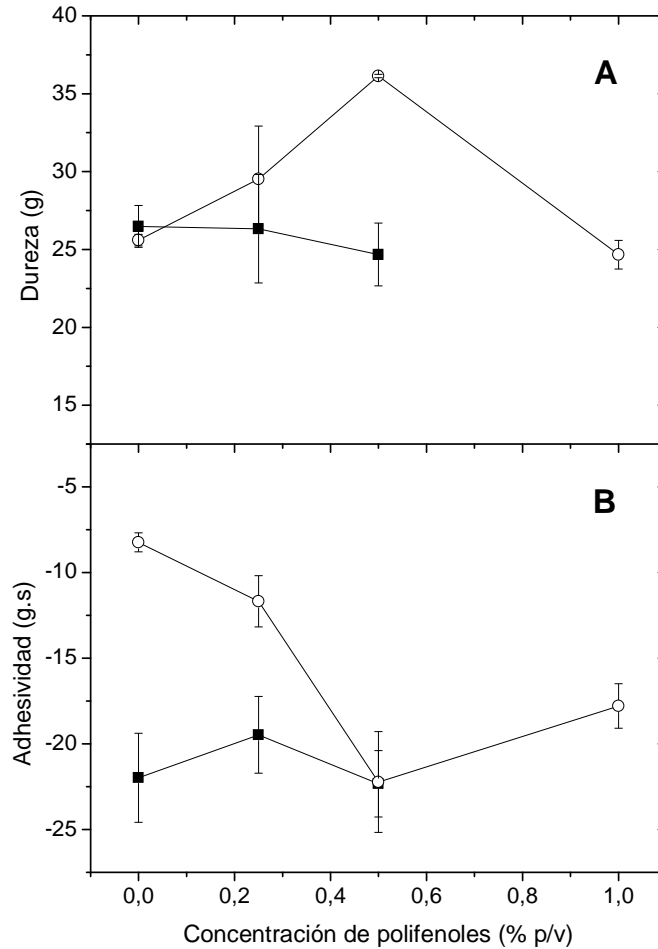


Figura 3.6. Dureza y adhesividad de geles de WPC35 (30% p/v) con concentraciones crecientes de polifenoles (0,25-1% p/v) a pH (■) 4,5 y (○) 6,0.

A pH 6,0 el análisis del perfil de textura indicó una mayor dureza y adhesividad para aquellos geles con 0,25 (30 ± 3 g) y 0,5% p/v ($36 \pm 0,1$ g) de polifenoles en comparación con el WPC solo ($26 \pm 0,4$ g) (**Figura 3.6 A y B**). Sin embargo, cuando la concentración de polifenoles aumentó a 1% p/v, la firmeza disminuyó ($25 \pm 0,9$ g) hasta el valor del WPC solo.

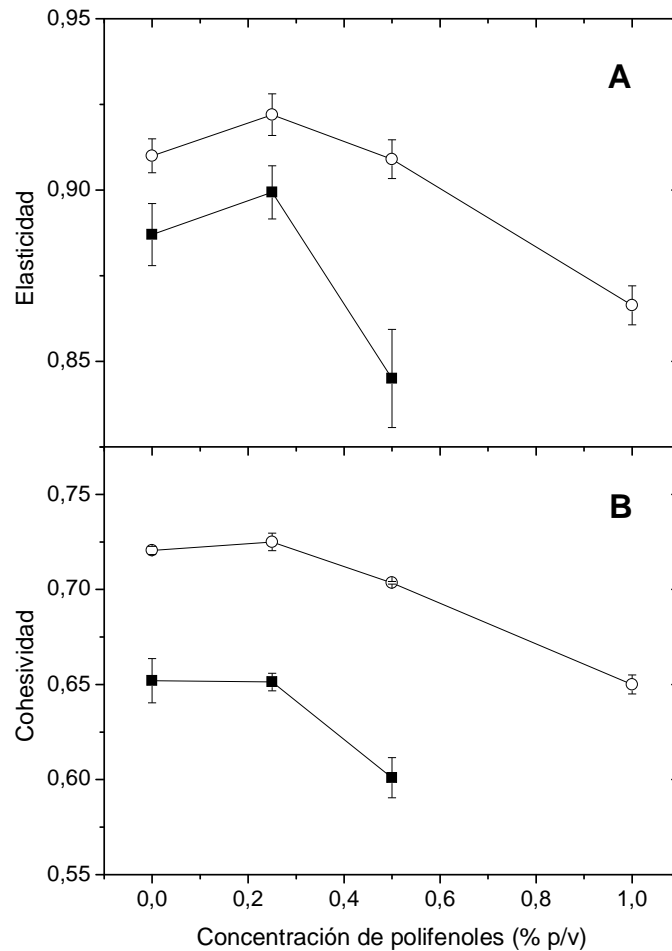


Figura 3.7. Elasticidad y cohesividad de geles de WPC35 (30% p/v) con concentraciones crecientes de polifenoles (0,25-1% p/v) a pH (■) 4,5 y (○) 6,0.

La adhesividad también disminuyó a esta concentración de polifenol (-18 ± 1 g.s) comparada con 0,5% p/v de polifenoles (-22 ± 3 g.s) pero mantuvo un nivel mayor que con 0,25% (-12 ± 1 g.s). La elasticidad y la cohesividad no presentaron diferencias significativas con 0,25 y 0,5% (p/v) de polifenoles comparado con el WPC solo (**Figura 3.7 A y B**), pero mostraron un importante decrecimiento cuando la concentración de polifenoles fue de 1% (p/v). *Balange y Benjakul (2009)* encontraron resultados similares cuando estudiaron las propiedades de geles de surimi de caballa adicionados con compuestos fenólicos a pH 6,8. Ellos observaron que la fuerza de ruptura y de

deformación de los geles incrementó a medida que se adicionaban los compuestos fenólicos hasta un nivel umbral de 0,5% (p/v). Cuando esta concentración era excedida se registraba un notable decrecimiento de los parámetros texturales. Estos autores concluyeron que la fuerza máxima del gel se alcanzaba con una concentración óptima de polifenoles de 0,5% (p/v). Ellos asociaron este comportamiento con la auto-agregación de los polifenoles cuando la concentración de los mismos es muy alta, lo que llevaría a una menor capacidad para promover el entrecruzamiento de las proteínas. Sin embargo, basándose en los resultados aquí presentados (**Tabla 3.1**) puede observarse que los polifenoles continúan pegándose a las proteínas más que auto-agregándose. Así, una mejor explicación sería que las proteínas del lactosuero, en presencia de altas concentraciones de polifenoles, estarían totalmente cubiertas de polifenoles y esto las inhabilitaría para interactuar entre sí y formar un gel. La agregación promovida por los polifenoles sería beneficiosa hasta un nivel umbral, por sobre el cual comenzaría a ser un obstáculo para la generación de interacciones más fuertes entre las proteínas formadoras del gel.

3.5. Conclusiones

La estabilidad coloidal de las mezclas de WPC y polifenoles depende del pH y de la concentración de polifenoles. Existe una concentración umbral de polifenoles por sobre la cual ocurre la separación de fases y esta concentración es dependiente del pH. A pH 4,5, cercano al punto isoeléctrico de las proteínas del lactosuero, la presencia de polifenoles tiene un efecto más negativo sobre la estabilidad coloidal de las mezclas debido a la formación de grandes agregados que precipitan rápidamente. En el **Capítulo 1** también se ha observado que las proteínas aisladas (β -lg, CMP y α -la-WPC) forman los complejos de mayor tamaño a pH cercano al punto isoeléctrico. Adicionalmente el carácter viscoelástico de los geles de WPC disminuyó fuertemente con el agregado de los polifenoles. El mismo comportamiento se observó en el

Capítulo 2 para los geles de β -lg y CMP donde también la viscoelasticidad relativa disminuyó en presencia de polifenoles.

A pH 6,0, pueden utilizarse concentraciones de polifenoles de 0,25 y 0,5% (p/v) sin producir precipitación del sistema y sin afectar negativamente la viscoelasticidad y la textura de los geles de WPC. Se ha comprobado en las proteínas aisladas (β -lg, CMP y α -la-WPC) que a este pH los complejos asumen pequeños tamaños (**Capítulo 1**).

Por lo tanto los polifenoles de té verde pueden verse como moduladores de las distribuciones de tamaño de los agregados proteicos que a su vez determinan el comportamiento de gelificación durante el calentamiento de soluciones de WPC. La elección adecuada de la concentración de polifenoles permitirá obtener los efectos biológicos para la salud presentes en este ingrediente funcional sin afectar negativamente las propiedades funcionales del WPC.

3.5. Referencias

Aguilera, J. M., Xiong, Y. L., & Kinsella, J. E. (1993). Viscoelastic properties of mixed dairy gels. *Food Research International*, *26*, 11-17.

Balange, A. K., & Benjakul, S. (2009). Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(6), 1059-1064.

Bordenave-Juchereau, S., Almeida, B., Piot, J.-M., & Sannier, F. (2005). Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. *Journal of Dairy Research*, *72*, 34-38.

Capitani, C., Pérez, O. E., Bertoldo Pacheco, M. T., & Pilosof, A. M. R. (2007). Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *21*(8), 1344-1354.

Charlton, A. J., Baxter, N. J., Lokman Khan, M., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1593-1601.

de Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, *81*, 597-608.

Foegeding, E. A., Bowland, E. L., & Hardin, C. C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*, *9*(4), 237-249.

Garrett, J. M., Stairs, R. A., & Annett, R. G. (1988). Thermal denaturation and coagulation of whey proteins: effect of sugars. *Journal of Dairy Science*, *71*, 10-16.

González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J. M., & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food science and Technology*, *13*, 334-240.

Kinghorn, N. M., Norris, C. S., Paterson, G. R., & Otter, D. E. (1995). Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *Journal of Chromatography A*, *700*, 111-123.

Mleko, S., Li-Chan, E. C. Y., & Pickus, S. (1997). Interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International*, *30*(6), 427-433.

Nakano, T., Ikawa, I., & Ozimek, L. (2007). Detection of sialylated phosphorylated κ -casein glycomacropptide electrophoresed on polyacrylamide gels and cellulose acetate strips by the thiobarbituric acid and malachite green dye reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2714-2726.

Pérez, O. E., Wargon, V., & Pilosof, A. M. R. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, *20*(7), 966-974.

Pessela, B. C. C., Torres, R., Batalla, P., Fuentes, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2006). Simple Purification of Immunoglobulins from Whey Proteins Concentrate. *Biotechnology Progress*, 22, 590-594.

Schokker, E. P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 10, 843-853.

Wu, W., Clifford, M., & Howell, N. K. (2007). The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1810-1819.

SECCIÓN II

Actividad antioxidante y antimicrobiana de polifenoles de té verde argentino: impacto de la interacción entre polifenoles y proteínas del lactosuero

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Concentrados proteicos de suero en polvo

Se utilizaron dos concentrados de proteínas de suero: WPC35 y WPC80. Ambos fueron proporcionados gentilmente por Milkaut S.A (Santa Fé, Argentina). Su composición porcentual es la siguiente:

| % p/p | WPC35 | WPC80 |
|----------|-------|-------|
| Proteína | 38,3 | 78,9 |
| Lactosa | 48,8 | 5,2 |
| Grasa | 2,2 | 6,0 |
| Humedad | 3,2 | 5,6 |
| Ceniza | 7,5 | 4,3 |

1.2. Té verde

Se utilizaron tres variedades de té argentino que corresponden a cultivares clonales de alto rendimiento, obtenidos y difundidos por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Cerro Azul - INTA, Misiones, Argentina). Los cultivares híbridos (CH) seleccionados, llamados CH 112, CH 318 y CH 410, se recolectaron al principio del período de zafra y se elaboraron en el INTA mediante tratamiento térmico de los brotes en microondas (700 watts por 5 minutos). Luego estos brotes se molieron suavemente y se almacenaron a -18°C hasta su uso. Se utilizó también un té verde chino comercial adquirido en un mercado local.

Preparación de las infusiones de té verde: Uno o tres gramos de hojas de té verde se molieron hasta obtener un polvo utilizando un molinillo de café. Para preparar las infusiones (I₁ e I₃) se agregaron 100 mL de agua caliente destilada (95°C) y luego se llevaron a un baño de agua a 95°C durante 20 minutos, con agitación periódica. Las infusiones se filtraron a través de un embudo con algodón y se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf® (5804 R, Hamburg, Germany) para eliminar restos de polvo e impurezas. Este procedimiento se repitió para cada variedad de té verde. La determinación de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu como se describe en **sección I - Materiales y Métodos**, punto 2.5.

Mezclas de WPC-té verde: Para preparar los sistemas de WPC-té verde, el WPC se disolvió en los distintos extractos de té verde a la concentración final deseada (8% ó 16% p/v) y se ajustó el pH con HCl 0.5N y NaOH 0.5N.

2. Métodos

2.1. Determinación del porcentaje de polifenoles precipitados en presencia de WPC

Este ensayo se llevó a cabo con la misma técnica descrita en **sección I - Materiales y Métodos**, punto 2.5.

2.2. Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres

Se utilizó el radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) (Sigma-Aldrich®, Buenos Aires, Argentina). La determinación se llevó a cabo de la siguiente manera: se

mezclaron 5.0 µL de la muestra con 2.0 mL de una solución etanólica de DPPH· 0.1 mM preparada en el día. Luego de 30 minutos de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 517 nm contra un blanco de etanol en un espectrofotómetro Uv-Vis. El porcentaje de inhibición del radical DPPH· se calculó como:

$$\text{Capacidad neutralizante del radical DPPH}\cdot (\%) = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde A_o es la absorbancia de la solución control (conteniendo sólo DPPH·) y A es la absorbancia de la solución de DPPH· en presencia de la muestra. Las determinaciones se realizaron en triplicado para cada muestra y los valores se promediaron.

2.3. Actividad antimicrobiana

2.3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Listeria innocua es una especie no patogénica que se utilizó en este trabajo como indicador biológico de *Listeria monocytogenes* debido a su similar respuesta a los tratamientos físicos, químicos y térmicos (Antwi, Bernaerts, van Impe & Geeraerd, 2007; Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2008; Kamat & Nair, 1996; Perni, Jordan, Andrew & Shama, 2006). Además, ambos microorganismos pueden ser aislados de queso producido con leche cruda (Carvalho, Viotto & Kuaye, 2007). En un trabajo reciente se utilizó *L. innocua* como sustituto de *L. monocytogenes* para evaluar los parámetros de supervivencia en medios de cultivo con composiciones similares a los quesos untados (Noriega, Laca & Díaz, 2008).

Para el crecimiento de *Listeria innocua* (CIP 8011), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) y *Escherichia coli* (ATCC 8739) se utilizó caldo triptona de soja enriquecido con 6 g/L de extracto de levaduras (TSBYE, Biokar Diagnostics, Francia). Alícuotas de las estrías stock se utilizaron para inocular, en cada caso, 100 mL de caldo que se incubó a 28°C para *L. innocua* y a 35°C para el resto de los microorganismos. La incubación se realizó con agitación constante durante 16-18 horas. Dos mililitros de cada cultivo fueron transferidos a 100 mL de caldo fresco TSBYE, el cual fue incubado en idénticas condiciones hasta obtener la concentración de células deseada (1×10^4 UFC mL^{-1} , aproximadamente) determinada por densidad óptica. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 40 minutos y luego de retirar los sobrenadantes, los pellets se resuspendieron en WPC35 (8% p/v).

2.3.2. Determinación del crecimiento microbiano

Todos los sistemas de WPC-té verde se inocularon con los distintos microorganismos y se incubaron a 20°C. Para determinar la población viable de microorganismos, las muestras primero se diluyeron en forma serial con agua peptonada (peptona de carne 0.1% p/v en agua destilada) y luego se sembraron alícuotas de 20 μL en la superficie de placas de Petri conteniendo agar TSYE. El número de UFC mL^{-1} se determinó luego de que las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.3.3. Condiciones de estrés

Para evaluar la respuesta de los microorganismos tratados con té verde frente a distintas condiciones de estrés posteriores, el WPC35 (8% p/v, pH 5,5) se inoculó con

los distintos microorganismos y se pre-trató con té verde (infusiones I₃) por 48 horas a 20°C. Luego de este tiempo, las muestras tratadas y los controles se diluyeron apropiadamente para obtener números de bacterias similares (10⁸ UFC/mL) en todas las muestras. Luego, se aplicaron las condiciones de estrés durante 60 minutos. Para esto, alícuotas de las muestras de 1,0 mL se incubaron en 9,0 mL de buffer fosfato (pH 7,0, 0,1M) de la siguiente manera: (a) tratamiento térmico, el buffer inoculado se incubó a 52°C; (b) estrés salino, buffer conteniendo cloruro de sodio (10% p/v); (c) estrés oxidativo, buffer conteniendo H₂O₂ (0,05% v/v); (d) estrés ácido, buffer conteniendo ácido láctico hasta alcanzar un pH igual a 4,0. Excepto para el estrés térmico, los demás tratamientos se realizaron a 20°C. Luego de 60 minutos, las muestras se diluyeron en agua peptonada (0,1% p/v) y los recuentos bacterianos se realizaron en placas agar triptona de soja enriquecida con extracto de levadura (0,6% p/v). Cada muestra se realizó por duplicado.

En el caso de los estreses ácidos utilizados sólo sobre *Listeria innocua* se utilizó 9,0 mL de buffer fosfato (PBS) conteniendo ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido láctico (todos de Anedra®, Argentina) en una concentración adecuada para lograr un pH igual a 4,0.

2.3.4. Medición de potencial zeta

La medición del potencial zeta de las cepas de *Listeria innocua* (CIP 980.11 y ATCC 33090) se realizó con la misma técnica descrita en **sección I - Materiales y Métodos**, punto **2.3**.

2.3.5. Determinación de hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de la superficie celular se determinó con el sistema bifásico solvente/buffer descrito por *Rosenberg, Gutnick y Rosenberg (1980)*. En el mismo, una suspensión bacteriana conteniendo aproximadamente 10^8 UFC/mL en 1,8 mL de PBS (0,1M pH 5,5), la cual posee una densidad óptica ($\lambda=400$ nm) entre 0,4 y 0,5 (A_o), se mantuvo en un baño térmico a 37 °C por 10 minutos con 0,3 mL de xileno (Sigma-Aldrich®, Buenos Aires, Argentina). Luego la muestra se agitó con vortex por 2 minutos y se mantuvo por 15 minutos a temperatura ambiente para asegurar una completa separación de fases. Una muestra (1,0 mL) se tomó cuidadosamente de la fase acuosa y se le midió la absorbancia a 400 nm (A). El porcentaje de células en el solvente se calcula entonces como:

$$\% \text{ de adhesión al solvente} = \frac{1-A}{A_o} \times 100 \quad (\text{ecuación 2})$$

El experimento se realizó por triplicado.

2.3.6. Respuesta osmótica

De acuerdo con *Pagan y Mackey (2000)*, las suspensiones de bacterias tratadas con té verde y las control se centrifugaron y se lavaron una vez con PBS (pH 7,0). Estas células se resuspendieron en 0,4 mL de PBS y de estas suspensiones se tomaron 100 μ L por triplicado y se agregaron a (i) 1,0 mL de PBS y (ii) 1,0 mL de PBS conteniendo cloruro de sodio (0,75 M). Luego de 4 minutos de incubación, se midió la densidad óptica ($\lambda=680$ nm) de estas suspensiones. El incremento en la densidad óptica se calculó restando el promedio de tres mediciones en PBS con NaCl menos el promedio

de tres mediciones en PBS solo. El porcentaje de cambio de la densidad óptica se obtuvo con respecto a las muestras en PBS solo.

2.3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las células de *Listeria innocua* (CIP 80.11) se trataron con té verde en WPC35 (8% p/v) por 48 horas y luego se sometieron por 60 minutos a un estrés con ácido láctico (pH 4,0) en PBS. El experimento se realizó a 20 °C.

Luego las células se fijaron con glutaraldehído (2,5 g/100 mL en PBS 0,1M pH 7,4) durante 1 hora, se enjuagaron tres veces durante 10 minutos en PBS y se volvieron a fijar en tetraóxido de osmio (1,0 g/100 mL) por 2 horas a 4 °C. Luego de la fijación, las células se enjuagaron tres veces durante 10 minutos en PBS y se deshidrataron secuencialmente utilizando acetona (30, 50, 70 y 95 mL/100 mL) por 15 minutos cada vez. Luego las células se trataron dos veces con óxido de propileno por 10 minutos a 4 °C y se infiltraron secuencialmente en una mezcla de óxido de propileno: resina epoxi Durcupan ACM (3:1, 1:1 y 1:3) por 45 minutos. La polimerización de la resina para formar bloques de muestra se realizó en un horno a 60 °C por 72 horas. Estos bloques de muestra se cortaron a mano con una hoja de afeitar y se seccionaron luego con cuchillo de diamante en un ultramicrotomo Sorvall MT2 Porter-Blum (DuPont Instruments, Sorvall Operations, Newtown, Conn., USA). Las secciones delgadas (70-80 nm) se colocaron en grillas de cobre y se tiñeron por 15-20 minutos en uranil:etanol (1:1). Luego se lavaron tres veces por 2 minutos y se incubaron con una gota de citrato de plomo de Reynold's. Las grillas se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Philips EM 301.

2.4. Tratamiento estadístico

Para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) se utilizaron los programas Microsoft® Office Excel 2003 y STATGRAPHICS Plus for Windows 3.0.

3. Referencias

- Antwi, M., Bernaerts, K., van Impe, J. F., & Geeraerd, A. H. (2007). Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 71-84.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 176-185.
- Carvalho, J. D. G., Viotto, W. H., & Kuaye, A. Y. (2007). The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, 18(3), 262-267.
- Kamat, A. S., & Nair, P. M. (1996). Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatments. *LWT*, 29, 714-720.
- Noriega, E., Laca, A., & Díaz, M. (2008). Modelling of diffusion-limited growth for food safety in simulated cheeses. *Food and Bioprocess Processing*, 86(2), 122-129.
- Pagán, R., & Mackey, B. (2000). Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2829-2834.
- Perni, S., Jordan, S. J., Andrew, P. W., & Shama, G. (2006). Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food Control*, 17(11), 875-883.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbon: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29-33.

Resultados

El objetivo de este capítulo fue estudiar las actividades antioxidantes y antimicrobianas de diferentes variedades de té verde argentino provisto por INTA y de un té verde chino comercial en WPC.

4.1. Introducción

La unión de los polifenoles con las proteínas puede afectar la capacidad antioxidante de los polifenoles mediante la reducción del número de grupos hidroxilo libres o también porque las interacciones entre polifenoles y proteínas pueden llevar a la precipitación de los complejos y, por lo tanto, restringir la interacción mediante difusión de los polifenoles unidos y los oxidantes libres en solución (*Arts, Haenen, Voss & Bast, 2001; Arts et al., 2002*). De hecho, se ha observado que la adición de leche con o sin grasa a infusiones de té disminuye su capacidad secuestradora de radicales libres, indicando que la fracción proteica es la responsable de la menor respuesta y no su fracción lipídica (*Kilmartin & Hsu, 2003; Serafini, Ghiselli & Ferro-Luzzi, 1996*).

Sin embargo, *Dubeau, Samson y Tajmir-Riahi (2010)* observaron que las proteínas de la leche podían tener un efecto dual sobre la capacidad antioxidante de polifenoles de té. Por un lado vieron un efecto inhibitorio cuando las reacciones ocurrían en solución o en interfases sólido-líquido y por otro, encontraron efectos sinérgicos en emulsiones aceite-en-agua. De hecho, *Almajano, Delgado y Gordon (2007a)* obtuvieron resultados similares al evaluar los cambios en los valores de peróxido en emulsiones aceite-en-agua conteniendo infusiones de té verde y ovoalbúmina o BSA. Estos autores observaron que en presencia de las proteínas el efecto antioxidante del té verde resulta mayor que en ausencia de las mismas, y dado que estas proteínas no poseen o poseen muy poca actividad antioxidante, el resultado es sinérgico.

Por otro lado, las catequinas del té verde son muy inestables en soluciones neutras o alcalinas y, relativamente estables bajo condiciones ácidas (Yoshino, Suzuki, Sasaki, Miyase & Sano, 1999; Zhu, Zhang, Tsang, Huang & Chen, 1997). De hecho, se ha observado que EGCG se degrada más rápido con el aumento del pH, la concentración de oxígeno o la temperatura (Zimeri & Tong, 1999). La interacción de los polifenoles con diversas proteínas podría suponer una ventaja para evitar los procesos degradativos de las catequinas. Shpigelman, Israeli & Livney (2010) produjeron ensamblados inducidos por calor de β -lg y EGCG como nanopartículas vehículo, protectoras de la catequina en cuestión. Estos ensamblados de menos de 50 nm confirieron una protección significativa a la EGCG frente a la oxidación y la degradación. De la misma manera, se ha postulado que los compuestos polifenólicos retardan las reacciones de oxidación y de pardeamiento no enzimático (reacciones de Maillard) de las proteínas lácteas mediante la unión a las mismas (Colahan-Sederstrom & Peterson, 2005; Schamberger & Labuza, 2007; Schwambach & Peterson, 2006; Viljanen, Halmos, Sinclair & Heinonen, 2005).

Así como pueden verse afectadas las capacidades antioxidantes de los polifenoles por la presencia de proteínas, también otras propiedades biológicas como su actividad antimicrobiana pueden verse disminuidas cuando los extractos de té verde forman parte de un sistema más complejo como un producto lácteo.

Estabilidad microbiológica del suero lácteo

El suero lácteo es una fuente de ingredientes de alto valor nutritivo, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas hidrosolubles (Atra, Vatai, Bekassy-Molnar & Balint, 2005; González-Martínez et al., 2002). Como se expuso anteriormente, el suero es generalmente procesado por ultrafiltración, evaporación y secado en spray para producir suero en polvo y concentrados proteicos. Estos productos se utilizan luego en fórmulas alimenticias (Henning, Baer, Hassan & Dave, 2006). Sin embargo, el líquido

proteico concentrado obtenido a la salida del proceso de membrana podría ser utilizado directamente en la formulación de alimentos si mantiene una estabilidad microbiológica apropiada, evitando el proceso de evaporación y secado los cuales tienen asociados un alto costo y afecta las propiedades funcionales y nutricionales del suero (Peters, 2005).

Este concentrado de suero líquido (CPSL) resulta entonces un producto lácteo fresco, no fermentado y con alto pH (>6,0). Por lo tanto es propenso al rápido deterioro microbiológico, especialmente en almacenamientos a temperaturas mayores a 4°C (Hough, Puglieso, Sanchez & Da Silva, 1999).

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados tienen un amplio impacto económico y sobre la salud pública en todo el mundo. Históricamente ha habido brotes de infecciones asociados con el consumo de queso y los organismos responsables incluyeron a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, cepas virulentas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (De Buyser, Dufour, Maire & Lafarge, 2001; Zottola & Smith, 1991). Varias investigaciones han mostrado que las fuentes de contaminación son la leche cruda o las contaminaciones post-pasteurización con organismos provenientes del ambiente de producción. Adicionalmente, estos microorganismos han demostrado que poseen tolerancia a los factores más comúnmente utilizados para controlar el crecimiento bacteriano en alimentos, tales como acidez, bajas temperaturas y adición de cloruro de sodio (Campbell, Bang, Isonhood, Gerard & Drake, 2004; Gandhi & Chikindas, 2007; Greenacre & Brocklehurst, 2006).

En las últimas décadas, *Listeria monocytogenes* se ha vuelto muy importante como microorganismo patógeno asociado a alimentos. Aunque los datos epidemiológicos muestran que la incidencia de listeriosis ha disminuido, los brotes de esta enfermedad continúan ocurriendo y la contaminación con *L. monocytogenes* es una de las causas

principales, mayormente asociada a carne fresca y productos lácteos (Sergelidis & Abraham, 2009). Actualmente, está establecido que este microorganismo es de suprema importancia para la industria alimentaria debido a la alta mortalidad producida por listeriosis en poblaciones susceptibles y a la resistencia de este patógeno frente a un número de prácticas de preservación de alimentos.

Las especies del género *Listeria* son microorganismos muy resistentes y se encuentra documentado su habilidad para tolerar diversas condiciones adversas en diferentes tipos de alimentos (Gandhi & Chikindas, 2007; Sergelidis & Abraham, 2009). Estos organismos se pueden adaptar y sobrevivir en ambientes salinos mediante la acumulación de solutos compatibles, lo cual es bastante sencillo dado que los alimentos constituyen una rica fuente de solutos compatibles y sus precursores. Además, la tolerancia a la acidez observada en el género *Listeria* es de particular preocupación durante el procesamiento de alimentos y representa un serio inconveniente para la manufactura de productos alimenticios salados y ácidos como los quesos semisólidos (Shabala, Mcmeekin, Budde & Siegumfeldt, 2006; Skandamis, Yoon, Stopforth, Kendall & Sofos, 2008). Más aún, *Listeria monocytogenes* es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración y, aunque el número inicial de patógenos contaminantes sea bajo en un determinado producto, esta bacteria puede crecer durante el almacenamiento a bajas temperaturas y representar de esta forma un riesgo para la salud pública (Walker, Archer & Bank, 1990). Debido a esto es importante asegurarse que los recuentos de *Listeria* sean muy bajos desde el comienzo de la vida útil.

Staphylococcus aureus es frecuentemente encontrado en leche y productos lácteos, particularmente en quesos ya sean éstos elaborados con leche cruda o pasteurizada, debido a que se encuentra entre los agentes etiológicos más importantes de la mastitis bovina y porque es extensamente transportado por los trabajadores de la industria alimentaria (Jørgensen, Mørk & Rørvik, 2005). *S. aureus* es también uno de los

agentes principales de las intoxicaciones causadas por el consumo de leche y productos lácteos en distintos países (*Andre´ et al., 2008*), y aún sigue siendo una de las principales causas de las enfermedades asociadas a alimentos en todo el mundo y el segundo reportado en Estados Unidos (*Jablonski & Bohach, 2001*).

El género *Salmonella* ha estado relacionado con brotes asociados al consumo de queso Cheddar (*D'Aoust, Warburton & Sewell, 1985*) y leche pasteurizada (*Ryan et al., 1987*). Dado que estos microorganismos enfrentan ambientes diversos y extremos, han desarrollado respuestas para combatir estas condiciones de estrés como pH extremo, presencia de sal y especies reactivas de oxígeno (*Foster, 1991*).

Escherichia coli es un habitante normal del tracto intestinal de los humanos y animales de sangre caliente. Aunque normalmente es inocuo, varias cepas de *E. coli* han adquirido determinantes genéticas (genes de virulencia) que los vuelven patogénicos. Estas cepas patogénicas son las responsables de tres infecciones clínicas principales: enfermedades entéricas y diarreas, infecciones del tracto urinario y meningitis. Así, sobre la base de los diagnósticos microbiológicos convencionales en el control de alimentos, se requiere la ausencia de *E. coli* sin ninguna otra caracterización de las cepas aisladas. Por otro lado, la aparición de cepas patogénicas de *E. coli* se debe parcialmente a su gran resistencia a los ambientes ácidos y su capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (entre 10°C y 43°C) (*Leyer, Wang & Johnson, 1995*).

La utilización de antimicrobianos naturales a partir de una amplia variedad de fuentes naturales está siendo estudiada como un medio para mejorar la seguridad y la estabilidad de muchos alimentos, manteniendo su imagen de productos naturales, saludables y de alta calidad (*Gould, 1997*). Estas técnicas de preservación no tradicionales están siendo desarrolladas para satisfacer demanda de los consumidores

en relación a aspectos nutricionales y sensoriales de los alimentos. Adicionalmente, muchos de los sistemas de antimicrobianos naturales también demostraron ventajas fisiológicas funcionales y surgen como ingredientes con valor agregado en numerosos productos alimenticios (Tiwari et al., 2009). En el caso del té verde, como se expuso anteriormente, el mismo posee diversas propiedades biológicas entre las que se destacan las actividades antimicrobianas y antioxidantes, motivo por el cual se eligió para ser estudiado en la preservación del CPSL.

En la preservación de alimentos, los antimicrobianos naturales se pueden usar solos o en combinación con otras tecnologías para reducir el nivel de cada método de preservación en lo que se denomina “efecto de barrera”. Sin embargo, muchos autores han alertado sobre la existencia de protección cruzada frente a condiciones de estrés múltiple, dado que la exposición de un patógeno a un tipo de estrés sub-letal como bajo pH, alta concentración de cloruro de sodio o bajas temperaturas de almacenamiento, puede conferir protección cruzada frente a otros estreses letales (Leenanon & Drake, 2001; O’Byrne & Booth, 2002; Skandamis et al., 2008). Por otro lado, dado que el CPSL estabilizado con té verde podría ser utilizado como ingrediente en otros alimentos, sufriría entonces numerosos procesos de preservación y almacenamiento asociados al tipo de alimento al cual se haya incorporado. De esta manera, sería útil evaluar la respuesta de bacterias contaminantes de productos lácteos frente al té verde y su posterior susceptibilidad o resistencia a diferentes condiciones de estrés comúnmente encontradas durante el procesamiento y preservación de los alimentos.

Hasta el momento, no se han reportado trabajos que evalúen el estrés sub-letal producido por antimicrobianos naturales como el té verde y la posibilidad de repuestas de protección cruzada frente a otras condiciones de estrés en sistemas lácteo como el CPSL. La acumulación de conocimiento detallado sobre el comportamiento de microorganismos contaminantes y patogénicos bajo condiciones de estrés asociadas

al procesamiento y almacenamiento de alimentos es un requisito importante para la evaluación y mejoramiento de la seguridad alimentaria.

Por otro lado, la utilización de extractos o infusiones de té verde en combinación con otros componentes antimicrobianos o métodos para estabilizar los productos alimenticios constituye un camino alternativo para mantener la calidad (Nazer, Kobilinsky, Tholozan & Dubois-Brissonnet, 2005).

La acidez es un factor comúnmente utilizado para controlar el crecimiento de microorganismos en alimentos (Phan-Thanh, Mahouin & Aligé, 2000). Los ácidos orgánicos son constituyentes naturales de muchos alimentos y también son ampliamente utilizados como aditivos en la preservación de alimentos. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que los efectos inhibitorios o bactericidas dependen de las características del ácido utilizado para ajustar el pH (Buchanan, Golden & Whiting, 1993; Eswaranandam, Hettiarachchy & Johnson, 2004; Parish & Higgins, 1989). Por otro lado, la tolerancia a la acidez varía entre distintos microorganismos y alimentos bajo estudio.

4.2. Actividad antioxidante de variedades de té verde

En primer lugar se estudió el contenido polifenólico de infusiones de té verde al 3% p/v (I₃). La **Tabla 4.1** muestra el contenido polifenólico total de las distintas variedades de té verde y del producto comercial, expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (EAG/L). Como puede verse el valor más bajo corresponde a la variedad china comercial. Almajano, Carbó, López Jiménez & Gordon (2008) obtuvieron un valor similar (4166 mg EAG/L) dado que reportaron $2083 \pm 51,3$ mg EAG/L para un extracto de té verde al 1,5% (p/v). Las variedades argentinas mostraron un contenido polifenólico mayor. Entre ellas la variedad CH 410 presentó el valor más alto. Según lo reportado por Prat Kricun (2005), cada una de estas variedades presenta una composición distinta de polifenoles (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.1. Contenido polifenólico de distintas variedades de té verde argentino (Infusiones I₃) y cantidad de polifenol precipitado por WPC35 (8% p/v; 3,2% p/v proteína) luego de centrifugar por 10 minutos a 5000 rpm.

| | Contenido polifenólico total EAG (mg/L) | Polifenol precipitado por WPC35 (%) |
|--------------------|--|--|
| Té verde comercial | 4110 ± 38 ^a | 32 ± 1 ^a |
| CH 112 | 6004 ± 92 ^b | 47 ± 2 ^b |
| CH 318 | 6395 ± 181 ^c | 60 ± 1 ^c |
| CH 410 | 7321 ± 202 ^d | 65 ± 2 ^d |

Los valores en la misma columna seguidos de distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 4.2. Contenido de catequinas y cafeína en cultivares híbridos recolectados al inicio de la zafra y elaborados como té verde Sencha. Datos en g/100g de materia seca.

| Cultivar | EGCG | EGC | EC | C | CG | Cafeína | Total |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| CH 112 | 6,5449 | 2,5595 | 0,6539 | 0,2508 | 0,2105 | 0,7099 | 10,2196 |
| CH 318 | 8,8786 | 2,857 | 0,7662 | 0,2611 | 0,4102 | 0,9044 | 13,1731 |
| CH 410 | 7,7052 | 3,9109 | 1,4836 | 0,5524 | 0,3241 | 0,6163 | 13,9762 |

EGCG (epigalocatequina galato), EGC (epigalocatequina), EC (epicatequina), C (catequina) y CG (catequina galato).

Tomado de *Prat Kricun (2005)*.

Como se ha mostrado en los capítulos anteriores, los polifenoles poseen una afinidad significativa por todas las proteínas del suero lácteo formando complejos solubles, los cuales pueden crecer hasta un tamaño coloidal e incluso precipitar. Sin embargo, podría esperarse que, debido a la diferente composición de los polifenoles de distintas variedades de té verde (**Tabla 4.2**), éstos tengan distinta afinidad por las proteínas. Como se muestra en la **Tabla 4.1** la cantidad de polifenoles precipitados por la presencia de WPC35, lo cual es indicativo de la capacidad de unión con las proteínas, se encuentra entre 32 y 65% y guarda relación con el contenido polifenólico de las

variedades de té estudiado. Es decir que no dependería de la variedad (es decir de la composición de polifenoles) sino del contenido total de polifenoles. A mayor porcentaje de polifenoles mayor precipitación ($R^2 = 0,9392$).

Aunque no existe un único método capaz de proveer una imagen completa del perfil antioxidante de una determinada muestra, una estimación rápida de la capacidad neutralizante de radicales libres mediante el uso de 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH·), podría proveer información preliminar sobre la capacidad antioxidante de sistemas de té verde y sus mezclas con WPC. DPPH· es uno de los pocos radicales libres orgánicos estables que existen y ha sido ampliamente utilizado para determinar la capacidad secuestradora de radicales libres de muchas muestras incluyendo infusiones de té verde. Las distintas variedades té verde mostraron distintas habilidades para neutralizar el radical DPPH· (**Figura 4.1**). La variedad CH 410 presentó el porcentaje más alto ($61,9 \pm 0,4$), seguida por la variedad CH 112 ($59,0 \pm 1,2$). La variedad comercial y la CH 318 tuvieron los menores porcentajes en su capacidad antioxidante ($53,2 \pm 0,4$ y $52,3 \pm 1,1$, respectivamente), no habiendo diferencias significativas entre ellos ($p=0,56$). Estos resultados no correlacionaron con el contenido polifenólico de la **Tabla 4.1**, señalando que deben ser considerados otros factores además del contenido polifenólico para explicar la capacidad antioxidante de una muestra compleja como las infusiones de té, las cuales también incluyen cafeína, clorofila, hidratos de carbono, aminoácidos, etc. De hecho, *Cuvelier, Maillard y Berset (1996)* llamaron “efecto mezcla” a la variedad de interacciones entre los distintos compuestos de las infusiones de té, las cuales llevan a efectos sinérgicos o antagónicos en su capacidad antioxidante. *Parejo et al. (2002)* también observaron que las propiedades antioxidantes de cada compuesto pueden variar marcadamente dentro de un grupo, es por esto que niveles similares en el contenido de polifenoles no necesariamente corresponden a similares respuestas antioxidantes. Ellos postulan que las infusiones de té son mezclas muy complejas de varios compuestos diferentes, con distinta polaridad y propiedades antioxidantes, que a veces muestran acciones

sinérgicas en comparación con los compuestos individuales. Así, la actividad secuestradora de radicales libres de una infusión de té no puede ser predicha sobre la base de su contenido polifenólico total. *Amarowicz y Shahidi (1995)*, quienes compararon la actividad antioxidante de un extracto de té verde y una mezcla reproducida de las catequinas presentes en una emulsión de β -caroteno/linoleato, reportaron que el primero mostró una actividad antioxidante mayor que la mezcla reproducida.

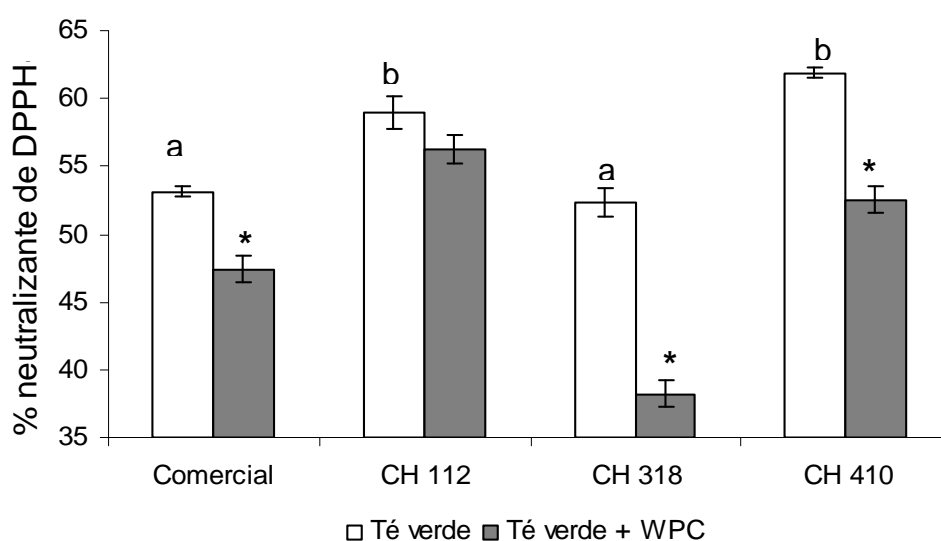


Figura 4.1. Actividad neutralizante de radicales libres de distintas variedades de té verde (Infusiones I₃) solas o combinadas con WPC35 (8% p/v sólidos; 3,2% p/v proteínas) a pH 5.5. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las variedades, mientras que las barras marcadas con un asterisco (*) representan valores que son significativamente ($p < 0,05$) diferentes de aquellas infusiones de té verde sin WPC35.

Cuando los extractos de té verde se combinaron con WPC, se observó un notable decrecimiento en la neutralización del radical DPPH· para todas las muestras pero en diferente medida para cada variedad (**Figura 4.1**). *Sharma, Kumar y Rao (2008)* obtuvieron resultados similares cuando evaluaron la influencia del agregado de leche y azúcar sobre el potencial antioxidante de té negro. Ellos observaron que el agregado de leche redujo la habilidad del té negro de neutralizar al radical DPPH·. En el

presente trabajo se observó que la variedad más afectada fue la CH 318, la cual mostró una disminución desde $52,3\% \pm 1,1$ a $38,2\% \pm 1,4$. Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que diferentes compuestos fenólicos reaccionan de manera distinta con las proteínas del lactosuero. *Dubeau, Samson y Tajmir-Riahi (2010)* observaron mediante técnicas de voltametría que los polifenoles presentes en distintos tipos de té difieren no sólo en su concentración sino también en sus propiedades redox. Estos autores también mostraron que la actividad antioxidante de los distintos tipos de té fue significativamente menor en presencia que en ausencia de leche, y que sus capacidades redox no fueron igualmente afectadas por la misma. Ellos atribuyen este fenómeno al efecto selectivo ejercido por la leche en relación a la composición polifenólica. Así, parecería ser que algunos polifenoles del té poseen una mayor afinidad para interactuar con proteínas lácteas. *Arts et al. (2002)* también notaron que el grado de enmascaramiento de la actividad antioxidante depende de la composición de polifenoles presentes como también del tipo de proteína láctea.

Si se compara la actividad antioxidante de las variedades de té verde en presencia de WPC35 con la cantidad de polifenol precipitado por el WPC35 (**Tabla 4.1**) puede concluirse de que no existe una correlación. Esto señala que los complejos de polifenol-proteína todavía retendrían su capacidad antioxidante porque no toda la molécula de polifenol estaría comprometida en la interacción. La mayoría de los polifenoles poseen grupos hidroxilos en dos anillos aromáticos vecinos, los cuales son los responsables de la actividad antioxidante, y es probable que, aún si los grupos hidroxilo de uno de estos anillos está involucrado en la unión con las proteínas, los grupos hidroxilo en el segundo anillo todavía estén libres para permitir a la molécula actuar como antioxidante (*Almajano et al., 2007a*). Adicionalmente, si se piensa en términos de la estabilidad oxidativa del sistema alimentario, esta unión entre las proteínas del suero y los polifenoles de té verde podría ser beneficiosa. *Viljanen, Halmos, Sinclair y Heinonen (2005)* postularon que los compuestos fenólicos también inhiben la oxidación de las proteínas del suero.

De hecho, la capacidad antioxidante de proteínas lácteas medida con el método ABTS fue reportada por *Almajano, Delgado y Gordon (2007b)*. Estos autores mostraron que la capacidad neutralizante de radicales libres de las proteínas mejoró notablemente con la adición de epigallocatequina galato (EGCg) durante el almacenamiento a 30°C. Sin embargo, el porcentaje de inhibición del radical ABTS fue menor en la mezcla que con la catequina sola. En el presente trabajo no se detectó ninguna actividad antioxidante para el WPC solo, probablemente debido a la baja concentración de proteína utilizada o al distinto tipo de ensayo utilizado. Incluso, el tipo de proteína en este ensayo no debería ser una variable ya que el WPC35 utilizado fue el mismo en todas las muestras. Sin embargo, las diferentes variedades de té verde contienen distintos polifenoles y proporciones de ellos (**Tabla 4.2**), los cuales pueden interactuar de manera diferente con cada proteína láctea. Estos resultados demuestran que las proteínas lácteas influyen en la eficacia antioxidante de los extractos de té verde disminuyendo su potencial antioxidante.

4.3. Actividad antimicrobiana de variedades de té verde

Para el estudio de la actividad antimicrobiana se utilizaron infusiones de té verde preparadas con 1g de té verde en 100mL agua (I_1) y con 3g de té verde en 100mL agua (I_3). El medio de cultivo fue en todos los casos WPC35 (8% p/v). El análisis de la respuesta de *L. innocua* frente a las distintas variedades de té verde mostró que, para las infusiones menos concentradas (I_1), aquellas variedades con mayor contenido polifenólico fueron las que tuvieron mayor efecto antimicrobiano (**Figura 4.2 A**). Sin embargo, sólo las variedades CH 318 y CH 410 presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el control al final del almacenamiento (4 días). Cuando la concentración de la infusión se incrementó (I_3), todas las variedades mostraron un efecto bacteriostático ya que el crecimiento de *L. innocua* se inhibió completamente (**Figura 4.2 B**). Este comportamiento observado con I_3 también se observó con las infusiones I_1

de té verde comercial pero en ausencia de WPC35, es decir en caldo TSYE (datos no mostrados), indicando que la matriz alimentaria puede disminuir el potencial antimicrobiano de los polifenoles. *Kim, Ruengwilysup & Fung (2004)* obtuvieron resultados similares para *L. monocytogenes* tratada con extractos acuosos (10% p/v) de té verde en caldo cerebro corazón a 35°C.

La actividad antimicrobiana de las infusiones I₁ sobre *Staphylococcus aureus* fue especialmente interesante ya que inhibieron completamente el crecimiento de este microorganismo. De hecho, se obtuvo una reducción promedio de 1 ciclo logarítmico para todas las variedades, mientras que las muestras control alcanzaron hasta 10⁷ UFC/ml a los 4 días de almacenamiento (**Figura 4.2 C**). *Wu et al. (2007)* también reportaron una actividad bacteriostática de extractos de té verde al 1% contra *S. aureus* en caldo nutritivo. Cuando se incrementó la concentración de las infusiones (I₃), se observó una disminución aún más importante del número inicial de bacterias luego de 4 días de almacenamiento, alcanzando reducciones de hasta dos ciclos logarítmicos para la variedad CH 410 (**Figura 4.2 D**). Trabajos previos sobre el efecto de los componentes del té verde sobre *S. aureus* revelaron la presencia de agregados multicelulares con paredes celulares engrosadas y septos aberrantes (*Hamilton-Miller & Shah, 1999; Stapleton et al., 2004*). Esta severa desorganización de la arquitectura de la pared celular, observada mediante estudios de microscopía electrónica, sugiere que los componentes del té interfieren con la síntesis del peptidoglicano y comprometen el proceso de separación celular. Adicionalmente, los polifenoles pueden modular y reducir la halotolerancia de *S. aureus* y su resistencia a varios antibióticos, indicando que el daño a la pared celular ocurre mediante una unión directa entre las catequinas y el peptidoglicano (*Stapleton, Gettert & Taylor, 2006; Stapleton et al., 2004; Zhao, Hu, Okubo, Hara & Shimamura, 2001*).

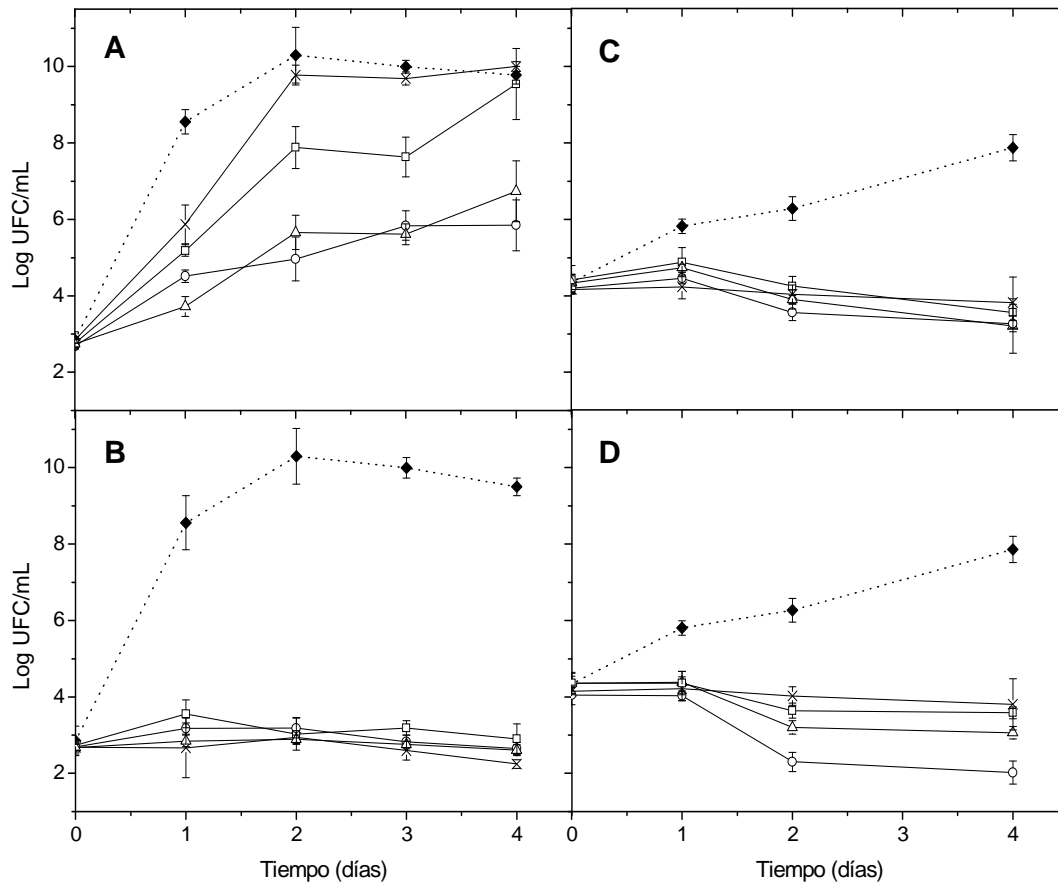


Figura 4.2. Actividad antimicrobiana de distintas variedades de té verde frente a *Listeria innocua* CIP 8011 (A-B) y *Staphylococcus aureus* (C-D) en WPC35 (8% p/v sólidos) a pH 5.5. (A, C) Infusiones I₁ y (B, D) Infusiones I₃. (♦) Control, sin agregado de té verde; (□) CH 112; (Δ) CH 318; (○) CH 410; (×) Té verde comercial. Las barras de error indican la desviación estándar.

En el caso de *Salmonella typhimurium* se observó que las infusiones menos concentradas (I₁) no produjeron ningún efecto inhibitorio ($p > 0,05$) (**Figura 4.3 A**). Sin embargo, cuando se utilizaron las infusiones I₃ se observó una disminución en las tasas de crecimiento. Para las variedades CH 318 y CH 410 se obtuvieron fases lag de hasta 24 horas y densidades poblacionales máximas 3 y 4 ciclos log menores que el control, respectivamente (**Figura 4.3 B**). El té verde comercial y la variedad CH 112 presentaron un efecto inhibitorio leve, con tasas de crecimiento inferiores al control pero con niveles de células similares al final del almacenamiento ($p > 0,05$). *Si et al.* (2006) obtuvieron una inhibición del 58% para *S. typhimurium* utilizando un extracto

comercial de té verde en una concentración de 500 mg/L. A través de estudios de microscopía electrónica de barrido observaron que en presencia de té, las células aparecen formando cadenas o agregados, lo cual indica que el tratamiento afecta la división celular. Ellos sugieren que éste es el blanco de los polifenoles de té verde ya que ningún microorganismo fue capaz de completar su división.

Por el contrario, *Escherichia coli* fue levemente inhibida por las variedades de té estudiadas (**Figura 4.3 C y D**). *Chou, Lin y Chung (1999)* también notaron una leve inhibición de *E. coli* (<30%) con el tratamiento de té verde, mientras que *Wu et al. (2007)* no observaron ninguna actividad contra *E. coli*.

El valor del contenido polifenólico de cada variedad (**Tabla 4.1**) correlacionó con su actividad antimicrobiana. Así, puede concluirse que el efecto de los polifenoles de té verde es concentración-dependiente, lo cual también se corrobora con la mayor efectividad de las infusiones I₃ comparadas con las infusiones I₁. *Si et al. (2006)* demostraron una relación directa entre el contenido polifenólico y la actividad antimicrobiana de un extracto de té verde chino.

Sin embargo, las distintas especies microbianas mostraron una sensibilidad distinta al té verde y a la concentración de la infusión durante el almacenamiento a 20°C (**Figuras 4.2 y 4.3**). El resultado obtenido para los distintos microorganismos confirmó lo que previamente reportaron *Kim et al. (2004)* y *Si et al. (2006)*, quienes encontraron que el té verde es más efectivo contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* que contra *Salmonella Spp.* y *E. coli* 0157:H7. De acuerdo con los datos aquí presentados, parecería que el crecimiento de las bacterias gram positivas está inhibido por las infusiones de té verde, mientras que las bacterias gram negativas son resistentes. Esto coincide con reportes previos los cuales sugieren una mayor susceptibilidad hacia los polifenoles de las bacterias gram positivas contaminantes de alimentos comparadas con las gram negativas (*Taguri, Tanaka & Kouno, 2004*). Se ha demostrado que la susceptibilidad de las distintas especies bacterianas a los componentes del té verde está relacionada con las diferencias en los componentes de

su pared celular (Ikigai, Nakae, Hara & Shimamura, 1993; Zhao et al., 2001). Estos autores propusieron que una de las razones por las que las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas a los polifenoles es la presencia de una fuerte carga negativa conferida por el lipopolisacárido sobre la superficie de los Gram negativos. Así, la membrana externa de los microorganismos Gram negativos actúa como una barrera debido a la repulsión electrostática entre los polifenoles y la superficie celular.

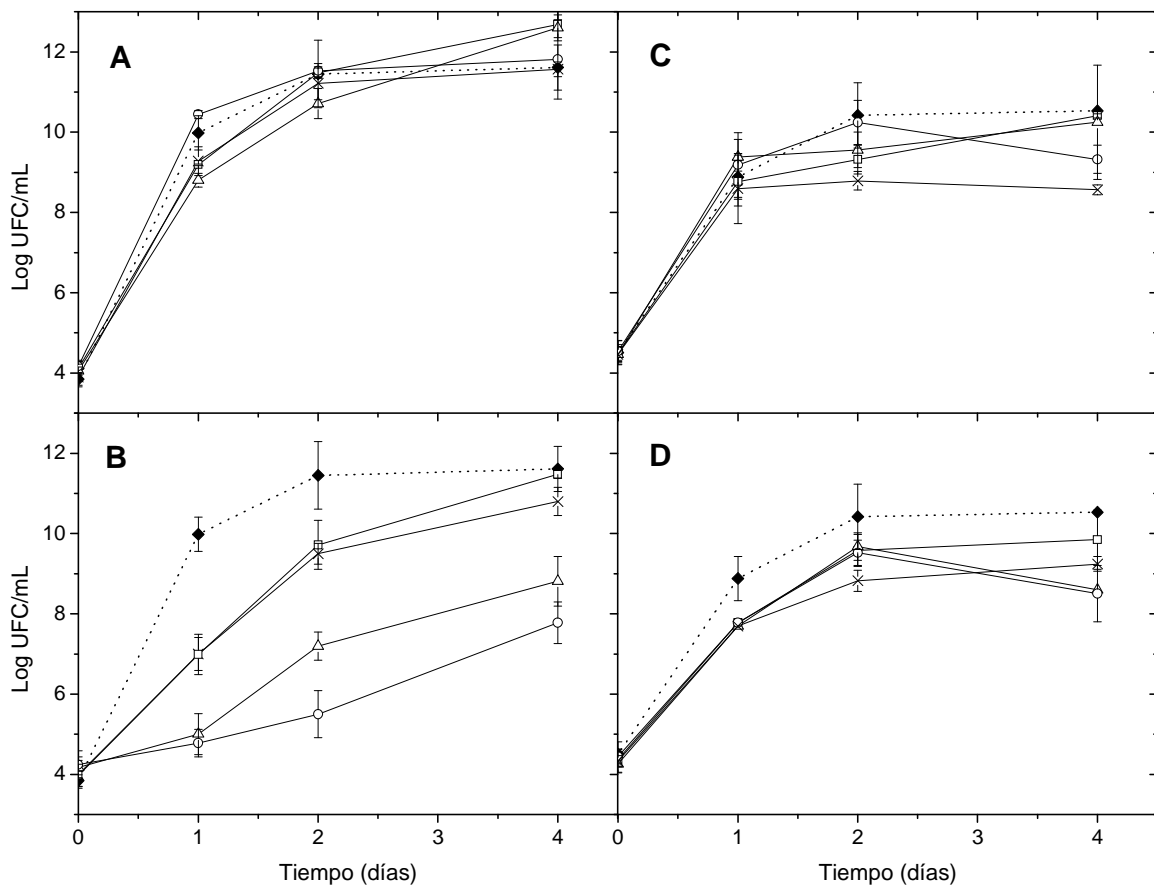


Figura 4.3. Actividad antimicrobiana de distintas variedades de té verde frente a *Salmonella typhimurium* (A-B) y *Escherichia coli* (C-D) en WPC35 (8% p/v sólidos) a pH 5.5. (A, C) Infusiones I₁ y (B, D) Infusiones I₃. (◆) Control, sin agregado de té verde; (□) CH 112; (Δ) CH 318; (○) CH 410; (×) Té verde comercial. Las barras de error indican desviación estándar.

Aunque algunos autores han llevado a cabo estudios sobre el mecanismo de acción antibacteriano de los polifenoles del té (*Caturla, Vera-Samper, Villalaín, Mateo & Micol, 2003; Zhang & Rock, 2004*), el mecanismo de acción exacto aún no está claro. Se ha sugerido que los flavonoides (polifenoles) pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y afectar la actividad enzimática, particularmente de aquellas enzimas asociadas a la producción de energía. La síntesis de lípidos y proteínas también se vio afectada aunque en menor medida. Adicionalmente, los polifenoles pueden interferir con las funciones de la membrana plasmática (transporte de electrones, absorción de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad enzimática) e interactuar con proteínas de la membrana causando deformaciones en la estructura y funcionalidad de la misma. *Ikigai et al. (1993)* informaron que las catequinas (polifenoles) actúan principalmente sobre la membrana dañando las bicapas lipídicas, posiblemente por penetración directa y disrupción de la función de barrera. Alternativamente, los polifenoles pueden cambiar la fluidez de la membrana y causar fusiones de membranas, proceso que puede resultar en la pérdida de material intracelular y agregación de células. En este sentido, *Caturla et al. (2003)* demostraron que las catequinas con grupos galo particionan muy eficientemente en las membranas biológicas y promueven la formación de estructuras resistentes al detergente o dominios de mayor orden molecular dentro de la empaquetada fosfolipídica. Estos dominios de membrana altamente compactados afectan la actividad enzimática y las funciones de las proteínas, y por lo tanto, afectan la regulación de las funciones de membrana. Estos autores también mostraron que las catequinas con grupos galo produjeron la fuga de material interno desde membranas aisladas de *E. coli*, reforzando la actividad antibacteriana global de estos compuestos.

4.4. Influencia de la concentración de WPC/proteína y del pH sobre la actividad antimicrobiana de té verde comercial sobre *L. innocua*

El efecto de la concentración de WPC sobre la actividad antimicrobiana del té verde comercial se estudió frente a *L. innocua* como representativa de bacterias gram positivas, la cual es completamente inhibida por las infusiones más concentradas (I_3) (**Figura 4.2 A**). Como puede verse en la **Figura 4.4**, el efecto inhibitorio del té verde en presencia de WPC35 se mantuvo hasta 4 días de almacenamiento. El aumento del contenido de sólidos de WPC35 de 8 a 16% p/v disminuyó significativamente ($p=0,0051$) la efectividad de la infusión de té verde (I_3), ya que con 16% de sólidos se obtuvo una densidad poblacional 2 ciclos logarítmicos mayor que con 8% de sólidos al día 4 (**Figura 4.4**). Para discernir si la disminución en la efectividad del té verde se debió al mayor contenido de proteínas, se utilizó un WPC80 (80% de proteínas). En este caso el contenido de sólidos se mantuvo constante (8% p/v) pero el contenido de proteínas aumentó de 3,2 a 6,7% p/v, el cual es similar al sistema de WPC35 con 16% de sólidos (6,4% p/v de proteínas). La **Figura 4.4** muestra claramente que la pérdida de actividad antimicrobiana es casi totalmente atribuible a las proteínas. Más aún, el sistema con WPC80 alcanzó niveles de crecimiento mayores que aquel con WPC35 (16% de sólidos) y similares al control, sin té verde, al finalizar el almacenamiento. Esta menor efectividad con WPC80 podría ser atribuida al menor contenido mineral de WPC80 comparado con WPC35. En este último, las sales estarían ejerciendo un efecto de “screening” o enmascaramiento disminuyendo el complejamiento entre proteínas y polifenoles.

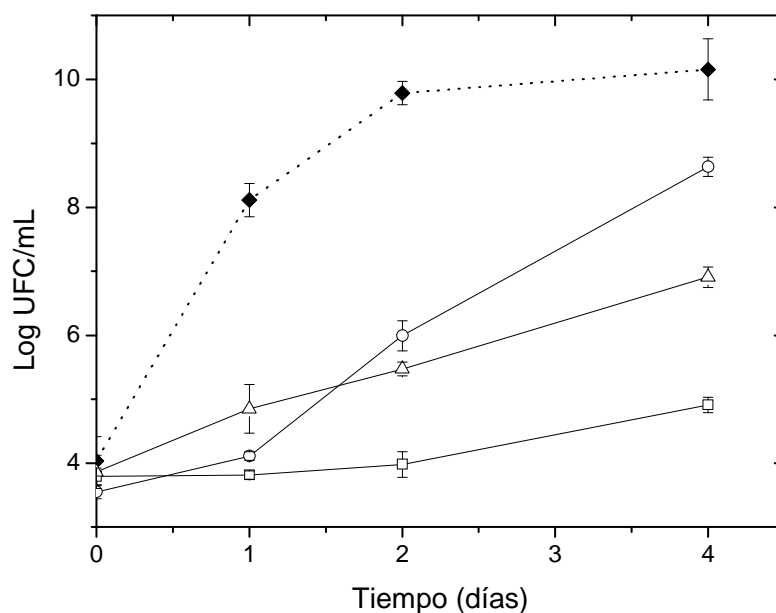


Figura 4.4. Actividad antimicrobiana de té verde comercial (Infusiones I₃) frente a *Listeria innocua* con distintas concentraciones de sólidos y proteínas de WPC a pH 5.5. (◆) Control sin té verde; (□) WPC35 8% p/v sólidos (3,2% p/v proteína); (Δ) WPC35 16% p/v sólidos (6,4% p/v proteína); (○) WPC80 8% p/v sólidos (6,7% p/v proteína). Las barras de error indican la desviación estándar.

Se ha informado que los polifenoles contenidos en infusiones de té verde son inestables en soluciones alcalinas donde pierden su estructura de monómeros mediante reacciones de polimerización, mientras que en soluciones ácidas muestran una gran estabilidad (Yoshino *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de las reacciones de polimerización y degradación a valores de pH altos, las nuevas sustancias formadas, conocidas como taninos, podrían tener actividades antimicrobianas similares o incluso mayores que aquellas ejercidas por los monómeros. Se estudió el efecto del pH sobre la inhibición de *L. innocua* por parte de infusiones de té verde comercial (I₃) en presencia de WPC35. Como se muestra en la **Tabla 4.3**, la variación de pH entre 5 y 7 no afectó la actividad inhibitoria del té verde. A pH 4 se observa un efecto bacteriostático incluso sin té verde debido al propio efecto inhibitorio del pH. Los resultados indican que el té verde podría utilizarse como antimicrobiano efectivo en alimentos en un amplio rango de pH.

Tabla 4.3. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana (Log UFC/mL) de infusiones (I₃) de té verde comercial frente a *Listeria innocua* en presencia de WPC35 (8% p/v sólidos).

| Tiempo (horas) | pH 4,0 | | pH 5,0 | | pH 6,0 | | pH 7,0 | |
|----------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | Control | Té verde | Control | Té verde | Control | Té verde | Control | Té verde |
| 0 | 6,5 ± 0,2 | 6,6 ± 0,3 | 6,6 ± 0,3 | 6,5 ± 0,1 | 6,7 ± 0,2 | 6,6 ± 0,2 | 6,8 ± 0,2 | 6,5 ± 0,1 |
| 24 | 6,5 ± 0,4 | 6,7 ± 0,3 | 10,8 ± 0,3 | 6,6 ± 0,2 | 10,8 ± 0,3 | 7,0 ± 0,2 | 10,8 ± 0,6 | 6,9 ± 0,3 |
| 48 | 6,4 ± 0,3 | 6,5 ± 0,2 | 10,9 ± 0,6 | 6,4 ± 0,3 | 10,3 ± 0,4 | 7,0 ± 0,6 | 11,2 ± 0,7 | 6,7 ± 0,3 |

4.5. Comportamiento de distintos microorganismos tratados con té verde en WPC35 frente a diversas condiciones de estrés

Se evaluaron las respuestas de microorganismos tratados con té verde (infusiones I₃), y sometidos posteriormente a diferentes condiciones de estrés. Los factores de estrés utilizados en este estudio pretenden simular algunas de las condiciones utilizadas habitualmente en el procesamiento y preservación de los alimentos. El método más conocido para destruir organismos vegetativos es el tratamiento térmico, con temperaturas que varían entre 60 °C y 100 °C. Durante el mismo, una gran cantidad de energía es transferida al alimento con las consecuentes reacciones indeseadas que afectan negativamente los aspectos organolépticos y nutricionales del producto (Sergelidis & Abraham, 2009). Así, un pre-tratamiento con té verde podría acelerar la inactivación térmica de un dado microorganismo, permitiendo la aplicación de un tratamiento menos severo, ya sea por reducción del tiempo o la temperatura del proceso. Otro método muy utilizado en la industria para preservar alimentos es la adición de sal a fin de disminuir la actividad de agua. De la misma forma, la reducción del pH mediante distintos ácidos orgánicos, los cuales tienen la capacidad para penetrar la membrana de las células bacterianas y afectar su pH intracelular, es siempre una buena estrategia cuando el producto lo permite. Finalmente, la acción antimicrobiana del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se basa en su habilidad para formar

especies reactivas de oxígeno las cuales pueden dañar el ADN, enzimas, constituyentes de la membrana y pueden llevar a la lisis de los microorganismos. En muchos países, el peróxido de hidrógeno ha sido aceptado como aditivo de alimentos para controlar el crecimiento bacteriano en leche almacenada antes de la elaboración de queso (*Report, 2003*) y como agente esterilizante de envases plástico utilizados en sistemas asépticos.

Tabla 4.4: Reducción (-Log N/No) en el número de células de distintos microorganismos tratados con té verde (infusiones I₃) por 48 horas a 20 °C en WPC35 (8% p/v, pH 5,5), y luego sometidos a diferentes condiciones de estrés durante 60 minutos en buffer fosfato. Se informa el promedio \pm desvío estándar.

| | | Tratamientos | | | |
|----------------------------------|-----------|-------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | Térmico (52°C) | Salino (10% p/v) | Oxidativo (0,05% v/v) | Ácido láctico pH 4 |
| <i>Listeria innocua</i> CIP 8011 | Control * | 0,3 \pm 0,2 | 1,1 \pm 0,3 | 4,1 \pm 0,3 | 1,2 \pm 0,3 |
| | Té verde | 1,1 \pm 0,1 | 2,0 \pm 0,1 | 3,5 \pm 0,3 | 6,5 \pm 0,3 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Control * | 2,8 \pm 0,1 | 0,7 \pm 0,2 | 1,6 \pm 0,1 | 2,0 \pm 0,2 |
| | Té verde | 6,4 \pm 0,3 | 2,7 \pm 0,2 | 1,2 \pm 0,1 | 2,2 \pm 0,2 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Control * | 6,8 \pm 0,1 | 2,1 \pm 0,2 | 6,2 \pm 0,1 | 0,0 \pm 0,1 |
| | Té verde | 7,1 \pm 0,2 | 0,7 \pm 0,0 | 5,2 \pm 0,2 | 0,0 \pm 0,1 |
| <i>Escherichia coli</i> | Control * | 5,8 \pm 0,0 | 2,5 \pm 0,0 | 5,4 \pm 0,1 | 1,1 \pm 0,1 |
| | Té verde | 6,2 \pm 0,1 | 3,0 \pm 0,2 | 3,7 \pm 0,3 | 2,6 \pm 0,0 |

* Sometido a estrés sin tratamiento previo con té verde

El tratamiento térmico aplicado en forma individual no produjo reducciones significativas ($p > 0,05$) en el número de células de *Listeria innocua*, mientras que los estreses salino y ácido produjeron leves efectos bactericidas. *Bearns y Girard (1958)* observaron que *Listeria monocytogenes* es un organismo muy resistente al calor porque se puede recuperar luego de un tratamiento térmico a 61,5 °C durante 35 minutos, lo cual es consistente con lo observado en este trabajo. El estrés oxidativo

fue el tratamiento más efectivo para reducir el número de este microorganismo (**Tabla 4.4**).

Se observaron pocas diferencias cuando se compara la respuesta de *L. innocua* a los distintos estreses con y sin té verde. La excepción fue el tratamiento consecutivo de té verde y ácido láctico, el cual mostró una reducción adicional de 5,3 ciclos logarítmicos, comparado con el estrés ácido solo (**Tabla 4.4**). Esto indica que la presencia de los componentes del té potencia la actividad antimicrobiana del ácido láctico. *Apostolidis, Kwon y Shetty (2008)* obtuvieron resultados similares cuando evaluaron la inhibición de *L. monocytogenes* por aplicación de compuestos polifenólicos de orégano y arándanos en combinación con lactato de sodio. Ellos observaron que esta combinación tenía el mejor efecto inhibitorio tanto en medio de cultivo como en sistemas de carne molida cocida. Adicionalmente, ellos propusieron un mecanismo en el cual los compuestos fenólicos pueden adherirse e insertarse en la membrana plasmática de los microorganismos produciendo cambios en la fluidez de la misma. Esto produciría una desestabilización y parcial disrupción de la membrana, permitiendo que otros compuestos fenólicos pequeños y las moléculas de ácido láctico entren al citosol y actúen sobre enzimas específicas involucradas en caminos biosintéticos clave para la producción de energía.

Cuando a *Staphylococcus aureus* se le aplicaron los tratamientos individuales de estrés térmico, oxidativo y ácido mostró reducciones de más de 1,5 ciclos log (**Tabla 4.4**). La condición menos efectiva fue el tratamiento salino el cual redujo menos de un orden, corroborando la bien conocida habilidad de este microorganismo para tolerar altas concentraciones de cloruro de sodio (*O'Byrne & Booth, 2002*).

El tratamiento de este microorganismo con té verde seguido por estrés térmico o salino mostró, respectivamente, reducciones de 3,6 y 2,0 ciclos logarítmicos mayores que las condiciones de estrés por sí solas (**Tabla 4.4**). *Bikels-Goshen, Landau, Saguy y Shapira (2010)* alertaron sobre la resistencia incrementada al calor y a otros

antimicrobianos por parte de *S. aureus*, cuando esta bacteria se encuentra adaptada a la presencia de catequinas de té verde. Sin embargo, la principal diferencia con nuestro trabajo que podría explicar estos resultados contradictorios se fundamenta en la utilización, por parte de estos autores, de concentraciones de EGCg muy bajas (0,002%) y de un menor tiempo de tratamiento térmico (10 minutos). Estas concentraciones no inhibitorias permiten que el organismo sintetice proteínas de estrés o proteínas de shock térmico, las cuales pueden ayudar a la bacteria a lidiar o aliviar el estrés térmico. Por otro lado, la efectividad del té verde para incrementar la vulnerabilidad al cloruro de sodio está de acuerdo con los resultados presentados por (Stapleton et al., 2006), quienes informaron que la catequina EGCg, presente en el té verde, puede suprimir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de sal. El té verde fue, sin embargo, inefectivo para potenciar la efectividad del peróxido de hidrógeno, mientras que la respuesta al ácido láctico no mejoró en absoluto (**Tabla 4.4**). Dado que el té verde es un potente antioxidante y que se ha demostrado su actividad frente a los daños oxidativos inducidos por H₂O₂ (Yang et al., 2007), es de esperar que los tratamientos combinados con peróxido de hidrógeno resulten en una menor reducción del número de microorganismos. De hecho, este evento se observó para todos los microorganismos evaluados e indica que los polifenoles del té verde estarían degradando al peróxido de hidrógeno antes de que pueda ejercer su efecto bactericida.

Salmonella typhimurium mostró una gran susceptibilidad al tratamiento térmico y al estrés oxidativo (**Tabla 4.4**). En este sentido, Ukuku, Pilizota & Sapers (2004) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron el efecto de tratamientos combinados de agua caliente y peróxido de hidrógeno sobre la supervivencia de *Salmonella Spp.* en melón fresco cortado. Sin embargo, este microorganismo fue menos afectado por el estrés salino, y el estrés ácido no produjo ningún cambio en el número de bacterias. Esta insensibilidad al ácido láctico también fue reportada por

Eswaranandam, Hettiarachchy & Johnson (2004), quienes observaron que este ácido orgánico incorporado en films de proteína de soja (2,6%, pH 3,35) no produjo ningún halo de inhibición y tampoco se registraron reducciones en el número bacteriano cuando *Salmonella* se inoculó directamente sobre el disco del film con 0,9% de ácido láctico (pH 4,5).

Este microorganismo no presentó cambios en las reducciones del número de bacterias cuando se aplicaron los tratamientos térmico y ácido luego del té verde, y desafortunadamente, los estreses salino y oxidativo mostraron reducciones de *S. typhimurium* menores que los correspondientes tratamientos de estrés por sí solos, resultando en un efecto levemente protector (**Tabla 4.4**). Estos resultados indican que la utilización del té verde como pre-tratamiento no aportaría un beneficio adicional en el control del crecimiento de *Salmonella typhimurium*.

Escherichia coli presentó importantes reducciones cuando se aplicó calor y peróxido de hidrógeno, mientras que las condiciones salinas y acídicas fueron menos efectivas en el control del crecimiento de este microorganismo (**Tabla 4.4**). Se ha reportado que el tratamiento térmico a 55 °C de células de *E. coli* induce la formación de burbujas y vesículas en la membrana externa, causando la liberación de proteínas y lipopolisacáridos desde la superficie celular, lo que produce una destrucción substancial de la estructura de la membrana externa (*Katsui et al., 1982*). Por otro lado, *Yokoigawa, Takikawa y Kawai (1999)*, quienes estudiaron las diferencias en la supervivencia entre cepas patogénicas y no patogénicas de *E. coli*, observaron que este microorganismo puede crecer y sobrevivir en muchos alimentos salados y ácidos, lo cual corrobora los resultados obtenidos con estos estreses.

Las células de *E. coli* tratadas con té verde y luego expuestas al calor, al cloruro de sodio y al ácido láctico mostraron un leve aumento en la sensibilidad respecto al tratamiento individual (**Tabla 4.4**).

A fin de entender la falta de respuesta sinérgica en los microorganismos Gram negativos, se realizó el ensayo de adhesión microbiana al solvente (MATS) descrito por *Rosenberg, Gutnick y Rosenberg (1980)* para evaluar si la hidrofobicidad de la superficie celular de bacterias Gram negativas expuestas al té verde se vio modificada por este tratamiento. La hidrofobicidad de la superficie celular está determinada por muchas estructuras y biomoléculas como proteínas, polisacáridos y lípidos presentes en la superficie bacteriana. Una modificación en el número de células que pueden adherirse a un determinado solvente es una indicación de que algunas de estas estructuras han cambiado. Se ha sugerido, como un simple modelo, que la hidrofobicidad de la superficie celular aumenta como resultado de la exposición de moléculas de lípidos causada por una rápida perturbación estructural de la membrana externa (*Tsuchido, Katsui, Takeuchi, Takano & Shibasaki, 1985*).

S. typhimurium no presentó cambios en la superficie celular luego del tratamiento con té verde, lo que podría explicar la ausencia de respuestas sinérgicas al combinar con los tratamientos de estrés. Por su parte, *E. coli* mostró un aumento del 8% en su capacidad de adhesión al solvente luego de ser tratada con té verde. Probablemente, el té verde debilitó la membrana externa de este microorganismo y así se volvió más desprotegido y vulnerable a las condiciones extremas. *Cho, Schiller, Kahng y Oh (2007)* identificaron cambios únicos en los ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana externa de *E. coli* tratada con polifenoles de té verde. También observaron mediante microscopía electrónica de barrido la presencia de perforaciones y formas irregulares con superficies arrugadas en las células tratadas con concentraciones letales de polifenoles de té verde.

4.6. Respuesta de *Listeria innocua* a ácidos orgánicos e inorgánicos luego de la aplicación de té verde en WPC35

Se estudió la respuesta de dos cepas de *Listeria innocua* a estreses ácidos aplicados solos o luego de un pre-tratamiento con té verde. También se evaluó un co-cultivo de ambas cepas, el cual proveyó una visión más real del comportamiento de *Listeria spp.* en la contaminación de productos alimenticios.

Las diferencias con los datos expuestos en las secciones 4.2 a 4.4 de este capítulo tienen que ver con que el protocolo es levemente diferente. Aquí, las distintas muestras son diluidas para lograr un número similar de bacterias en todas ellas antes de aplicar los tratamientos ácidos.

L. innocua (CIP 80.11) resultó levemente sensible al tratamiento con té verde a las 48 horas. Esta misma cepa incubada durante 60 minutos con ácido láctico o cítrico presentó en ambos casos reducciones de 1,2 ciclos logarítmicos (Tabla 4.5). El tratamiento menos efectivo fue el del ácido clorhídrico ya que no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control sin ácido, corroborando en este sistema que, a igual pH externo, los ácidos orgánicos débiles son más deletéreos para este microorganismo en particular que los ácidos inorgánicos fuertes. Los ácidos minerales fuertes se disocian completamente en protones (H^+) y aniones. La membrana celular tiene una muy baja permeabilidad a los protones, pero éstos pueden entrar y salir de las células mediante la interacción con sistemas que controlan el transporte de H^+ . Para eliminar el exceso de H^+ y mantener el correcto pH interno, las células deben gastar energía. Esto afecta el transporte de nutrientes y la actividad metabólica general resultando en fases de latencia más largas, menores tasas de crecimiento y menor recuperación celular. Por otro lado, el mecanismo de acción de los ácidos orgánicos está basado en su capacidad para reducir el pH del medio y en la habilidad de las formas no disociadas para penetrar a través de las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, el mayor pH intracelular produce la disociación de estas

moléculas, liberando protones y acidificando el citoplasma. Esto afecta la actividad normal de la célula dado que el gradiente de protones y los sistemas de transporte se ven afectados (Samelis & Sofos, 2003). Además, muchas enzimas metabólicas esenciales son inactivadas a bajos valores de pH.

Tabla 4.5. Reducción (-Log N/No) del número de células de *L. innocua* (promedio \pm desvío estándar) tratadas con té verde (infusiones I₃) por 48 horas o sin tratar (control) en WPC35 (8% p/v, pH 5,5) y luego sometidas por 60 minutos a estrés ácido (pH 4,0) mediante la adición de distintos ácidos en buffer fosfato. Los experimentos se realizaron a 20 °C.

| | | Control | Té verde (5390 mg/L EAG) |
|---|---------------|---|---|
| <i>L. innocua</i> CIP 80.11 | Sin ácido | 0,2 \pm 0,1 ^{a, α} | 1,4 \pm 0,4 ^{a, β} |
| | HCl | 0,3 \pm 0,1 ^{a, α} | 0,6 \pm 0,0 ^{b, α} |
| | Acido láctico | 1,2 \pm 0,5 ^{b, α} | 6,5 \pm 0,3 ^{c, β} |
| | Acido cítrico | 1,2 \pm 0,3 ^{b, α} | 5,4 \pm 0,3 ^{d, β} |
| <i>L. innocua</i> ATCC 33090 | Sin ácido | 0,0 \pm 0,0 ^{a, α} | 0,0 \pm 0,0 ^{a, α} |
| | HCl | 0,0 \pm 0,0 ^{a, α} | 1,0 \pm 0,2 ^{b, β} |
| | Acido láctico | 0,0 \pm 0,0 ^{a, α} | 4,7 \pm 0,2 ^{c, β} |
| | Acido cítrico | 0,1 \pm 0,1 ^{a, α} | 1,8 \pm 0,5 ^{b, β} |
| Co-cultivo <i>CIP 80.11 + ATCC 33090</i> | Sin ácido | 0,1 \pm 0,0 ^{a, α} | 2,6 \pm 0,2 ^{a, β} |
| | HCl | 0,2 \pm 0,0 ^{a, α} | 2,6 \pm 0,2 ^{a, β} |
| | Acido láctico | 0,6 \pm 0,1 ^{b, α} | 4,2 \pm 0,2 ^{b, β} |
| | Acido cítrico | 0,4 \pm 0,1 ^{c, α} | 4,1 \pm 0,2 ^{b, β} |

Los valores en una misma columna, correspondientes a cada cultivo bacteriano, seguidos de distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Los valores en una misma fila seguidos de distintas letras griegas son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

El tratamiento consecutivo de té verde y ácidos redujo la habilidad de *L. innocua* (CIP 80.11) para tolerar el estrés ácido. Cuando se compara con los tratamientos de ácidos solos, los ácidos láctico y cítrico aplicados luego del té verde llevaron a reducciones

adicionales de 5,3 y 4,2 ciclos log, respectivamente, mientras que el té verde resultó menos efectivo en aumentar la vulnerabilidad al ácido clorhídrico (**Tabla 4.5**).

L. innocua (ATCC 33090) no se vio afectada por el té verde ni por la presencia de ácidos. Sin embargo, la aplicación de té verde antes del tratamiento con ácidos mostró efectos sinérgicos con todos los ácidos (**Tabla 4.5**). La combinación más efectiva fue con el ácido láctico, la cual llevó a una reducción de 4,7 ciclos logarítmicos.

En cuanto al co-cultivo el efecto del té verde fue mayor en éste que sobre las cepas puras, y los ácidos láctico y cítrico produjeron leves reducciones (**Tabla 4.5**).

La presencia del té verde mostró mejores resultados en combinación con ácido clorhídrico cuando se lo compara con el mismo tratamiento sobre las cepas puras y presenta reducciones bacterianas similares a los cultivos puros cuando el té verde se aplica antes de los ácidos orgánicos.

El fenómeno de tolerancia a ambientes ácidos en bacterias, incluyendo *Listeria spp.* ha sido estudiado por muchos años (*Shabala et al., 2006*). Como resaltan *Phan-Thanh, Mahouin y Aligé (2000)*, el pH mínimo que puede resistir *Listeria* depende de la composición del medio, la cepa y su estado fisiológico. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, más allá de las leves diferencias entre las cepas y el tipo de ácido (orgánico o inorgánico) aplicado, *L. innocua* presentó una alta tolerancia a los ambientes ácidos. Sin embargo, cuando el estrés ácido se aplicó luego de un pre-tratamiento con té verde, *L. innocua* (como cepas puras y como co-cultivo) mostró en todos los casos reducciones celulares mayores que con ácidos solos (**Tabla 4.5**).

4.7. Caracterización del impacto del tratamiento con té verde en las propiedades de la membrana y estructura celular de *Listeria innocua*

Las diferentes respuestas al té verde por parte de cada una de las cepas podrían tener relación con las distintas propiedades de superficie de estos microorganismos, las

cuales determinan las interacciones con el ambiente, incluyendo el intercambio de nutrientes y la resistencia a estreses externos como factores fisicoquímicos y térmicos. Para analizar las características de la superficie celular de las dos cepas de *L. innocua*, se llevaron a cabo mediciones del potencial zeta (ζ) y experimentos de hidrofobicidad y de integridad de membrana.

4.7.1. Potencial zeta (ζ)

Las células bacterianas generalmente poseen una carga neta negativa en su pared celular a pH neutro (Palmer, Flint & Brooks, 2007). Sin embargo, la magnitud de esta carga varía entre especies y probablemente también esté influida por las condiciones de cultivo (Kim & Frank, 1994), fase de crecimiento (Walker, Hill, Redman & Elimelech, 2005), fuerza iónica y pH. La carga sobre la superficie celular puede determinarse como su potencial ζ y la mayoría de las bacterias poseen un potencial ζ negativo a pH fisiológico (Lerebour, Cupferman & Bellon-Fontaine, 2004). Al pH experimental, utilizado en este trabajo (pH 5,5), las dos cepas de *L. innocua* mostraron valores de potencial ζ muy diferentes, $\zeta = -32 \pm 1$ mV y -96 ± 3 mV para *L. innocua* (CIP 80.11) y *L. innocua* (ATCC 33090), respectivamente. Estos valores indicaron diferentes características de superficie celular basadas en distintas composiciones de la pared, lo cual podría tener un rol importante en la sensibilidad al té verde y a los estreses ácidos posteriores.

4.7.2. Hidrofobicidad de la superficie celular

Los resultados de la adhesión microbiana a un solvente no-polar (reportado como el porcentaje de adhesión) obtenidos para *L. innocua* (CIP 80.11) y *L. innocua* (ATCC 33090) creciendo en WPC35 (8% p/v) fueron de 40,8% y 21,2%, respectivamente, lo

que indica que *L. innocua* (ATCC 33090) posee una menor hidrofobicidad que *L. innocua* (CIP 80.11).

La menor hidrofobicidad de la pared celular de *L. innocua* (ATCC 33090) junto con su mayor potencial ζ podrían explicar la falta de efecto de los polifenoles sobre esta cepa debido a la mayor repulsión electrostática y la existencia de menos regiones hidrofóbicas de unión (Ikigai et al., 1993; Zhao et al., 2001).

4.7.3. Respuesta osmótica

Con el fin de verificar el daño celular en las dos cepas de *L. innocua*, se evaluó la respuesta osmótica de las mismas luego del tratamiento con té verde.

Pagán & Mackey (2000) relacionaron la efectividad de los tratamientos físicos o químicos con la integridad de la membrana celular. Según estos autores existe una relación entre el daño de la membrana y la pérdida de viabilidad con una pérdida de la respuesta osmótica de las células. Esta respuesta osmótica se evaluó como un cambio en la densidad óptica ($\lambda = 680$ nm) entre las células control y las tratadas con té verde en WPC35 (8% p/v), cuando las mismas son colocadas en una solución de buffer fosfato con cloruro de sodio (0,75 M).

Las células de *L. innocua* (CIP 80.11) mostraron un aumento del 7,8% en la densidad óptica, mientras que *L. innocua* (ATCC 33090) sólo presentó un incremento del 1,7%. Esto indica que el tratamiento con té verde cambia la respuesta osmótica de las dos cepas en distinta medida y permite explicar la mayor susceptibilidad a los tratamientos posteriores de la cepa CIP 80.11.

4.7.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión se llevaron a cabo a fin de visualizar cambios morfológicos en la célula debidos a los tratamientos simples y

consecutivos con té verde (infusiones I₃) y ácido láctico (pH 4,0) sobre *Listeria innocua* (CIP 80.11) en WPC35 (8% p/v).

Las micrografías de las células control (sin tratamientos) de *L. innocua* tienen la estructura típica de las bacterias Gram positivas, mostrando una forma uniforme con membranas intactas lisas, sin desprendimientos de la pared celular ni signos de plasmólisis. Las células también mostraron una progresión normal de la formación del septo en el proceso de división celular (**Figura 4.5 A**).

Las células de *L. innocua* expuestas al ácido láctico presentaron marcados daños en el citoplasma celular sin cambios aparentes sobre la membrana (**Figura 4.5 B**). Este hecho está de acuerdo con el mecanismo de acción del ácido láctico ya que éste causa la inhibición de reacciones metabólicas esenciales, perturbación de la homeostasis del pH intracelular y acumulación de aniones tóxicos. *Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008)* observaron resultados similares cuando evaluaron la acción de ácido málico (0,6 mL/100 mL) sobre *L. monocytogenes* en jugo de melón.

Las células de *L. innocua* tratadas con té verde mostraron membranas desorganizadas (**Figura 4.5 C**). *Sivarooban, Hettiarachchy y Johnson (2008)* informaron que el efecto del té verde sobre *L. monocytogenes* era visible mediante TEM. Ellos observaron que el té verde puede alterar la morfología celular mediante cambios en la presión osmótica de las células. De hecho, *Si et al. (2006)* también mostraron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) que las catequinas del té verde presentes en un caldo sintético alteraron la morfología de las células y la división celular. Estos autores sugirieron que la división celular sería el blanco de acción de los polifenoles del té ya que todas las células afectadas presentaron algún grado de división incompleta. En el presente trabajo, este fenómeno no fue observado dado que para esta condición no pudo encontrarse ninguna célula en división activa. Estas células también mostraron algunos sedimentos sobre la superficie celular (**Figura 4.5 C**), probablemente debidos a la interacción de los polifenoles del té con las proteínas del

lactosuero. Como ya se ha visto, los polifenoles del té se unen a las proteínas del suero y forman complejos insolubles los cuales también pueden interactuar con los polisacáridos presentes en la pared celular bacteriana (Ferruzzi & Green, 2006; He, Shi & Yao, 2006).

Finalmente, las células tratadas con el tratamiento consecutivo de té verde y ácido láctico exhibieron un efecto mayor que el té verde solo sobre la superficie celular y el citoplasma apareció fragmentado (**Figura 4.5 D**). Estas observaciones mostrarían que la acción antimicrobiana del té verde sobre la membrana celular facilitaría la entrada de moléculas de ácido láctico al citosol.

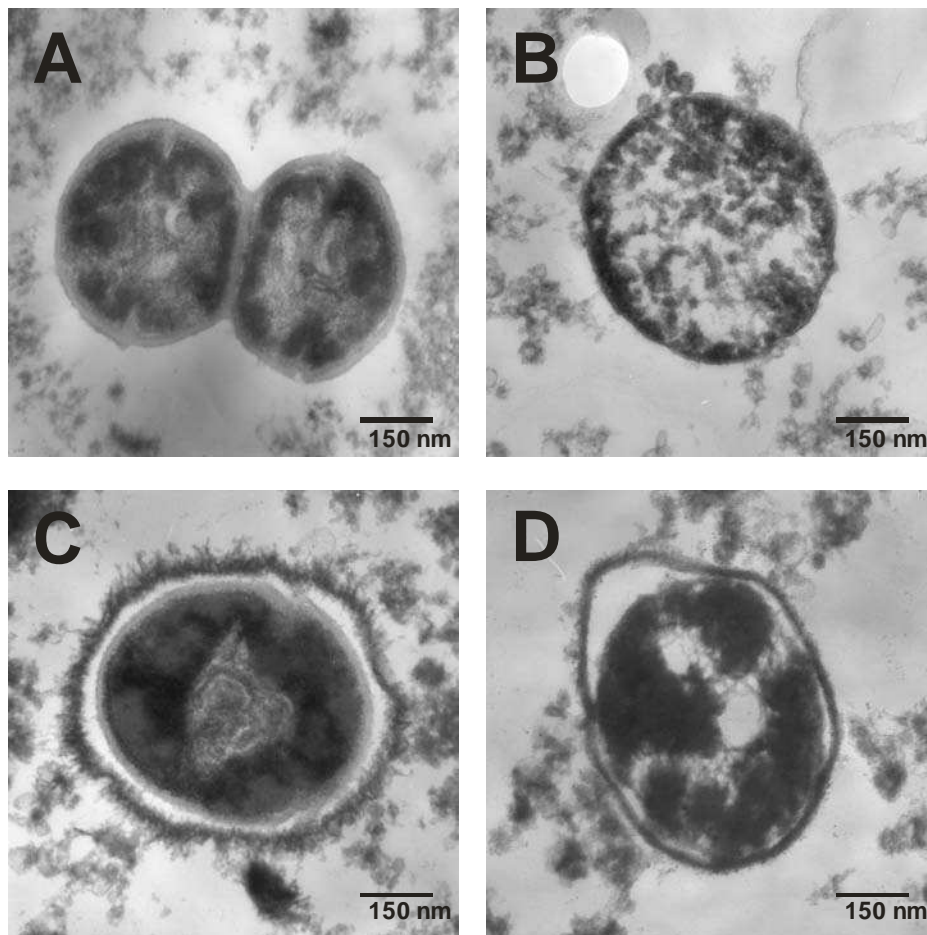


Figura 4.5. Micrografías de células de *Listeria innocua* (CIP 80.11) tratadas con té verde (infusiones I₃) por 48 horas en WPC35 (8% p/v, pH 5,5) y luego sometidas por 60 minutos a un estrés ácido (pH 4,0) mediante la adición de ácido láctico en buffer fosfato. El experimento se realizó a 20 °C. (A) control, sin tratamientos; (B) células tratadas sólo con ácido láctico; (C) células tratadas sólo con té verde; (D) células tratadas con té verde y ácido láctico.

4.8. Conclusiones

La variedad argentina de té verde CH 410 mostró una efectividad sobresaliente como antioxidante y antimicrobiano aún en presencia de WPC, atribuible principalmente a su mayor contenido de polifenoles.

El grado de inhibición de la actividad antioxidante por presencia del WPC dependió de la variedad de té verde y no de su contenido polifenólico, revelando el complejo mecanismo de interacción entre polifenoles y proteínas.

La actividad antimicrobiana de todas las variedades de té estudiadas en presencia de WPC se observó principalmente frente a bacterias gram positivas, como ha sido descrito en la literatura. El té verde se comportó como agente bacteriostático contra *L. innocua* pero como bactericida contra *S. aureus*, indicando que puede utilizarse para controlar algunos microorganismos patógenos en alimentos en un rango de pH 4-7.

La respuesta a diversas condiciones de estrés de un determinado microorganismo, tratado previamente con té verde, varía con el microorganismo y con el tipo de estrés. Sin embargo, en la mayoría de los casos el té verde mejoró el efecto del estrés aplicado sin producir efectos de protección cruzada.

En los casos de estrés por aplicación de ácidos se observó que *L. innocua* (CIP 80.11) resultó ser más sensible que *L. innocua* (ATCC 33090) a todos los tratamientos, mostrando la primera mayores daños en la membrana. Estas respuestas diferenciales entre las cepas correlacionaron con una superficie celular más hidrofóbica de la cepa CIP 80.11, la cual también presentó un potencial ζ menos negativo. Esto la tornaría más susceptible a interaccionar con los polifenoles.

El co-cultivo de ambas cepas de *L. innocua* (CIP 80.11 y ATCC 33090), el cual representó un enfoque más realista sobre la contaminación de *Listeria spp.* en

alimentos, se comportó de manera similar a *L. innocua* (CIP 80.11) frente al té verde y mostró reducciones mayores en todos los tratamientos combinados con ácidos.

Estos resultados indican que el té verde puede ser potencialmente utilizado en productos lácteos, como es el caso del lactosuero. Los efectos sinérgicos deberían ser más estudiados para minimizar la concentración de aditivos requerida para alcanzar un efecto bactericida particular sin afectar negativamente la aceptabilidad sensorial. Este conocimiento sobre las interacciones entre el té verde y los estreses tiene importantes implicancias para la industria alimentaria cuando se necesita conocer cuál es la mejor estrategia de preservación a adoptar.

La aplicación potencial de té verde en productos lácteos está también condicionada a estudios organolépticos y sensoriales. En el **Capítulo 3**, se ha demostrado que la utilización de polifenoles en concentraciones menores o iguales a 0,5% (equivalente a las infusiones I₃) no produce la precipitación del sistema y no afecta negativamente la viscoelasticidad y la textura de los geles de WPC35 a pH 6,0.

4.9. Referencias

Almajano, M. P., Carbó, R., López Jiménez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*, 55-63.

Almajano, M. P., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2007a). Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *102*, 1375-1382.

Almajano, M. P., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2007b). Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry*, *101*, 126-130.

Amarowicz, R., & Shahidi, F. (1995). Antioxidants activity of green tea catechins in a beta-carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, *2*, 47-56.

Andre´, M. C., Hidalgo Campos, M. R., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., & Bisol Serafini, A. (2008). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control*, *19*, 200-207.

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, *128*, 317-324.

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R., Voss, H.-P., & Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein *Food and Chemical Toxicology*, *39*, 787-791.

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H.-P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1184-1187.

Atra, R., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E., & Balint, A. (2005). Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose *Journal of Food Engineering*, *67*, 325-332.

Bearns, R. E., & Girard, K. F. (1958). The effects of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*, *4*, 55-61.

Bikels-Goshen, T., Landau, E., Saguy, S., & Shapira, R. (2010). Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. *International Journal of Food Microbiology*, *138*, 26-31.

Buchanan, R. L., Golden, M. H., & Whiting, R. C. (1993). Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*, *56*, 474-478.

Campbell, J., Bang, W., Isonhood, J., Gerard, P. D., & Drake, M. A. (2004). Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* 0157:H7. *Food Microbiology*, *21*, 727-735.

- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C. R., & Micol, V. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology & Medicine*, *34*, 648-662.
- Colahan-Sederstrom, P. M., & Peterson, D. G. (2005). Inhibition of key aroma compound generated during ultrahigh-temperature processing of bovine milk via epicatechin addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 398-402.
- Cuvelier, M. E., Maillard, M. N., & Berset, C. (1996). Synergistic and antagonistic effect in pure phenolic antioxidant mixtures and in plant extracts. In: *1st Congress of the European section of AOCS*. Dijon.
- Cho, Y. S., Schiller, N. L., Kahng, H. Y., & Oh, K. H. (2007). Cellular responses and proteomic analysis of *Escherichia coli* exposed to green tea polyphenols. *Current Microbiology*, *55*, 501-506.
- Chou, C.-C., Lin, L.-L., & Chung, K.-T. (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*, *48*, 125-130.
- D'Aoust, J. Y., Warburton, D. W., & Sewell, A. M. (1985). *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from Cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. *Journal of Food Protection*, *48*, 1062-1066.
- De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M., & Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, *67*, 1-17.
- Dubeau, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, *122*, 539-545.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2004). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, *69*, 79-84.
- Ferruzzi, M. G., & Green, R. J. (2006). Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, *99*, 484-491.
- Foster, J. W. (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, *173*, 6896-6902.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, *113*, 1-15.
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J. M., & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food science and Technology*, *13*, 334-240.
- Gould, G. W. (1997). Methods of preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 51-64.

- Greenacre, E. J., & Brocklehurst, T. F. (2006). The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 62-65.
- Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (1999). Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 176, 463-469.
- He, Q., Shi, B., & Yao, K. (2006). Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry*, 95, 1178-1182.
- Henning, D. R., Baer, R. J., Hassan, A. N., & Dave, R. (2006). Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*, 89, 1179-1188.
- Hough, G., Pugliese, M. L., Sanchez, R., & Da Silva, O. M. (1999). Sensory and microbiological shelf-life of a commercial Ricotta cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 454-459.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et biophysica acta*, 1147, 132-136.
- Jablonski, L. M., & Bohach, G. (2001). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press.
- Jørgensen, H. J., Mørk, T., & Rørvik, L. M. (2005). The Occurrence of *Staphylococcus aureus* on a Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 3810-3817.
- Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M., & Shibasaki, I. (1982). Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 151, 1523-1531.
- Kilmartin, P. A., & Hsu, C. F. (2003). Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82, 501-512.
- Kim, K. Y., & Frank, J. F. (1994). Effect of growth nutrients on attachment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 7, 720-726.
- Kim, S., Ruengwilysup, C., & Fung, D. Y. C. (2004). Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in a food model. *Journal of Food Protection*, 67, 2608-2612.
- Leenanon, B. R., & Drake, M. A. (2001). Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behaviour of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 64, 970-974.
- Lerebour, G., Cupferman, S., & Bellon-Fontaine, M. N. (2004). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 7-16.
- Leyer, G. J., Wang, J. J., & Johnson, E. A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3752-3755.

Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J. L., & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: A synergistic effect? *Food Microbiology*, 22(5), 391-398.

O'Byrne, C. P., & Booth, I. R. (2002). Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 203-216.

Pagán, R., & Mackey, B. (2000). Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2829-2834.

Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 577-588.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6882-6890.

Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *Journal of Food Protection*, 52, 144-147.

Peters, R. H. (2005). Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal*, 15, 537-545.

Phan-Thanh, L., Mahouin, F., & Aligé, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 121-126.

Prat Kricun, S. D. (2005). Contenido de catequinas en cultivares clonales argentinos de té (*Camellia sinensis*), elaborados como té negro y té verde sencha. *Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales: Universidad Nacional de Misiones*.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2008). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, 20(2), 105-112.

Report, E. U. R. A. (2003). Hydrogen peroxide vol. 38 (pp. 1-258).

Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbon: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29-33.

Ryan, C. A., Nickels, N. T., Hargrett-Bean, N. T., Potter, M. E., Endo, T., Mayer, L., Langkop, C. W., Gibson, L., McDonald, R. C., Kenney, R. T., Puhr, N. D., McDonnell, P. J., Martin, R. J., Cohen, M. L., & Blake, P. A. (1987). Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *Journal of American Medical Association*, 258, 3269-3274.

Samelis, J., & Sofos, J. N. (2003). Organic acids. In: S. Roller, *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 98-132). Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.

Schamberger, G. P., & Labuza, T. P. (2007). Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. *LWT*, 40, 1410-1417.

- Schwambach, S. L., & Peterson, D. G. (2006). Reduction of stale flavor development in low-heat skim milk powder via epicatechin addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 502-508.
- Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A. (1996). In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, *50*, 28-32.
- Sergelidis, D., & Abraham, A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control*, *20*, 1-10.
- Shabala, L., Mcmeekin, T., Budde, B. B., & Siegumfeldt, H. (2006). *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, *110*, 1-7.
- Sharma, V., Kumar, H. V., & Rao, L. J. M. (2008). Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. *Food Research International*, *41*, 124-129.
- Shpigelman, A., Israeli, G., & Livney, Y. D. (2010). Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, *24*, 735-743.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., & Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, *1125*, 204-210.
- Sivaroban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with Nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, *71*, 2105-2109.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, *25*, 294-303.
- Stapleton, P. D., Gettert, J., & Taylor, P. W. (2006). Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, *111*, 276-279.
- Stapleton, P. D., Shah, S., Hamilton-Miller, J. M. T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., & Taylor, P. W. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *24*, 374-380.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(12), 1965-1969.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 5987-6000.
- Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M., & Shibasaki, I. (1985). Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*, 363-371.

- Ukuku, D. O., Pilizota, V., & Sapers, G. M. (2004). Effect of hot water and hydrogen peroxide treatments on survival of *Salmonella* and microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67, 432-437.
- Viljanen, K., Halmos, A. L., Sinclair, A., & Heinonen, M. (2005). Effect of blackberry and raspberry juice on whey protein emulsion stability. *European Food Research and Technology*, 221, 602-609.
- Walker, S. J., Archer, P., & Bank, J. G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 157-162.
- Walker, S. L., Hill, J. E., Redman, J. A., & Elimelech, M. (2005). Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3093-3099.
- Wu, S.-C., Yen, G.-C., Wang, B.-S., Chiu, C.-K., Yen, W.-J., Chang, L.-W., & Duh, P.-D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT*, 40, 506-512.
- Yang, Z., Tu, Y., Xia, H., Jie, G., Chen, X., & He, P. (2007). Suppression of free-radicals and protection against H₂O₂-induced oxidative damage in HPF-1 cell by oxidized phenolic compounds present in black tea. *Food Chemistry*, 105, 1349-1356.
- Yokoigawa, K., Takikawa, A., & Kawai, H. (1999). Difference between *Escherichia coli* O157:H7 and non-pathogenic *E. coli*: survival and growth in seasonings. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 574-576.
- Yoshino, K., Suzuki, M., Sasaki, K., Miyase, T., & Sano, M. (1999). Formation of antioxidants from (-) epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 223-229.
- Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2004). Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 30994-31001.
- Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., Okubo, S., Hara, Y., & Shimamura, T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1737-1742.
- Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (1997). Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4624-4628.
- Zimeri, J., & Tong, C. H. (1999). Degradation kinetics of (-)-epigallocatechin gallate as a function of pH and dissolved oxygen in a liquid model system. *Journal of Food Science*, 64(5), 753-758.
- Zottola, E. A., & Smith, L. B. (1991). Pathogens in cheese. *Food Microbiology*, 8, 171-182.

SECCIÓN III

Actividad antiproliferativa de células tumorales de polifenoles de té verde: impacto de la interacción entre polifenoles y proteínas del lactosuero

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Proteínas del lactosuero

Se utilizaron las siguientes proteínas del lactosuero: β -lactoglobulina (β -lg) y caseinoglicomacropéptido (CMP). La proteína β -lg utilizada corresponde a un producto comercial (BioPURE β -lactoglobulina) provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición es: 97,8 % de proteína (base seca) siendo β -lactoglobulina el 93,6 % del total de proteínas, 0,3 % de grasa, 1,8 % de ceniza y 5,0 % de humedad. El caseinomacropéptido (CMP) (BioPURE GMP caseinoglicomacropéptido) también fue provisto por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición es: 79,0 % de proteína (en base seca), siendo CMP el 86,3 % del total de proteínas, 0,6 % de grasa, 6,3 % de ceniza y 6,4 % de humedad.

1.2. Polifenoles de té verde

Se utilizó un extracto de polifenoles de té verde en polvo (Sunphenon® 90MD), de Taiyo International, Inc. (Minneapolis, Minnesota). Contiene más de un 95% de polifenoles totales, más de un 75% de catequinas totales, más de un 45% de epigallocatequina galato (EGCG) y menos de un 6,0% de cafeína.

2. Métodos

2.1. Preparación de las muestras

Las soluciones de proteínas del lactosuero y de extracto de té verde se prepararon disolviendo las cantidades apropiadas de cada polvo en buffer fosfato (pH 6,0, 0,01M)

a temperatura ambiente. Se agitaron durante 30 minutos y de ser necesario, el pH se ajustó a 6,0 con HCl o NaOH. Los sistemas mixtos de polifenoles y proteínas se prepararon mezclando los volúmenes apropiados de cada solución para alcanzar las concentraciones finales deseadas (3% p/v de proteína y 1% p/v de polifenoles).

También se obtuvieron mezclas tratadas térmicamente a 90 °C durante 20 minutos. Luego todas las muestras fueron congeladas a -20 °C por 24 horas y posteriormente liofilizadas.

2.2. Actividad anticancerígena

2.2.1. Líneas celulares

Es bien conocido que las diferentes líneas celulares pueden tener distintas sensibilidades hacia un determinado compuesto citotóxico. Por esta razón, en este estudio se utilizaron líneas celulares procedentes de distintos orígenes histológicos:

U251 (Glioma, Sistema Nervioso Central -SNC-)

UACC-62 (Melanoma)

MCF-7 (Mama)

NCI.ADR/RES (Ovario resistente a múltiples drogas)

NCI-H460 (Pulmón, tipo no-células pequeñas)

PC-3 (Próstata)

OVCAR-3 (Ovario)

HT-29 (Cólon)

Todas las líneas celulares fueron gentilmente provistas por Frederick MA, National Cancer Institute (USA).

2.2.2. Cultivos celulares

Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB: Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) a 37 °C con 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos días hasta que las células alcanzaron la confluencia, punto en el cual fueron subcultivadas.

2.2.3. Ensayos anti-proliferativos

Las células adherentes de las líneas celulares se desprendieron de los frascos de cultivo mediante el agregado de una solución de tripsina 0,025% (Nutricell). Luego la tripsina se inactivó agregando 5 mL de SFB 5% en medio RPMI-1640. Las suspensiones de células individuales se recogieron suavemente con pipeta, se contó el número de células y se diluyeron para obtener densidades de siembra apropiadas. Se colocaron en microplacas de 96 pocillos (Nunc Brand Products) a razón de 100 µL por pocillo. Las densidades de siembra fueron de aproximadamente 10⁴ células/mL. Esta concentración inicial de células se determinó de cada curva de crecimiento individual y se constató que las células se encontraran en fase de crecimiento logarítmica durante todo el experimento.

Las microplacas con las células se pre-incubaron por 24 horas a 37 °C para permitir la estabilización antes de la adición de 100 µL de las sustancias a evaluar. Los polifenoles (extracto comercial Sunphenon® 90MD de Taiyo Internacional Inc.) y las proteínas del lactosuero (β-Ig y CMP) se utilizaron en un rango de concentraciones 0,25 - 250 µg/mL, mientras que en las mezclas la concentración de polifenoles se utilizó en un rango 0,0625 - 62,5 µg/mL. Como control positivo se utilizó doxorubicina (DOX) en el mismo rango de concentración. Todas las sustancias a evaluar se

disolvieron previamente en dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma) y luego se disolvieron en el medio con 50 µg de gentamicina/mL (Schering-Plough). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.2.4. Determinación de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó espectrofotométricamente utilizando sulfo-Rodamina B (SRB) como colorante de unión a las proteínas (*de Fatima, Kohn, Antônio, de Carvalho & Pilli, 2004*). La sulfo-Rodamina B es una aminoxantina de color rosa claro con dos grupos sulfónicos. Dado que es un colorante aniónico en soluciones de ácidos débiles, es capaz de unirse a grupos básicos de proteínas presentes en las células fijadas con ácido tricloroacético (TCA). Así, esta metodología no-clonogénica (las células están fijadas, no siguen proliferando) permite obtener una relación directa entre las proteínas y el cultivo celular.

Las células se fijaron con 50% de TCA (Sigma) a 4 °C (50 µL/pocillo, concentración final 10%) durante una hora. El sobrenadante se descartó y las microplacas se lavaron 5 veces con agua corriente. Las células se tiñeron por 30 minutos con 0,4% SRB en 1% de ácido acético (50 µL/pocillo) (Sigma) y luego se lavaron 4 veces con ácido acético 1% para remover todo el colorante no adherido. Las placas se secaron al aire y el colorante adherido a las proteínas celulares se re-solubilizó con 150 µL de buffer trizma (100 mM) (Sigma). La densidad óptica resultante se leyó a 540 nm en un lector de placas multiwell. Se utilizaron blancos con las drogas utilizadas y controles sin sustancias a evaluar.

Para aquellas células cultivadas en suspensión se utilizó el mismo método pero la concentración del TCA fue de 80% para poder fijar las células a la base de la placa.

3. Tratamiento estadístico

Para calcular los valores de ITC (concentración necesaria para lograr una inhibición total del crecimiento celular) se utilizó un análisis de regresión no-lineal mediante el programa ORIGIN 8.0® (OriginLab Corporation).

4. Referencias

de Fatima, Â., Kohn, L. K., Antônio, M. A., de Carvalho, J. E., & Pilli, R. A. (2004). Enantioselective syntheses of (R)- and (S)-argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(20), 5437-5442.

Resultados

El objetivo de este capítulo fue estudiar la actividad anticancerígena de polifenoles de té verde en distintas líneas celulares y evaluar el impacto de su interacción con proteínas del lactosuero.

5.1. Introducción

Las células que conforman los tejidos del cuerpo humano están constantemente expuestas a una mezcla de compuestos potencialmente tóxicos como también a moléculas que son consideradas favorables para la salud. El balance entre los daños causados por los compuestos tóxicos y los mecanismos de defensa es clave para la preservación de la salud y la prevención de enfermedades.

La quimio-prevención involucra el uso de agentes naturales o sintéticos para suprimir, bloquear o revertir los procesos de carcinogénesis. Mientras que los tratamientos farmacológicos agresivos suelen ser necesarios para aquellos pacientes con alto riesgo de cáncer, los productos naturales como los polifenoles de té verde pueden ser útiles para la población con riesgo normal. En los últimos años, se ha prestado mucha atención a los componentes de los alimentos con potenciales efectos inhibitorios del cáncer y a la identificación de nuevos suplementos dietarios quimio-preventivos.

Se ha informado que los polifenoles de té verde poseen propiedades benéficas para la salud como agentes anti-mutagénicos y anti-carcinogénicos ya que estudios con animales indicaron que el consumo de té verde podría tener efectos significativos en la reducción del número de tumores y en su crecimiento (*Yang, Landau, Huang & Newmark, 2001*). Los efectos anticancerígenos se observaron en diversos tejidos y órganos incluyendo boca, estómago, duodeno, colon, hígado, pulmón, mama y piel, entre otros. Además los tres niveles de progresión del cáncer, denominados iniciación, promoción y transformación, se vieron comprometidos.

Se han propuesto muchos mecanismos para explicar sus efectos anticancerígenos:

Primero, los polifenoles pueden actuar como agentes bloqueantes en la iniciación del tumor mediante la modulación del metabolismo de xenobióticos (*Scalbert, Manach, Morand & Rémésy, 2005*).

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos son aquellos procesos enzimáticos a los que se ven sometidos estos compuestos exógenos al organismo para lograr, en general, su neutralización y eliminación. Estas reacciones están divididas en dos etapas llamadas Fase 1 y Fase 2. La Fase 1 involucra oxidaciones, reducciones o hidrólisis que convierten los xenobióticos en metabolitos más polares, mientras que la Fase 2 implica la conjugación de los xenobióticos, o sus metabolitos, con moléculas endógenas polares. La Fase 1 en general activa los pro-carcinógenos a carcinógenos que son intermediarios electrofílicos, mientras que la Fase 2 es mayormente responsable de la detoxificación de estos productos. Como consecuencia, el balance entre las reacciones de bioactivación y detoxificación tiene un rol central en la susceptibilidad individual a los carcinógenos químicos.

Los polifenoles pueden inhibir la expresión de las enzimas citocromo P450 (Fase 1). Estas enzimas son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos, por lo que participan en la eliminación de gran número de fármacos y compuestos tóxicos. Sin embargo, debido a su baja especificidad son también responsables de la activación de toxinas o pro-carcinógenos hacia los respectivos agentes carcinógenos.

Por otro lado, los polifenoles pueden facilitar la eliminación de los agentes carcinógenos mediante la inducción de la síntesis de las enzimas de conjugación de la Fase 2 (*Chow et al., 2007*). Esta inducción de las enzimas de la Fase 2 puede tener su origen en la propia toxicidad de los polifenoles, los cuales pueden formar quinonas que son a su vez sustrato de estas enzimas. La presencia de polifenoles puede activar estas enzimas para su propia detoxificación y, de esta manera, inducir una respuesta general de las defensas contra los xenobióticos tóxicos.

También los polifenoles pueden reducir el número de células iniciadas mediante la estimulación de la reparación del ADN.

Segundo, los polifenoles pueden actuar como agentes supresores de la formación y crecimiento de tumores a partir de células iniciadas ya que inhiben la proliferación celular *in Vitro*. De hecho, se ha observado que algunos polifenoles pueden afectar los caminos de transducción de señales relacionados con la división celular mediante la inhibición de la proteína kinasa C y del factor de transcripción AP-1 (Khan & Mukhtar, 2008). De esta forma los polifenoles inhiben la expresión de oncogenes* y regulan la actividad de la ornitina decarboxilasa, enzima clave en la síntesis de poliaminas asociadas a la proliferación celular.

Los polifenoles también pueden inhibir la proliferación celular mediante sus efectos sobre el metabolismo del ácido araquidónico. Este ácido graso permite la formación de diferentes lípidos con distintas actividades biológicas, por lo tanto es un precursor de diversas moléculas. El metabolismo del ácido araquidónico es frecuentemente elevado en numerosos tumores y su inhibición suprime efectivamente el crecimiento celular (Hong & Yang, 2003).

Los polifenoles pueden inducir el arresto del ciclo celular y la apoptosis de células tumorales y, de esta manera, reducir el crecimiento y el tamaño de los tumores (Khan & Mukhtar, 2008). Esto se ha observado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

Finalmente, los polifenoles del té verde también pueden inhibir la angiogénesis y de esta manera limitar el crecimiento de los tumores o prevenir la invasión del tumor a través de la inhibición de las enzimas metaloproteinasas (Oku et al., 2003) y de factores de transcripción (Lamy, Gingras & Béliveau, 2002). La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes.

* Un oncogén es un gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén (estos últimos están asociados a la proliferación y el crecimiento). Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer.

La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también es un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral. Los tumores no pueden crecer más allá de un cierto tamaño, generalmente uno o dos milímetros, debido a carencia de oxígeno y de otros nutrientes esenciales. Por lo tanto la angiogénesis es un paso necesario y requerido para la transición de un grupo inofensivo pequeño de células, a un tumor de gran tamaño. La angiogénesis también es imprescindible para la diseminación de un cáncer, o metástasis. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor sólido determinado, entrar en un vaso sanguíneo, y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis.

Los polifenoles también inhiben al factor de transcripción NF-κB. El NF-κB es una proteína que controla la transcripción del ADN y está relacionado con la respuesta de la célula a diversas condiciones de estrés como radicales libres, luz UV y antígenos virales o bacterianos, entre otras. Sin embargo, una regulación incorrecta del NF-κB puede desencadenar el cáncer o enfermedades auto-inmunes. La inhibición del NF-κB mediante los polifenoles tendría un rol fundamental en la prevención del cáncer (*Khan & Mukhtar, 2008*).

Las propiedades anticancerígenas de los polifenoles podrían, entonces, ser explicadas mediante muchos mecanismos diferentes. Por lo tanto, explicar sus efectos protectores sólo mediante sus propiedades antioxidantes e inhibitorias del daño a biomoléculas como el ADN, sería ciertamente una simplificación.

Por otro lado, cabe destacar que luego de tomar un té, sólo un cierto porcentaje de polifenoles es absorbido y se considera biodisponible aquel que aparece en sangre y tejidos. La biodisponibilidad de polifenoles de alto PM como las teaflavinas (564-868 Da) es muy baja. También EGCg (458 Da) tiene una limitada biodisponibilidad, mientras que aquellas catequinas como EGC y EC (306 y 290 Da, respectivamente)

poseen biodisponibilidades mucho mayores. Por ejemplo, luego de ingerir el equivalente a dos tasas de té verde, se tarda entre una hora y media a dos horas en alcanzar el pico de concentración de catequinas en sangre. Los valores reportados son 0,26, 0,48 y 0,19 μM para EGCg, EGC y EC, respectivamente (Yang, Wang, Lu & Picinich, 2009), aunque los niveles de EGCg en el té son mucho mayores que los del resto de las catequinas. Cuando se administran dosis farmacológicas de EGCg más elevadas oralmente, el pico en plasma puede llegar hasta concentraciones de 5-7 μM . Una vez en el cuerpo, los polifenoles pueden ser metilados con S-adenosil-metionina, o bien formar conjugados con glucurónido o fosfatos, según la enzima que los catalice (Yang, Sang, Lambert & Lee, 2008). También se pueden formar metabolitos producto de la fisión de anillos aromáticos luego del catabolismo de los polifenoles por parte de la microflora intestinal. Todos estos metabolitos poseen actividades biológicas, pero las mismas son menores que las de EGCg en los ensayos de inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro*. Debido a esto es que se ha observado una mayor eficacia en el tratamiento de tumores relacionado al tracto oral-digestivo (Ju, Lu, Lambert & Yang, 2007), donde los polifenoles no metabolizados pueden actuar en altas concentraciones.

Como se vio en todos los capítulos anteriores, existe una fuerte interacción entre proteínas y polifenoles que puede impactar en las propiedades funcionales, antioxidantes y antimicrobianas. Debido a esto, es de interés evaluar si la interacción entre polifenoles y proteínas del lactosuero presenta un efecto sobre la actividad anticancerígena.

Para evaluar la eficacia quimio-preventiva de un determinado compuesto o sustancia, es importante estudiar la citotoxicidad y la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer antes de embarcarse en ensayos biológicos con animales o clínicos a gran escala.

5.2. Actividad antiproliferativa de la doxorubicina (DOX) sobre las líneas celulares

La Doxorubicina (nombre comercial Adriamicina) o hidroxildaunorrubicina es un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia del cáncer (**Figura 5.1**). Es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, con una relación estructural cercana a la daunomicina, siendo como ésta última un intercalante del ADN. La DOX se usa habitualmente en el tratamiento de gran variedad de formas de cáncer.

El mecanismo de acción de la doxorubicina es complejo y aún no está plenamente esclarecido, aunque se piensa que actúa mediante intercalación en el ADN (**Figura 5.2**) (*Fornari, Randolph, Yalowich, Ritke & Gewirtz, 1994*). Se sabe que al intercalarse, inhibe la biosíntesis de macromoléculas al estorbar el avance de la enzima topoisomerasa II, que desenrolla el ADN durante los procesos de transcripción y replicación (*Momparler, Karon, Siegel & Avila, 1976*). La doxorubicina bloquea a la topoisomerasa II evitando que se libere la doble hélice y deteniendo así el proceso de replicación.

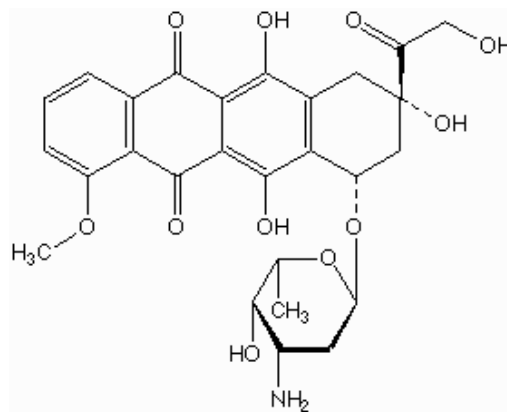


Figura 5.1. Estructura química de doxorubicina.

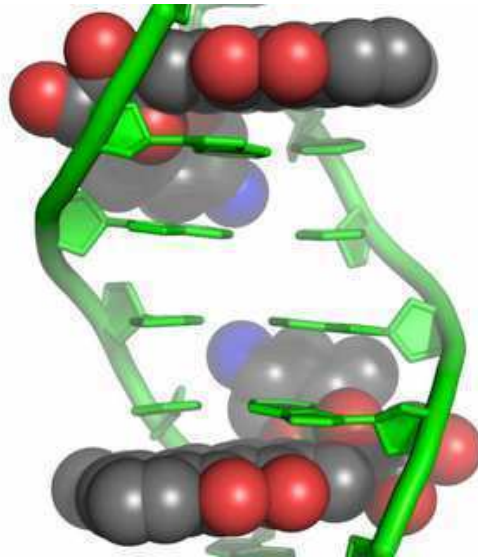


Figura 5.2. Mecanismo de acción de la doxorrubicina: actúa como agente intercalante entre las cadenas del ADN y evita así su replicación.

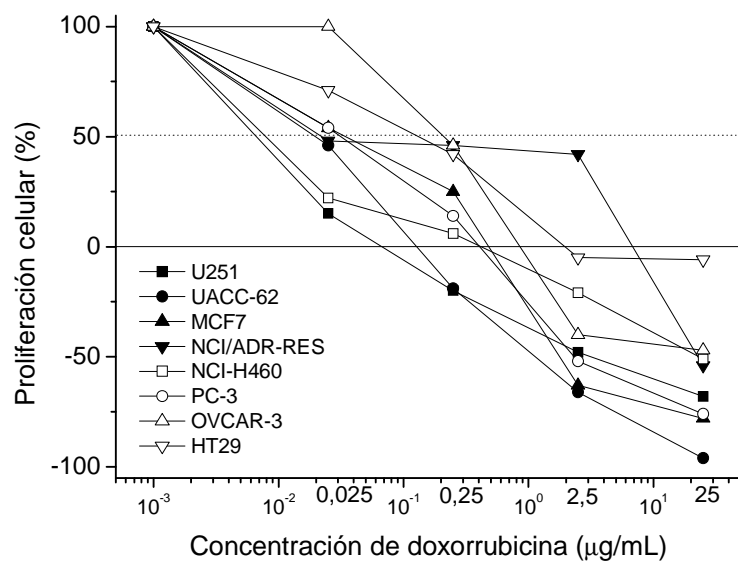


Figura 5.3. Actividad antiproliferativa del control positivo doxorrubicina sobre las distintas líneas celulares.

La **Figura 5.3** muestra el efecto antiproliferativo de la doxorrubicina sobre las células tumorales evaluadas. Puede observarse que la droga tiene una actividad dosis-dependiente, sin embargo no todas las líneas celulares respondieron de igual manera.

Las líneas celulares de colon y ovario resistente fueron las menos afectadas por la DOX.

La doxorubicina se usa habitualmente en el tratamiento de algunas leucemias y en el linfoma de Hodgkin, así como en el cáncer de vejiga, de mama, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, sarcoma de tejido blando, mieloma múltiple entre otros.

5.3. Actividad antiproliferativa de los polifenoles de té verde sobre las líneas celulares

Se sabe que los agentes quimio-terapéuticos normalmente utilizados en las terapias contra el cáncer son también citotóxicos para las células normales. Además muchos tipos de cáncer desarrollan resistencia a la quimioterapia, resultando en altos porcentajes de mortalidad. En este sentido, se ha considerado de importancia el desarrollo e investigación de drogas que provean una muerte celular específica de las células cancerosas.

La **Figura 5.4** muestra que los polifenoles de té verde produjeron inhibición del crecimiento y muerte celular con una buena correlación entre concentración y efecto en todas las líneas celulares evaluadas. Las líneas celulares más afectadas fueron las de glioma y las de ovario resistente. Para el resto de las líneas celulares se necesitó una concentración mínima de 50 µg/mL de polifenoles para lograr una inhibición total del crecimiento (**Tabla 5.1**).

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso importante en el desarrollo y en la homeostasis de los tejidos. Este fenómeno ocurre en células dañadas por ciertos niveles de agentes tóxicos y es un proceso crucial para la eliminación de células cancerosas. La muerte celular apoptótica se caracteriza por distintas características morfológicas como contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN nuclear, desprendimiento de la membrana en forma de burbujas y finalmente la ruptura celular en cuerpos apoptóticos. Por otro lado, cada vez hay más pruebas de

que la inducción de apoptosis con agentes quimio-preventivos o quimio-terapéuticos está asociada con perturbaciones de una fase específica del ciclo celular (Jo *et al.*, 2005; Srivastava & Singh, 2004).

De acuerdo a la bibliografía, los polifenoles de té verde ejercen sus efectos anticancerígenos mediante la inducción de apoptosis, inactivación de factores de transcripción, inhibición de la enzima uroquinasa, supresión de la actividad de las enzimas lipooxigenasa y oxigenasa y arresto del ciclo celular en G₁ (Kundu, Dey, Roy, Siddiqi & Bhattacharya, 2005). Los polifenoles también pueden incorporarse a las bicapas lipídicas de las membranas celulares y unirse a diversos receptores de moléculas que promueven los tumores, llevando de esta manera a un bloqueo de la transducción de señales que desencadena la división celular.

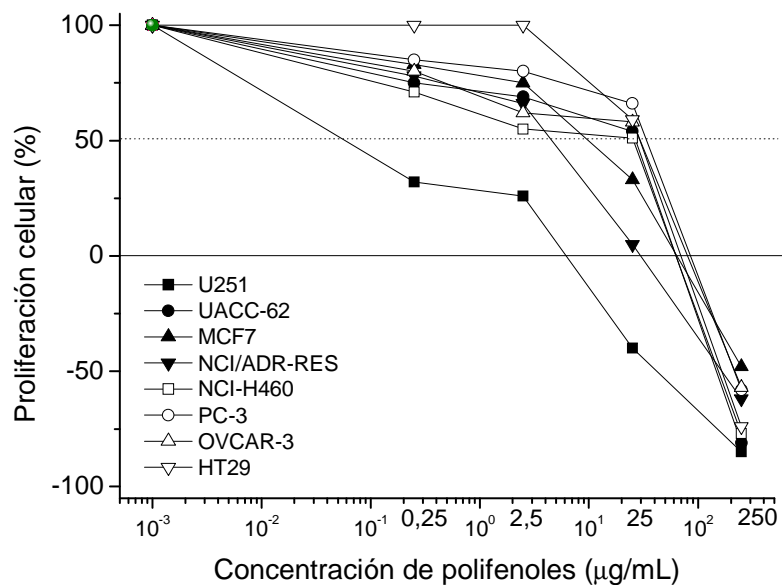


Figura 5.4. Actividad antiproliferativa de polifenoles de té verde sobre las distintas líneas celulares.

Huh *et al.* (2004) también observaron que la catequina mayoritaria del té verde (EGCg) suprime de manera significativa el crecimiento de células cancerosas de ovario incluyendo OVCAR-3. De hecho obtuvieron efectos inhibitorios del crecimiento en forma dosis-dependiente e informaron que EGCg induce arresto del ciclo celular y

apoptosis. Ellos sugieren que EGCg regula la expresión de numerosas proteínas relacionadas con el ciclo celular.

La línea celular de colon pareció ser una de las más resistentes al tratamiento con las dosis más bajas de polifenoles (**Figura 5.4**). *González de Mejía, Song, Heck y Ramírez-Mares (2010)* obtuvieron resultados similares utilizando la misma línea celular HT-29, sin embargo, la concentración mínima de polifenoles té verde necesaria para lograr una inhibición total del crecimiento obtenida por estos investigadores fue de $150,7 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$, mientras que en el presente trabajo la misma fue de $65,2 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 5.1**). Esta diferencia puede deberse al distinto contenido polifenólico presente en los extractos de té verde. Además *González de Mejía et al. (2010)* también observaron que con concentraciones de hasta $50 \mu\text{g/mL}$ no se ve afectado el crecimiento ni la viabilidad de células normales.

Se observó que la incorporación de EGCg por células HT-29 es concentración dependiente en un rango de 10 a $275 \mu\text{g/mL}$ (*Lambert et al., 2006*) y que luego de 36 horas de tratamiento se logra inhibir el crecimiento del 50% de las células con sólo $50 \mu\text{g/mL}$ de EGCg (*Chen et al., 2003*). Otros autores obtuvieron concentraciones similares para la inhibición de la proliferación celular de esta línea en particular (*Yang, Liao, Kim, Yurkow & Yang, 1998*) y se atribuyen las leves diferencias a limitaciones en la biodisponibilidad de la catequina. Además con las concentraciones más elevadas se observó condensación y fragmentación nuclear (*Chen et al., 2003*), en particular se vio condensación de la cromatina y agrandamiento del espacio citoplasmático lo cual es característico de las células apoptóticas (*González de Mejía et al., 2010*).

Vergote et al. (2002) mostraron que los polifenoles de té verde inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama (MCF-7) pero no de células epiteliales mamarias normales. La inhibición en este caso se debió a la inducción de apoptosis, sin cambios en la progresión del ciclo celular.

5.4. Actividad antiproliferativa de las proteínas del lactosuero sobre las líneas celulares

Las **Figuras 5.5** y **5.6** muestran el porcentaje de crecimiento celular en presencia de β -lactoglobulina y CMP solos (sin polifenoles). Puede observarse un leve decaimiento en la proliferación celular de algunas líneas, aunque sólo en el caso de las células de próstata se observó una inhibición del crecimiento mayor al 50% con 250 $\mu\text{g/mL}$ de β -lg.

Kennedy, Konok, Bounous, Baruchel y Lee (1995) observaron que el WPC puede anular el crecimiento de células tumorales, las cuales poseen una concentración de glutatión (GSH) mayor a las células normales, y volverlas más vulnerables a la quimioterapia. Estos autores también observaron que las proteínas lácteas en las mismas concentraciones en las que inducen la síntesis de GSH en células normales (ver introducción general), disminuían los niveles de este péptido en células de cáncer de mama inhibiendo su proliferación en ensayos *in Vitro*.

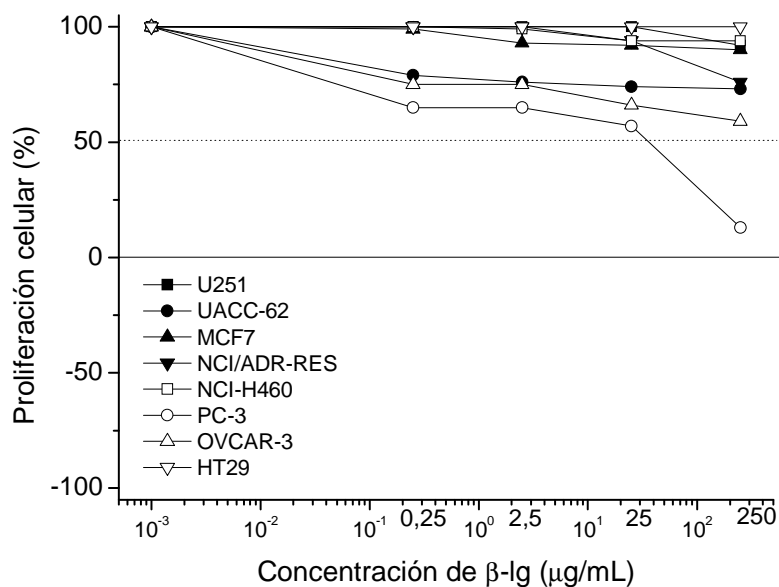


Figura 5.5. Actividad antiproliferativa de β -lactoglobulina sobre las distintas líneas celulares.

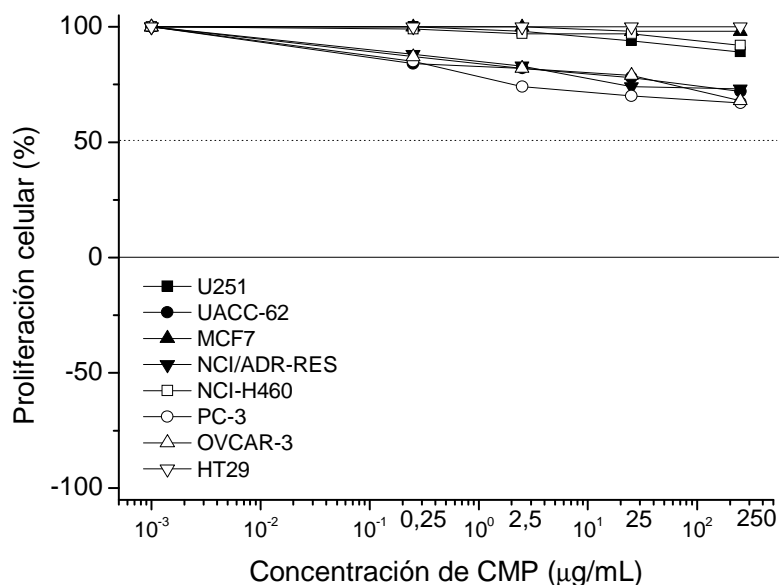


Figura 5.6. Actividad antiproliferativa de CMP sobre las distintas líneas celulares.

5.5. Actividad antiproliferativa de mezclas de polifenoles y proteínas del lactosuero sobre las líneas celulares

Las mezclas (1% p/v polifenol y proteína 3% p/v) se comparan con los polifenoles solos a igual cantidad de polifenol, debido a que los mismos representan el compuesto activo con mayor actividad anticancerígena. Las mezclas fueron más o menos efectivas que los polifenoles solos dependiendo de la línea celular en cuestión, ya que en algunos casos se observaron respuestas sinérgicas mientras que en otros no hubo cambios o bien fueron levemente antagónicas comparadas con los polifenoles solos (**Figuras 5.7 y 5.8**). Las mezclas polifenol-proteína con y sin calentamiento a 90 °C por 20 minutos no presentaron marcadas diferencias entre sí.

Para poder tener un parámetro concreto de comparación entre las distintas líneas celulares tratadas con los polifenoles solos o con las mezclas de polifenol-proteína, se define el ITC. Este índice representa la concentración de muestra a evaluar, necesaria para que ocurra inhibición total del crecimiento en cada línea celular. En la **Tabla 5.1**

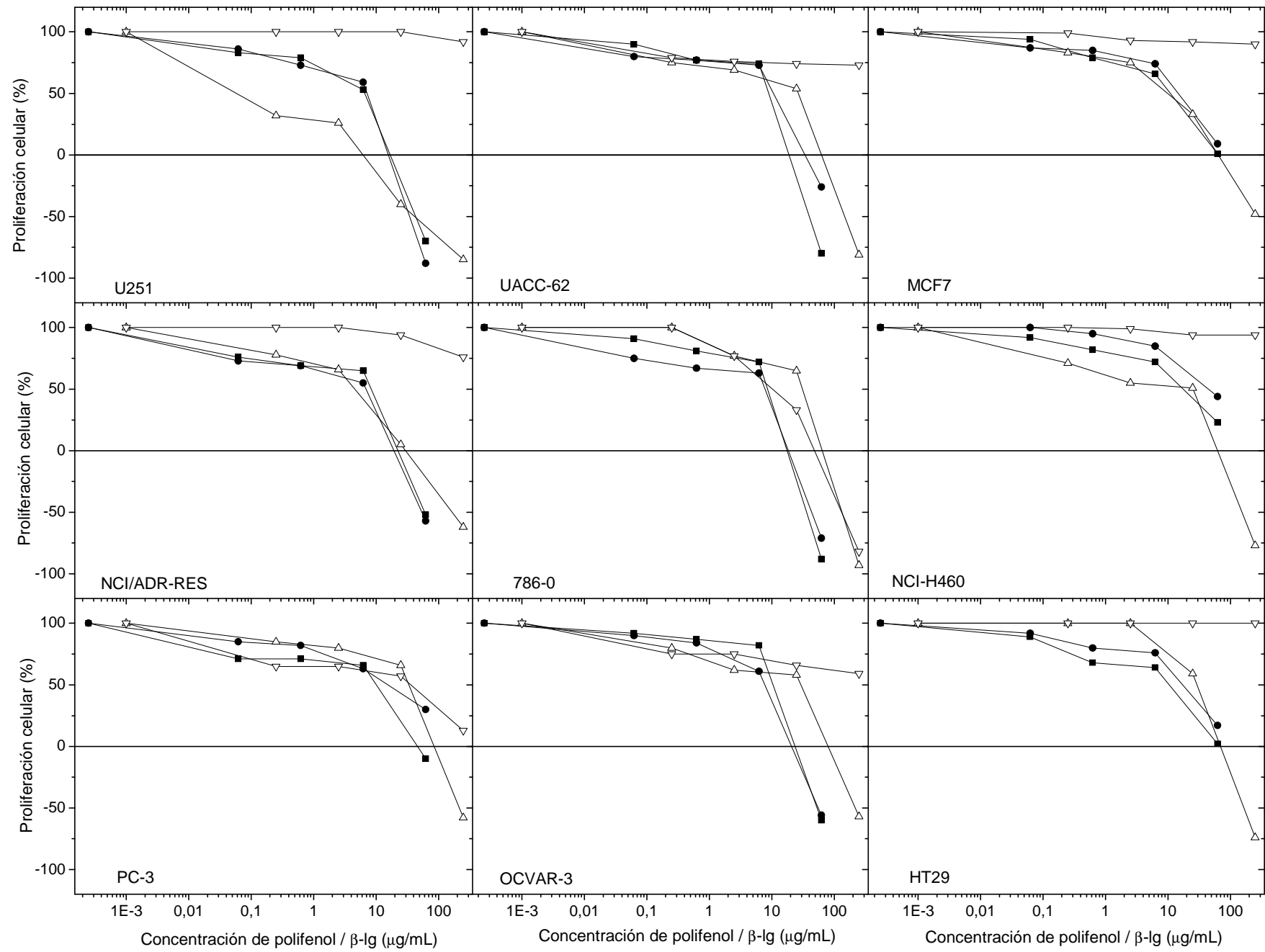


Figura 5.7. Actividad antiproliferativa de mezclas de polifenoles de té verde y β -Ig sobre las distintas líneas celulares.

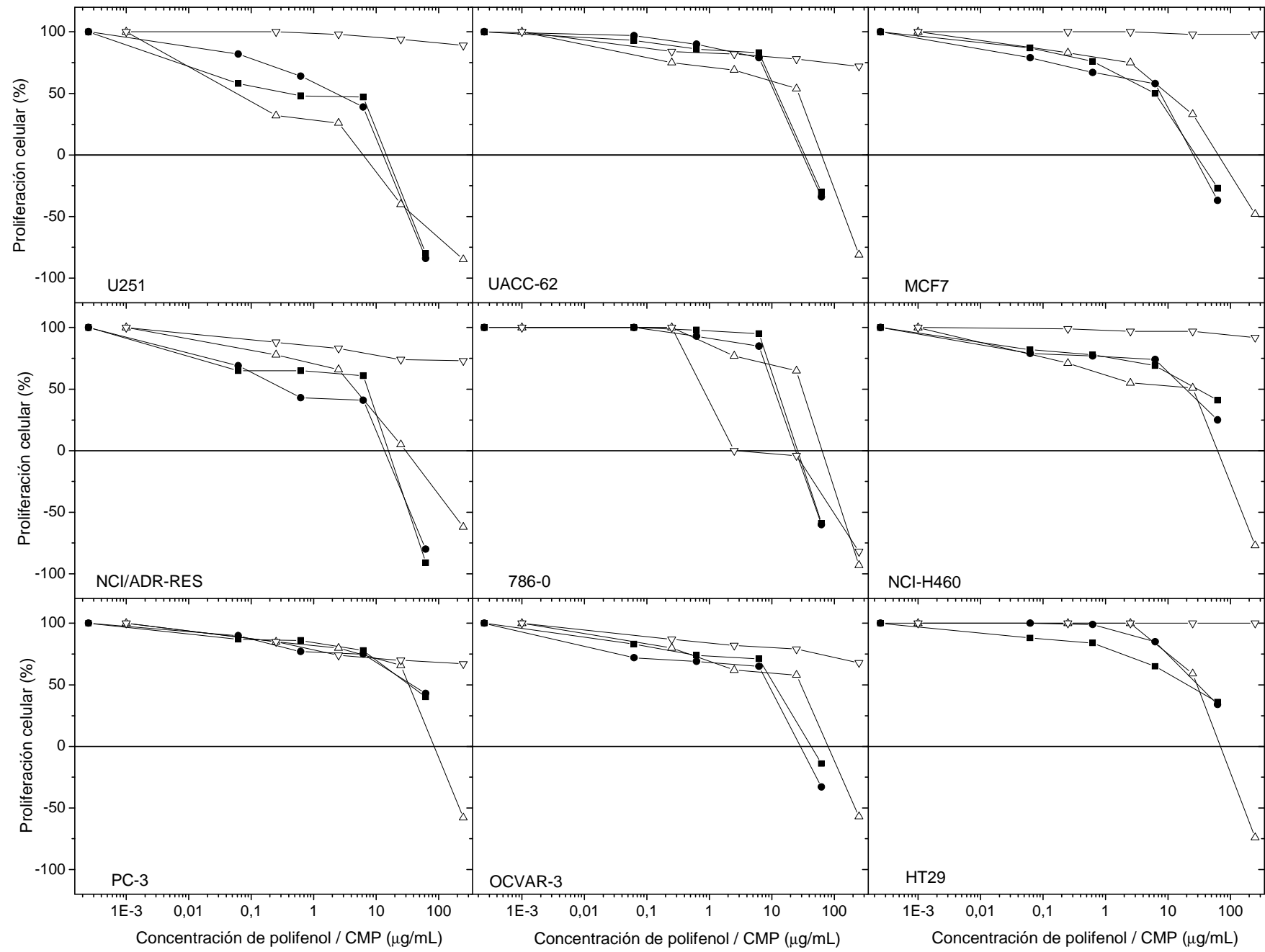


Figura 5.8. Actividad antiproliferativa de mezclas de polifenoles de té verde y CMP sobre las distintas líneas celulares.

Tabla 5.1. Actividad antiproliferativa de polifenoles, proteínas del lactosuero y sus mezclas sobre líneas celulares cancerosas^a.

| | ITC ^b (µg/mL) | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | U251 | UACC-62 | MCF-7 | NCI-ADR/RES | 786-0 | NCI-H460 | PC-3 | OVCAR-3 | HT-29 |
| Doxorrubicina | 0,12 ± 0,07 | 0,14 ± 0,02 | 0,37 ± 0,12 | 4,2 ± 4,1 | <0,025 | 0,45 ± 0,31 | 0,36 ± 0,07 | 1,2 ± 0,6 | 6,1 ± 4,3 |
| CPM | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| Beta | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| Polifenol | 3,4 ± 1,8 | 55,7 ± 21,9 | 58,8 ± 11,1 | 27,4 ± 4,8 | 53,0 ± 16,2 | 51,4 ± 28,8 | 85,6 ± 20,8 | 72,4 ± 32,3 | 65,2 ± 1,3 |
| CPM + polifenol | 10,7 ± 4,9 | 34,9 ± 3,9 | 24,7 ± 13,0 | 7,7 ± 7,1 | 27,4 ± 2,5 | >62,5 | >62,5 | 29,2 ± 18,2 | >62,5 |
| CPM + polifenol (90°) | 8,6 ± 9,2 | 38,3 ± 6,7 | 28,3 ± 6,9 | 13,3 ± 9,3 | 33,5 ± 1,2 | >62,5 | >62,5 | 47,0 ± 22,5 | >62,5 |
| Beta + polifenol | 13,6 ± 5,4 | 36,4 ± 14,4 | >62,5 | 17,7 ± 9,2 | 17,4 ± 8,8 | >62,5 | >62,5 | 20,7 ± 3,5 | >62,5 |
| Beta + polifenol (90°) | 15,6 ± 4,8 | 18,1 ± 6,1 | >62,5 | 22,1 ± 10,8 | 15,6 ± 4,9 | >62,5 | 60,4 ± 5,2 | 26,1 ± 4,1 | >62,5 |

U251 (glioma, SNC); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovario, fenotipo resistente a múltiples drogas); 786-0 (riñón); NCI-H460 (pulmón, tipo no-células pequeñas); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovario); HT-29 (colon).

^a evaluadas mediante el ensayo SRB

^b Inhibición total del crecimiento (ITC) – Los valores representan la concentración (µg/mL) necesaria para lograr una inhibición total del la proliferación de las células cancerosas. Los valores se determinaron mediante un análisis de regresión no-lineal utilizando el programa ORIGIN 8.0® (OriginLab Corporation). Rango de dosis utilizado: 0,25 – 250 µg/mL (compuestos puros); 0,0625 – 62,5 µg/mL (mezclas).

En gris se encuentran marcadas aquellas líneas celulares que presentaron respuestas sinérgicas con el tratamiento combinado de proteínas y polifenoles.

se encuentran resumidos los valores ITC para cada línea celular con cada tratamiento. Puede observarse por ejemplo que las líneas UACC-62, 786-0 y OVCAR-3 presentaron respuestas sinérgicas con los tratamientos que combinan polifenoles con proteínas del lactosuero. Otras, como MCF-7 y NCI-ADR/RES sólo mostraron sinergismo con el CMP, mientras que el resto o bien no presentaron diferencias marcadas como HT29, PC-3 o presentaron un leve efecto antagónico como U251.

En muchas partes del mundo el té es consumido con leche. Tanto el té como la leche son ricos en compuestos bioactivos y nutracéuticos. *Chandra Mohan, Gunasekaran, Varalakshmi, Hara y Nagini (2007)* observaron que el tratamiento con lactoferrina bovina no indujo ningún efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de boca. Sin embargo, cuando esta proteína se combinó con polifenoles de té verde obtuvieron efectos sinérgicos en una relación polifenol:proteína 1:2, indicando una concentración umbral de proteína por sobre la cual el efecto citotóxico disminuye. Adicionalmente, la disminución del efecto anticancerígeno por adición de lactoferrina fue mayor cuando la misma se combinó con extractos de té negro, lo que demuestra la diferente capacidad de unión de las proteínas con polifenoles de gran tamaño como los taninos del té negro.

5.6. Conclusiones

Los polifenoles de té verde presentaron un potencial como agentes antiproliferativos, en particular en algunas líneas celulares cancerosas como U251 (glioma) y NCI-ADR/RES (ovario resistente a múltiples drogas). Sin embargo, la interacción de los polifenoles con β -lg o CMP con los cuales forma complejos, tuvo un neto efecto antagónico sobre la línea U251. En cambio en muchas líneas celulares, incluyendo NCI-ADR/RES, la formación de complejos resultó en un menor valor de ITC, es decir tuvo un efecto sinérgico. Esta respuesta se diferencia de la obtenida al evaluar las capacidades antioxidantes o antimicrobianas de los polifenoles (**Capítulo 4**), las

cuales disminuyen muy significativamente debido al complejamiento de los polifenoles con β -lg o CMP.

Por otro lado, como se ha observado, los complejos de proteína-polifenol son estables en un amplio rango de pH y las proteínas del lactosuero actúan como moléculas “carrier” para estos compuestos bioactivos, protegiéndolos de la degradación durante la preparación de los alimentos (*Riihimäki et al., 2008; Shpigelman, Israeli & Livney, 2010*). Estos resultados resaltan el potencial uso de las proteínas del lactosuero para mediar la actividad anticancerígena de los polifenoles mediante la unión y la protección de los mismos en alimentos tales como diversos productos lácteos.

Como es el caso del presente trabajo, en la mayoría de los estudios de los polifenoles sobre líneas celulares se trabaja con concentraciones mucho más altas que las observadas en plasma luego de la ingesta de té. Por lo tanto, no se puede asegurar que los resultados sean totalmente extrapolables a la prevención y el tratamiento del cáncer en humanos, sobre todo debido a los numerosos factores de interferencia que existen en los estudios epidemiológicos (ej. consumo de tabaco y alcohol) (*Gao et al., 1994*).

Debido a los amplios efectos que poseen los polifenoles del té en la prevención del cáncer en distintos modelos animales, es muy probable que esto ocurra mediante múltiples mecanismos y no sólo se deba a un único receptor o molécula blanco. Incluso en sistemas experimentales sencillos se observa que numerosas moléculas blanco están involucradas en el proceso. Entre ellas se encuentran varias proteínas como receptores transmembrana, quinasas y otras enzimas, todas proteínas que interactúan primeramente con los polifenoles y de esta manera se bloquean señales clave y caminos metabólicos esenciales para el desarrollo de tumores, o bien inducen la apoptosis de células malignas o pre-malignas. Queda pendiente el desafío de demostrar que estos eventos moleculares específicos son los responsables de la prevención del cáncer en modelos animales y humanos. Un fenómeno interesante que observaron muchos autores es la mayor susceptibilidad de las células cancerosas a

los polifenoles del té mientras que las células normales no sufrían cambio alguno. Una posible explicación es el concepto de “adicción al oncogén” propuesto por *Weinstein & Joe (2008)*. De acuerdo a este concepto, el crecimiento rápido de las células cancerosas depende de la actividad aberrante o de la sobreexpresión de unos pocos oncogenes; si los polifenoles bloquean la actividad de uno o dos de estos oncogenes, el crecimiento celular estará severamente inhibido y ocurrirá la apoptosis. Por el contrario, el crecimiento y la supervivencia de las células normales dependen de la expresión de muchos grupos de genes y caminos metabólicos: cuando uno o dos de ellos son inhibidos por los polifenoles, esto no afectará significativamente la supervivencia de la célula.

La quimio-prevención con polifenoles parecería ser una estrategia promisoriosa debido a la alta inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación de células cancerosas.

5.7. Referencias

- Chandra Mohan, K. V. P., Gunasekaran, P., Varalakshmi, E., Hara, Y., & Nagini, S. (2007). *In vitro* evaluation of the anticancer effect of lactoferrin and tea polyphenol combination on oral carcinoma cells *Cell Biology International*, 31, 599-608.
- Chen, C., Shen, G. X., Hebbar, V., Hu, R., Owuor, E. D., & Kong, A. N. T. (2003). Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, 24, 1369-1378.
- Chow, H. H. S., Hakim, I. A., Vining, D. R., Crowell, J. A., Tome, M. E., Ranger-Moore, J., Cordova, C. A., Mikhael, D. M., Briehl, M. M., & Alberts, D. S. (2007). Modulation of Human Glutathione S-Transferases by Polyphenon E Intervention. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(8), 1662-1666.
- Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., & Gewirtz, D. A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45, 649 - 656.
- Gao, Y. T., McLaughlin, J. K., Blot, W. J., Ji, B. T., Dai, Q., & Fraumeni, J. F. (1994). Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(11), 855-858.
- González de Mejía, E., Song, Y. S., Heck, C. I., & Ramírez-Mares, M. V. (2010). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*, 2, 23-34.
- Hong, J., & Yang, C. S. (2003). Effects of tea polyphenols on arachidonic acid metabolism in human colon. In: F. Shahidi, *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention* (pp. 27-38). Washington, DC: ACS, American Chemical Society.
- Huh, S. W., Bae, S. M., Kim, Y.-W., Lee, J. M., Namkoong, S. E., Lee, I. P., Kim, S. H., Kim, C. K., & Ahn, W. S. (2004). Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology*, 94(3), 760-768.
- Jo, E. H., Kim, S. H., Ra, J. C., Kim, S. R., Cho, S. D., & Jung, J. W. (2005). Chemopreventive properties of the ethanol extract of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 230, 239-247.
- Ju, J., Lu, G., Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2007). Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 395-402.
- Kennedy, R. S., Konok, G. P., Bounous, G., Baruchel, S., & Lee, T. D. (1995). The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. *Anticancer Research*, 15, 2643-2649.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2008). Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Letters*, 269, 269-280.
- Kundu, T., Dey, S., Roy, M., Siddiqi, M., & Bhattacharya, R. K. (2005). Induction of apoptosis in human leukemia cells by black tea and its polyphenol theaflavin. *Cancer Letters*, 230, 111-121.

- Lambert, J. D., Lee, M. J., Diamond, L., Ju, J., Hong, J., Bose, M., Newmark, H. L., & Yang, C. S. (2006). Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug Metabolism and Disposition*, *34*, 8-11.
- Lamy, S., Gingras, D., & Béliveau, R. (2002). Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Research*, *62*, 381-385.
- Momparler, R. L., Karon, M., Siegel, S. E., & Avila, F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, *36*, 2891 - 2895.
- Oku, N., Matsukawa, M., Yamakawa, S., Asai, T., Yahara, S., Hashimoto, F., & Akizawa, T. (2003). Inhibitory effect of green tea polyphenols on membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *26*(9), 1235-1238.
- Riihimäki, L. H., Vainio, M. J., Heikura, J. M. S., Valkonen, K. H., Virtanen, V. T., & Vuorela, P. M. (2008). Binding of phenolic compounds and their derivatives to bovine and reindeer β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(17), 7721-7729.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., & Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*, 287-306.
- Shpigelman, A., Israeli, G., & Livney, Y. D. (2010). Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, *24*, 735-743.
- Srivastava, S. K., & Singh, S. V. (2004). Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzylisothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, *25*, 1701-1709.
- Vergote, D., Cren-Olivé, C., Chopin, V., Toillon, R.-A., Rolando, C., Hondermarck, H., & Le Bourhis, X. (2002). (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast Cancer Research and Treatment*, *76*, 195-201.
- Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogen addiction. *Cancer Research*, *68*, 3077-3080.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, *21*, 381-406.
- Yang, C. S., Sang, S., Lambert, J. D., & Lee, M. J. (2008). Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, *52*(S1), 139-151.
- Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, *9*(6), 429-439.

Yang, G. Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J., & Yang, C. S. (1998). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19, 611-616.

Conclusiones generales

Como se ha visto a lo largo del trabajo, tanto los polifenoles del té verde como las proteínas del lactosuero poseen propiedades biológicas y funcionales de interés. Sin embargo, estas propiedades se vieron afectadas en las mezclas:

Pudo comprobarse que los polifenoles de té verde poseen una fuerte afinidad por todas las proteínas del lactosuero estudiadas (β -lg, CMP y α -la-WPC) a todos los pH analizados, pero el tamaño de los complejos formados es máximo cercano al punto isoeléctrico de cada proteína. Además la insolubilidad de los mismos está mayormente determinada por su carga superficial.

La presencia de polifenoles aceleró el proceso de gelificación tanto de la β -lg como del CMP. En el caso de β -lg, el complejamiento de la misma con los polifenoles facilitó tanto su desnaturalización como su agregación. En el caso de CMP, el complejamiento con los polifenoles promovió la agregación del mismo. En los geles de β -lg el componente elástico aumenta muy significativamente con el incremento en la concentración de polifenoles, mientras que en el caso de CMP no se observan cambios significativos.

Cuando se utilizó un sistema más complejo como el WPC35, pudo observarse que la estabilidad coloidal de las mezclas con polifenoles dependió tanto del pH como de la concentración de estos últimos. A pH 4,5, la presencia de polifenoles tuvo un efecto más negativo sobre la estabilidad coloidal de las mezclas debido a la formación de grandes agregados que precipitan rápidamente. Adicionalmente el carácter viscoelástico de los geles de WPC disminuyó fuertemente con el agregado de los polifenoles. A pH 6,0, pudieron utilizarse concentraciones de polifenoles hasta 0,5% (p/v) sin producir precipitación del sistema y sin afectar negativamente la viscoelasticidad y la textura de los geles de WPC35.

Puede concluirse que los polifenoles de té verde son moduladores de las distribuciones de tamaño de los agregados de proteínas del lactosuero, lo que determina el comportamiento de gelificación durante el calentamiento.

El té verde en general, y en particular las variedades argentinas, mostraron fuertes actividades antioxidantes y antimicrobianas, las cuales dependieron de la composición específica de polifenoles de cada variedad. Estas capacidades antioxidantes y antimicrobianas de los polifenoles disminuyeron muy significativamente debido al complejamiento de los polifenoles con el WPC. Sin embargo, aún en presencia de WPC el té verde mostró una efectividad sobresaliente como antioxidante y antimicrobiano. La actividad antimicrobiana de todas las variedades de té estudiadas en presencia de WPC se observó principalmente frente a bacterias gram positivas, presentando resultados similares en un amplio rango de pH (4-7). Adicionalmente, el tratamiento previo con té verde no produjo efectos de protección cruzada con los tratamientos de estrés comúnmente utilizados en el procesamiento de alimentos. Por el contrario, en la mayoría de los casos la efectividad de estos tratamientos resultó potenciada. Estos resultados permiten concluir que el té verde puede ser potencialmente utilizado como antimicrobiano en productos lácteos, como es el caso del lactosuero.

Los polifenoles de té verde presentaron un gran potencial como agentes anticancerígenos. La interacción de los polifenoles con β -lg o CMP tuvo efectos sinérgicos o antagónico dependiendo de la línea celular evaluada. Por otro lado, los complejos de proteína-polifenol son estables en un amplio rango de pH y las proteínas del lactosuero actuarían como moléculas "carrier" para estos compuestos bioactivos, protegiéndolos de la degradación durante la preparación de los alimentos.

Finalmente, La elección adecuada de la concentración de polifenoles permitiría obtener los efectos biológicos para la salud presentes en este ingrediente funcional sin afectar negativamente las propiedades funcionales de sistemas lácteos como el WPC y sus proteínas.