

Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

**FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTILES EN
POLVO: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN,
EL PROCESAMIENTO Y EL
ALMACENAMIENTO SOBRE LAS
PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y
FUNCIONALES**

Tesis doctoral

Mariana Rodríguez Arzuaga

Directoras: María C. Añón y Analía G. Abraham

- 2022 -





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Fórmulas lácteas infantiles en polvo: efecto de la composición,
el procesamiento y el almacenamiento sobre las propiedades
tecnológicas y funcionales”***

Tesista: Ing. Mariana Rodríguez Arzuaga

**Directoras: Dra. María Cristina Añón
Dra. Analía Graciela Abraham**

Año: 2022

A Julia y Clara

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Cristina y Analía, por guiarme y enseñarme. Muchas gracias por su generosidad y paciencia y por las charlas compartidas.

A Lilia Ahmné, por la oportunidad y por abrirme las puertas del laboratorio y de su casa. Muchas gracias por la experiencia inolvidable y los conocimientos adquiridos durante mi estadía en Copenhague.

A Gustavo, por darme la oportunidad, la confianza y el apoyo para realizar este doctorado.

A Latitud y LATU, por los recursos y la financiación para llevar adelante mis estudios.

A Leopoldo Suescun del Laboratorio de Cristalografía, Química del Estado Sólido y Materiales de la Facultad de Química (Universidad de la República), por su colaboración con los ensayos de DRX.

A Alejandra Medrano y Jéssica Baez del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química (Universidad de la República), por su ayuda con los ensayos de digestibilidad.

A Marcela Díaz del Institut Pasteur de Montevideo, por su colaboración con los análisis por microscopía de barrido confocal láser.

A Alejandra Bosch del CINDEFI, por ayudarme y guiarme en el análisis e interpretación de resultados de FTIR.

A Agustina Cipollone del CIDCA y Fabiana Rey y Marvia Pérez de Latitud, por su ayuda con las electroforesis SDS-PAGE.

A Alicia Sánchez de Latitud, por su ayuda con el microscopio óptico.

A Epameinondas Xanthakis del RISE, Research Institutes of Sweden, por su colaboración con los ensayos de propiedades de flujo de polvos.

A los funcionarios y estudiantes de la Universidad de Copenhague, por guiarme, ayudarme y enseñarme, durante mi estancia allí. En especial a Sylvain Barjon por su ayuda en la planta piloto, a Kataneh Aalaei por su colaboración con la determinación de lisina disponible, a Denise Felix da Silva por su ayuda en todo momento.

A todos mis compañeros de Latitud, por el apoyo, los almuerzos y los momentos compartidos, en especial a Patricia por darme el impulso que necesitaba para iniciar este camino.

A Denise y Shyam, que con su amistad me hicieron disfrutar muchísimo los meses en Dinamarca, a pesar de la distancia y la oscuridad del invierno.

A mis padres, por impulsarme y ayudarme siempre. También a ellos, Ceci, Pablo, Emma, Arturo y Lumi por estar siempre disponibles para Julia, en mis ausencias.

A Pato, por apoyarme, escucharme y alentarme siempre y por bancar la distancia y a Julia y Clara, por alegrarme la vida.

A la Educación Pública.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido publicados parcialmente en:

Trabajos en revistas con referato:

- *“Impact of wet-mix total solids and heat treatment of physicochemical and techno-functional properties of infant milk formula powders”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, Denise Felix da Silva, Epameinondas Xanthakis, Kataneh Aalaei, Tomasz Pawel Czaja, María Cristina Añón, Analía G. Abraham, Lilia Ahrné. **Powder Technology** 390(2021) 473-481. doi: 10.1016/j.powtec.2021.05.093.
- *“Infant milk formulae processing: Effect of wet-mix total solids and heat treatment temperature on rheological, emulsifying and nutritional properties”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, Kataneh Aalaei, Denise Felix da Silva, Sylvain Barjon, María C. Añón, Analía G. Abraham, Lilia Ahrné. **Journal of Food Engineering** 290(2021) 110194. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110194.
- *“Heat induced conformational changes of whey proteins in model infant formulae: Effect of casein and inulin”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, Alejandra Bosch, María Cristina Añón, Analía Graciela Abraham. **International Dairy Journal** 105(2020) 104695. doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104695.
- *“Pérdida de solubilidad de sistemas modelo de aislado de proteínas de lactosuero, caseinato de calcio, lactosa e inulina por acción de la composición y el tratamiento térmico”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, María Cristina Añón, Analía Graciela Abraham. **INNOTEC** 19(2020) 23-36. doi: 10.12461/19.06.

Trabajos en congresos internacionales:

- *“Cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento de fórmulas infantiles en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, Analía G. Abraham, María C. Añón. Póster y video. 10º Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA). 27 de setiembre al 1º octubre de 2021. Montevideo, Uruguay. ISSN: 2301-0940, p. 60.
- *“Efecto del procesamiento wet-mix en las propiedades fisicoquímicas de fórmulas infantiles en polvo”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, María Cristina Añón, Analía G. Abraham, Lilia Ahrné. Presentación oral. 3er Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos (CHIAL). 18 al 20 de noviembre de 2020. Montevideo, Uruguay. ISBN: 978-9974-8562-1-9, p. 13.
- *“Heat induced conformational changes of whey proteins in model infant formulae: Effect of casein and inulin”*. Mariana Rodríguez Arzuaga, María C. Añón, Analía G. Abraham.

Póster. 11th NIZO Dairy Conference (**NIZO**). 8 al 11 de octubre de 2019. Papendal, Países Bajos.

- “*Procesamiento wet-mix y su impacto en las propiedades tecno-funcionales de fórmulas infantiles*”. Mariana Rodríguez Arzuaga. Conferencia. 9° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (**INNOVA**). 2 al 4 de octubre de 2019. Montevideo, Uruguay. ISSN: 2301-0940, p. 28.

- “*Pérdida de solubilidad de sistemas modelo de WPI, caseína, lactosa e inulina por acción de la composición y el tratamiento térmico*”. Mariana Rodríguez Arzuaga, María C. Añón, Analía G. Abraham. Póster. 9° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (**INNOVA**). 2 al 4 de octubre de 2019. Montevideo, Uruguay. ISSN: 2301-0940, p. 66.

- “*Impact of wet-mix processing conditions on rehydration properties of powdered milk infant formula*”. Mariana Rodríguez Arzuaga, Denise Felix da Silva, Kataneh Aalaei, María Cristina Añón, Analía G. Abraham, Lilia Ahrné. Póster. 13th International Congress on Engineering and Food (**ICEF13**). 23 al 26 de setiembre de 2019. Melbourne, Australia. Congress handbook (<https://www.aifst.asn.au/resources/Documents/AFEA/ICEF13%20program%20and%20book%20of%20abstracts.pdf>), p.738.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α-La	α -Lactoalbúmina
β-Lg	β -Lactoglobulina
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte
ΔH	Entalpía
η	Viscosidad
η_a	Viscosidad aparente
λ	Longitud de onda
σ_1	Esfuerzo principal de consolidación
σ_c	Resistencia mecánica a la compresión de lecho
τ	Esfuerzo de corte/Tiempo de desfase/Tensión umbral
τ_0	Esfuerzo de corte umbral
A	Área bajo la curva
a*	Parámetro instrumental de color (verde/rojo)
AGE	Producto final de glicación avanzada (<i>advanced glycation end products</i>)
AGL	Ácidos grasos libres
ANOVA	Análisis de varianza (<i>analysis of variance</i>)
ATR	Reflectancia total atenuada (<i>attenuated total reflectance</i>)
a_w	Actividad de agua
b*	Parámetro instrumental de color (azul/amarillo)
b.h.	Base húmeda
BS	<i>Backscattering</i>
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Contenido de cenizas
CAA	Código Alimentario Argentino
CAGR	Tasa de crecimiento anual compuesta (<i>compound annual growth rate</i>)
CL	Cadena larga
CLSM	Microscopía confocal de barrido láser (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
C_p	Calor específico
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
d	Diámetro hidrodinámico

D	Coeficiente de difusión
D[4,3]	Diámetro medio del volumen equivalente
DLS	Dispersión dinámica de la luz (<i>dynamic light scattering</i>)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (<i>differential scanning calorimetry</i>)
DTP	Distribución de tamaño de partícula
ffc	Índice de factor de flujo
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FOS	Fructo-oligosacáridos
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
G	Contenido de materia grasa
GH	Grado de hidrólisis
GLS	Grasa libre superficial
GMP	Glicomacropéptido
GOS	Galacto-oligosacáridos
GP	Grado de polimerización
H	Contenido de humedad
ht	Altura total
HMF	Hidroximetil furfural
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	Humedad relativa
I	Intensidad
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
Ig	Inmunoglobulina
IP	Índice de pardeamiento
K	Coeficiente de consistencia
k_B	Constante de Boltzmann
L	Contenido de lactosa
L*	Parámetro instrumental de color (negro/blanco)
LF-NMR	Resonancia magnética nuclear de bajo campo (<i>low field nuclear magnetic resonance</i>)

LPD	Leche descremada en polvo
m	Flujo másico
Mn	Poblaciones relativas
MPC	Concentrado de proteínas de la leche
n	Índice de comportamiento de flujo
N	Número total de partículas en la población
N total	Nitrógeno total
NE	No especificado
OLM	Oligosacáridos de la leche materna
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	o-ftaldialdehído
P	Contenido de proteína
PFT	<i>Powder Flow Tester</i>
PM	Peso molecular
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
Q	Energía
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (<i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i>)
s.f.	Sin fecha
SMUF	Simulado de ultrafiltrado de leche (<i>simulated milk ultrafiltrate</i>)
ST	Sólidos totales
STT	Sin tratar térmicamente
T	Temperatura
T_{2n}	Tiempo de relajación transversal
T_{cr}	Temperatura de cristalización
T_d	Temperatura de desnaturalización
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T_g	Temperatura de transición vítrea
TSI	Índice de estabilidad Turbiscan (<i>Turbiscan stability index</i>)
TT	Tratamiento térmico
WP	Proteínas del suero (<i>whey proteins</i>)

WPC Concentrado de proteínas del suero (*whey protein concentrate*)

WPI Aislado de proteínas del suero (*whey protein isolate*)

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	2
2. Definiciones y tipos de fórmulas infantiles	3
3. Mercado de fórmulas infantiles	5
3.1. Mercado mundial y regional	5
3.2. Producción mundial y regional	6
4. Composición de fórmulas infantiles	7
4.1. Proteínas.....	8
4.1.1 Proteínas del suero	9
4.1.2 Caseínas.....	11
4.1.3 Nitrógeno no proteico.....	12
4.2. Lípidos.....	12
4.3. Carbohidratos	13
4.4. Oligosacáridos.....	14
4.5. Micronutrientes	16
4.5.1. Minerales.....	16
4.5.2. Vitaminas	17
4.5.3. Otros micronutrientes.....	18
5. Producción de fórmulas infantiles	18
5.1. Producción de fórmulas infantiles líquidas	19
5.2. Producción de fórmulas infantiles en polvo	21
5.2.1. Proceso wet-mix.....	22
OBJETIVOS	39
1. Objetivo general	40
2. Objetivos específicos	40
CAPÍTULO 2	42
1. Introducción	43
2. Objetivo	44
3. Parte I: Ensayos preliminares	45
3.1. Materiales y métodos	45
3.1.1. Materiales.....	45
3.1.2. Preparación de los sistemas modelo.....	45
3.1.3. Tratamientos térmicos	46
3.1.4. Solubilidad proteica.....	46

3.1.5.	Cuantificación de proteína soluble	46
3.2.	Resultados	48
3.2.1.	Efecto de la composición de los sistemas modelo en la pérdida de solubilidad proteica	48
3.2.2.	Efecto del tratamiento térmico en la pérdida de solubilidad proteica de los sistemas modelo	49
3.3.	Conclusiones	52
4.	Parte II: Efecto de la caseína, lactosa e inulina en los cambios conformacionales de las proteínas del suero inducidos por calor.	53
4.1.	Materiales y métodos	53
4.1.1.	Materiales	53
4.1.2.	Preparación de los sistemas modelo	53
4.1.3.	Tratamientos térmicos	53
4.1.4.	Distribución de tamaño de partícula.....	53
4.1.5.	Perfil proteico por SDS-PAGE.....	55
4.1.6.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	56
4.1.7.	Temperatura y grado de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	60
4.1.8.	Solubilidad proteica.....	61
4.1.9.	Análisis estadístico	61
4.2.	Resultados y discusión	62
4.2.1.	Distribución de tamaño de partícula.....	62
4.2.2.	Perfil proteico por SDS-PAGE.....	67
4.2.3.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	71
4.2.4.	Temperatura y grado de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	78
4.2.5.	Solubilidad proteica.....	85
5.	Conclusiones	88
	CAPÍTULO 3	90
1.	Introducción.....	91
2.	Objetivo	92
3.	Materiales y métodos	92
3.1.	Materiales	92
3.2.	Producción de fórmulas modelo	93
3.2.1.	Diseño experimental	93
3.2.2.	Formulación modelo	93
3.2.3.	Producción de fórmulas modelo	93
3.3.	Estimación del consumo energético	95

3.4. Cuantificación de las proteínas del suero nativas	98
3.4.1. Obtención de las proteínas del suero solubles	99
3.4.2. Condiciones del HPLC.....	99
3.4.3. Cálculos y expresión de resultados	99
3.5. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones	100
3.6. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas	100
3.7. Características de las emulsiones post reconstitución	101
3.7.1. Microestructura	101
3.7.2. Composición proteica en la interfase aceite/agua	102
3.7.3. Estabilidad de la emulsión post reconstitución	104
3.8. Lisina disponible	105
3.8.1. Preparación de soluciones	106
3.8.2. Procedimiento analítico.....	106
3.8.3. Curva de calibración.....	106
3.8.4. Cálculo y expresión de resultados.....	107
3.9. Análisis estadístico	107
4. Resultados y discusión	108
4.1. Estimación del consumo energético	108
4.2. Análisis general del efecto de las etapas y parámetros del proceso sobre las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales	109
4.3. Desnaturalización de las proteínas del suero	110
4.4. Distribución de tamaño de partícula de las emulsiones	112
4.5. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas	116
4.6. Características de las emulsiones post reconstitución	122
4.6.1 Microestructura de las emulsiones post reconstitución.....	123
4.6.2 Composición proteica en la interfase aceite/agua	127
4.6.3 Estabilidad de la emulsión post reconstitución	129
4.7. Lisina disponible	135
5. Conclusiones	136
CAPÍTULO 4	138
1. Introducción.....	139
2. Objetivo.....	140
3. Materiales y métodos	141
3.1. Fórmulas infantiles modelo.....	141
3.2. Propiedades fisicoquímicas.....	141
3.2.1. Composición nutricional	141
3.2.2. Actividad de agua.....	142

3.2.3.	Grasa libre superficial	142
3.2.4.	Color.....	142
3.2.5.	Distribución de tamaño de partícula del polvo.....	143
3.2.6.	Microestructura	143
3.2.7.	Densidad de partícula	144
3.2.8.	Temperatura de transición vítrea.....	144
3.3.	Propiedades de rehidratación de las fórmulas infantiles en polvo	145
3.3.1.	Humectabilidad	145
3.3.2.	Dispersabilidad.....	146
3.3.3.	Índice de solubilidad	147
3.3.4.	Cinética de rehidratación por resonancia magnética nuclear de bajo campo (LF-NMR)	148
3.4.	Propiedades de flujo de las fórmulas infantiles en polvo y densidad aparente	148
3.5.	Análisis estadístico.....	149
4.	Resultados y discusión	149
4.1.	Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades fisicoquímicas de las fórmulas infantiles modelo en polvo.....	149
4.1.1.	Composición nutricional, contenido de grasa libre superficial y actividad de agua	149
4.1.2.	Distribución de tamaño de partícula.....	151
4.1.3.	Color.....	153
4.1.4.	Microestructura	154
4.1.5.	Densidad.....	157
4.1.6.	Temperatura de transición vítrea.....	158
4.2.	Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades de rehidratación de las fórmulas infantiles modelo en polvo.....	160
4.2.1.	Humectabilidad	160
4.2.2.	Dispersabilidad.....	161
4.2.3.	Índice de solubilidad	162
4.2.4.	Cinética de rehidratación por resonancia magnética nuclear de bajo campo (LF-NMR)	162
4.3.	Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades de flujo de las fórmulas infantiles modelo en polvo.....	164
5.	Conclusiones	167
	CAPÍTULO 5	168
1.	Introducción.....	169
2.	Objetivos	169
3.	Materiales y métodos	170
3.1.	Materiales	160

3.2.	Condiciones de almacenamiento	160
3.2.1.	Condiciones de almacenamiento	170
3.2.2.	Preparación de las muestras	170
3.3.	Propiedades fisicoquímicas	16072
3.3.1.	Actividad de agua.....	172
3.3.2.	Humedad	173
3.3.3.	Temperatura de transición vítrea y temperatura de cristalización	173
3.3.4.	Cristalinidad por difracción de rayos X	174
3.3.5.	Grasa libre superficial	177
3.3.6.	Microscopía confocal de barrido láser	178
3.3.7.	Color.....	179
3.3.8.	Evaluación visual de las características físicas macroscópicas	179
3.4.	Microestructura	160
3.5.	Solubilidad	160
3.6.	Digestibilidad	16081
3.6.1.	Digestión in vitro de las fórmulas reconstituidas	1811
3.6.2.	Grado de proteólisis	184
3.6.3.	Identificación de proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras.....	188
3.6.4.	Grado de lipólisis	189
3.7.	Análisis estadístico	16089
4.	Resultados y discusión	190
4.1.	Propiedades fisicoquímicas	190
4.1.1.	Actividad de agua y humedad	190
4.1.2.	Transición vítrea y cristalización	192
4.1.3.	Cristalinidad por difracción de rayos X	197
4.1.4.	Grasa libre superficial	201
4.1.5.	Color.....	206
4.1.6.	Características físicas macroscópicas.....	208
4.2.	Microestructura	211
4.3.	Solubilidad	216
4.4.	Digestibilidad	218
4.4.1.	Grado de proteólisis	218
4.4.2.	Identificación de proteínas por SDS-PAGE	219
4.4.3.	Grado de lipólisis	221
5.	Conclusiones	223
	CONCLUSIONES	224
	REFERENCIAS	228

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Composición de leche humana madura y de vaca.	3
Tabla 1.2. Límites regulatorios para fórmulas infantiles elaboradas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.	7
Tabla 1.3. Concentración de aminoácidos esenciales y semiesenciales de la leche materna.	8
Tabla 1.4. Composición de proteínas del suero en las leches bovina y materna.	9
Tabla 1.5. Composición de caseínas en las leches bovina y materna.	11
Tabla 1.6. Cuadro comparativo de los requisitos reglamentarios establecidos para sustancias minerales en fórmulas infantiles obtenidas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.	17
Tabla 1.7. Cuadro comparativo de los requisitos reglamentarios establecidos para vitaminas en fórmulas infantiles obtenidas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.	18
Tabla 1.8. Ventajas y desventajas de los métodos <i>dry-mix</i> y <i>wet-mix</i> de producción de fórmulas infantiles en polvo.	22
Tabla 1.9. Materias primas comúnmente utilizadas en fórmulas infantiles de proteínas de leche de vaca intactas.	24

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1. Composición de los sistemas modelo.	46
Tabla 2.2. Composición de la solución simulada de ultrafiltrado de leche (SMUF).	54
Tabla 2.3. Asignación de bandas en la región amida I según información bibliográfica.	59
Tabla 2.4. Temperaturas de desnaturalización (°C) obtenidas para los sistemas modelo sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.	79
Tabla 2.5. Entalpías de desnaturalización (ΔH) obtenidas para los sistemas modelo sin tratar térmicamente (STT).	81
Tabla 2.6. Composición de las suspensiones acuosas preparadas para evaluar el efecto de la lactosa.	83

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Composición porcentual (% p/p) de los macrocomponentes relevantes para la producción de las fórmulas en los ingredientes, según los certificados de análisis de lote.	93
Tabla 3.2. Diseño experimental.	93
Tabla 3.3. Cantidades de ingredientes utilizados (por lote de 15 kg) en las fórmulas modelo con distintos niveles de ST y nivel de ST real obtenido luego de la etapa de dispersión.	95

Tabla 3.4. Ecuaciones para obtener los calores específicos (C_p) de cada componente de las mezclas húmedas en función de la temperatura.	97
Tabla 3.5. Valores de calor específico (C_p) estimados para cada mezcla húmeda en cada etapa de la pasteurización.	97
Tabla 3.6. Volúmenes utilizados para la preparación de las muestras para SDS-PAGE.	102
Tabla 3.7. Consumo de energía estimado durante las operaciones de pasteurización y secado spray piloto.	109
Tabla 3.8. Resumen de resultados del análisis de varianza factorial de las variables: proteínas del suero nativas, parámetros reológicos (η_{300} , K y n), tamaño de gota de aceite ($D[4,3]$) y lisina disponible.	110
Tabla 3.9. Diámetro volumétrico medio global ($D[4,3]$; μm) de las fórmulas infantiles modelo luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización (en mezclas húmedas) y luego de la etapa de secado spray (en polvos reconstituidos).	113
Tabla 3.10. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas obtenidas luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización.	119
Tabla 3.11. Lisina disponible (% en materia seca) en las fórmulas infantiles modelo luego de las etapas de dispersión, pasteurización, homogeneización y secado spray.	135

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Composición nutricional, grasa libre superficial y actividad de agua (a_w) de las fórmulas infantiles modelo en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción.	150
Tabla 4.2. Cuadro comparativo de la composición nutricional de las fórmulas infantiles modelo obtenidas bajo distintas condiciones de producción y los requisitos establecidos en la Unión Europea.	150
Tabla 4.3. Parámetros de distribución de tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo en polvo.	152
Tabla 4.4. Parámetros instrumentales de color de las fórmulas infantiles modelo en polvo. ...	154
Tabla 4.5. Densidad de partícula y densidad aparente de las fórmulas infantiles modelo en polvo.	157
Tabla 4.6. Temperatura de transición vítrea (T_g) de las fórmulas infantiles modelo en polvo.	159

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Composición nutricional de las fórmulas infantiles utilizadas para el ensayo de almacenamiento.	170
Tabla 5.2. Volúmenes de soluciones utilizadas para la determinación de la curva de calibración de OPA.	186

Tabla 5.3. Volúmenes tomados para la preparación de muestra previo al análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras.	188
Tabla 5.4. Temperaturas de transición vítrea (T_g) inicial, media y final y diferencia de capacidad calorífica entre el inicio y el final de la transición vítrea (ΔC_p) de las fórmulas modelo, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 1 semana a 25 °C y 58 % HR y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético.	196
Tabla 5.5. Temperaturas de cristalización (T_{cr}) inicial y media y entalpía de cristalización (ΔH) de las fórmulas modelo, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 1 semana a 25 °C y 58 % HR y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético.	196

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Categorías de fórmulas disponibles comercialmente.	5
Figura 1.2. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles líquidas.	20
Figura 1.3. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles en polvo por el método de mezcla en seco.	21
Figura 1.4. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles en polvo por el método <i>wet-mix</i>	23
Figura 1.5. Imagen de un tanque de agitación alta cizalla.	25
Figura 1.6. Representación esquemática de un intercambiador de calor de placas (A) y un intercambiador de calor tubular (B).	26
Figura 1.7. Sistemas de inyección directa de vapor (A) e infusión de vapor (B).	27
Figura 1.8. Homogeneizador de dos etapas.	30
Figura 1.9. Evaporador de múltiples efectos.	32
Figura 1.10. Secador spray multi-etapa.	34
Figura 1.11. Temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua.	35
Figura 1.12. Esquema general de la reacción de Maillard.	36

OBJETIVOS

Figura O1.1. Esquema representativo del proceso de producción de fórmulas utilizado en la tesis y las etapas y características evaluadas en cada capítulo.	41
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Curvas de calibración para el método de Bradford obtenidas con soluciones patrón de BSA, WP, caseína y WP:Caseína relación 1,5:1.	48
Figura 2.2. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin tratar térmicamente.	49
Figura 2.3. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin caseína (A) y con caseína (B) sin tratar térmicamente (STT) y tratado térmicamente a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min. ...	50
Figura 2.4. Solubilidad proteica del sistema modelo CAS sin tratar térmicamente (STT) y tratado a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min.	52
Figura 2.5. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrómetro FT-IR.	57
Figura 2.6. Representación del accesorio de reflectancia total atenuada (ATR).	58
Figura 2.7. Representación esquemática de la determinación de la temperatura de desnaturalización (Td) y entalpía de desnaturalización (ΔH) por calorimetría diferencial de barrido (DSC).	60

Figura 2.8. Distribución de tamaño de partícula de los sistemas modelo WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL sin tratar térmicamente (TT) y tratados a 66, 70 o 75 °C durante 30 min.	62
Figura 2.9. Distribución de tamaño de partícula de los sistemas modelo WP-LAC, WP-CAS-LAC, WP-INUL-LAC y WP-CAS-INUL-LAC sin tratar térmicamente (TT) y tratados a 66, 70 o 75 °C durante 30 min.	63
Figura 2.10. Distribución de tamaño de partícula de un sistema puro de caseinato de calcio (CAS) sin tratar térmicamente (STT) y tratado a 66 y 75 °C por 30 min.	65
Figura 2.11. SDS-PAGE de los sistemas modelo sin lactosa, sin tratar térmicamente (STT) y tratados térmicamente a 66, 70 o 75 °C durante 30 min, en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B).	68
Figura 2.12. SDS-PAGE de los sistemas modelo con lactosa, sin tratar térmicamente (STT) y tratados térmicamente a 66, 70 o 75 °C durante 30 min, en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B).	69
Figura 2.13. Espectros ATR/FT-IR de los sistemas modelo WP, WP-CAS, WP-INUL, WP-CAS-INUL (A) y WP-LAC, WP-CAS-LAC, WP-INUL-LAC y WP-CAS-INUL-LAC (B) sin tratar térmicamente en la región espectral 1700 – 700 cm ⁻¹	72
Figura 2.14. Análisis de <i>clusters</i> obtenido con las derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo normalizados vectorialmente en el rango completo (4000 – 650 cm ⁻¹).	73
Figura 2.15. Derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo WP (a), WP-CAS (b), WP-INUL (c) y WP-CAS-INUL (d) sin tratar térmicamente, en la región amida I (1700-1600 cm ⁻¹).	74
Figura 2.16. Análisis de <i>clusters</i> obtenido con las derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo normalizados vectorialmente, en las regiones asociadas a agregación: hojas β agregada de alta energía (1700 – 1675 cm ⁻¹) y hojas β intermoleculares de baja energía (1631 – 1610 cm ⁻¹).	75
Figura 2.17. Derivada segunda de los espectros FT-IR en la región amida I (1700 – 1600 cm ⁻¹) de los sistemas modelo WP (A), WP-CAS (B), WP-INUL (C) y WP-CAS-INUL (D), sin tratar térmicamente (STT) y sometidos a tratamientos a 66 °C, 70 °C y 75 °C durante 30 min.	76
Figura 2.18. Termogramas obtenidos para el sistema WP (A) y para una suspensión de caseinato de calcio (B) sin tratar térmicamente.	79
Figura 2.19. Termogramas obtenidos para los sistemas modelo WP (A), WP-CAS (B), WP-INUL (C) y WP-CAS-INUL (D) sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 o 75 °C por 30 min.	80
Figura 2.20. Grado de desnaturalización de los sistemas WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL, calentados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.	82

Figura 2.21. Termogramas obtenidos para el sistema WP-LAC sin tratar térmicamente, liofilizado y resuspendido en agua al 50 % (p/v).	83
Figura 2.22. Termogramas de las suspensiones acuosas conteniendo 10,5 % de proteínas del suero y 7,1 % de caseínas y concentraciones crecientes de lactosa: 0,0 % (A), 5,0 % (B), 10,1 % (C), 20,0 % (D), 30,0 % (E) y 40,1 % (F).	84
Figura 2.23. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin lactosa (A) y con lactosa (B) sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.	85

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Esquema de producción de fórmulas infantiles modelo por el método <i>wet-mix</i>	94
Figura 3.2. Representación del balance de energía en el pasteurizador.	96
Figura 3.3. Representación del balance de masa en el secador spray.	97
Figura 3.4. Proceso de reconstitución de las fórmulas, separación de fases y extracción de proteínas adsorbidas en la interfase aceite/agua, para su identificación.	104
Figura 3.5. Curva de calibración obtenida para la determinación de lisina disponible por el método de unión con colorante.	107
Figura 3.6. Contenido de proteínas nativas del suero (WP) en las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s) luego de las etapas de pasteurización, homogeneización y secado spray, expresado como porcentaje de proteína nativa en la etapa de dispersión.	112
Figura 3.7. Distribución del tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), luego de las etapas de dispersión (PD), pasteurización (PP) y homogeneización (PH) y luego de la etapa de secado spray y reconstitución (PSR).	113
Figura 3.8. Representación esquemática de la posible estructura de agregados presentes en una emulsión con proteínas del suero tratadas térmicamente. El agregado se forma por interacción entre proteínas del suero desnaturalizadas no adsorbidas y proteínas del suero adsorbidas en la superficie de la gota.	115
Figura 3.9. Curvas de flujo de los distintos tipos fluidos.	117
Figura 3.10. Curvas de flujo de las mezclas húmedas de fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s) luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización.	118
Figura 3.11. Viscosidad aparente (η) de las mezclas húmedas post-homogeneización en función de la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$).	121
Figura 3.12. Distribución del tamaño de partícula de fórmulas infantiles modelo en polvo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).	123

Figura 3.13. Micrografías de las fórmulas infantiles modelo en polvo (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C, 60%-100°C) reconstituidas al 12,5 % (p/v) en agua o SDS 1%, obtenidas por microscopía óptica con magnificación 100×.	124
Figura 3.14. Micrografía de la fórmula infantil modelo en polvo 60%-75°C, reconstituidas al 12,5 % (p/v) en agua,1%, por microscopía óptica con magnificación 100×. La imagen de la derecha corresponde a una ampliación del recuadro indicado en la imagen de la izquierda.	126
Figura 3.15. Representación esquemática de un flóculo con estructura cerrada (A) y un flóculo con estructura abierta (B).	127
Figura 3.16. SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D). Las calles A, B, C, D corresponden a las fórmulas reconstituidas completas y las calles identificadas con una i corresponden a las proteínas adsorbidas en la interfase en la fórmula correspondiente.	127
Figura 3.17. Esquema de funcionamiento del Turbiscan.	130
Figura 3.18. Imagen de tubos de Turbiscan conteniendo muestra reconstituida.	130
Figura 3.19. Medidas de <i>backscattering</i> de las fórmulas reconstituidas en función del tiempo.	131
Figura 3.20. Índice de estabilidad de emulsión de las fórmulas infantiles modelo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), durante el almacenamiento a 20 °C.	132
Figura 3.21. Índice de estabilidad de emulsión de las fórmulas infantiles modelo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), durante el almacenamiento a 20 °C, en las zonas inferior (altura = 2-3 cm) y superior (altura = 10 – 12 cm) del tubo.	133

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Esquema representativo de las etapas de rehidratación.	140
Figura 4.2. Representación gráfica del espacio de color.	143
Figura 4.3. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido para ejemplificar la obtención de las temperaturas de transición vítrea.	144
Figura 4.4. Imágenes de la determinación de humectabilidad.	146
Figura 4.5. Mezcladora Funke Gerber para ensayo de índice de solubilidad.	147
Figura 4.6. Distribución de tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).	152
Figura 4.7. Relación entre la viscosidad aparente medida a 300 s ⁻¹ y 65 °C (η_{300}) de las mezclas húmedas en la alimentación del secador spray (post- homogeneización) y el tamaño de partícula de las fórmulas en polvo resultantes.	153

Figura 4.8. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (A: 50%-75°C, B: 50%-700°C, C: 60%-75°C, D: 60%-100°C) en dos niveles de magnificación: $\times 500$ y $\times 1500$	156
Figura 4.9. Imágenes de las muestras 50%-100°C (A) y 60%-100°C durante la determinación de densidad aparente.	158
Figura 4.10. Ejemplo de termograma obtenido para la determinación de la temperatura de transición vítrea de las fórmulas infantiles en polvo.	158
Figura 4.11. Humectabilidad de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C \times 18 s).	160
Figura 4.12. Dispersabilidad de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C \times 18 s).	162
Figura 4.13. Tiempos de relajación (ms) de las fracciones de agua ligada (T_{21} , A) y agua libre (T_{22} , B) determinados por LF-NMR durante la rehidratación de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C \times 18 s).	163
Figura 4.14. Funciones de flujo a diferentes esfuerzos principales de consolidación de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C \times 18 s).	165

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Muestra 50%-100°C fraccionada, previo a su almacenamiento.	172
Figura 5.2. Cámara de almacenamiento a 25 °C, conteniendo las bolsas con muestra para almacenamiento en condiciones herméticas y los desecadores para almacenamiento a 58 % HR.	172
Figura 5.3. Ejemplo de termograma indicando cómo se determinan las temperaturas de transición vítrea (T_g) inicial, media y final, así como la diferencia de capacidad calorífica asociada (ΔC_p) y las temperaturas de cristalización (T_{cr}) y el cambio de entalpía asociado (ΔH_{cr}).	174
Figura 5.4. Esquema de la difracción de rayos X incidentes sobre planos atómicos paralelos de un sólido cristalino.	175
Figura 5.5. Representación esquemática de los componentes de un difractómetro de rayos X de polvos.	175
Figura 5.6. Preparación de la muestra (A), compactación en el portamuestras (B) y ubicación en el equipo de Difracción de Rayos de X (C).	177
Figura 5.7. Condiciones de digestión estática <i>in vitro</i>	181

Figura 5.8. Reacción del reactivo OPA con los grupos aminos libres (aminoácidos terminales o grupo ϵ -amino de la lisina) en presencia de un agente reductor, para formar un isoindol detectable por UV.	185
Figura 5.9. Curva de calibración obtenida para la determinación de aminos libres por el método de OPA.	186
Figura 5.10. Actividad de agua (A) y contenido de humedad (B) de las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción, antes de su almacenamiento (barras con rayas verticales), durante su almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (barras lisas), y luego de 12 semanas de almacenamiento a 25 °C en envase hermético (barras con rayas en diagonal).	190
Figura 5.11. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para la fórmula modelo 50%-100°C al tiempo 0 (A), luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (B), luego de 14 días de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (C) y luego de 12 semanas en envase hermético a 25 °C (D).	193
Figura 5.12. Estructura de la lactosa.	197
Figura 5.13. Diagramas obtenidos por difracción de rayos X de las fórmulas modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0) y luego de 7, 14 y 28 días de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C.	198
Figura 5.14. Diagramas obtenidos por difracción de rayos X de las fórmulas modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D) antes del almacenamiento (tiempo 0) mezcladas con L-valina y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.	201
Figura 5.15. Grasa libre superficial de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).	202
Figura 5.16. Micrografías obtenidas por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de las fórmulas modelo en polvo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, antes de su almacenamiento (A), luego de 28 días a 25 °C y 58 % HR (B) y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético (C).	205
Figura 5.17. Índice de pardeamiento (IP) de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).	206
Figura 5.18. Fotografías de las fórmulas infantiles modelo durante su almacenamiento a 58 % HR y 25 °C.	208
Figura 5.19. Fotografías de las fórmulas infantiles modelo durante su almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.	209

Figura 5.20. Representación esquemática de la pegajosidad y <i>caking</i> en polvos con alto contenido de azúcar.	210
Figura 5.21. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, en dos niveles de magnificación, ×500 y ×2500, antes de su almacenamiento (tiempo 0) y luego de 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR.	212
Figura 5.22. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, en dos niveles de magnificación, ×500 y ×2500, antes de su almacenamiento (tiempo 0) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.	214
Figura 5.23. Solubilidad de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).	216
Figura 5.24. Grado de proteólisis (%) de las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 58 % HR y 25 °C y luego de 12 semanas en bolsa hermética a 25 °C, a los 60 min de digestión gástrica <i>in vitro</i> (gástrica) y luego de 60 min de digestión intestinal <i>in vitro</i> (gastrointestinal).	218
Figura 5.25. SDS-PAGE en condiciones reductoras de la fórmula infantil modelo 50%-75°C, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 25 °C y 58 % HR (alta HR) y luego de 12 semanas en bolsa hermética y 25 °C (hermético), en distintos puntos de la digestión. G0: antes de la digestión, G60: luego de 60 min de digestión gástrica <i>in vitro</i> , I60: luego de 60 min de digestión gástrica + 60 min de digestión intestinal <i>in vitro</i>	220
Figura 5.26. Ácidos grasos libres (g ácido oleico/100 mL fórmula reconstituida) en las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 58 % HR y 25 °C y luego de 12 semanas en bolsa hermética a 25 °C, antes de la digestión (inicial, G0) y luego de 60 min de digestión gástrica + 60 min digestión intestinal <i>in vitro</i> (digerido, I60).	222

CAPÍTULO 1:

**Formulación y producción de fórmulas
infantiles: estado del arte**

1. Introducción

La leche materna es el alimento ideal para el recién nacido y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida y continuar con la lactancia, complementada con otros alimentos nutritivos, hasta los 2 años o más (OMS, 2011).

La lactancia está asociada a importantes beneficios en la salud del niño y de la madre, incluyendo la reducción de la mortalidad infantil (Bahl et al., 2005; Brahm & Valdés, 2017; VanLandingham et al., 1991). También se ha demostrado que las cifras de enfermedades como diarrea, infecciones del tracto respiratorio y otitis media son más bajas en niños amamantados, y que, a su vez, la incidencia de estas enfermedades en lactantes menores de 6 meses con lactancia exclusiva es menor que en aquellos alimentados parcialmente con leche materna. La lactancia materna ha sido asociada también con beneficios en el desarrollo cognitivo y motor de los niños y algunos estudios sugieren una posible disminución de enfermedades crónicas tales como obesidad, alergias, asma, diabetes, infecciones urinarias o enfermedad celíaca. Entre los beneficios a la madre, se destacan el retraso en el retorno de la fertilidad, que reduce los peligros asociados con embarazos consecutivos en intervalos cortos de tiempo, y menor riesgo de sufrir cáncer de útero en la premenopausia y cáncer de ovario (Allen & Hector, 2005; León-Cava et al., 2002). Finalmente, amamantar también implica un beneficio económico tanto para la familia como para los sistemas de salud, debido al costo que implica la compra de fórmulas infantiles para sustituir la leche materna.

A pesar de que la leche humana es considerada el mejor alimento para satisfacer los requerimientos del recién nacido, hay algunas situaciones en las cuales las madres no desean o no pueden amamantar. De hecho, a nivel mundial, sólo el 40 % de los lactantes menores de 6 meses se alimentan exclusivamente con leche materna (OMS, 2011). Las causas por las cuales las madres no desean o no pueden amamantar parcial o exclusivamente a sus hijos son variadas e incluyen motivos económicos, socioculturales y de salud (Drapala, 2017). En esos casos es necesario sustituir o complementar a la leche materna con alimentos que satisfagan las necesidades nutricionales durante las primeras etapas de la vida. La leche de vaca no es adecuada para tal fin, debido a las importantes diferencias composicionales que presenta con la leche materna, que se resumen en la Tabla 1.1. Por lo tanto, es necesario diseñar alimentos específicos para suplir o complementar la leche materna, cuando ésta no está disponible o no es suficiente.

Tabla 1.1. Composición de leche humana madura y de vaca.

Componente	Leche humana	Leche bovina
Energía total (kcal/100 mL)	71	69
Proteína total (g/100 mL)	1,0	3,4
Grasa (g/100 mL)	3,8	3,7
Lactosa (g/100 mL)	7,0	4,8
Oligosacáridos (g/100 mL)	1,3	< 0,1
Cenizas (g/100 mL)	0,2	0,7
Sólidos totales (g/100 mL)	12,2	12,7

Fuente: Coppa et al. (2006); Fox et al. (2015); Thompkinson & Kharb (2007).

2. Definiciones y tipos de fórmulas infantiles

Los requerimientos nutricionales de los niños cambian a medida que éstos crecen y estos cambios se ven acompañados por modificaciones en la composición de la leche materna, que es un fluido complejo cuya composición varía a lo largo de la lactación, así como entre madres y entre poblaciones (Andreas et al., 2015; Ballard & Morrow, 2013). Por lo tanto, los productos formulados para sustituir la leche materna deben adecuarse también a la edad del niño. El Codex Alimentarius distingue dos categorías de productos: preparados para lactantes y preparados complementarios, que se definen a continuación.

- **Preparados para lactantes:** “sucedáneos de la leche materna fabricados especialmente para satisfacer por sí solos las necesidades de los lactantes durante los primeros meses de vida, hasta la introducción de una alimentación complementaria adecuada” (Codex Alimentarius, 2007).

- **Preparados complementarios:** “aquellos alimentos destinados a ser utilizados como parte líquida de una ración de destete para lactantes a partir del sexto mes y para los niños pequeños (de hasta tres años)” (Codex Alimentarius, 1987).

A pesar de que el Codex Alimentarius distingue dos categorías de fórmulas, a nivel comercial las complementarias suelen subdividirse en varios grupos: 6 a 12 meses (de continuación), 1 a 2 años (de crecimiento), más de 2 años.

Existen también distintos tipos de fórmulas, según su presentación:

- **Fórmulas en polvo:** deben reconstituirse antes de su consumo, son las más económicas y de mayor vida útil.

- **Fórmulas líquidas concentradas:** requiere una dilución con agua previo a su consumo.

- **Fórmulas líquidas listas para consumir:** son las más prácticas porque no requieren ningún tipo de preparación previa al consumo, pero también son las más caras.

Las fórmulas pueden elaborarse a partir de ingredientes de distintos orígenes:

Capítulo 1

- **Fórmulas a base de leche de vaca:** se obtienen a partir de ingredientes de leche de vaca y son la más comunes.
- **Fórmulas a base de leche de cabra:** se basan en que la leche de cabra es en algunos aspectos más similar a la leche materna que la leche de vaca (concentración y estructura de oligosacáridos y características de las caseínas), lo que permite una digestión gástrica más rápida y similar a la de la leche materna (Infante & Tormo, 2017). Las fórmulas de leche de cabra están expresamente autorizadas en la legislación europea (Comisión Europea, 2016).
- **Fórmulas a base de proteína de soja:** son leches libres de lactosa. Pueden ser consumidas por intolerantes a la lactosa, alérgicos a la proteína de leche de vaca o lactantes con padres vegetarianos que desean evitar proteínas de origen animal (Satriano et al., 2012).
- **Fórmulas a base de proteína de arroz:** suelen utilizarse proteínas hidrolizadas enzimáticamente y pueden indicarse a niños alérgicos a la proteína de leche de vaca y a la proteína de soja y a intolerantes a la lactosa. Estas fórmulas están suplementadas con los aminoácidos lisina, treonina y triptófano, por ser limitantes en las proteínas de arroz (Martín Martínez, 2018). Por otro lado, existen leches especiales formuladas para niños con requerimientos específicos, entre ellas se encuentran:
 - **Fórmulas sin lactosa:** aquellas en las que la lactosa ha sido sustituida por otro carbohidrato, generalmente maltodextrina. Se indican principalmente a niños con intolerancia a la lactosa (Satriano et al., 2012).
 - **Fórmulas con proteínas modificadas:** aquellas en las que las proteínas han sido parcial o altamente hidrolizadas con enzimas proteolíticas, con el fin de reducir la alergenicidad. La investigación y desarrollo en este tipo de fórmulas está ganando atención debido al aumento de casos de alérgicos a la proteína de leche de vaca en los países desarrollados (O'Callaghan et al., 2011).
 - **Fórmulas elementales:** están formuladas en base a mezclas de aminoácidos libres esenciales y no esenciales, con un perfil basado en la leche materna. Se indican a niños con alta sensibilidad, alergias múltiples y también pueden consumirse por intolerantes a la lactosa (Martín Martínez, 2018).
 - **Fórmulas antirregurgitación:** se indican a niños con reflujo gastroesofágico y suelen tener agentes espesantes como el almidón precocido (Sainz Jiménez & Salto Hurtado, 2016).
 - **Fórmulas para prematuros o recién nacidos con bajo peso:** son fórmulas específicas con mayor densidad calórica y proteica, con fósforo y vitaminas A y D (Satriano et al., 2012).

En la Figura 1.1 se resumen las principales categorías de fórmulas infantiles disponibles en el mercado.

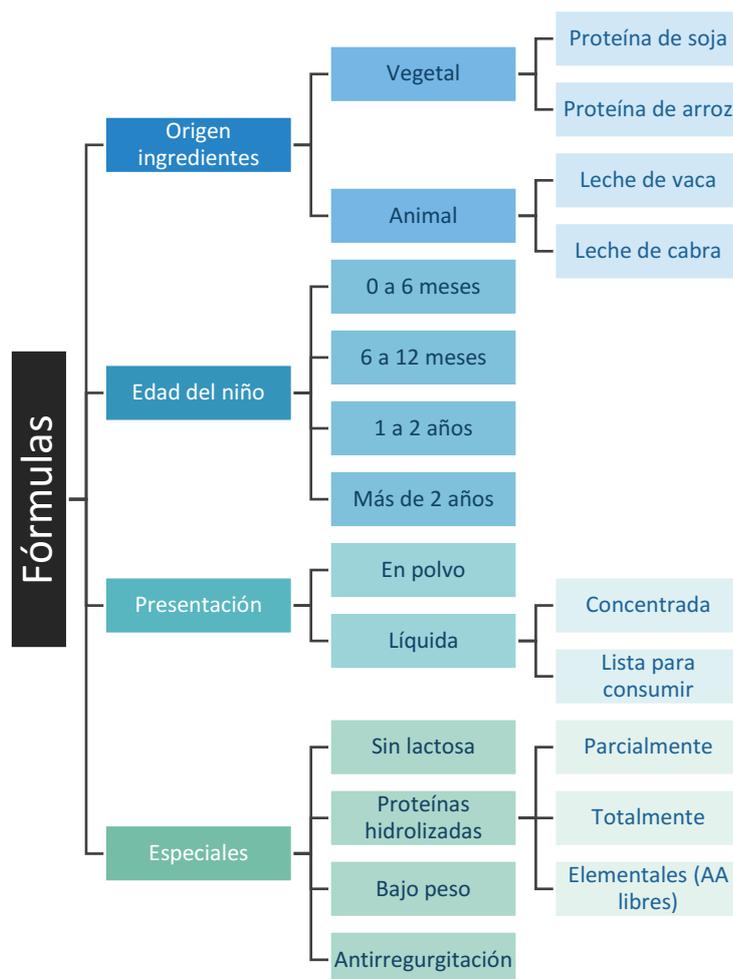


Figura 1.1. Categorías de fórmulas disponibles comercialmente.

AA: aminoácidos.

3. Mercado de fórmulas infantiles

3.1. Mercado mundial y regional

En medio de la crisis por la pandemia de COVID-19, el mercado global de alimentación infantil (fórmulas infantiles y alimentos para bebés) alcanzó US\$ 53.700 millones en 2020 y se estima que alcance US\$ 71.100 millones en 2027, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 4,1 % en el período 2020-2027. Para el mercado de fórmulas infantiles en particular se proyecta un crecimiento a una CAGR de 4,3 % alcanzando US\$ 53.600 millones al final del mencionado período (StrategyR, 2021).

El crecimiento del mercado se explica por varios factores, incluyendo el mayor número de madres que ingresan al mercado laboral, cambios en el estilo de vida y el aumento de la clase media en los países emergentes y en desarrollo. Por otra parte, la diversificación de productos (desarrollo de fórmulas vegetarianas, orgánicas o específicas para determinadas patologías) también contribuye al aumento del mercado de fórmulas infantiles (Allied Market Research, 2018).

En cuanto a la segmentación por país, China es el mayor mercado de alimentación infantil en el mundo, representando un 39 % de las ventas totales. A su vez, las fórmulas infantiles representan el 76 % del volumen de ventas del sector. Este alto consumo de fórmulas infantiles se debe a que China es uno de los países con menor tasa de lactancia materna en el mundo (aproximadamente 20 %, mientras que a nivel mundial asciende a 41 %) (Mollà García, 2019).

En Argentina, el porcentaje de niños alimentados exclusivamente a leche materna disminuye con la edad, ascendiendo a 58 % a los 2 meses, 51 % a los 4 meses y 42 % a los 6 meses (Ministerio de Salud de la Nación, 2018). Por su parte, las fórmulas infantiles expandieron sus ventas en los últimos años. Sin embargo, a partir de 2018 comenzó una tendencia decreciente en las ventas. En el año 2020 la contracción del mercado se agudizó aún más, observándose una reducción del volumen de ventas con respecto al año anterior, del 23,74 % en fórmulas de inicio (0 a 6 meses), 44,10 % en fórmulas de continuación (6 a 12 meses) y 22,10 % en fórmulas de crecimiento (más de 12 meses). Esta fuerte caída puede explicarse por la merma del poder adquisitivo de los salarios, así como por un aumento en la lactancia materna que puede haberse posibilitado por el mayor tiempo en casa debido a las cuarentenas y restricciones a la movilidad instauradas durante la epidemia por COVID-19 (Observatorio de Salud, Medicamentos y Sociedad, 2020).

De acuerdo con datos del 2019, en Uruguay el 69,9 % de los niños de 2 meses son alimentados exclusivamente en base a leche materna, mientras que el porcentaje desciende a 43,4 % para los niños de 4 meses (Carrero et al., 2020).

3.2. Producción mundial y regional

De acuerdo con datos de 2017, Europa es el principal productor de fórmulas infantiles (con un tercio del volumen global producido), seguido por China y el sudeste asiático, y los principales países productores en Europa son Francia, Países Bajos, Irlanda, Alemania, España y Polonia (Chen, 2018). Debido al conocimiento científico específico necesario para el desarrollo de fórmulas infantiles y el muy alto nivel de control de calidad y procedimientos de seguridad requeridos durante todo el proceso productivo, el mercado mundial de fórmulas está dominado por unas pocas empresas (Montagne et al., 2009). Las principales empresas productoras de fórmulas infantiles son: Nestlé, Danone S.A., Mead Johnson & Company LLC, Abbott, Friesland Campina, Bellamy's Organic, Kraft Heinz, HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG, Perrigo y Arla Foods, de las cuales las tres primeras acumulaban el 45 % del mercado global en 2019 (Chakravarty, 2019).

En Argentina, las fórmulas infantiles representaron el 6 % de la exportación de lácteos en el año 2018 (Friedlander, 2019). Entre las empresas productoras se encuentra La Sibila, que produce fórmulas infantiles de inicio, continuación, crecimiento y especiales, en su planta ubicada en Entre Ríos, y comercializa bajo marcas propias o para clientes como Roemmers, Mead Johnson, Danone, Vinamilk, tanto para mercado interno como para exportación a diversos países (Kroll,

2013; La Sibila, s.f.). Por su parte, Danone produce fórmulas en Argentina bajo la marca Nutrilon, a través de Nutricia Bagó, que se sumó al grupo Danone en el año 2007, en su planta Kasdorf ubicada en Provincia de Buenos Aires (Danone, s.f.). La marca de fórmula SanCor Bebé se elabora en la planta de Sunchales de la empresa SanCor aunque la marca y la fórmula pertenece a Mead Johnson Nutrition desde el año 2012 (Télam, 2012). Nestlé también elabora fórmulas infantiles en Argentina, bajo su marca NAN.

4. Composición de fórmulas infantiles

En adelante, el término fórmula infantil se empleará para hacer referencia a los preparados para lactantes, destinados a niños de 0 a 6 meses, obtenidos a partir de leche de vaca con proteínas intactas.

Como se mencionó anteriormente, las fórmulas infantiles se diseñan con el objetivo de imitar la composición de la leche materna para proveerle a los lactantes una nutrición adecuada. En la Tabla 1.2 se presentan los requisitos de composición que deben cumplir las fórmulas infantiles, de acuerdo con el Codex Alimentarius y las normativas europea, norteamericana y china, argentina y uruguay vigentes. Actualmente no hay una reglamentación MERCOSUR sobre fórmulas infantiles. En Argentina, por la Resolución 12/2018 conjunta de la Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y la Secretaría de Alimentos y Bioeconomía, se adoptaron los límites establecidos en el Codex Alimentarius, que se agregaron al Código Alimentario Argentino (2018). Como se puede apreciar, en la norma de Estados Unidos no se estipulan requisitos de aporte energético ni de carbohidratos y oligosacáridos totales. Por otro lado, las únicas diferencias entre el Codex y la norma europea, en cuanto al nivel de macronutrientes permitidos, son el límite máximo de proteínas y la concentración de oligosacáridos, que no está especificada en el Codex Alimentarius. Los límites para China son similares a los del Codex Alimentarius y los de Uruguay son similares a los de Estados Unidos.

Tabla 1.2. Límites regulatorios para fórmulas infantiles elaboradas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.

Componente	Codex ¹ / Argentina ²	Unión Europea ³	Estados Unidos ⁴	China ⁵	Uruguay ⁶
Energía (kcal/100 mL)	60 - 70	60 - 70	NE	60 - 70	65 - 75
Proteínas (g/100 kcal) ⁷	1,8 - 3,0	1,8 - 2,5	1,8 - 4,5	1,88 - 2,93	1,8 - 4,0
Lípidos (g/100 kcal)	4,4 - 6,0	4,4 - 6,0	3,3 - 6,0	4,39 - 5,86	3,3 - 6,0
Carbohidratos (g/100 kcal)	9,0 - 14,0	9,0 - 14,0	NE	9,2 - 13,8	NE
Oligosacáridos (g/100 mL)	≤ 0,8 ^{8,9}	≤ 0,8 ⁸	NE	NE	NE

¹Codex Alimentarius (2007). ²Código Alimentario Argentino (2018). ³Comisión Europea (2016). ⁴FDA (2016). ⁵SAC (2010). ⁶Reglamento Bromatológico Nacional (1994). ⁷Proteínas = Nitrógeno total × 6,25. ⁸Combinación de 90 % oligogalactosil lactosa y 10 % de oligofructosil sacarosa de elevado peso molecular. ⁹No está estipulado en el Codex Alimentarius (2007), sólo para Argentina (Código Alimentario Argentino, 2018). NE: No especificado.

4.1. Proteínas

La leche materna contiene más de 400 proteínas que ejercen funciones nutricionales, antimicrobianas e inmunomodulatorias, entre otras (Andreas et al., 2015).

Una de las principales diferencias composicionales entre la leche materna y la bovina es el contenido y composición proteica. La leche de vaca tiene un contenido de proteína total significativamente mayor al de la leche materna (Tabla 1.1), pero, además, la composición de la fracción proteica difiere entre ambas especies (Thompkinson & Kharb, 2007).

Las fórmulas infantiles deben proveer al niño todos los aminoácidos esenciales y semiesenciales, en, al menos, la concentración en la que se encuentran en la leche materna (Tabla 1.3). La leche de vaca presenta una concentración relativamente baja de los aminoácidos triptófano, tirosina y cisteína. Por lo tanto, para compensar estas diferencias, las fórmulas infantiles elaboradas a partir de leche bovina deben presentar una concentración de proteína mayor (1,2 – 2 g/100 mL) que la leche materna (1,0 g/100 mL) (O'Callaghan et al., 2011).

Tabla 1.3. Concentración de aminoácidos esenciales y semiesenciales de la leche materna.

Aminoácido	Concentración (mg/100 kcal)
Cisteína	38
Histidina	40
Isoleucina	90
Leucina	166
Lisina	113
Metionina	23
Fenilalanina	83
Treonina	77
Triptófano	32
Tirosina	76
Valina	88

Fuente: Comisión Europea (2016).

Además del contenido total de proteína, el perfil proteico de las leches bovina y materna presenta diferencias importantes. En la leche de vaca las caseínas representan un 80 % y las proteínas del suero (WP) un 20 % del total proteico, mientras que en la leche humana madura la relación caseína/WP es aproximadamente 40/60 (Thompkinson & Kharb, 2007). A su vez, las WP y caseínas presentes en la leche materna varían respecto a la leche de vaca, como se discutirá a continuación. Por este motivo, en la actualidad existen fórmulas infantiles en las que predominan las WP (60 %), en contraste a las FI tradicionales en las que la relación caseína/WP se mantenía en los niveles de la leche de vaca (80/20). Se ha visto que el consumo de fórmulas con un contenido predominante de WP acelera la digestión gastrointestinal, porque se produce una cuajada más suave que permanece por menos tiempo en el estómago (Thompkinson & Kharb, 2007). Las legislaciones revisadas anteriormente no establecen qué relación caseína/WP deben

contener las fórmulas infantiles, excepto por la normativa china, que estipula que al menos el 60 % de la proteína debe corresponder a WP (SAC, 2010).

4.1.1 Proteínas del suero

Las WP son las proteínas de la leche que se mantienen en solución al remover las caseínas por precipitación a pH= 4,6 (Fox et al., 2015). Son proteínas globulares en las que las cadenas hidrofóbicas se orientan al interior de la estructura tridimensional, y las cadenas polares se orientan hacia afuera (Nasirpour et al., 2006). Como se mencionó anteriormente, los perfiles proteicos de las leches humana y bovina presentan importantes diferencias. En la Tabla 1.4 se compara la composición de WP de ambas especies. Las fórmulas infantiles producidas a partir de leche bovina comparten su perfil de WP, en el que la β -Lactoglobulina (β -Lg) representa aproximadamente el 50 %, la α -Lactoalbúmina (α -La) el 20 % y la seroalbúmina bovina (BSA) el 5-10 % del total de WP (O'Mahony & Fox, 2013). A continuación, se describen en más detalle las principales proteínas del suero.

Tabla 1.4. Composición de proteínas del suero en las leches bovina y materna.

Proteína	Leche de vaca (g/L)	Leche humana (g/L)
β -Lg	2 – 4	—
α -La	1,2 – 1,3	1,9 – 3,4
BSA	0,1 – 0,4	0,5
Lactoferrina	0,02 – 0,5	1,5 – 2,0
Lisozima	Trazas	0,1 – 0,9
IgA	0,05 – 0,14	0,96

Datos adaptados de: Gurr (1981); Meng et al. (2021) y O'Regan et al. (2009).

β -Lg: β -Lactoglobulina; α -La: α -Lactoalbúmina; BSA: seroalbúmina bovina; IgA: inmunoglobulina A.

4.1.1.1 β -Lactoglobulina

Al pH normal de la leche, la β -Lg existe como un dímero de 36 kDa y cada uno de sus monómeros consiste en una secuencia de 162 residuos. Posee un alto valor nutricional, aunque su función biológica exacta aún se desconoce. La β -Lg, de alta concentración relativa en la leche bovina, no se encuentra en la leche materna y la proteína intacta puede ser alergénica (Fenelon et al., 2018; O'Mahony & Fox, 2013). Las fórmulas con proteínas de vaca hidrolizadas se indican a niños con alergia a la proteína de la leche de vaca, aunque la remoción de la β -Lg podría ser la base para la producción de fórmulas infantiles hipoalergénicas (Fenelon et al., 2018).

4.1.1.2 α -Lactoalbúmina

La α -La es una proteína pequeña, con una masa molecular de 14.070 Da en la leche humana y 14.178 Da en la leche de vaca. Se encuentra en una concentración de aproximadamente 1,2 g/L en la leche bovina, representando 20-25 % del total de WP, mientras que en la leche materna

representa aproximadamente el 41 % de las WP. Las proteínas de ambos orígenes tienen secuencias aminoacídicas muy similares (72 % de homología), por lo que la α -La de origen bovino constituye un muy buen sustituto a la de origen humano (Fenelon et al., 2018). La α -La presenta una proporción relativamente alta de triptófano y otros aminoácidos esenciales como lisina y cisteína. Estudios clínicos han demostrado que reducir la concentración total de proteínas en fórmulas infantiles, al tiempo que se incrementa la concentración de α -La, resulta en concentraciones de triptófano en plasma similares a las obtenidas en bebés amamantados (Davis et al., 2008).

4.1.1.3 Seroalbúmina bovina

La BSA es una proteína de gran tamaño (66 kDa) que contiene 582 residuos y es fuente de aminoácidos esenciales. Se encuentra presente tanto en la leche materna como en la leche bovina y se le desconocen funciones fisiológicas (Fenelon et al., 2018; O'Regan et al., 2009).

4.1.1.4 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Igs) representan el 10-15 % del total de WP tanto en la leche de vaca como en la leche materna. Las principales clases de Igs en ambas especies son: IgA, IgG e IgM. La IgA predomina en la leche materna y en el calostro, mientras que en la leche de vaca también está presente la IgA pero predomina la IgG. Estas proteínas dan protección inmunológica contra infecciones gastrointestinales y respiratorias, dado que tienen la capacidad de aglutinar bacterias, neutralizar toxinas, inactivar virus y favorecer el crecimiento de microorganismos benéficos (Fenelon et al., 2018).

4.1.1.5 Lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína de 78 kDa con capacidad de unir hierro. Es la segunda WP en abundancia en la leche materna, pero en la leche bovina se encuentra en una concentración mucho menor, que se sitúa inicialmente en 0,8 g/L y desciende a 0,1 g/L en la leche madura. Las proteínas de ambas especies presentan alta homología (77 %), lo que sugiere que suplementando a las fórmulas infantiles con lactoferrina bovina se obtendrían los efectos beneficiosos de la leche materna (Fenelon et al., 2018). Además de su capacidad de unir hierro, se han descrito varias funciones, como sus actividades antimicrobiana e inmunomodulatoria, y su efecto benéfico en la prevención de enfermedades, tales como cáncer y osteoporosis (Aly et al., 2013).

4.1.1.6 Glicomacropéptido

El glicomacropéptido (GMP) es una glicoproteína derivada de la caseína, que se libera al suero por acción de la enzima quimosina, durante la elaboración de queso. El GMP también se libera en el tracto gastrointestinal de humanos adultos debido a la hidrólisis por la enzima pepsina al ingerir leche. Estudios han demostrado que el GMP puede representar hasta el 28 % del material

nitrogenado presente en aislados y concentrados de WP. Por lo tanto, dependiendo de la fuente de WP utilizada en la producción de fórmulas infantiles, éstas podrían contener niveles de GMP de hasta el 15 % de la proteína total (Murphy, 2015).

4.1.1.7 Enzimas

El suero contiene varias enzimas que ejercen distintas funciones. Una de las principales enzimas del suero es la lactoperoxidasa, que en la leche materna puede prevenir infecciones en la boca y tracto gastrointestinal alto del recién nacido. Representa 0,25-0,50 % del total de WP y su concentración es más elevada en la leche bovina que en la humana (Fenelon et al., 2018).

Otra de las enzimas del suero es la lisozima, que es capaz de degradar la pared celular externa de las bacterias Gram positivas y actúa sinérgicamente con la lactoferrina y las Igs inhibiendo el crecimiento de bacterias (Fenelon et al., 2018).

4.1.2 Caseínas

La Tabla 1.5 presenta el perfil de las principales caseínas de las leches bovina y humana. Como se puede observar, la α_{s2} -caseína se encuentra en la leche de vaca, pero está ausente de la leche materna.

Tabla 1.5. Composición de caseínas en las leches bovina y materna.

Proteína	Leche de vaca (g/L)	Leche humana (g/L) ¹
β -caseína	8,6 – 9,3	1,25 (0,04 – 4,42)
κ -caseína	2,3 – 3,3	0,75 (0,1 – 1,72)
α_{s1} -caseína	8,0 – 10,7	0,33 (0,04 – 1,68)
α_{s2} -caseína	2,8 – 3,4	—

Fuente: Meng et al. (2021). ¹Promedio (Rango).

La caseína es una fracción proteica muy heterogénea. Las α_{s1} - y β -caseína no contienen cistina ni cisteína, mientras que α_{s2} - y κ -caseína contienen dos residuos de cisteína, que normalmente se encuentran como cistina (unidas por puentes disulfuro). En la leche, las caseínas se presentan en micelas, que son asociaciones coloidales de 30 a 600 nm y pesos moleculares en el orden de 10^8 Da en la leche de vaca (O'Regan et al., 2009). Por su parte, las micelas de caseína de la leche humana presentan menor tamaño (~42 nm) (Meng et al., 2021). A pesar de estas diferencias, las micelas de ambas especies tienen estructuras similares, en las que la β - y α_s -caseínas se posicionan en el centro a través de interacciones hidrofóbicas y de grupos fosforilados, mientras que la κ -caseína se ubica en la superficie, contribuyendo a la estabilidad micelar, impidiendo la precipitación por iones de Ca^{2+} (Meng et al., 2021; O'Mahony & Fox, 2013). A lo largo del tiempo, se han propuesto diferentes modelos con el fin de explicar la estructura micelar

(Bloomfield & Morr, 1973; Morr, 1967; Schmidt & Payens, 1976; Slattery, 1976; Walstra, 1999), sin embargo, aún no se ha logrado un consenso.

4.1.3 Nitrógeno no proteico

El 25 % del nitrógeno presente en la leche materna corresponde a nitrógeno no proteico contenido en urea, ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos y nucleótidos, mientras que en la leche de vaca representa sólo aproximadamente el 5 % (Andreas et al., 2015; Murphy, 2015).

La taurina, que a veces se considera un aminoácido no proteico, se encuentra en la leche materna en todas las etapas de lactación (3,4 – 8,0 mg/100 mL), pero está prácticamente ausente en la leche de vaca. A pesar de no existir evidencia de sus beneficios, y al no haberse reportado efectos adversos, es muchas veces incorporada a las fórmulas infantiles (Thompkinson & Kharb, 2007). De hecho, la reglamentación europea establece que puede añadirse en cantidades no mayores a 12 mg/100 kcal (Comisión Europea, 2016).

La colina está presente en distintas proporciones en la leche de varias especies. En la leche materna, el contenido se duplica durante la primera semana posterior al parto. El contenido de colina en la mayoría de las fórmulas infantiles es comparable al del calostro, pero inferior al de la leche humana madura (Thompkinson & Kharb, 2007). Es así, que la Comisión Europea (2016) establece que el contenido de colina en fórmulas infantiles debe estar entre 25 y 50 mg/100 kcal, mientras que el Codex Alimentarius (2007) establece un contenido mínimo de 7 mg/kcal.

4.2. Lípidos

Los lípidos son la mayor fuente de energía en la leche materna, aportando entre el 40 y el 55 % del total de energía de la leche. El 98 % de los lípidos secretados son triglicéridos y el 2 % restante corresponde a diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol. Estos componentes se encuentran empaquetados en glóbulos de grasa (al igual que en otros mamíferos como la vaca), con los fosfolípidos ubicados en la membrana, junto a proteínas específicas y colesterol, y los triglicéridos en el interior del glóbulo (Andreas et al., 2015). El tamaño de los glóbulos grasos de la leche materna madura varía entre 0,1 y 15 μm (Gallier et al., 2015). Por otro lado, en las fórmulas infantiles los lípidos están presentes en gotas de 0,1 a 1 μm , estabilizados por membranas de caseína, agregados de WP y, posiblemente, remanentes de membrana de glóbulo graso (Bourlieu et al., 2015).

Además de proveer energía, los lípidos aportan ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles (Thompkinson & Kharb, 2007). La grasa de la leche materna se caracteriza por su alto contenido de ácidos oleico y palmítico, mientras que el ácido linoleico, que es un ácido graso esencial, es el tercero en abundancia (Macías et al., 2006).

En las fórmulas infantiles normalmente se utilizan mezclas de aceites vegetales (soja, girasol, girasol de alto oleico, coco, palma, colza bajo en erúcico) de forma de obtener los niveles de

ácidos grasos requeridos legalmente y, en algunas ocasiones se utilizan bajas concentraciones de grasa láctea (Drapala, 2017; Murphy, 2015). El agregado de aceites de algodón y de sésamo está prohibida en Europa (Comisión Europea, 2016). El Codex Alimentarius, así como las normativas europea y china, coinciden en que el ácido erúxico no podrá exceder el 1 % y los ácidos grasos trans el 3 % del total de ácidos grasos (Codex Alimentarius, 2007; Comisión Europea, 2016; SAC, 2010). La presencia de ácidos grasos trans se autoriza con el objeto de permitir la utilización de grasa láctea como ingrediente. Las concentraciones de los ácidos grasos esenciales, linoleico y α -linolénico, se encuentra regulada, debido a su rol en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA-CL). Aun así, las fórmulas infantiles suelen fortificarse con PUFA-CL debido a sus efectos beneficiosos sobre el desarrollo visual y cognitivo (Murphy, 2015).

La leche materna y las fórmulas infantiles suelen diferir en la distribución posicional de los ácidos grasos, especialmente del ácido palmítico, que representa aproximadamente el 20 % del total de ácidos grasos de fórmulas infantiles. En los aceites vegetales, el ácido palmítico suele localizarse en las posiciones Sn1 y Sn3 del triacilglicerol, mientras que en la leche humana se ubica principalmente en la posición Sn2. Debido a los sitios de escisión enzimática preferenciales en humanos, la ubicación en las posiciones Sn1 y Sn3 puede generar la liberación de ácido palmítico libre, induciendo la formación de jabones de calcio en el lumen intestinal, que a su vez podría generar diferencias en las consistencias de las heces de bebés alimentados a leche materna y a fórmulas infantiles, potencialmente reduciendo la biodisponibilidad de calcio en estos últimos. Para intentar disminuir este posible efecto, se pueden agregar a las fórmulas infantiles aceites vegetales enriquecidos con ácido palmítico en posición Sn2, a través de transesterificación industrial (O'Callaghan et al., 2011).

4.3. Carbohidratos

La lactosa es el azúcar más abundante en la leche materna y su concentración ($6,2 \pm 0,9$ %) permanece constante durante las distintas etapas de lactación (Meng et al., 2021). La lactosa, junto a la grasa, provee la energía necesaria para el normal crecimiento y desarrollo del bebé y, además, favorece la implantación de una flora acidófila, participa en la regulación de la presión osmótica durante la producción de leche y aumenta la absorción del calcio (Macías et al., 2006; Meng et al., 2021). La lactosa también es el azúcar predominante en la leche bovina, aunque se presenta en una concentración total menor que en la leche humana (Tabla 1.1). La Comisión Europea (2016) establece que de los 9 a 14 g de carbohidratos por cada 100 kcal, como mínimo 4,5 g deben corresponder a lactosa. Por su parte, la norma china indica que como mínimo 90 % de los carbohidratos totales deben ser lactosa (SAC, 2010). Considerando las diferencias de concentración de lactosa en las leches bovina y humana, al producir fórmulas infantiles a partir de leche de vaca es necesario adicionar lactosa, para obtener el contenido adecuado.

Además de la lactosa, en la Unión Europea se autoriza la incorporación a fórmulas infantiles obtenidas a partir de proteínas de leche de vaca intactas, de maltosa, jarabe de glucosa o jarabe de glucosa deshidratado (si su equivalente de dextrosa no excede 32 y si el contenido de glucosa derivada de los jarabes es menor a 0,84 g/100 kcal), maltodextrina, y almidones pretostados o gelatinizados (cuya concentración no excederá 2 g/100 mL y no representará más del 30 % del total de carbohidratos) (Comisión Europea, 2016).

4.4. Oligosacáridos

Los oligosacáridos de la leche materna (OLM) también representan una fracción significativa de los carbohidratos y son el tercer componente mayoritario de la leche, tras la lactosa y la grasa (Andreas et al., 2015; Macías et al., 2006). Se han identificado aproximadamente 200 OLM, cuya concentración total puede alcanzar los 15 g/L. Su estructura es muy compleja y variable, pero están compuestos de cinco monosacáridos: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico, y presentan un residuo de lactosa en el extremo reductor (Bode, 2015; Han et al., 2012). Sólo aproximadamente el 1 % de los OLM ingeridos son absorbidos, la gran mayoría son metabolizados por los microorganismos presentes en el intestino del niño o excretados en las heces. Los OLM cumplen diversas funciones, incluyendo una acción prebiótica, ya que sirven como sustratos metabólicos para bacterias específicas que ejercen un beneficio para la salud, protegiendo al mismo tiempo contra la colonización de bacterias patógenas (Andreas et al., 2015; Bode, 2015). Además, actúan como antiadhesivos bloqueando la unión de virus, bacterias o parásitos patógenos a las células epiteliales, por tener una estructura similar a la de los glicanos. También se ha visto que alteran la respuesta inmune de las células epiteliales (Bode, 2015; Kulinich & Liu, 2016).

Hasta el momento, dada la complejidad de su estructura, ha sido imposible producir estructuras idénticas a los OLM para su inclusión en fórmulas infantiles. Además, dado que su concentración en la leche de vaca (Tabla 1.1) y en la de otros animales es muy inferior a la de la leche humana, su aislamiento requiere de un muy alto esfuerzo tecnológico, por lo que estas sustancias no se utilizan en las fórmulas infantiles comerciales (Boehm, 2013). Por este motivo, se han realizado esfuerzos por identificar sustancias que provengan de otros orígenes y que al menos ejerzan un efecto prebiótico.

El término prebiótico se define como “un sustrato que es selectivamente utilizado por los microorganismos del huésped, confiriendo un beneficio para la salud”, de acuerdo con el consenso científico alcanzado en 2017 (Gibson et al., 2017).

Actualmente, existe evidencia de efecto prebiótico en humanos en la inulina y fruto-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (GOS) y la lactulosa, además de los OLM (Corzo et al., 2015).

Capítulo 1

Los oligosacáridos más estudiados en humanos son GOS y FOS/inulina y existe un consenso en que ambos ejercen un efecto prebiótico en todas las etapas de la vida (Boehm, 2013). De hecho, en la Unión Europea se autoriza explícitamente la adición de FOS y GOS a fórmulas infantiles, en una relación 90/10 de GOS/FOS y en una concentración total no superior a 0,8 g/100 mL, aunque se aclara que podrán utilizarse diferentes combinaciones y niveles máximos de oligosacáridos siempre que su idoneidad para lactantes haya sido demostrada mediante el análisis sistemático de los datos disponibles o estudios pertinentes sobre los beneficios esperados y consideraciones de inocuidad (Comisión Europea, 2016).

La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36.000 especies de plantas, que suele obtenerse industrialmente de la achicoria. La inulina es un fructano, moléculas de fructosa unidas por enlaces β -(2-1). Las cadenas de fructosa pueden terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace α -(1-2) (residuo D-glucopiranosil) o en un residuo D-fructopiranosil (Madrigal & Sangronis, 2007).

Los fructanos más ampliamente utilizados a nivel industrial son la inulina, los FOS y la oligofructosa. Todos presentan una estructura polimérica predominantemente lineal y se diferencian en el grado de polimerización (GP), siendo la inulina la de mayor GP (2-60). Los FOS y la oligofructosa son muy similares y se diferencian únicamente en su método de obtención: la oligofructosa (GP= 2-9) se obtiene por hidrólisis enzimática de la inulina, mientras que los FOS (GP= 2-4) se obtienen por transfructosilación de la sacarosa (Madrigal & Sangronis, 2007).

Los GOS están compuestos por 2 a 10 unidades de galactosa unidas a una de glucosa terminal y se pueden obtener industrialmente a partir de la lactosa mediante transglucosilación catalizada por β -galactosidasas (lactasas). Estas enzimas, bajo determinadas condiciones, catalizan la hidrólisis de lactosa y la formación de un enlace β -glicosídico entre la galactosa liberada y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción (Corzo et al., 2015).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para investigar el efecto de la adición de prebióticos a fórmulas infantiles. En 2012, Cilla et al. realizaron una revisión sistemática de la bibliografía para determinar el efecto de la adición de prebióticos a fórmulas infantiles sobre la salud de los lactantes. Los autores concluyeron que la alimentación con fórmulas infantiles con GOS y FOS parece generar un efecto bifidogénico similar al de la leche materna, deposiciones más blandas y frecuentes y una posible disminución de infecciones y alergias. Sin embargo, destacaron la necesidad de realizar más estudios clínicos a largo plazo para poder establecer una mayor base científica. Por su parte, Moreno Villares (2008) realizó una revisión bibliográfica en la que concluyó que la incorporación de prebióticos podría modificar la respuesta inmune en lactantes, previniendo alergias e infecciones leves.

En un estudio llevado con un total de 187 niños, se compararon los niveles de colesterol y triacilglicerol en lactantes alimentados con leche materna y fórmulas infantiles con y sin GOS/FOS en relación 90/10 (concentración total 0,6 g/100 mL). Los autores concluyeron que la

suplementación con esos oligosacáridos a esa concentración no afectaba significativamente los niveles de colesterol total y LDL, a la vez que demostraron que la concentración de colesterol era mayor en niños alimentados con leche materna en comparación con aquellos alimentados con fórmulas infantiles con o sin oligosacáridos (Alliet et al., 2007).

4.5. Micronutrientes

Además de los macronutrientes, la leche materna presenta alta biodisponibilidad de minerales, especialmente calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc, y cantidades suficientes de vitaminas para el normal crecimiento del bebé, a excepción de la vitamina K que se encuentra en muy bajas concentraciones independientemente de la dieta materna (Macías et al., 2006).

4.5.1. *Minerales*

Un consumo adecuado de calcio, el mineral más abundante en el cuerpo humano es vital para la salud de los niños. Otro mineral crítico para el desarrollo de los niños es el hierro, ya que una deficiencia en hierro durante el primer año de vida se asocia con retrasos cognitivos a largo plazo. A su vez, la mayoría de las fórmulas infantiles suelen fortificarse con elementos ultratraza, como el selenio (O'Callaghan et al., 2011).

En la Tabla 1.6 se indican los rangos de concentraciones de minerales para fórmulas infantiles establecidos en distintas reglamentaciones. Además, la relación calcio/fósforo debe estar entre 1 y 2 (Codex Alimentarius, 1987; Comisión Europea, 2016; SAC, 2010; Código Alimentario Argentino, 2018), en todos los casos, salvo para Estados Unidos, que establece una relación 1,1/2,0 (FDA, 2016).

Para poder cumplir con los requisitos, las fórmulas infantiles derivadas de la leche bovina deben fortificarse. Algunas de las sustancias minerales comúnmente utilizadas para tal fin son: carbonato de calcio, fosfatos de calcio, fosfato de magnesio dibásico, citrato de potasio, cloruro de magnesio, entre otras (Murphy, 2015).

Tabla 1.6. Cuadro comparativo de los requisitos reglamentarios establecidos para sustancias minerales en fórmulas infantiles obtenidas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.

Mineral	Codex			
	Alimentarius ¹ / Argentina ²	Unión Europea ³	Estados Unidos ⁴	China ⁵
Sodio (mg/100 kcal)	20 - 60	25 - 60	20 - 60	21 - 59
Potasio (mg/100 kcal)	60 - 180	80 - 160	80 - 200	59 - 180
Cloruro (mg/100 kcal)	50 - 160	60 - 160	55 - 150	50 - 159
Calcio (mg/100 kcal)	≥ 50	50 - 140	≥ 60	50 - 146
Fósforo total (mg/100 kcal)	≥ 25	25 - 90	≥ 30	25 - 100
Magnesio (mg/100 kcal)	≥ 5	5 - 15	≥ 6	5,0 - 15,1
Hierro (mg/100 kcal)	≥ 0,45	0,3 - 1,3	0,15 - 3,0	0,42 - 1,51
Zinc (mg/100 kcal)	≥ 0,5	0,5 - 1	≥ 0,5	0,50 - 1,51
Cobre (µg/100 kcal)	≥ 35	60 - 100	≥ 60	35,6 - 121,3
Yodo (µg/100 kcal)	≥ 10	15 - 29	5 - 75	10,5 - 58,6
Selenio (µg/100 kcal)	≥ 1	3 - 8,6	2 - 7	2,01 - 7,95
Manganeso (µg/100 kcal)	≥ 1	1 - 100	≥ 5	5,0 - 100,4
Molibdeno (µg/100 kcal)	NE	≤ 14	NE	NE
Fluoruro (µg/100 kcal)	NE	≤ 100	NE	NE

¹Codex Alimentarius (2007). ²Código Alimentario Argentino (2018). ³Comisión Europea (2016). ⁴FDA (2016). ⁵SAC (2010). NE: No especificado.

4.5.2. Vitaminas

Existen requerimientos regulatorios específicos de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles en fórmulas infantiles, para asegurar el crecimiento y desarrollo infantil, que se resumen en la Tabla 1.7.

La absorción de vitaminas liposolubles se relaciona con la absorción de las grasas. Estas vitaminas se almacenan en depósitos de grasa del cuerpo, como el tejido adiposo, por lo que grandes consumos de estas vitaminas durante períodos prolongados puede derivar en su acumulación en los tejidos. Además, al momento del nacimiento, el niño tiene una reserva de vitaminas liposolubles que obtuvo a través de la placenta durante el embarazo (Thompson & Kharb, 2007). Los PUFA, incluyendo el ácido linoleico, requieren de cantidades suficientes de vitamina E para mantener la integridad de la piel y el normal crecimiento.

A diferencia de lo que ocurre con las vitaminas liposolubles, el exceso de vitaminas hidrosolubles es fácilmente eliminado por el cuerpo (Montagne et al., 2009).

Tabla 1.7. Cuadro comparativo de los requisitos reglamentarios establecidos para vitaminas en fórmulas infantiles obtenidas a partir de proteínas de leche de vaca intactas.

Vitamina	Codex Alimentarius ¹ /Argentina ²	Unión Europea ³	Estados Unidos ⁴	China ⁵
Vitamina A (µg RE/100 kcal) ⁶	60 – 180	70 – 114	75-225	59 – 180
Vitamina D (µg/100 kcal)	1 – 2,5 ⁷	2 – 3	1-2,5 ⁸	1,05 – 2,51 ⁷
Tiamina (µg/100 kcal)	≥ 60	40 – 300	≥ 40	59 – 301
Riboflavina (µg/100 kcal)	≥ 80	60 – 400	≥ 60	80 – 498
Niacina (mg/100 kcal) ⁸	≥ 0,3	0,4 – 1,5	≥ 0,25	0,293 – 1,506
Ácido pantoténico (mg/100 kcal)	≥ 0,4	0,4 – 2	≥ 0,3	0,402 – 2
Vitamina B ₆ (µg/100 kcal)	≥ 35	20 – 175	≥ 35 ⁹	35,6 – 188,3
Biotina (µg/100 kcal)	≥ 1,5	1 – 7,5	≥ 1,5 ¹⁰	1,5 – 10,0
Ácido fólico (µg/100 kcal)	≥ 10	15 – 47,6 ¹¹	≥ 4	10,5 – 50,2
Vitamina B ₁₂ (µg/100 kcal)	≥ 0,1	0,1 – 0,5	≥ 0,15	0,105 – 1,506
Vitamina C (mg/100 kcal)	≥ 10 ¹²	4 – 30	≥ 8 ¹²	10,5 -71,1
Vitamina K (µg/100 kcal)	≥ 4	1 – 25	≥ 4 ¹³	4,2 – 27,2 ¹³
Vitamina E (mg α-TE/100 kcal) ¹⁴	≥ 0,5 ¹⁵	0,6 – 5	≥ 0,7 ¹⁶	0,50 – 5,02 ¹⁵

¹Codex Alimentarius (2007). ²Código Alimentario Argentino (2018). ³Comisión Europea (2016). ⁴FDA (2016). ⁵SAC (2010). ⁶Vitamina A preformada. ER= equivalente a todo-trans-retinol. ⁷Calciferol, 1 µg calciferol = 40 UI vitamina D. ⁸Niacina preformada. ⁹La vitamina 6 debe estar presente en al menos 15 µg de vitamina B₆ por cada gramo de proteína en exceso de los 1,8 g proteína/100 kcal. ¹⁰Este requerimiento aplica sólo a fórmulas infantiles basadas en ingredientes no lácteos. ¹¹Folato equivalente en dieta (EFD). 1 µg EFD = 1 µg folato en alimentos = 0,6 µg ácido fólico en fórmulas infantiles. ¹²Expresada como ácido ascórbico. ¹³La vitamina K adicionada debe estar en forma de filoquinona (Vitamina K1). ¹⁴α-TE= α-tocoferol equivalente. ¹⁵El contenido de vitamina E deberá ser ≥ 0,5 mg α-TE/g PUFA, aplicando los siguientes factores de equivalencia para adaptar el contenido mínimo de vitamina E al número de dobles enlaces de ácidos grasos en la FI: 0,5 mg α-TE/1 g de ácido linoleico (18:2n-6); 0,75 mg α-TE/1 g de ácido α-linolénico (18:3n-3); 1,0 mg α-TE/1g de ácido araquidónico (20:4n-6); 1,25 mg α-TE/1g de ácido eicosapentaenoico (20:5n3); 1,5 mg α-TE/1g de ácido docosahexaenoico (22:6n-3). ¹⁶La vitamina E deberá estar presente al menos en 0,7 Unidades Internacionales de vitamina E por g de ácido linoleico.

4.5.3. Otros micronutrientes

Los avances tecnológicos en los análisis de leche materna han permitido detectar la presencia de nutrientes endógenos (como nucleótidos y colina) y exógenos (como luteína y licopeno) derivados de la dieta de la madre (O’Callaghan et al., 2011).

La Unión Europea admite la inclusión de los nucleótidos citidina 5’-monofosfato, uridina 5’-monofosfato, adenosina 5’-monofosfato, guanosina 5’-monofosfato e inosina 5’-monofosfato, cada uno con un límite de concentración máximo y sin superar en total los 5 mg/100 kcal (Comisión Europea, 2016). Por su parte, el Codex Alimentarius (2007) recomienda que los límites máximos totales de nucleótidos sean establecidos por las autoridades nacionales competentes.

5. Producción de fórmulas infantiles

Las fórmulas infantiles pueden presentarse líquidas o en polvo. A continuación, se describirán los métodos de producción disponibles para ambos tipos de fórmulas.

5.1. Producción de fórmulas infantiles líquidas

La producción de las fórmulas infantiles líquidas (concentradas o listas para consumir) comprende varias etapas que se describen en la Figura 1.2.

En primer lugar, los ingredientes líquidos y polvos se mezclan en un tanque de agitación hasta obtener una solución libre de partículas. Esta etapa suele realizarse a temperaturas levemente elevadas para facilitar la disolución y bajo vacío para evitar problemas asociados a la formación de espuma (Montagne et al., 2009).

Luego, se agregan mezclas de aceites vegetales (y, en algunos casos, grasa animal), lecitina, para facilitar la formación de la emulsión y también pueden incorporarse vitaminas liposolubles. Los lípidos se calientan a aproximadamente 60 °C para asegurar su completa fusión, reducir la viscosidad y facilitar su incorporación en la matriz proteica (Montagne et al., 2009).

Una vez que los ingredientes se han incorporado, se realiza un primer tratamiento térmico (directo o indirecto a 85 – 120 °C) para reducir la carga microbiológica de las materias primas e inactivar enzimas indeseables, como las fosfatasas, lipasas y proteasas. A continuación, se realiza la homogeneización (T ~60 °C, presión: 15 – 25 MPa) para emulsionar los aceites (Montagne et al., 2009).

La emulsión se enfría y se almacena en un tanque y se agregan ingredientes menores. Se realizan análisis de laboratorio y se corrigen las concentraciones, en caso de que fuera necesario (Montagne et al., 2009).

Las fórmulas líquidas reciben un tratamiento térmico para garantizar la esterilidad comercial. Este tratamiento puede realizarse luego de envasar el producto en latas o botellas de vidrio (118 – 122 °C por 15 – 20 min), o por un sistema UHT (ultra alta temperatura) con calentamiento directo o indirecto, seguido por homogeneización y envasado aséptico (en envases de vidrio, metal, plástico o cartón estériles). Esta segunda opción es preferible ya que minimiza los efectos negativos en las propiedades nutricionales, físicas y sensoriales del producto. El tratamiento UHT por calentamiento directo consiste en un precalentamiento a ~80 °C, seguido de un muy rápido aumento de la temperatura por inyección directa de vapor hasta 140 – 150 °C, temperatura a la que el producto se mantiene por algunos segundos para finalmente enfriarse muy rápidamente (enfriamiento flash) hasta ~80 °C. En el caso del tratamiento térmico indirecto (en intercambiador de placas o tubos), el producto se precalienta a ~80 °C, luego se aumenta muy rápidamente su temperatura hasta 135 – 145 °C, se mantiene por unos segundos y finalmente se enfría hasta ~20 °C (Montagne et al., 2009).

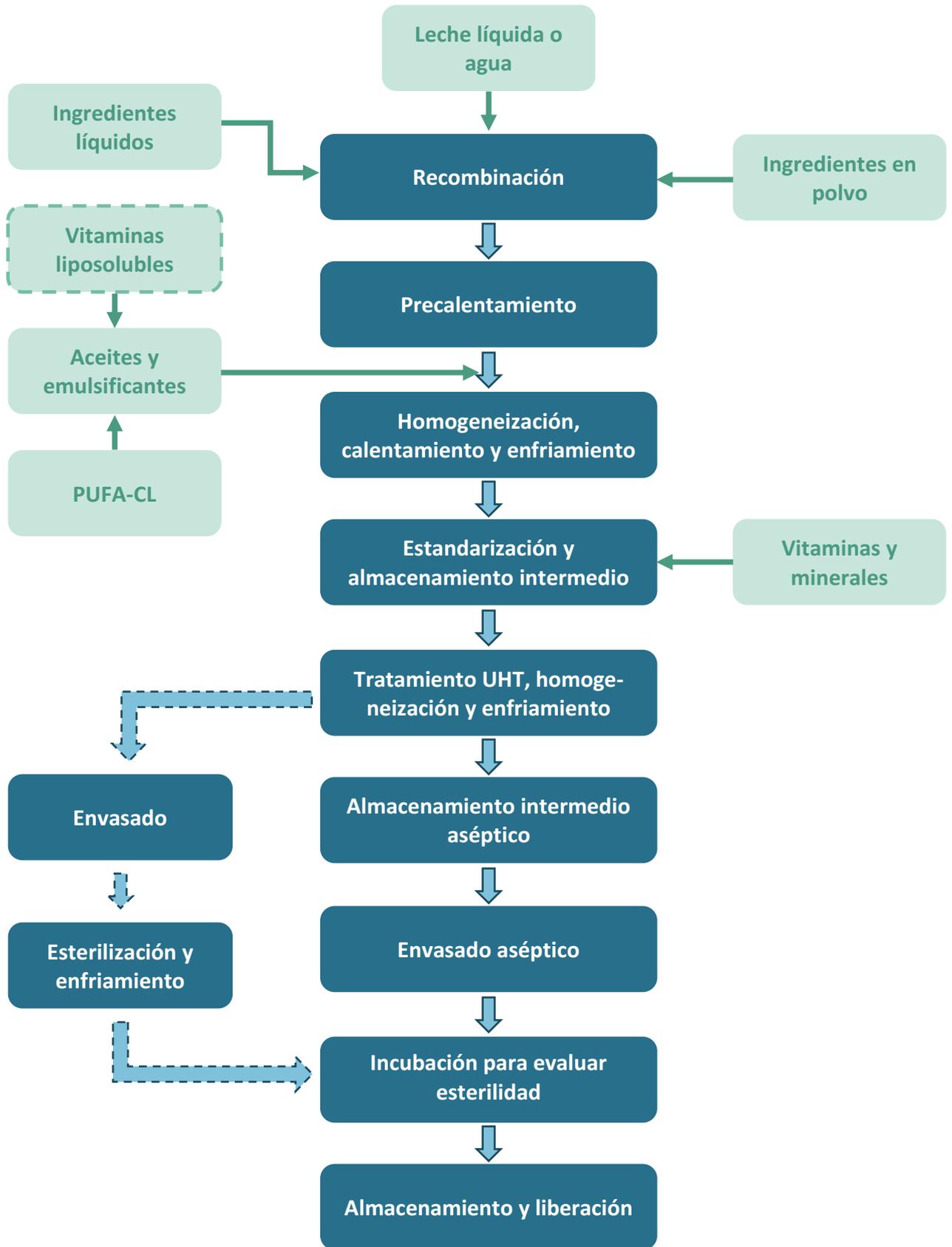


Figura 1.2. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles líquidas (adaptada de: Montagne et al. (2009)).

Las líneas punteadas indican ingredientes o etapas alternativos.

5.2. Producción de fórmulas infantiles en polvo

Las fórmulas infantiles en polvo son las que se encuentran más comúnmente en el mercado. Existen dos procesos de manufactura: el método de mezcla seca (o *dry-mix*) y el método de mezcla húmeda (más conocido como *wet-mix*).

En el método *wet-mix* se prepara una mezcla húmeda concentrada de todos los ingredientes, que es posteriormente deshidratada en un secador spray para obtener la fórmula infantil en polvo. Por otro lado, en el método *dry-mix*, los ingredientes en polvo se homogeneizan para obtener una mezcla uniforme de los macro y micronutrientes que conforman la fórmula, como se esquematiza en la Figura 1.3. Actualmente, se utiliza a menudo una combinación de ambos métodos, que consiste en realizar el método de mezcla húmeda seguido del agregado y mezclado de ingredientes secos (vitaminas, minerales, etc.), luego de la etapa de secado spray. La calidad microbiológica de los ingredientes secos agregados debe ser muy especialmente considerada (Montagne et al., 2009).

Ambos métodos tienen ventajas y desventajas que se presentan en la Tabla 1.8.



Figura 1.3. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles en polvo por el método de mezcla en seco (adaptada de: Masum et al. (2020c)).

Tabla 1.8. Ventajas y desventajas de los métodos *dry-mix* y *wet-mix* de producción de fórmulas infantiles en polvo.

Método	Ventajas	Desventajas
<i>Dry-mix</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo consumo energético. • Baja inversión (edilicia, equipamiento, mantenimiento). • Bajo riesgo de contaminación microbiológica por ausencia de agua. • Producción rápida y sencilla. 	<ul style="list-style-type: none"> • La calidad microbiológica depende de la calidad de la materia prima. • Segregación durante almacenamiento y transporte por diferencias en densidades de ingredientes. • Pobre humectabilidad y solubilidad. • No permite incorporar aceites (deben encapsularse).
<i>Wet-mix</i>	<ul style="list-style-type: none"> • El tratamiento térmico asegura la calidad microbiológica del producto final. • Producto homogéneo con buena calidad física y distribución uniforme de nutrientes. • Permite incorporar aceite. • Mejor humectabilidad y solubilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor consumo energético. • Mayor inversión (edilicia, equipos, mantenimiento). • Proceso de varias etapas distintas y tiempo más largo. • Coexisten áreas secas y húmedas en la planta de producción.

Fuente: Jiang (2014); Masum et al. (2020c); Montagne et al. (2009); Murphy (2015).

El método *wet-mix* es el más utilizado a nivel industrial y el que fue aplicado durante el desarrollo de esta tesis. Por lo tanto, se describirá en detalle en la próxima sección.

5.2.1. Proceso *wet-mix*

El proceso *wet-mix* consiste básicamente en la preparación de una mezcla húmeda de los distintos ingredientes, su tratamiento térmico para inactivar microorganismos, homogeneización para formar una emulsión, concentración por evaporación y secado spray para obtener el polvo final. Si bien la línea de producción varía entre plantas de procesamiento, en la Figura 1.4 se esquematiza una posible línea de producción de fórmulas infantiles por el método *wet-mix*. A continuación, se describen las distintas etapas involucradas en el proceso.

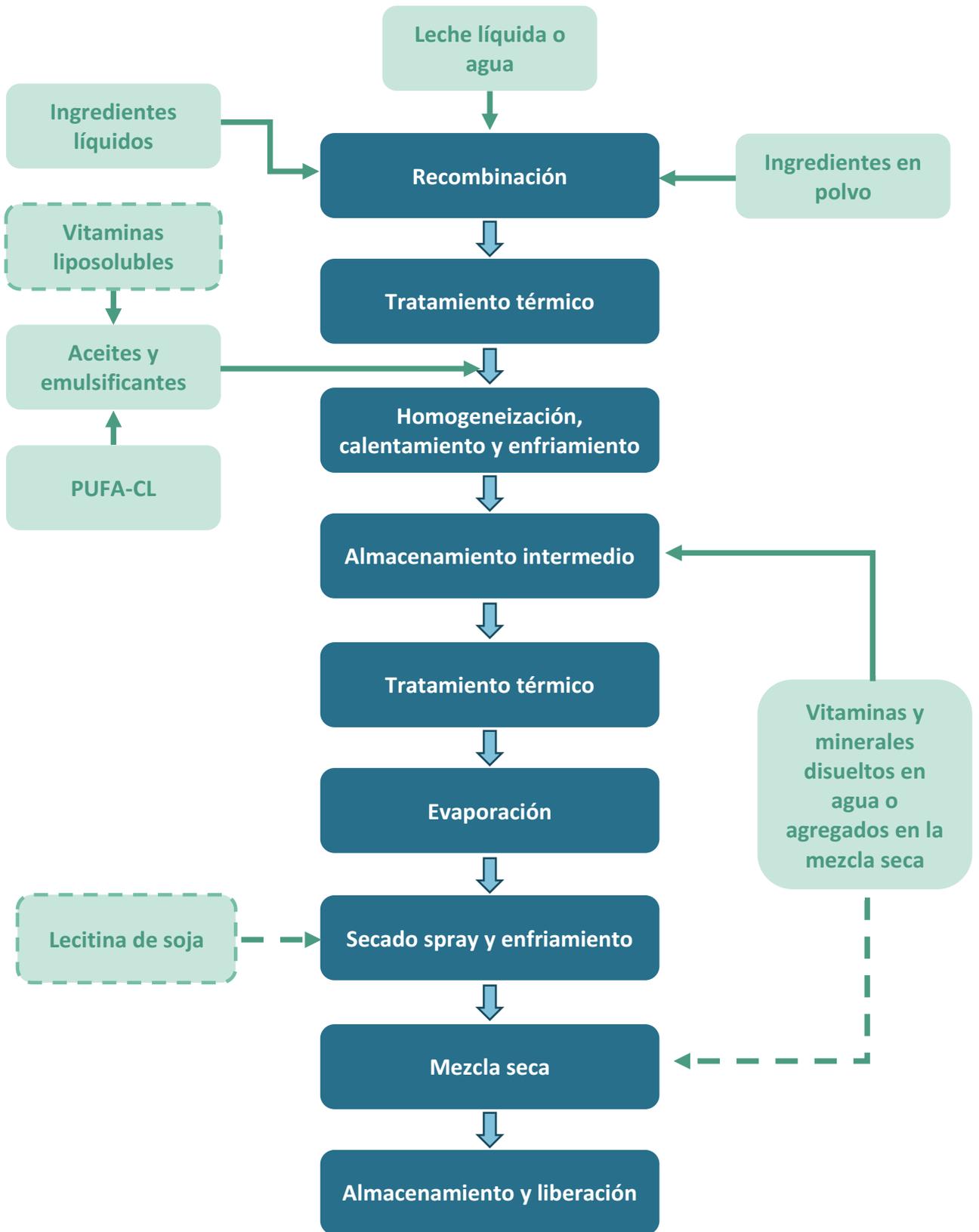


Figura 1.4. Esquema del proceso de producción de fórmulas infantiles en polvo por el método *wet-mix* (adaptada de: Montagne et al. (2009)).

Las líneas punteadas indican ingredientes o etapas alternativos.

5.2.1.1. Preparación de la mezcla húmeda

Las materias primas que se utilizan habitualmente como fuente de los distintos nutrientes requeridos en las fórmulas infantiles elaboradas a partir de leche de vaca se listan en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9. Materias primas comúnmente utilizadas en fórmulas infantiles de proteínas de leche de vaca intactas.

Fuente de:	Materia prima
Caseína	Leche entera o descremada (líquida o en polvo), caseína ácida, caseinato de sodio/calcio/potasio, concentrado de proteínas de leche
WP	Aislado (WPI) y concentrado (WPC) de proteínas de suero, suero en polvo desmineralizado o parcialmente desmineralizado, leche.
Carbohidratos	Lactosa, maltodextrina, almidón, jarabe de maíz, leche.
Lípidos	Aceites vegetales, crema, grasa láctea anhidra, <i>butter oil</i> , leche entera.
Sales minerales	Carbonatos, citratos, fosfatos o cloruros de K, Na, Ca y Mg.
Micronutrientes	Vitaminas A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, colina, inositol, aminoácidos, KI, FeSO ₄ , ZnSO ₄ , CuSO ₄ , MnSO ₄ .
Ingredientes funcionales	Emulsificantes/Estabilizantes (lecitina de soja, mono y diglicéridos)
Otros	Prebióticos (GOS, FOS, inulina), probióticos (<i>Bifidobacterium animalis</i> sp. <i>lactis</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG (anteriormente <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG), <i>Bifidobacterium longum</i> BL999), lactoferrina, membrana del glóbulo graso de la leche.

Fuente: Masum et al. (2020c); Montagne et al. (2009); Nasirpour et al. (2006).

MPC: concentrado de proteínas de la leche; WP: proteínas del suero; WPI: aislado de proteínas del suero; WPC: concentrado de proteínas del suero, GOS: galacto-oligosacáridos, FOS: fructo-oligosacáridos.

En primer lugar, los ingredientes hidrosolubles se recombinan en leche o agua, a temperaturas de entre 60 y 70 °C, generalmente en un tanque de agitación de alta cizalla, y, posteriormente, se agregan los aceites y micronutrientes (Jiang, 2014; Montagne et al., 2009). Los tanques de alta cizalla (Figura 1.5) se prefieren para facilitar la rehidratación y generalmente se trabaja bajo vacío para minimizar problemas asociados a la generación de espuma, incorporando el polvo por debajo de la superficie del líquido para humedecerlo y desairearlo instantáneamente. Luego de mezclar completamente los ingredientes, el pH de la mezcla es ajustado a ~6,8, utilizando una solución ácida (ácido cítrico) o alcalina (NaOH o KOH) (Jiang, 2014; Masum et al., 2020c; Montagne et al., 2009).



Figura 1.5. Imagen de un tanque de agitación alta cizalla (GEA, s.f.).

La temperatura de esta etapa es crítica para lograr una adecuada rehidratación de los componentes, especialmente de la lactosa que se puede encontrar a altas concentraciones, dependiendo del contenido de sólidos totales (ST) de la mezcla húmeda. La lactosa es un azúcar relativamente insoluble, y su solubilidad se puede describir por la función: $C_{LAC} = 10,9109 * e^{0,0284T}$, donde C_{LAC} es la concentración de lactosa en gramos por 100 g de agua y T es la temperatura en °C (Huppertz & Gazi, 2016). Por lo tanto, existe un nivel de ST crítico por encima del cual la lactosa es insoluble. Además, el nivel de ST está limitado por la viscosidad de la mezcla húmeda, que debe ser lo suficientemente baja como para permitir un adecuado bombeo y manejo del producto. Las mezclas húmedas suelen prepararse con niveles de ST de 20 a 30 % (p/p), para facilitar la disolución de los ingredientes (Masum et al., 2020c).

5.2.1.2. Tratamiento térmico

Esta etapa es crítica para asegurar la calidad microbiológica de las fórmulas infantiles. Entre los microorganismos patógenos de preocupación para este producto, se destaca *Cronobacter sakazakii*, que ha sido detectado en fórmulas infantiles y en plantas productoras de leche en polvo, y ha causado enfermedad y muerte de lactantes. *Salmonella* es otro de los patógenos que puede encontrarse en fórmulas infantiles y que ha sido responsable de varios brotes relacionados a su consumo (Ahmad & Guo, 2014).

El tratamiento térmico puede ser directo o indirecto. El tratamiento térmico indirecto, es el más frecuente en la industria láctea, y consiste en la aplicación de calor a través de una barrera física, en pasteurizadores de placas o tubos, con la ventaja de que el producto y el medio de

calentamiento no entran en contacto. En la Figura 1.6 se representa esquemáticamente el funcionamiento de este tipo de intercambiadores de calor.

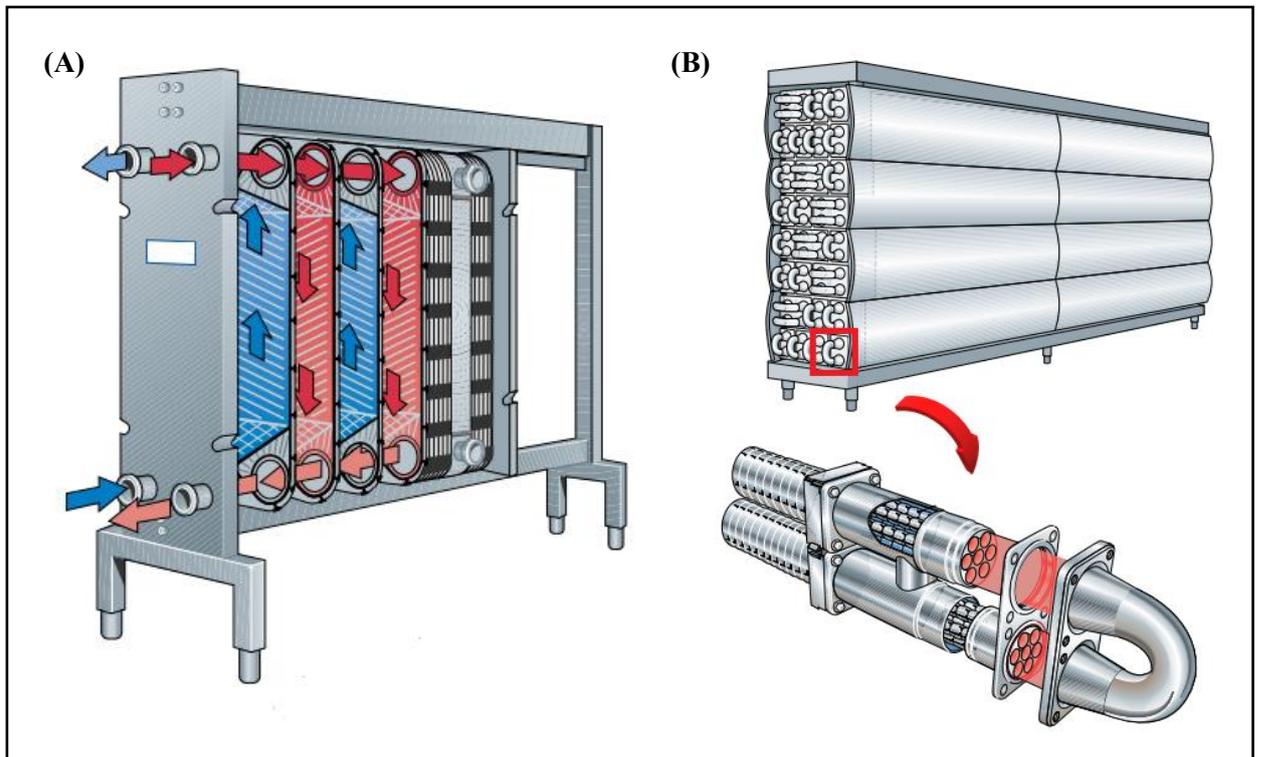


Figura 1.6. Representación esquemática de un intercambiador de calor de placas (A) y un intercambiador de calor tubular (B) (adaptadas de: Tetra Pak (1995)).

En el caso del tratamiento térmico directo (Figura 1.7), el producto y el medio de calentamiento entran en contacto directo (inyección o infusión de vapor), por lo que la calidad del vapor utilizado debe controlarse muy estrictamente. El tratamiento directo presenta la ventaja de poder alcanzar altas temperaturas en tiempos mucho más cortos (~ 1 s) (Písecký, 2012).

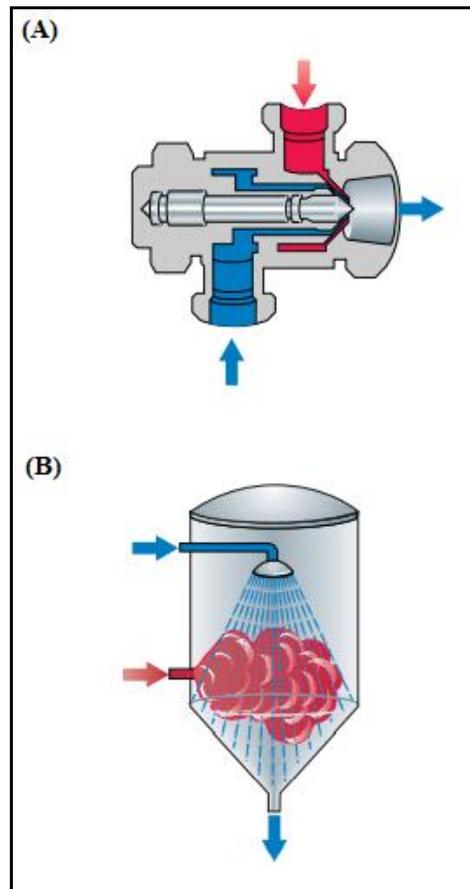


Figura 1.7. Sistemas de inyección directa de vapor (A) e infusión de vapor (B) (adaptadas de: Tetra Pak (1995)).

Varios estudios han demostrado que la etapa de pasteurización puede inducir desnaturalización y agregación proteica, y que el grado de desnaturalización depende del tipo de tratamiento térmico aplicado. Oldfield et al. (2005) investigaron la desnaturalización proteica durante la producción de leche en polvo descremada y concluyeron que la desnaturalización irreversible de las proteínas del suero mayoritarias (β -Lg y α -La) y minoritarias (IgG y BSA) ocurre principalmente durante el tratamiento térmico, mientras que las etapas de evaporación y secado spray tienen un efecto menor, en las temperaturas de concentración y secado spray (entrada y salida de aire) utilizadas normalmente. El tipo de tratamiento térmico aplicado también influye en el grado de desnaturalización. Akkerman et al. (2016) compararon el efecto de tres sistemas de calentamiento aplicados a leche descremada: intercambiador de calor de placas, intercambiador de calor de tubos e inyección directa de vapor, en la desnaturalización térmica de las proteínas del suero. Los autores reportaron que la desnaturalización depende del sistema de calentamiento y que aumenta con la temperatura y el tiempo de retención en todos los sistemas. De acuerdo con sus resultados, el intercambiador de tubos induce mayor desnaturalización a temperaturas < 100 °C y el

calentamiento directo (inyección directa de vapor) resulta en niveles significativamente menores de desnaturalización que los tratamientos térmicos indirectos. Murphy et al. (2013) obtuvieron resultados similares al trabajar con fórmulas infantiles. En su estudio, los autores compararon la producción de fórmulas infantiles por el método *wet-mix* tradicional, con pasteurización indirecta de una mezcla húmeda con 30 % ST a 110 °C por 3 s, con la producción de una mezcla húmeda de altos ST (60 %) con tratamiento térmico por inyección directa de vapor (110 °C – 3 s) y sin etapa de evaporación. En línea con los resultados obtenidos por Akkerman et al. (2016), Murphy et al. (2013) concluyeron que la mezcla húmeda de altos ST pasteurizada por inyección directa de vapor sufría menor desnaturalización proteica y menor incremento de viscosidad.

La desnaturalización y agregación de proteínas globulares por acción del calor son generalmente causadas por la exposición de grupos sulfhidrilo libres y aminoácidos hidrofóbicos. Los mecanismos de desnaturalización y agregación de la β -Lg, proteína mayoritaria en el suero vacuno, puede describirse en las siguientes etapas (Wijayanti et al., 2019):

- a. Disociación. Los dímeros de β -Lg se disocian en dos monómeros idénticos, por acción del calor.
- b. Desdoblamiento. La estructura nativa se despliega formando monómeros reactivos con grupos sulfhidrilos libres y residuos hidrofóbicos expuestos, que participan en reacciones de agregación, si se sigue calentando.
- c. Agregación a través de reacciones de intercambio —SH/S—S— y/o interacciones no covalentes. Los monómeros reactivos interactúan para producir oligómeros vía enlaces —S—S— y/o interacciones no covalentes. Temperaturas de entre 65 y 85 °C favorecen la formación de agregados a través de enlaces no covalentes, mientras que temperaturas por encima de 85 °C favorecen las reacciones de intercambio —SH/S—S—.
- d. Polimerización/formación de agregados de alto peso molecular a través de reacciones de intercambio —SH/S—S—. Los oligómeros forman agregados a través de interacciones covalentes y no covalentes y finalmente se forman geles.

Si bien las caseínas presentan alta estabilidad térmica, resistiendo incluso calentamientos a 140 °C por 20 min sin coagular, éstas reaccionan con las WP desnaturalizadas formando agregados (Fox et al., 2015; Wijayanti et al., 2019). Las interacciones entre las WP y las micelas de caseína ocurren específicamente entre la β -Lg y la κ - y/o α_{s2} -caseína a través de reacciones de intercambio —SH/S—S—, dado que esas caseínas contienen residuos de cisteína que permiten estas asociaciones (Wijayanti et al., 2019).

La desnaturalización y agregación proteica pueden tener implicancias tecnológicas, como el aumento indeseado de la viscosidad de las mezclas húmedas o el ensuciamiento de las superficies del intercambiador de calor (*fouling*), que a su vez puede generar una reducción de la transferencia de calor y problemas de inocuidad, asociados al crecimiento de bacterias en la capa depositada

sobre la superficie (Murphy et al., 2014; Petit et al., 2013). Además, los tratamientos térmicos modifican las propiedades de superficie de las proteínas. Se ha reportado que el calentamiento tanto de β -Lg como de WPI mejora sus propiedades emulsionantes (Wijayanti et al., 2019). Es así, que si bien durante la producción de fórmulas infantiles, el tratamiento térmico puede realizarse antes o después de la homogeneización, realizar la pasteurización antes de homogeneizar presenta ventajas. Buggy et al. (2017) compararon la distribución de tamaño de partícula de mezclas húmedas pasteurizadas antes y después de la homogeneización y obtuvieron un tamaño de partícula promedio significativamente menor al realizar el tratamiento térmico antes.

Estas reacciones también pueden tener consecuencias desde el punto de vista nutricional. La α -La y β -Lg son proteínas globulares con alta resistencia a la proteólisis debido a la inaccesibilidad de las cadenas proteicas a las enzimas. Por lo tanto, la desnaturalización a temperaturas por encima de 70 °C generalmente favorece la digestión, dado que, al desplegarse las proteínas, las cadenas quedan expuestas favoreciendo su hidrólisis (Wijayanti et al., 2019). Por otro lado, se ha reportado que la aplicación de tratamientos térmicos intensos puede llevar a la formación de macroagregados con digestibilidad *in vitro* reducida (Carbonaro et al., 1998).

5.2.1.3. Homogeneización

Durante la homogeneización, la mezcla húmeda es forzada a pasar a través de un pequeño orificio, lo que genera la disrupción de las gotas o glóbulos de grasa en partículas más pequeñas y permite que las proteínas se adsorban en las nuevas superficies formadas, estabilizando la emulsión (Masum et al., 2020c). El objetivo de la homogeneización es obtener una emulsión aceite en agua, es decir, una mezcla uniforme de pequeñas gotas de aceite ($< 1 \mu\text{m}$) dispersas en un sistema acuoso que incluye a las proteínas, carbohidratos y otros ingredientes menores, como vitaminas, minerales y agentes emulsificantes (McSweeney, 2008). Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que las fórmulas infantiles con gotas de aceite de mayor tamaño (más cercanas al tamaño del glóbulo de grasa de la leche humana) presentan digestibilidades y propiedades metabólicas más similares a las de la leche materna (Bourlieu et al., 2015; Gallier et al., 2015).

Este paso suele realizarse en homogeneizadores de dos etapas (Figura 1.8), con presiones de aproximadamente 13,8 y 3,5 MPa, en la primera y segunda etapa, respectivamente. La alta presión de la primera etapa permite la obtención de pequeñas gotas de aceite, mientras que la segunda etapa permite la disrupción de los agregados de gotas de aceite (floculación) formados luego de la primera etapa (Masum et al., 2020c). McCarthy et al. (2015) evaluaron los efectos de varios parámetros del proceso (ST de la mezcla húmeda, tratamiento térmico y presiones en la primera y segunda etapa de homogeneización) sobre la estabilidad de la emulsión de fórmulas infantiles. Los autores concluyeron que las presiones de ambas etapas de homogeneización son igualmente importantes para la creación de una emulsión estable, y que el tamaño de la gota de aceite post-

homogeneización está influenciado por las interacciones entre la presión de la primera etapa y el tratamiento térmico y la presión de la primera etapa y los ST de la mezcla húmeda.

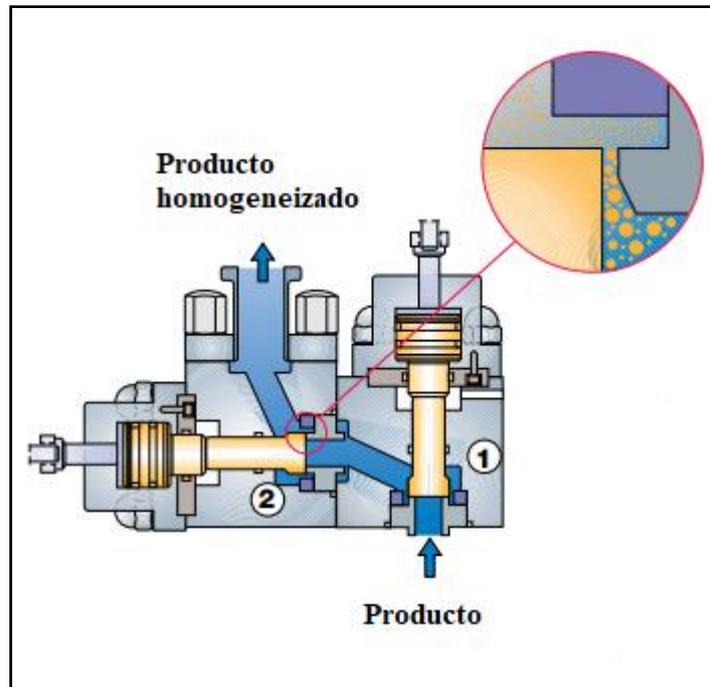


Figura 1.8. Homogeneizador de dos etapas (adaptada de: Tetra Pak (1995)).

Por su naturaleza anfipática, las proteínas son excelentes emulsificantes, ya que se adsorben en la superficie de la gota y orientan sus regiones hidrofílicas hacia la fase acuosa y sus regiones hidrofóbicas hacia la fase lipídica, reduciendo la tensión interfacial y estabilizando la emulsión. Las proteínas de la leche se caracterizan particularmente por ser buenos agentes emulsificantes, aunque su capacidad para estabilizar la emulsión depende de su estado conformacional (McCarthy et al., 2015). El tratamiento térmico aplicado antes de la homogeneización puede inducir la desnaturalización de las WP y la agregación entre sí y con la κ -caseína. Estudios previos han sugerido que WP desnaturalizadas favorecen la formación de gotas más pequeñas y distribuciones de tamaño de partícula más angostas, debido a un efecto complementario de las proteínas nativas, desnaturalizadas y agregadas en baja proporción. Las proteínas nativas se adsorberían en primer lugar en la interfase aceite/agua, y las proteínas desnaturalizadas facilitarían la formación de film interfacial grueso. Por otro lado, se han reportado efectos opuestos cuando el grado de agregación es alto, debido a que las proteínas pierden flexibilidad y no pueden disponerse adecuadamente en la superficie de la gota, lo que resulta en gotas de mayor tamaño (Liang et al., 2017). Por otro lado, aunque tanto las caseínas como las WP pueden adsorberse en la superficie, se ha visto que, en las emulsiones estabilizadas por proteínas lácteas, las caseínas se adsorben preferentemente (Dalglish et al., 2002).

En las fórmulas infantiles suele modificarse la relación WP/caseínas con el objetivo de imitar la composición de la leche materna. Sourdet et al. (2002) investigaron la adsorción de las proteínas de la leche en la interfase aceite/agua de emulsiones alimentarias con distintas relaciones WP/caseína (20/80, 40/60, 100/0). Los autores observaron que en ausencia de caseína la estabilidad de la emulsión disminuía. Por su parte, Masum, Huppertz et al. (2020) no detectaron diferencias significativas en el tamaño promedio de la gota de aceite luego de homogeneizar mezclas húmedas de fórmulas infantiles con relaciones WP/caseína de 60/40, 50/50 y 40/60. Sin embargo, los autores reportaron que la carga neta negativa de las proteínas de la formulación decreció con al aumentar la relación WP/caseína, debido a que al desnaturalizarse las WP (proteínas globulares) exponen sus grupos cargados, que en el estado nativo se ubican en el interior de la estructura.

Manteniendo el foco en la “humanización” de las fórmulas infantiles, es decir asemejarlas en la mayor medida de lo posible a la leche materna, se ha investigado el impacto de aumentar la concentración de α -La. Buggy et al. (2017) reportaron que la estabilidad de la emulsión puede aumentar al incrementar la concentración relativa de α -La, dado que la menor concentración de β -Lg hace que se formen menos agregados covalentes durante el tratamiento térmico.

La utilización de proteínas del suero hidrolizadas para reducir la alergenicidad de las fórmulas infantiles está ganando atención. Sin embargo, al utilizar hidrolizados proteicos existe una mayor exposición de sitios reactivos y una menor estabilidad estérica, que pueden favorecer la floculación y coalescencia (Euston et al., 2001; Singh & Dalgleish, 1998). Drapala et al. (2017) demostraron una mejora en la estabilidad durante el procesamiento de fórmulas a escala laboratorio, así como en la composición superficial del polvo resultante, al conjugar el hidrolizado de proteínas del suero con maltodextrina. Por su parte, en su estudio, de Figueiredo Furtado et al. (2021) reportaron que la adición de lactoferrina (que además contribuye a la “humanización” de la fórmula) mejora la estabilidad de la emulsión de fórmulas infantiles modelo producidas con proteínas del suero hidrolizadas.

Además de las proteínas, durante la producción de fórmulas infantiles se utilizan comúnmente emulsificantes no proteicos, tales como lecitina (E322), mono y diglicéridos (E472c). En las fórmulas producidas con hidrolizados de proteínas del suero se admite también la adición de ésteres del ácido cítrico de mono y diglicéridos (CITREM, E471c), ésteres de ácidos grasos de sacarosa (E473) y octenil succinato sódico de almidón (E1450) (McSweeney, 2008). La lecitina es el agente emulsificante más utilizado en la industria alimentaria, en particular, la obtenida del aceite de soja. Los mono-di-glicéridos comerciales en general comprenden una mezcla de 45-55 % monoglicéridos, 35-38 % diglicéridos, 8-12 % triglicéridos y 1-7 % glicerol libre, y se obtienen por interesterificación de triglicéridos con glicerol a 200-250 °C bajo catálisis alcalina (McSweeney, 2008).

5.2.1.4. Evaporación

Las mezclas húmedas suelen prepararse con 20–30 % ST, para facilitar la rehidratación y solubilización de ingredientes y evitar problemas de viscosidad (Masum et al., 2020c). Sin embargo, secar una mezcla húmeda con ese bajo nivel de ST presenta una serie de desventajas y, por lo tanto, ésta debe concentrarse por evaporación antes de ingresar al secador spray. Desde el punto de vista económico, remover agua por evaporación es más conveniente que hacerlo por secado y, además, las propiedades fisicoquímicas del polvo mejoran al aumentar los ST del concentrado, porque se favorece la aglomeración de partículas y se minimiza el aire ocluido por desaireación del concentrado (Montagne et al., 2009; Písecký, 2012).

La evaporación suele realizarse en evaporadores de film descendente de múltiples efectos (Figura 1.9), que trabajan bajo vacío a 50–70 °C, lo que permite la evaporación de mezclas húmedas con componentes termosensibles (Masum et al., 2020c; Montagne et al., 2009; Murphy, 2015). En general, las mezclas húmedas suelen concentrarse hasta aproximadamente 50 % ST, aunque el grado de concentración está limitado por la viscosidad. Blanchard et al. (2013) recomiendan que la viscosidad del concentrado no exceda los 200 mPa.s, mientras que Písecký (2012) indica que para leche entera la viscosidad del concentrado a la entrada del secador no debe exceder 60–100 mPa.s.

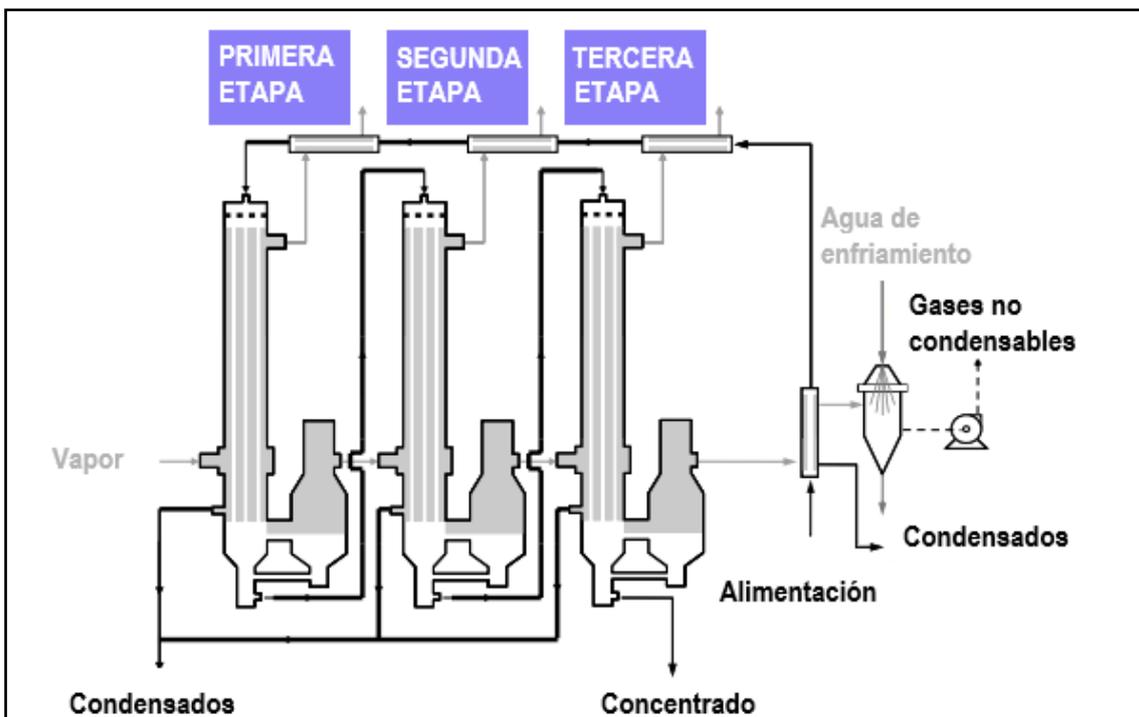


Figura 1.9. Evaporador de múltiples efectos (adaptada de: Schuck et al. (2012)).

5.2.1.5. Secado spray

Luego de la evaporación, el concentrado es deshidratado para producir la fórmula infantil en polvo. El secado spray consiste en la deshidratación de un líquido conteniendo sólidos disueltos o dispersos, a través de la transformación de ese líquido en pequeñas gotas y su exposición a una corriente de aire caliente. La elevada área superficial de las gotas genera que la evaporación del agua ocurra muy rápidamente, convirtiendo a las gotas en partículas de polvo (Písecký, 2012). La remoción de las últimas trazas de agua es muy difícil, a no ser que se utilicen temperaturas de salida de aire muy elevadas, lo que tiene efectos negativos sobre la calidad del polvo. Por lo tanto, si la humedad del polvo a la salida de la cámara es todavía demasiado elevada, se agrega una segunda etapa de secado que consiste en un lecho fluido. En esta configuración, denominada secado spray en dos etapas, la humedad a la salida de la cámara se encuentra 2-3 % por encima del valor final deseado. Luego de salir de la cámara, el polvo pasa por un lecho fluido donde se elimina ese exceso de humedad y se enfría (Tetra Pak, 1995).

La técnica más utilizada actualmente para la producción de fórmulas en polvo es el secado spray de múltiples etapas (Blanchard et al., 2013). En esta configuración, también llamada secado spray en tres etapas, la segunda etapa ocurre dentro de la cámara de secado que contiene un lecho fluido integrado, y la tercera etapa ocurre en un lecho fluidizado externo, donde se alcanza la humedad final especificada. En el lecho fluidizado vibratorio los finos se separan y recogen en un ciclón, que los recircula al secador spray aumentando la aglomeración de las partículas. De esta forma se obtienen polvos con mayor grado de aglomeración, lo que mejora su fluidez y propiedades de rehidratación (Montagne et al., 2009; Písecký, 2012). La Figura 1.10 representa un secador spray multietapa.

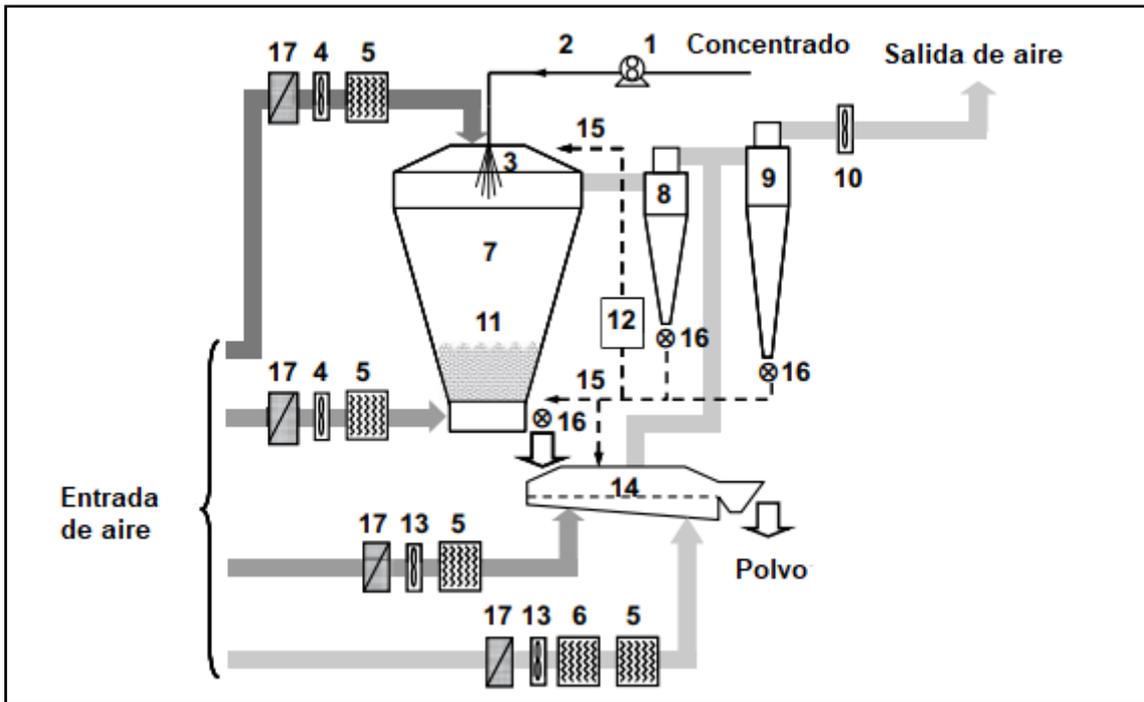


Figura 1.10. Secador spray multi-etapa (adaptada de: Schuck et al. (2012)).

1: Cañería de alimentación, 2: Flujo de alimentación, 3: Atomizador, 4: Ventilador de entrada de aire, 5: Calentador de aire, 6: Enfriador de aire, 7: Cámara de secado, 8: Ciclón primario, 9: Ciclón secundario, 10: Ventilador de salida de aire, 11: Lecho fluidizado integrado, 12: Sistema de transporte de presión, 13: Ventilador de aire del lecho vibrofluidizado, 14: Lecho vibrofluidizado, 15: Reincorporación de finos, 16: Válvula rotatoria, 17: Filtración de aire.

Las fórmulas infantiles se encuentran dentro de los productos más difíciles de secar, debido a su alto contenido de lactosa y otros carbohidratos. Se recomienda trabajar con temperaturas de entrada del aire entre 160 y 180 °C y secar en una primera etapa hasta un contenido de humedad entre 3 y 4 % y luego, llevar a 2,5 % de humedad en las etapas de lecho fluidizado y enfriamiento, debido a la alta higroscopicidad y pegajosidad del polvo (Písecký, 2012).

El secado spray se realiza con el objetivo de remover agua y, por lo tanto, extender la vida útil del producto, generando a su vez una reducción en el volumen final que conduce a menores costos de almacenamiento y transporte. Además de la disminución de la actividad de agua (a_w), o a consecuencia de ella, durante o luego del secado spray pueden ocurrir otros cambios físicos y químicos en el producto, tales como reacción de Maillard, transición vítrea y cristalización.

Los alimentos en polvo pueden existir en forma amorfa o cristalina, dependiendo del grado de ordenamiento de sus moléculas. Mientras que, en las estructuras cristalinas las moléculas presentan un alto grado de orden y empaquetamiento, en las estructuras amorfas se distribuyen aleatoriamente. Las diferencias en el arreglo molecular de polvos amorfos y cristalinos impactan en muchas de sus propiedades, tales como densidad, higroscopicidad, porosidad interna, fluidez, compresibilidad y solubilidad. Los polvos cristalinos son estables desde el punto de vista termodinámico, mientras que los amorfos no lo son y tienden a pasar al estado cristalino durante

la producción o el almacenamiento (Ho et al., 2017). La transición gradual de un estado al otro se denomina transición vítrea y la velocidad a la que ocurre está determinada por la movilidad molecular, que a su vez depende de la humedad y temperatura (Figura 1.11) (Ho et al., 2017; Schuck, 2017). La transición vítrea ocurre en un rango de temperaturas e induce un cambio en el calor específico del material debido a la movilidad molecular, por lo que puede determinarse por calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde se define tanto la temperatura a la que comienza la transición (T_g inicial) o a la temperatura media del cambio de calor específico (T_g media) (Fitzpatrick et al., 2007).

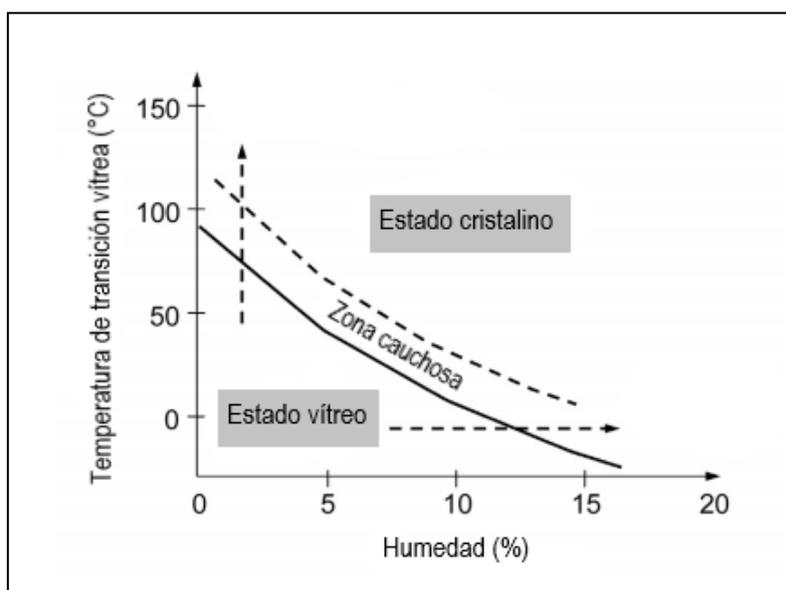


Figura 1.11. Temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua (adaptada de: Schuck (2017)).

Los principales componentes amorfos de los productos lácteos son los carbohidratos y las proteínas, aunque los primeros suelen dominar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los polvos lácteos, debidos a su transición vítrea (Roos, 2002). Muchos sólidos amorfos, tales como la lactosa vítrea, son razonablemente estables, pero al aumentar la movilidad molecular debido a la transición vítrea se pierden sus características de sólido. Además, el estado vítreo tiende a pasar al estado cristalino, que es termodinámicamente más estable, lo que lleva a la cristalización dependiente del tiempo (Roos, 2002).

Otra reacción de gran relevancia para estos productos y operaciones es la reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático, que ocurre entre un azúcar reductor, como la lactosa, glucosa, maltosa, y un grupo amino libre de un aminoácido o proteína (generalmente por reacción con lisina). Las fórmulas infantiles contienen lactosa y proteínas y un pH cercano a la neutralidad que las hacen un muy buen medio para la reacción de Maillard (Nasirpour et al., 2006). La reacción

tiene múltiples consecuencias en el producto, pudiendo afectar sus propiedades sensoriales, por el desarrollo de sabores, olores y pigmentos amarronados (melanoidinas) e inocuidad, por formación de productos con potencial mutagénico. La reacción de Maillard ocurre mediante un mecanismo muy complejo que se esquematiza en la Figura 1.12 y puede dividirse en tres etapas (Ruan et al., 2018):

- Etapla inicial.** Incluye la condensación del azúcar y la amina, la formación de una base de Schiff y la formación de productos del arreglo de Amadori/Heyns.
- Etapla intermedia.** Incluye la deshidratación del azúcar, fragmentación y degradación de aminoácidos. Algunos de los productos de fragmentación se conocen como productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por su sigla en inglés).
- Etapla final.** Los productos intermedios obtenidos en las etapas anteriores se polimerizan formándose pigmentos amarronados de alto peso molecular que contienen nitrógeno, denominados melanoidinas.

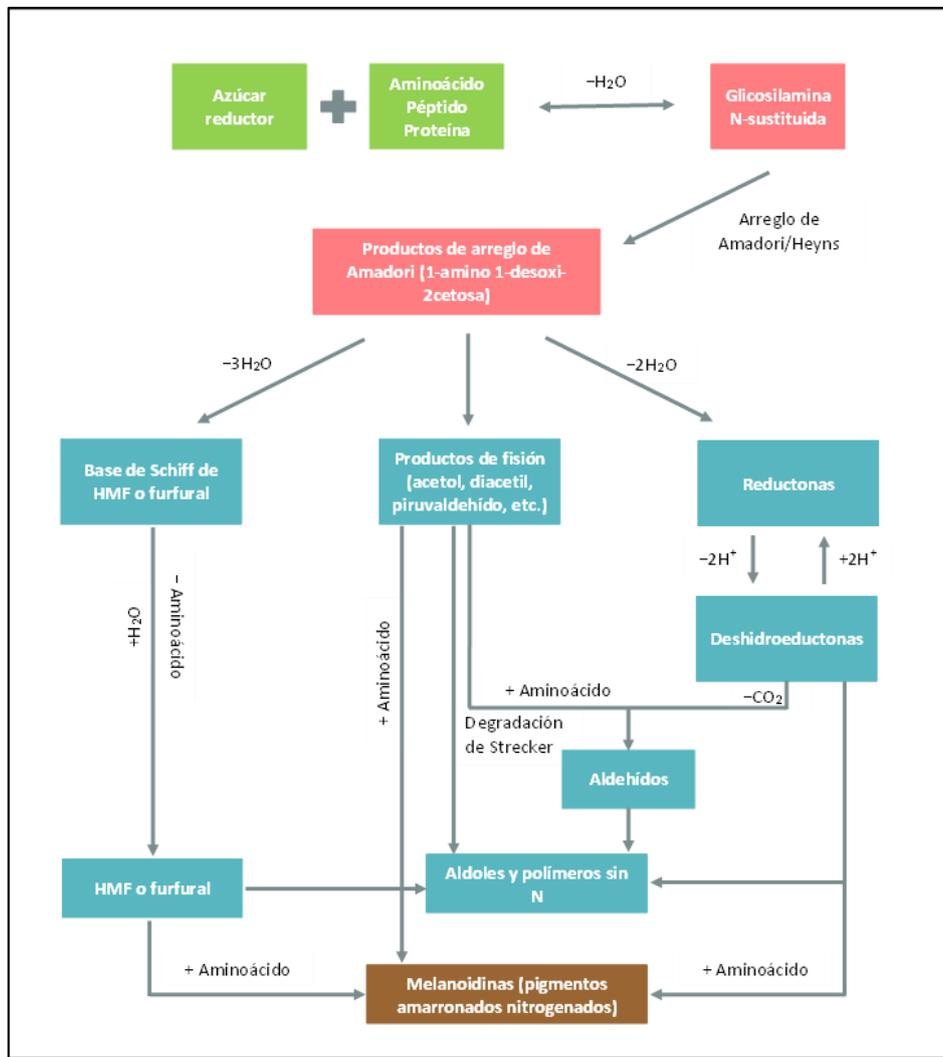


Figura 1.12. Esquema general de la reacción de Maillard (adaptada de: Hodge (1953); Ruan et al. (2018)). HMF: Hidroximetilfurfural.

Varios autores han estudiado el grado de avance de la reacción de Maillard en fórmulas infantiles a través de la cuantificación de furfural, HMF, furosina, carboximetil-lisina o la disminución de lisina disponible (Aalaei et al., 2019; Chávez-Servín et al., 2015; Cheng et al., 2017; Contreras-Calderón et al., 2009). Por otro lado, Ferrer et al. (2000) cuantificaron la lisina disponible durante la producción de fórmulas infantiles y reportaron que la operación de secado spray genera la mayor reducción, por encima de las etapas de pasteurización y esterilización. Zhou & Langrish (2021) revisaron los factores que afectan la cinética de la reacción de Maillard durante el secado spray, incluyendo el tiempo de residencia en el secador, la composición de la alimentación, presencia de oxígeno dentro de la cámara de secado (o su sustitución por nitrógeno), pH, a_w y la Tg (que modifica las propiedades físicas del material, afectando su movilidad molecular y el grado de depósito en las paredes del secador). En el caso particular de las fórmulas infantiles, Schmitz-Schug et al. (2013) reportaron que temperaturas de partículas más elevadas, dadas por temperaturas de aire de salida altas o tiempos de residencia prolongados en el secador spray (debido a la recirculación de partículas o a producto adherido a las paredes de la cámara) provocan pérdida de lisina disponible.

5.2.1.6. Envasado y almacenamiento

Las fórmulas infantiles en polvo se envasan en latas metálicas con films de poliolefina y en atmósfera de nitrógeno, dada su susceptibilidad a la oxidación lipídica, el pardeamiento no enzimático y la cristalización y *caking* (Masum et al., 2020c).

Además de la reacción de Maillard y cristalización de la lactosa mencionadas anteriormente, las fórmulas pueden sufrir oxidación lipídica durante su almacenamiento. Los ácidos grasos poliinsaturados comúnmente incorporados a las fórmulas se oxidan fácilmente a productos secundarios tales como aldehídos, cetonas y alcoholes, que son potencialmente tóxicos y aportan sabores extraños (Cheng et al., 2019). Entre los factores que deben controlarse para aumentar la estabilidad de las fórmulas se encuentran la humedad relativa, temperatura, oxígeno y exposición a la luz (Nasirpour et al., 2006). Zhu et al. (2018) investigaron el efecto de la temperatura de almacenamiento de fórmulas infantiles y concluyeron que a bajas temperaturas la limitante de calidad está dada por la oxidación lipídica mientras que, a temperaturas más altas, si bien ocurre oxidación lipídica, la reacción de Maillard inicia antes.

Durante el almacenamiento a altas HR, las fórmulas absorben agua que actúa como un plastificante disminuyendo la Tg y aumentando la probabilidad de que ésta sea superada durante el almacenamiento. Si la temperatura de almacenamiento de los polvos es mayor a la Tg, ocurre la cristalización de la lactosa, en la que pasa del estado amorfo al cristalino, liberando agua. La cristalización de la lactosa tiene múltiples efectos sobre la calidad del polvo.

La formación de cristales de lactosa puede tener como consecuencia un aumento de la grasa libre superficial, debido a la ruptura de la membrana del glóbulo graso y liberación de los triglicéridos

a la superficie (Kim et al., 2009b). La presencia de lípidos en la superficie los hace muy susceptibles a la oxidación e impacta negativamente en propiedades tecno-funcionales de los polvos, como la fluidez o la rehidratación. El incremento de la grasa libre superficial aumenta la hidrofobicidad en la superficie de la partícula reduciendo su humectabilidad y, por lo tanto, afectando sus propiedades de rehidratación (Kim et al., 2002, 2005). Por otro lado, la presencia de líquidos en la superficie de las partículas, tanto agua como aceite, favorece la formación de puentes líquidos entre ellas en sus puntos de contacto, que producen fuerzas capilares que las unen. Para que un polvo fluya, se debe superar la resistencia a fluir. Por lo tanto, el aumento en la fuerza de atracción particular dado por la formación de puentes líquidos, resulta en polvos con menor fluidez (Fitzpatrick, 2013).

El apelmazamiento de los polvos, conocido como *caking* es un problema común durante el almacenamiento. En los polvos lácteos el *caking* puede deberse a la formación de puentes líquidos o sólidos. Los puentes líquidos pueden formarse por la fusión de compuestos superficiales o por la liberación de líquidos que se encontraban encapsulados dentro de la partícula. Por su parte, los puentes sólidos ocurren por solidificación de puentes líquidos o cristalización de sólidos disueltos. En fórmulas infantiles, el *caking* suele ocurrir por la cristalización de la lactosa, la absorción de agua y la formación de puentes de grasa. La formación de puentes líquidos entre partículas se favorece en fórmulas que contienen mayor concentración de compuestos hidrofílicos y grasa, por ser más susceptibles a la absorción de agua y la fusión de la grasa, respectivamente. Además, altas HR o fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento también favorecen el apelmazamiento. El aumento de temperatura puede generar la fusión de la grasa libre superficial, y, por lo tanto, de puentes líquidos entre las partículas. Luego, una subsecuente reducción de la temperatura generaría la cristalización parcial o completa de esa grasa formándose puentes sólidos (Tham et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivos

Las fórmulas infantiles en polvo son comúnmente producidas por el método wet-mix. Por lo tanto, resulta de interés evaluar cómo impactan las variables del proceso en las propiedades fisicoquímicas, tecno-funcionales y nutricionales, tanto durante la producción, como en el producto final, y su estabilidad durante el almacenamiento. Por otro lado, si bien la leche bovina ha sido ampliamente estudiada, las importantes diferencias composicionales entre las fórmulas infantiles y la leche de vaca resaltan la importancia de estudiar las interacciones que pueden ocurrir entre los componentes de las fórmulas durante el procesamiento, en los niveles relevantes para la producción de fórmulas infantiles. Teniendo en cuenta estas consideraciones se plantean los siguientes objetivos general y específicos.

1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la composición, los parámetros de producción *wet-mix* y las condiciones de almacenamiento de fórmulas lácteas infantiles en polvo, sobre las interacciones entre componentes y su incidencia en las propiedades tecnológicas y funcionales del producto final.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Analizar la incidencia de la presencia de caseína, inulina y lactosa, en proporciones relevantes para la producción de fórmulas infantiles, sobre los cambios conformacionales de las proteínas de suero inducidos por el tratamiento térmico.
- 2.2. Evaluar el efecto de las variables del proceso, nivel de sólidos totales y temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, en las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales de las fórmulas infantiles, a lo largo de su proceso de producción.
- 2.3. Estudiar el efecto del nivel de sólidos totales y temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, en las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de fórmulas infantiles en polvo.
- 2.4. Evaluar la estabilidad de fórmulas infantiles en polvo, obtenidas variando el nivel de sólidos totales y la temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, durante el almacenamiento imitando condiciones de envase cerrado y envase abierto, y estudiar el efecto de las variables de producción y almacenamiento sobre la digestibilidad de las fórmulas.

Para cumplir con los objetivos propuestos, la tesis se dividió en cuatro capítulos experimentales (Capítulos 2 a 5). En la Figura O1.1 se resumió el proceso de producción de fórmulas utilizado en la tesis y las etapas y características que se evaluaron en cada capítulo.

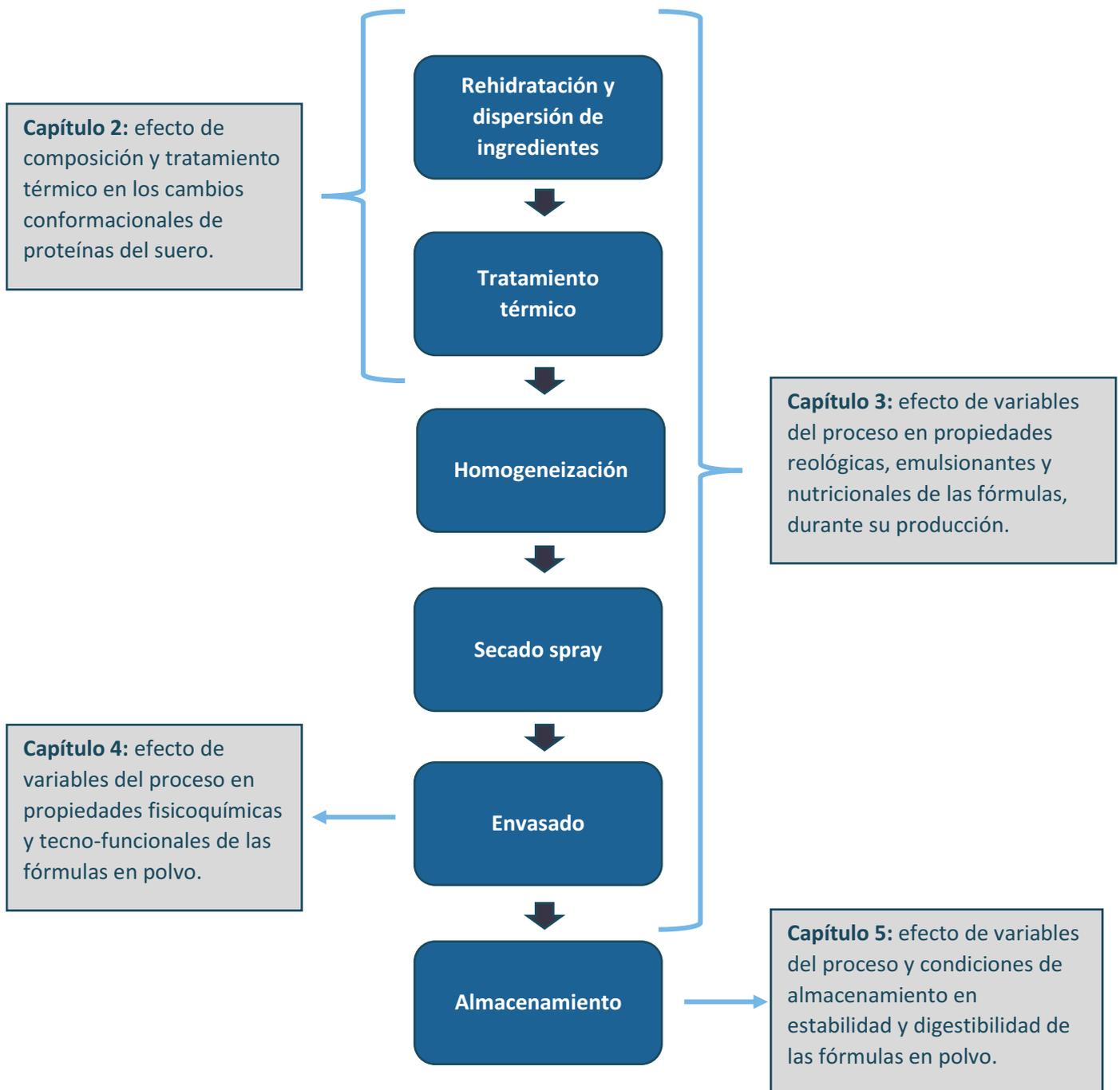


Figura O1.1. Esquema representativo del proceso de producción de fórmulas utilizado en la tesis y las etapas y características evaluadas en cada capítulo.

CAPÍTULO 2:

Efecto de la composición en los cambios conformacionales de las proteínas del suero inducidos por calor

1. Introducción

La leche humana es considerada el mejor alimento para los recién nacidos. Sin embargo, hay algunas situaciones en las que debe sustituirse o complementarse con fórmulas infantiles (Sabater et al., 2016). Las fórmulas infantiles de inicio, destinadas a niños de hasta 6 meses, están normalmente formuladas en base a leche bovina descremada adicionada de WP, lactosa, aceites vegetales, oligosacáridos, vitaminas y minerales, en concentraciones diseñadas para imitar el perfil nutricional de la leche materna. Las importantes diferencias composicionales entre las leches bovina y materna hacen necesaria la suplementación de la primera para la obtención de fórmulas infantiles con el perfil nutricional adecuado. La leche de vaca contiene una concentración de proteína total mayor que la leche humana, por lo que se le suele agregar lactosa, pero también presenta una menor relación WP/caseínas que hace necesaria la fortificación con WP. Otra importante diferencia composicional es la presencia de oligosacáridos, que en la leche humana representan el tercer componente mayoritario, mientras que en la leche bovina se encuentra a nivel de trazas (Fenelon et al., 2018; Kunz & Rudloff, 2008). Los oligosacáridos permitidos en la normativa europea vigente sobre fórmulas infantiles son los galacto-oligosacáridos (GOS) y los fructo-oligosacáridos (FOS) de cadena larga, o inulina con un grado de polimerización superior a 10 (Boehm, 2013; Comisión Europea, 2016).

Durante la producción de fórmulas infantiles, los ingredientes se recombinan, rehidratan y tratan térmicamente (Blanchard et al., 2013). Los tratamientos térmicos se aplican para asegurar la calidad microbiológica y prolongar la vida útil del producto, pero pueden tener efectos indeseados, considerando que las WP son termolábiles y pueden sufrir cambios conformacionales y pérdida de funcionalidad durante el procesamiento (Huppertz, 2016). La β -Lg, WP mayoritaria en la leche de vaca, se desnaturaliza a temperaturas mayores a 65 °C, exponiendo su grupo tiol libre, lo que lleva a la agregación con otras WP o caseínas, a través de intercambios tiol-disulfuro (Fenelon et al., 2018). Estudiar los cambios conformacionales de las WP durante el procesamiento es importante porque éstas pueden tener consecuencias tecnológicas y funcionales, tales como el impacto en las propiedades emulsionantes o en el incremento de viscosidad, que puede generar *fouling* sobre la superficie de los intercambiadores de calor, reduciendo la eficiencia del secado spray y afectando la solubilidad y la densidad aparente del polvo resultante (Anema et al., 2004, 2014; Dapuetto et al., 2019; Q. T. Ho et al., 2019; Petit et al., 2013; Schuck, Méjean et al., 2005). La presencia de otros componentes, tales como lactosa y calcio, la concentración de proteína y el nivel de ST afectan los cambios conformacionales de WP. Anema, Siew et al. (2006) demostraron que aumentar la concentración de lactosa o de componentes solubles no proteicos retrasa la desnaturalización irreversible de β -Lg y α -La, mientras que el nivel de desnaturalización de ambos aumenta con la concentración de proteína en la leche. Anema (2000) también reportó que

aumentar la concentración de sólidos en la leche reduce la desnaturalización de la β -Lg, probablemente debido al incremento en la concentración de lactosa.

Estudios previos han demostrado la actividad chaperona de las caseínas, estabilizando otras proteínas lácteas y no lácteas, previniendo su agregación y pérdida de solubilidad (Kehoe & Foegeding, 2011; Matsudomi et al., 2004; Morgan et al., 2005; O'Kennedy & Mounsey, 2006; Yong & Foegeding, 2010). La interacción entre la inulina y las WP también se ha estudiado. Tobin et al. (2010) produjeron concentrados de WP microparticulados y encontraron que reemplazar parcialmente la lactosa por inulina aumenta la desnaturalización y agregación de las WP y concluyeron que la inulina no protege a las WP de la desnaturalización térmica como lo hace la lactosa. Guo et al. (2018) reportaron que las WP y la inulina interactúan impactando las propiedades gelificantes de las WP. Gao et al. (2019) también reportaron una interacción entre las WP y la inulina durante el calentamiento en sistemas húmedos. Al calentar las WP en presencia de inulina, los autores observaron un aumento de la hidrofobicidad superficial y un descenso en el contenido de grupos sulfhidrilos libres, en comparación con sistemas de WP sin inulina, indicando que la inulina afecta la conformación de las WP y favorece la agregación. Sin embargo, los reportes sobre la interacción entre caseína, inulina y lactosa con las WP, a las concentraciones encontradas durante la elaboración de fórmulas infantiles, son muy limitadas.

Las diferencias composicionales entre la leche bovina y las fórmulas infantiles y la presencia de componentes en las fórmulas que están naturalmente ausentes en la leche de vaca, como los oligosacáridos, resaltan la importancia de estudiar el efecto que cada componente ejerce en los cambios conformacionales de las WP, en los niveles comúnmente encontrados en las fórmulas infantiles. Además, los avances tecnológicos han permitido la separación y purificación de los componentes de la leche, permitiendo desacoplarlos y estudiar el efecto que ejercen tanto individual como combinadamente.

2. Objetivo

Analizar la incidencia de la presencia de caseína, inulina y lactosa, en proporciones relevantes para la producción de fórmulas infantiles, sobre los cambios conformacionales de las proteínas de suero inducidos por el tratamiento térmico

Para poder dar cumplimiento al objetivo planteado, este capítulo se dividió en dos partes. En una primera etapa se realizaron ensayos preliminares para poner a punto el método de cuantificación de la proteína soluble y definir la composición de los sistemas modelo y tratamientos térmicos a evaluar (Parte I). La Parte II del capítulo, describe el estudio completo realizado en función de los resultados preliminares y consta de la descripción de los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, la discusión general de resultados y las conclusiones del capítulo.

3. Parte I: Ensayos preliminares

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales

Para la preparación de los sistemas modelo se utilizaron como ingredientes: WPI (Provon® 292, Glanbia Nutritionals Inc, Fritchburg, USA), caseinato de calcio (Lactoprot, Kaltenkirchen, Alemania), lactosa (Variolac® 850, Arla, Viby J, Dinamarca) e inulina con grado de polimerización promedio ≥ 10 (Orafiti® GR, Beneo, Tienen, Bélgica). El contenido de proteína bruta (Nitrógeno total $\times 6,38$) determinado por el método de Kjeldahl (International Organization for Standardization, 2014) fue 86,99 % (p/p) en el WPI, 88,39 % (p/p) en el caseinato de calcio y 2,03 % (p/p) en la lactosa.

3.1.2. Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon dispersiones acuosas conteniendo WPI solo y con el agregado de caseinato de calcio, lactosa o inulina y todas sus combinaciones. Los cálculos de las concentraciones de los componentes individuales se realizaron de manera de obtener 25 % (p/v) de sólidos totales en una mezcla húmeda con la formulación completa (WP, caseínas, lactosa, inulina y aceite), pero el aceite fue excluido del presente estudio. La concentración de los componentes individuales se calculó en base a la normativa europea vigente (Comisión Europea, 2016). En todos los sistemas modelo se mantuvieron fijas las relaciones másicas proteína total:lactosa = 1:5 y WP:caseína = 60:40. La concentración de inulina utilizada corresponde al máximo nivel permitido de oligosacáridos totales en la normativa europea (Comisión Europea, 2016).

Considerando el nivel de proteína total de cada componente, los insumos previamente pesados (Tabla 2.1) se agregaron lentamente a aproximadamente 300 mL de agua destilada a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) con agitación magnética. El orden de agregado de los componentes fue el siguiente: WPI-Caseinato de calcio-Lactosa-Inulina. Una vez incorporados los componentes, se agregó agua hasta un volumen final de 500 mL y se continuó agitando durante 30 min.

Tabla 2.1. Composición de los sistemas modelo.

Sistema modelo	Proteína del suero (% p/p) ¹	Proteína de caseína (% p/p) ²	Lactosa (% p/p) ³	Inulina (% p/p)	Sólidos totales (% p/p)
WP	1,8	0,0	0,0	0,0	2,1
WP-CAS	1,8	1,2	0,0	0,0	3,4
WP-INUL	1,8	0,0	0,0	1,5	3,6
WP-CAS-INUL	1,8	1,2	0,0	1,5	4,9
WP-LAC	1,8	0,0	15,1	0,0	17,2
WP-CAS-LAC	1,8	1,2	15,1	0,0	18,5
WP-INUL-LAC	1,8	0,0	15,1	1,5	18,8
WP-CAS-INUL-LAC	1,8	1,2	15,1	1,5	20,1

¹Corresponde al contenido de proteína en el ingrediente WPI agregado. ²Corresponde al contenido de proteína en el ingrediente caseinato de calcio agregado. ³Corresponde al contenido de la lactosa en el ingrediente lactosa agregado.

3.1.3. Tratamientos térmicos

Las muestras se dividieron en submuestras de 40 mL en tubos Falcon de 50 mL de capacidad. Cada una de las submuestras se sometió a los siguientes tratamientos: 66 °C-30 min, 66 °C-60 min, 75 °C-30 min, 75 °C-60 min, 85 °C-30 min, 85 °C-60 min y sin tratamiento térmico (STT). El mínimo tratamiento térmico (66 °C-30 min) se seleccionó por corresponder a la pasteurización en *batch* para productos lácteos con un nivel de sólidos totales superior a 18 % (FDA, 2017). Los tratamientos térmicos se realizaron en baño de agua con agitación (JP Selecta, Barcelona, España). Una vez cumplido el tiempo de calentamiento, las muestras se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se llevaron a cámara de refrigeración (2 °C) por 16 h.

3.1.4. Solubilidad proteica

La solubilidad proteica en los sistemas modelo se determinó de acuerdo con la Ecuación 2.1.

$$\text{Solubilidad proteica} \left(\%, \frac{m}{m} \right) = \frac{\text{Contenido de proteína soluble}}{\text{Contenido de proteína total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde: el contenido de proteína total se calculó como la suma del contenido de proteína total determinada por Kjeldahl (ISO, 2001) de cada uno de los ingredientes presentes en el sistema y el contenido de proteína soluble se determinó por el método de Bradford (1976).

3.1.5. Cuantificación de proteína soluble

Para la cuantificación de proteína soluble, cada sistema modelo se centrifugó en una centrífuga Spectrafuge 24D (Labnet, Edison, New Jersey, Estados Unidos) durante 20 min a 10.000×g a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) y se midió el contenido de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford (1976).

Capítulo 2

3.1.5.1. Preparación de reactivo de Bradford

Cien mg de Coomassie Azul Brillante G250 (Merck, Burlington, Massachusetts, USA) se diluyeron en 50 mL de etanol 95 % (v/v) y 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/p), antes de llevar a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. El reactivo se conservó al resguardo de la luz.

3.1.5.2. Procedimiento analítico

Cien μL de una dilución correspondiente del sobrenadante y 1000 μL de reactivo de Bradford, previamente filtrado a través de papel Whatman N°1, se mezclaron en un tubo Eppendorf. La mezcla se dejó 10 min en reposo y luego se midió la absorbancia a 595 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-2550, Tokio, Japón). Para el cálculo de la concentración de proteína soluble se utilizaron distintas curvas de calibración según la composición proteica del sistema modelo.

3.1.5.3. Curvas de calibración

Se prepararon soluciones estándar de BSA (Merck, Estados Unidos) de concentración 0,35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, WP (WPI, Provon® 292, Glanbia Nutritionals Inc, Estados Unidos) de concentración 0,36 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, caseína (caseinato de calcio, Lactoprot, Alemania) de concentración 0,31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y WP:Caseína en relación 60:40 (0,15 μg WPI/ μL y 0,096 μg caseinato de calcio/ μL), en agua destilada.

En tubos Eppendorf se agregaron volúmenes de solución patrón de entre 0 y 100 μL y el volumen de agua destilada correspondiente para completar 100 μL . En cada tubo se agregaron 1000 μL de reactivo de Bradford, se agitó y se midió la absorbancia a 595 nm luego de 10 min de reposo. Cada punto de las curvas se determinó por triplicado. Se obtuvieron las cuatro curvas de calibración ($A_{595\text{nm}}$ en función de los μg de proteína), que se utilizaron para el cálculo del contenido de proteína soluble. Las curvas de calibración se obtuvieron por análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados utilizando el software OriginPro 2018 (OriginLab, Massachusetts, Estados Unidos).

La BSA es comúnmente utilizada como estándar para la construcción de las curvas de calibración debido a que está disponible en su forma pura y su precio es accesible. Además, el hecho de ser ampliamente utilizada facilita la comparación con resultados de estudios previos. Sin embargo, la utilización de BSA como estándar puede subestimar el contenido proteico porque presenta una tinción inusualmente alta en el ensayo de Bradford. Por otro lado, la respuesta del método a las distintas proteínas es muy variable (Kruger, 2002). Por lo tanto, teniendo en cuenta que en este estudio la composición proteica difiere entre los distintos sistemas modelo, se decidió cuantificar la proteína soluble en cada sistema, utilizando una curva construida con una solución de igual composición proteica que el sistema en cuestión. En la Figura 2.1 se presentan las curvas de calibración obtenidas para cada solución patrón. La curva de calibración obtenida con la solución patrón de BSA obtuvo la mayor pendiente, mientras que, para una concentración dada de proteína total, la curva de WPI presentó una absorbancia mucho menor. Por lo tanto, la utilización de una

curva de BSA para todos los sistemas modelo redundaría en una subestimación del contenido de proteína.

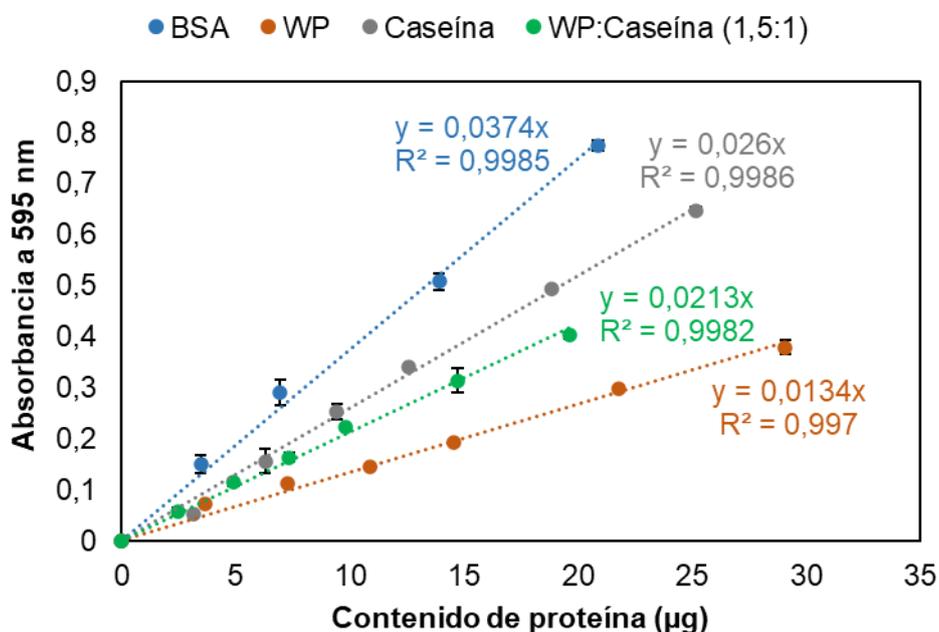


Figura 2.1. Curvas de calibración para el método de Bradford obtenidas con soluciones patrón de BSA, WP, caseína y WP:Caseína relación 1,5:1.

Las barras representan la desviación estándar (n = 3).

3.1.5.4. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para comparar los resultados entre los distintos sistemas o tratamientos. Se aplicó el test de Tukey ($P < 0,05$) para detectar diferencias significativas entre sistemas o tratamientos. Los análisis de datos se realizaron con el software Infostat 2020 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3.2. Resultados

En esta etapa, se prepararon sistemas modelo conteniendo WP acompañadas o no de caseína, lactosa e inulina. Los sistemas modelo se sometieron a distintos tratamientos térmicos y se cuantificó la solubilidad proteica.

3.2.1. Efecto de la composición de los sistemas modelo en la pérdida de solubilidad proteica

Los sistemas modelo sin tratar térmicamente (STT) con mayor solubilidad proteica fueron WP ($89,3 \pm 2,0$ % p/p) y WP-INUL ($89,6 \pm 1,8$ % p/p). Tanto el agregado de caseinato como de lactosa provocaron una reducción significativa de la solubilidad (Figura 2.2). El sistema CAS presentó una solubilidad de $102,0 \pm 9,3$ % p/p. La alta solubilidad de este sistema indica que la reducción

de solubilidad obtenida en los sistemas que contenían caseína no se debe a una menor solubilidad del caseinato, sino a interacciones entre las WP y las caseínas. La lactosa se encuentra en una proporción muy alta, en consecuencia, los sistemas que contienen lactosa presentan niveles de ST (18,7–20,4 %) considerablemente mayores que los sistemas sin LAC (1,4–4,9 %) (Tabla 2.1). Por lo tanto, la pérdida de solubilidad puede explicarse por una menor proporción de agua disponible para solubilizar las proteínas.

El sistema WP-CAS-LAC-INUL presentó la menor solubilidad ($63,2 \pm 2,3$ % p/p). Este sistema contiene los cuatro componentes y, por lo tanto, tiene el mayor nivel de ST y la menor cantidad de agua disponible para la solubilización proteica. La inulina no pareció afectar la solubilidad de las WP en ninguno de los sistemas modelo ensayados.

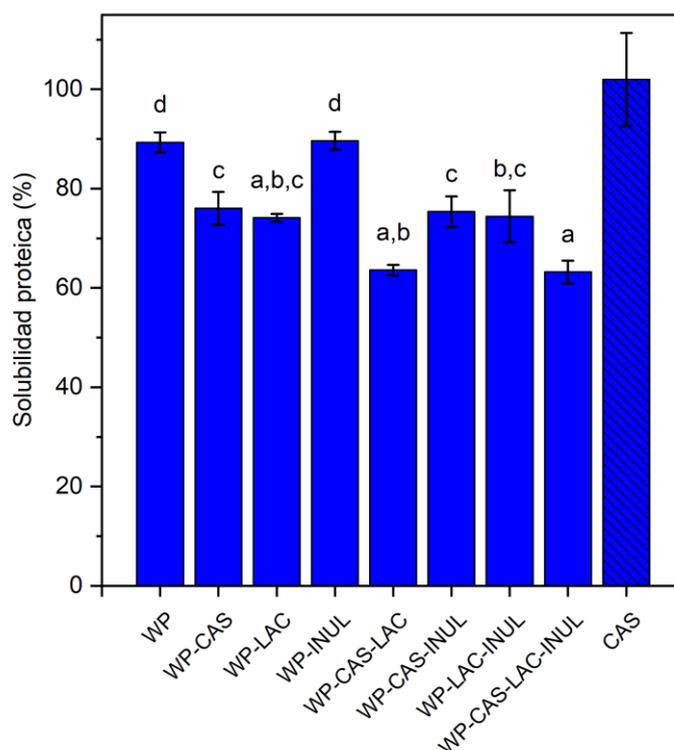


Figura 2.2. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin tratar térmicamente.

Las barras representan la desviación estándar ($n = 2$). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sistemas. La solubilidad del sistema CAS no se incluyó en el ANOVA.

3.2.2. Efecto del tratamiento térmico en la pérdida de solubilidad proteica de los sistemas modelo

En la Figura 2.3 se presentan los resultados del efecto del tratamiento térmico sobre los sistemas conteniendo WP. La solubilidad del sistema WP aumentó al tratarlo térmicamente a 66 °C. El tratamiento a 75 °C-30 min redujo la solubilidad en un 39 %, luego se observó una disminución paulatina con el incremento de la intensidad del tratamiento térmico (Figura 2.3A).

El sistema WP-LAC presentó una pérdida de solubilidad mucho menor que WP hasta el tratamiento a 75 °C-60 min (12 % respecto a la solubilidad inicial) y se observó un descenso drástico luego del tratamiento a 85 °C.

Por otro lado, la presencia de inulina no redujo la pérdida de solubilidad de las proteínas del suero. La solubilidad del sistema WP-INUL se mantuvo estable hasta el tratamiento 75 °C-30 min que produjo una reducción del 24,4 %. A su vez, el sistema WP-LAC-INUL presentó un comportamiento similar al de WP-LAC, sin embargo, en WP-LAC-INUL se observó una reducción significativa ($P < 0,05$) de la solubilidad luego del tratamiento a 75°C-60 min que no se obtuvo en WP-LAC (Figura 2.3.A).

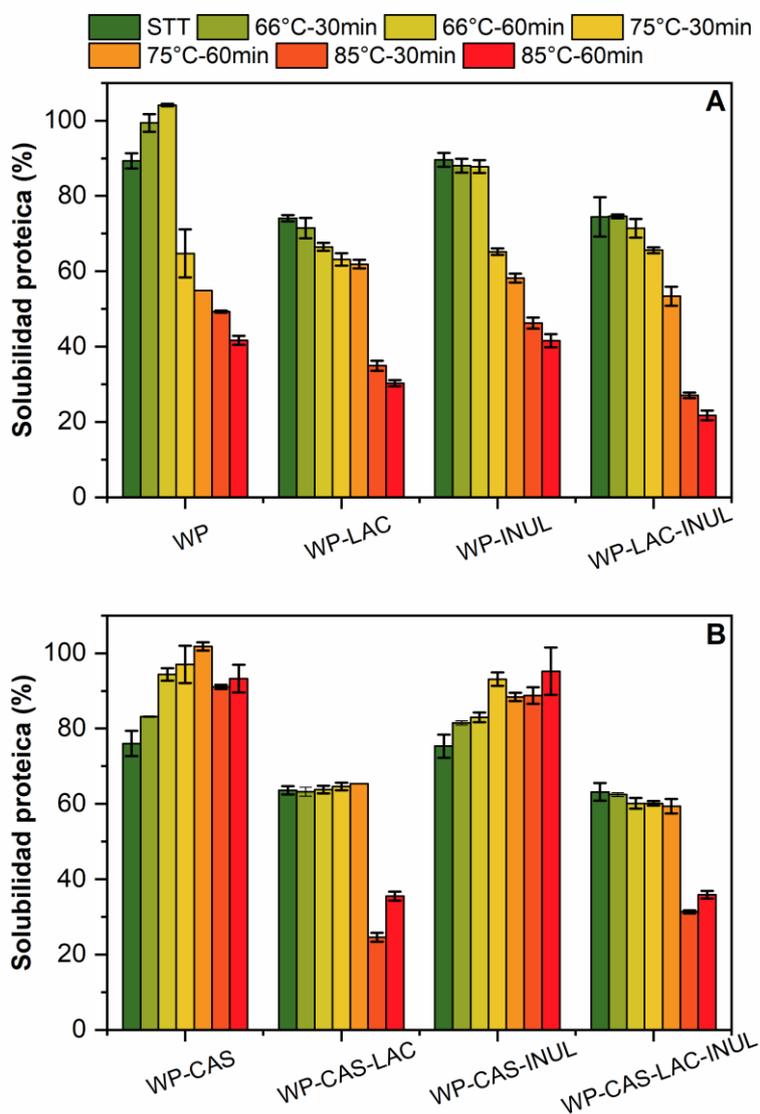


Figura 2.3. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin caseína (A) y con caseína (B) sin tratar térmicamente (STT) y tratado térmicamente a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min.

Las barras representan la desviación estándar (n = 2).

Para evaluar el efecto del agregado del caseinato fue necesario estudiar la solubilidad y estabilidad térmica de un sistema compuesto únicamente por caseinato de calcio (CAS). Como se observa en la Figura 2.4, este sistema mantuvo una solubilidad cercana al 100 % que no varió significativamente ($P > 0,05$) al aplicar los distintos tratamientos térmicos. Este resultado se explica por la alta estabilidad térmica de las caseínas, las cuales no son susceptibles a desnaturalización térmica. Se ha reportado que el caseinato de sodio puede ser sometido a temperaturas superiores a 140 °C por más de 1 h sin observarse ningún cambio fisicoquímico (Fox et al., 2015). En los sistemas WP-CAS y WP-CAS-INUL se observó un incremento de la solubilidad proteica al aumentar la intensidad del tratamiento. Al comparar los resultados de WP-CAS y WP-CAS-INUL con sistemas similares sin caseinato (WP y WP-INUL), se observa claramente que en presencia de caseinato no hay una pérdida drástica de la solubilidad luego del tratamiento 75 °C-30 min. Incluso luego de un tratamiento muy severo como el de 85 °C-60 min el sistema WP-CAS presentó una solubilidad del 93,2 % (52 % más alta que la de WP luego del mismo tratamiento) y WP-CAS-INUL una solubilidad del 95,2 % p/p (53 % más alta que la de WP-INUL luego del mismo tratamiento) (Figura 2.3B). Cabe señalar que en estas muestras la medida de solubilidad involucra no solo a WP sino también a las caseínas.

Por último, en los sistemas con caseinato y lactosa (WP-CAS-LAC y WP-CAS-LAC-INUL) la solubilidad se mantuvo constante ($P > 0,05$) con los tratamientos a temperaturas igual o inferior a 75 °Cmin y presentó una reducción al tratarlos a 85 °C (Figura 2.3B).

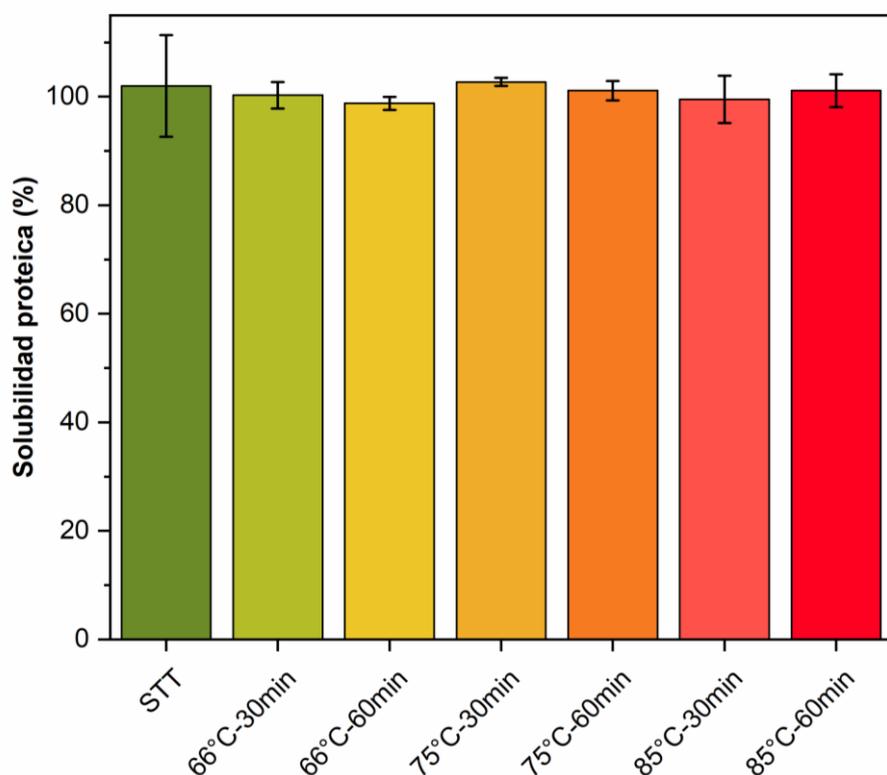


Figura 2.4. Solubilidad proteica del sistema modelo CAS sin tratar térmicamente (STT) y tratado a 66, 75 y 85 °C por 30 y 60 min.

Las barras representan la desviación estándar (n = 2).

3.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que, en ausencia de caseína y de lactosa, los sistemas modelo presentan una marcada reducción de la solubilidad proteica al aumentar la temperatura del tratamiento térmico de 66 a 75 °C. A su vez, en líneas generales se observó que los mayores cambios en la solubilidad ocurrieron al modificar la temperatura, por lo que se optó por utilizar la temperatura como único factor, fijando el tiempo del tratamiento en 30 min. Entonces, en función de los resultados preliminares, se decidió incorporar una temperatura intermedia (70 °C), para poder evaluar los cambios que ocurren entre 66 y 75 °C. y suprimir la temperatura 85 °C, dado que un tratamiento térmico a 85 °C-30 min, resulta muy intenso y no representativo de cambios que podrían encontrarse a nivel industrial.

4. Parte II: Efecto de la caseína, lactosa e inulina en los cambios conformacionales de las proteínas del suero inducidos por calor.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Materiales

Los sistemas modelo se prepararon utilizando los mismos materiales (WPI, caseinato de calcio, inulina y lactosa) que en el ensayo preliminar (3.1.1).

4.1.2. Preparación de los sistemas modelo

Los sistemas se prepararon de igual forma que en la Parte I (3.1.2), con la diferencia de que una vez completada la adición de todos los ingredientes, los sistemas se agitaron durante 60 min. La composición de los sistemas modelo es la misma que la utilizada en los ensayos preliminares, que se presentó en la Tabla 2.1. El pH (pHmetro SevenMulti, Mettler Toledo, Ohio, Estados Unidos) de los distintos sistemas modelo fue $6,2 \pm 0,3$.

4.1.3. Tratamientos térmicos

Las muestras se dividieron en submuestras de 40 mL en tubos Falcon de 50 mL de capacidad. Los tubos se colocaron en baño de agua (JP Selecta, Barcelona, España) con una velocidad de agitación de 60 u, a temperaturas de 66, 70 o 75 °C, según correspondiera, por 30 min. El tiempo de calentamiento se contabilizó desde que la muestra en el interior del tubo alcanzó la temperatura deseada. La velocidad de calentamiento de los sistemas fue 1,6-2,1 °C/min.

Una vez cumplido el tiempo de calentamiento, las muestras se enfriaron rápidamente en baño de hielo para finalizar el tratamiento térmico y se llevaron a cámara de refrigeración (2 °C) por 16 h, junto con los sistemas STT. Al cabo de dicho tiempo, se tomaron muestras para determinar la solubilidad proteica en los sistemas modelo y la muestra sobrante se congeló y liofilizó (VirTis Benchtop K, SP Industries, Pennsylvania, Estados Unidos) para su análisis posterior.

4.1.4. Distribución de tamaño de partícula

Los sistemas modelo liofilizados se dispersaron al 1 % (p/v) en una solución simulada de ultrafiltrado de leche (SMUF) a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) y se agitaron durante 1 hora. El SMUF se preparó como una solución en agua milliQ de las sales en las concentraciones presentadas en la Tabla 2.2, ajustando el pH a 6,7 con KOH, de acuerdo con el método de Jenness & Koops (1962).

Tabla 2.2. Composición del simulado de ultrafiltrado de leche (SMUF).

Componente	Concentración (mM)
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	11,71
Citrato tripotásico hidrato (K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O)	3,70
Citrato trisódico dihidrato (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	6,09
Sulfato de potasio (K ₂ SO ₄)	1,03
Cloruro de calcio dihidrato (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	8,98
Cloruro de magnesio hexahidrato (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	3,21
Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃)	2,17
Cloruro de potasio (KCl)	8,05

La distribución de tamaño de partícula (DTP) de cada sistema, ponderada por intensidad, se determinó por dispersión dinámica de luz (*dynamic light scattering*, DLS).

La determinación de la DTP por DLS se basa en que las partículas suspendidas en líquidos se encuentran en movimiento browniano debido a las colisiones aleatorias con las moléculas del solvente. Este movimiento causa la difusión de las partículas a través del medio y el coeficiente de difusión, D , es inversamente proporcional al tamaño de partícula, según la ecuación de Stokes-Einstein (Particulate Systems, 2012):

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde: D es el coeficiente de difusión, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad y d es el diámetro hidrodinámico.

La Ecuación 2.2 muestra que, para partículas grandes, D es relativamente chico y, por lo tanto, las partículas se moverán más lentamente. Entonces, es posible determinar el tamaño de partícula a partir de la observación de su movimiento y la determinación del coeficiente de difusión en un medio líquido. Cuando una luz láser es dirigida a las partículas, la luz es dispersada en todas las direcciones. La luz dispersada que se observa proviene de la colección de elementos dentro de un volumen de dispersión definido por el ángulo y las aperturas de detección. La intensidad de una luz dispersada observada a cualquier instante será el resultado de la interferencia de la luz dispersada por cada elemento y, por lo tanto, dependerá de la posición relativa de los elementos. Si las partículas están en movimiento, las posiciones relativas de los elementos varían con el tiempo, observándose fluctuaciones en la intensidad con el tiempo. Como las partículas en movimiento browniano se mueven aleatoriamente, las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada también serán aleatorias. Las fluctuaciones ocurrirán rápidamente para partículas pequeñas que se mueven a alta velocidad y más lentamente para partículas de mayor tamaño que se mueven a menor velocidad (Particulate Systems, 2012). La luz dispersada a un ángulo determinado se detecta y analiza para generar una función de autocorrelación normalizada de primer orden ($g^{(1)}(\tau)$), que para partículas esféricas monodispersas de tamaño mucho menor que

la longitud de onda del haz incidente se representa por la Ecuación 2.3 (Murphy, 1997). La intensidad de la luz dispersada depende de la posición de las partículas en el volumen analizado: a tiempos cortos la correlación es alta porque la posición de las partículas está muy relacionada con la posición al tiempo anterior y a tiempos largos la correlación es menor, lo que hace que la función de autocorrelación decaiga con el tiempo (Ahijado Guzmán, 2013).

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-Dq^2\tau} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde: τ es el tiempo de decaimiento, D es el coeficiente de difusión de la partícula y $q = (4\pi n/\lambda_0) \cdot \text{sen}(2\theta)$, es el vector de dispersión de la luz, que es función del índice de refracción del solvente (n), la longitud de onda del haz incidente (λ_0) y el ángulo de dispersión (θ).

Las determinaciones se realizaron a 25 °C luego de 60 s de equilibración en celda de vidrio, en un equipo Nano-Plus 3 (Particulate Systems, Georgia, Estados Unidos), con un ángulo de dispersión de 165° y una longitud de onda de 663 nm. Este equipo mide el tamaño de partícula de muestras en suspensión en un rango de 0,6 nm a 10 μm . Se consideró una viscosidad de solvente de 0,89 mPa.s y un índice de refracción de 1,33 (Crowley et al., 2016). Cada sistema se analizó por triplicado y en cada réplica se tomaron tres medidas con un tiempo de acumulación de 50.

4.1.5. Perfil proteico por SDS-PAGE

El perfil proteico de los sistemas modelo antes (STT) y después de los tratamientos térmicos se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras, según el método de Laemmli (1970).

El método se basa en que la movilidad electroforética de las proteínas depende de su tamaño, conformación y carga neta. Se utiliza poliacrilamida como un soporte que colabora con la separación de las proteínas debido a su porosidad que actúa como un tamiz, y presenta varias ventajas como, alta reproducibilidad, estabilidad, transparencia, elasticidad, porosidad comprobable y compatibilidad con un gran número de compuestos químicos. La matriz de poliacrilamida se forma por copolimerización de acrilamida y bis-acrilamida, en presencia de tetrametiletildiamina (TEMED) y persulfato de amonio. La porosidad de la acrilamida puede regularse ajustando las condiciones de reacción y la concentración de los monómeros. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) es la más comúnmente utilizada. En presencia de SDS las proteínas se desnaturalizan y se cargan negativamente, obteniéndose una relación relativamente constante de carga/masa para las distintas proteínas, lo que permite su separación por peso molecular (PM) (Moronta, 2015).

Las muestras se incuban en un buffer de muestra que puede o no contener β -mercaptoetanol. Las muestras incubadas en presencia de β -mercaptoetanol corresponden a corridas en condiciones reductoras, porque este compuesto reduce los enlaces disulfuro. Por otro lado, si las muestras se incuban en un buffer que no contiene un agente reductor, la corrida corresponde a condiciones no reductoras.

La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y no reductoras en un Mini Protean II Dual Slab Cell (BIO-RAD, California, Estados Unidos). Se prepararon geles separadores y de apilamiento de 12 y 4 % acrilamida, respectivamente. Se utilizó un buffer de corrida pH= 8,3, conteniendo Tris 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS 0,1 %. Los sistemas modelo liofilizados se reconstituyeron en buffer de muestra (SDS 6 %, glicerol 30 % y azul de bromofenol 0,03 %) con y sin β -mercaptoetanol, en una relación 150 μ g proteína soluble total en la muestra/500 μ L. Se sembraron 6-10 μ L muestra y 4 μ L de marcador de bajo peso molecular (GE Healthcare 17044061, Illinois, Estados Unidos), que incluía: fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20 kDa) y lisozima (14 kDa). Se utilizó Commassie Brilliant Blue R250 como agente colorante.

4.1.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se utilizó para evaluar los cambios en la estructura secundaria de las WP por acción del tratamiento térmico, en los distintos sistemas modelo.

Los espectrómetros infrarrojos (IR) producen luz IR dentro de un rango de longitudes de onda y monitorean las vibraciones que exhiben las moléculas bajo esta luz. Como resultado del análisis se obtiene un espectro de IR de la muestra analizada, que es una secuencia de picos o bandas de absorción en un intervalo de frecuencias dentro del IR. Cada pico representa un tipo de vibración ocurrida en un enlace atómico cuando el haz de luz IR interactúa con la muestra (Mondragón Cortez, 2020).

En la Figura 2.5 se representa esquemáticamente un espectrómetro FT-IR, que consiste esencialmente de una fuente que produce una luz IR, un interferómetro para generar un rango de números de onda y un detector para registrar la señal. El interferómetro está compuesto por un espejo fijo y uno móvil y un divisor de haz, que divide el haz IR y lo recombina para producir distintas longitudes de onda IR. Una serie de espejos se utilizan para desviar el haz. El láser actúa como referencia temporal para la recopilación de datos. El detector registra la señal como un interferograma, que luego es sometido a una transformación de Fourier resultando un espectro de un solo haz. La transformada de Fourier es una función matemática que convierte los datos a un formato más significativo de absorbancia/transmitancia sobre una forma de frecuencia/longitud de onda. A partir de un espectro de un único haz del *background* y de la muestra se utilizan para obtener un espectro IR de la muestra (Subramanian et al., 2011).

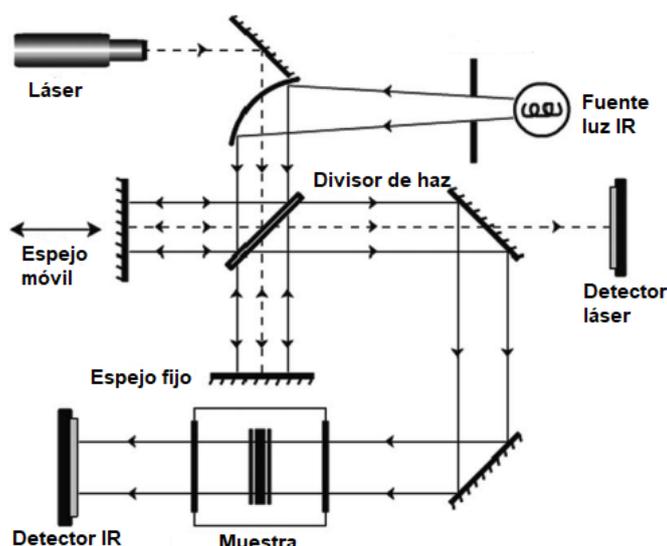


Figura 2.5. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrómetro FT-IR (adaptada de: Subramanian et al. (2011)).

La espectroscopía del IR medio por transformada de Fourier monitorea la vibración fundamental y estiramiento rotacional de las moléculas y produce un perfil químico de la muestra. La región del IR medio ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) es una región muy robusta y reproducible del espectro electromagnético en el que pequeñas diferencias en la composición de las muestras pueden medirse de forma confiable (Subramanian et al., 2011). El IR medio refleja la composición bioquímica total de la muestra, con bandas correspondientes a los principales constituyentes celulares, tales como agua, lípidos, polisacáridos, ácidos, etc.

- i. En la región $4000\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ se obtienen bandas correspondientes a estiramientos vibracionales de los enlaces O—H de grupos hidroxilo y N—H de grupos amida A de proteínas (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2009). El enlace hidroxilo del agua genera una banda muy amplia e intensa entre 3500 y 3200 cm^{-1} , mientras que la banda correspondiente a este mismo enlace, pero en otra molécula, tiene forma puntiaguda y es poco intensa (Mondragón Cortez, 2020).
- ii. La región $3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ contiene bandas correspondientes al estiramiento vibracional del enlace C—H de los grupos funcionales —CH_3 y >CH_2 (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2009).
- iii. En la región $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ del espectro usualmente no aparecen bandas y, en caso de aparecer, corresponden a enlaces triples $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{O}$ o $\text{C}\equiv\text{N}$, que no suelen ser relevantes para la interpretación del espectro (Mondragón Cortez, 2020).

- iv. La región $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, llamada la región de los dobles enlaces, corresponde principalmente a los enlaces de vibración $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{O}$. La banda asociada al enlace $\text{C}=\text{O}$ es intensa y aparece entre 1830 y 1650 cm^{-1} , dependiendo del compuesto (Mondragón Cortez, 2020).
- v. El rango del espectro entre 1250 y 800 cm^{-1} consiste en señales de fosfodiésteres y carbohidratos (Subramanian & Rodríguez-Saona, 2009).
- vi. La región $1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ presenta bandas que son producto de varios tipos de vibraciones de enlace, lo que dificulta asignar su origen, pero contiene señales características y distintivas de cada muestra, por lo que es conocida como la región de la huella dactilar (Mondragón Cortez, 2020; Subramanian & Rodríguez-Saona, 2009).

En la presente tesis se utilizó la técnica de muestreo reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés “*attenuated total reflectance*”), que es muy versátil, adaptándose a cualquier presentación de muestra. Un accesorio ATR (Figura 2.6) consta principalmente de un cristal de alto índice de refracción (n_1), que no absorbe radiación IR. La muestra, con índice de refracción n_2 , se coloca sobre el accesorio en contacto con la superficie del cristal. La radiación IR incide a través del cristal, y de ahí a la interfase (cristal-muestra). Una fracción de esta radiación penetra la muestra y, parte de ella, es selectivamente absorbida a determinadas frecuencias mientras que el resto de la radiación sale hacia el detector del espectrofotómetro (Mondragón Cortez, 2020). La utilización de ATR presenta varias ventajas tales como que permite obtener espectros de muestras de cualquier estado físico (sólido, líquido, gas), permite medir muestras en polvo, evitando problemas de dispersión o alta absorción debido a que el haz de IR penetra de forma tenue (atenuada) y en varias ocasiones (múltiples reflexiones internas), y no requiere dilución de la muestra (Mondragón Cortez, 2020).

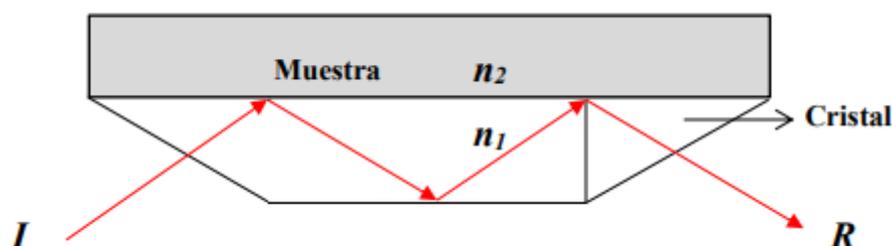


Figura 2.6. Representación del accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) (adaptada de: Mondragón Cortez (2020)).

I = radiación incidente, R = radiación reflejada, n_1 = índice de refracción del cristal, n_2 = índice de refracción de la muestra.

Los sistemas modelo sometidos a los distintos tratamientos térmicos y posteriormente liofilizados (muestras sólidas en polvo) fueron analizados por FT-IR con reflectancia total atenuada (ATR/FT-IR) en un espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). El cristal utilizado en el accesorio ATR fue diamante. Los análisis se realizaron en el rango 4000–650 cm^{-1} , a temperatura ambiente, con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Para mejorar la relación señal/ruido se hicieron 32 escaneos por espectro. Se calculó la derivada segunda de los espectros promedio utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay con un suavizado de 9 puntos. Este procedimiento se utilizó para aumentar el número de características discriminativas dentro de las amplias bandas espectrales, facilitar la asignación de bandas y minimizar los problemas debidos a los cambios en la línea de base (Naumann, 2000). Para el estudio de los cambios conformacionales de las WP se analizaron las regiones correspondientes a amida I (1700-1600 cm^{-1}), amida II (1600-1480 cm^{-1}) y amida III (1320-1220 cm^{-1}). Dentro de la región amida I, las bandas obtenidas en las derivadas segundas de los espectros se asignaron a distintos tipos de estructura secundaria, de acuerdo con información bibliográfica reportada para proteínas globulares (Tabla 2.3), lo que derivó en la identificación de cinco bandas principales.

Tabla 2.3. Asignación de bandas en la región amida I según información bibliográfica.¹

Estructura	Pico (cm^{-1})	Región (cm^{-1})
α -hélice	1652	1656 – 1646
Giros β	1674	1679 – 1667
<i>Random coil</i>	1645	1646 – 1639
Hoja plegada β intermolecular	1693, 1688	1697 – 1675
Hoja plegada β intramolecular	1636	1639 – 1631
Hoja plegada β antiparalela intermolecular	1628, 1624, 1617	1631 - 1610

¹(Grewal et al., 2018; Haque et al., 2015; Markoska et al., 2019; Murphy et al., 2014; Rahaman et al., 2015).

Para determinar la heterogeneidad y/o variabilidad de los espectros se realizaron distintos análisis de conglomerados o *clusters*. El análisis de *clusters* es una técnica sencilla cuyo principal objetivo es establecer similitudes y diferencias entre los espectros y representarlas mediante dendrogramas, que agrupan los espectros más similares en categorías o *clusters* (Naumann, 2000). Para esto, se utilizaron las derivadas segundas de los espectros promedio normalizados vectorialmente en el rango completo (4000–650 cm^{-1}). Los valores de distancia espectral se calcularon a los diferentes números de onda utilizando el método “*scaling to first range*”. El análisis de *clusters* se realizó utilizando el algoritmo de Ward, que muestra la distribución de los *clusters* en función de la heterogeneidad de los espectros. El procesamiento y análisis de datos se realizó con el software OPUS (versiones 4.2 y 7.0, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania).

4.1.7. Temperatura y grado de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura de desnaturalización (T_d) y el grado de desnaturalización de las WP se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC Q2000, TA Instruments, Delaware, Estados Unidos), calibrado con indio.

En el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC), la muestra y una referencia inerte (en este caso, aire) se someten a una rampa de calentamiento a una velocidad constante y se registra el flujo de calor en función de la temperatura o el tiempo. Cuando la muestra rica en proteínas globulares alcanza la temperatura de desnaturalización, las proteínas presentes en la muestra se despliegan. El estado nativo de las proteínas (plegadas) es el estado de menor energía, por lo tanto, al desnaturalizarse ocurre un proceso de absorción de calor, que se observa en el termograma como un pico endotérmico (Figura 2.7). Del termograma puede obtenerse información sobre la temperatura de desnaturalización (T_d = temperatura correspondiente al mínimo del pico endotérmico) así como de la cantidad de calor requerido para la desnaturalización (ΔH [J/g]= área del pico endotérmico).

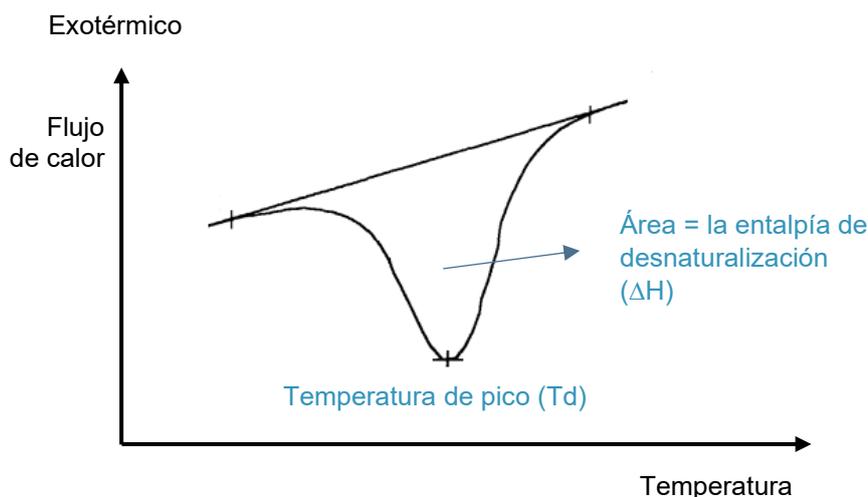


Figura 2.7. Representación esquemática de la determinación de la temperatura de desnaturalización (T_d) y entalpía de desnaturalización (ΔH) por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los sistemas modelo liofilizados se rehidrataron en agua destilada hasta ~30 % (p/p) ST, para obtener resultados comparables, dado que la temperatura de desnaturalización de las proteínas depende fuertemente del contenido de agua y, en particular, se ha demostrado que la T_d de las WP disminuye exponencialmente al aumentar el contenido de agua (Zhou & Labuza, 2011). Se pesaron 15-20 mg de cada sistema en cápsulas herméticas de aluminio, que se sellaron herméticamente. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Las muestras se equilibraron a 20 °C por 3 min, luego se calentaron hasta 130 °C a 10 °C/min y finalmente se equilibraron a 130 °C por 3 min. Luego del ensayo, las cápsulas se perforaron y se secaron en estufa a 102 °C durante

16 horas, para determinar el contenido de ST exacto dentro de cada cápsula. El mínimo correspondiente al pico endotérmico se definió como temperatura de desnaturalización (Td). El grado de desnaturalización se calculó según la Ecuación 2.4.

$$\text{Grado de desnaturalización (\%)} = 100 - \left(\frac{\Delta H_i}{\Delta H_{STT}} \times 100 \right) \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde: ΔH_i es el área del pico endotérmico (expresada en J/g WP) del sistema tratado térmicamente, i es el tratamiento térmico correspondiente, ΔH_{STT} es el área del pico endotérmico (expresada en J/g WP) del mismo sistema modelo sin tratar térmicamente. Los g de WP en las cápsulas se calcularon a partir del contenido de ST en la cápsula (obtenido gravimétricamente por secado en estufa a 102 °C) y los g de WP en base seca presentes en cada sistema (Tabla 2.2).

Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.1.8. Solubilidad proteica

La solubilidad de las proteínas se cuantificó al igual que en el ensayo preliminar (3.1.4). El contenido de proteína soluble se determinó sobre el sobrenadante obtenido luego de centrifugar (Spectrafuge 24D, Labnet, New Jersey, Estados Unidos) los sistemas modelo líquidos (antes de liofilizarlos) durante 20 min a 20.000×g y temperatura ambiente (aprox. 25 °C), por el método de Bradford (1976). La determinación se realizó tal como se describió en 3.1.4, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Mettler Toledo UV5 (Ohio, Estados Unidos). El cálculo del contenido de proteína soluble se realizó utilizando una curva de calibración de WP ($A_{595\text{nm}} = 0,0198 * \mu\text{g proteína}$, $R^2 = 0,965$) o WP:caseína = 1,5:1 ($A_{595\text{nm}} = 0,0262 * \mu\text{g proteína}$, $R^2 = 0,969$), según el perfil proteico del sistema a analizar. La solubilidad proteica se calculó por la Ecuación 2.1. Los análisis se realizaron por triplicado.

4.1.9. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA monofactoriales para determinar si existían diferencias significativas en las distintas variables estudiadas entre tratamientos térmicos para cada sistema modelo o entre sistemas para un mismo tratamiento. Se utilizó el test de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95 % para detectar diferencias significativas entre muestras. Para el análisis de los espectros FT-IR/ATR se realizaron análisis de *clusters*, tal como se describió en 4.1.6.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), con un nivel de confianza de 95 % ($P < 0,05$), excepto por los análisis de *clusters* de los espectros FT-IR/ATR, que se realizaron con el software OPUS (versiones 4.2 y 7.0, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Distribución de tamaño de partícula

Se determinó la DTP de los sistemas modelo STT y tratados térmicamente a 66, 70 y 75 °C, liofilizados y disueltos en SMUF, con el objetivo de evaluar la formación de agregados en las muestras.

En la Figura 2.8 se presentan las DTP de los sistemas sin lactosa (WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL) y en la Figura 2.9 se presentan las DTP de los sistemas con lactosa (WP-LAC, WP-CAS-LAC, WP-INUL-LAC, WP-CAS-INUL-LAC), sometidos a los distintos TT.

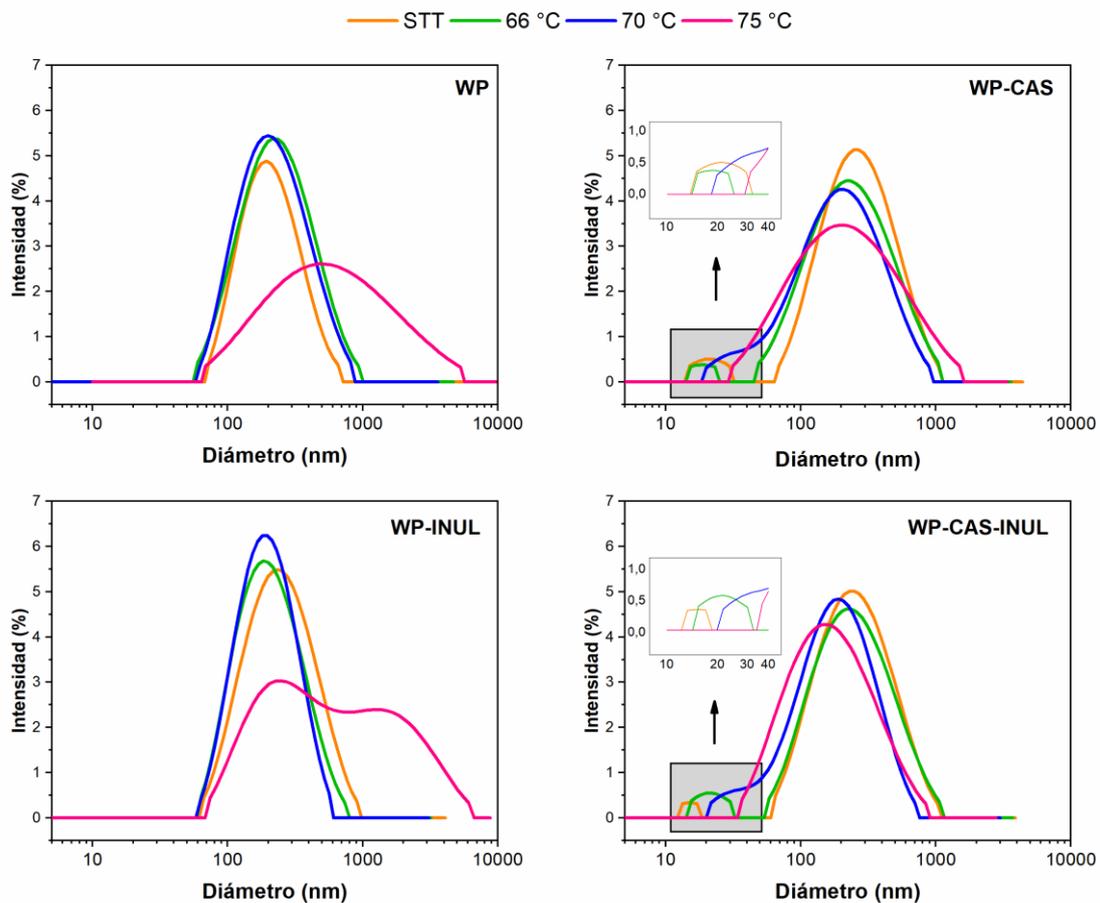


Figura 2.8. Distribución de tamaño de partícula de los sistemas modelo WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 o 75 °C durante 30 min.

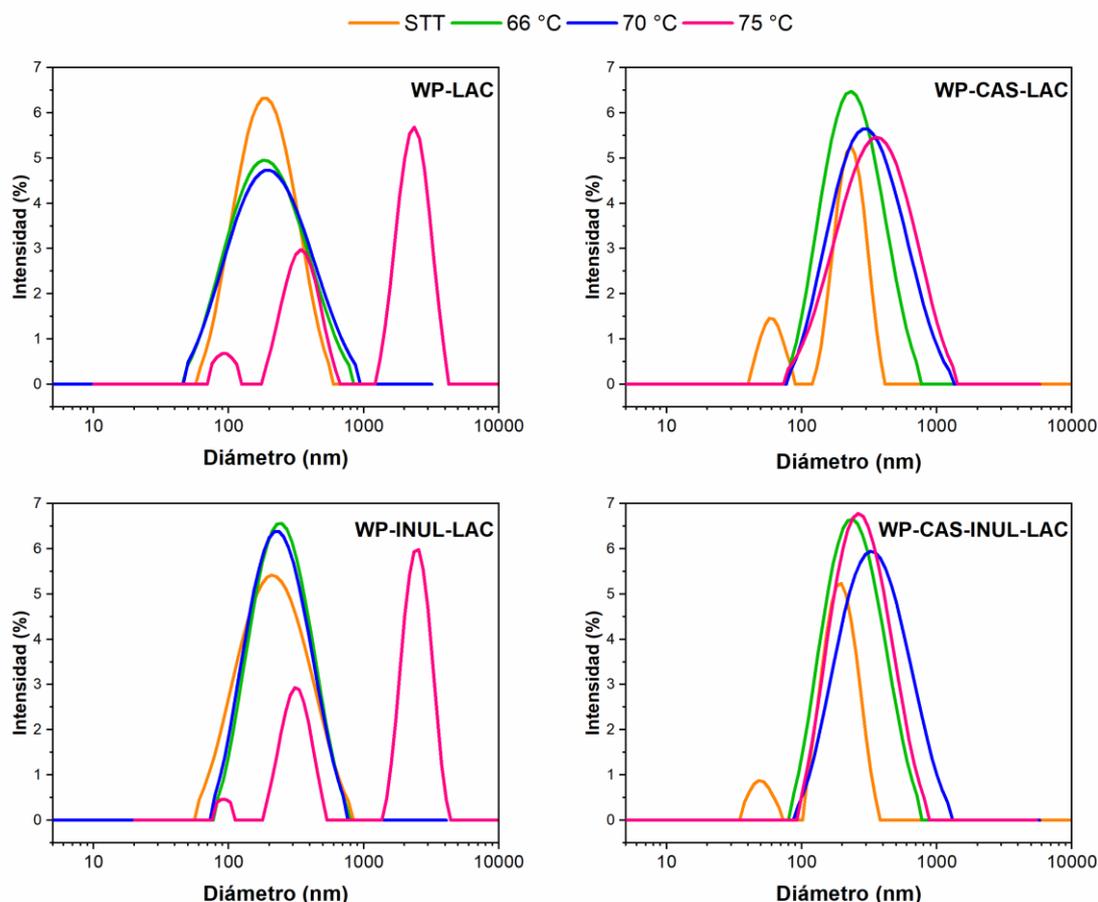


Figura 2.9. Distribución de tamaño de partícula de los sistemas modelo WP-LAC, WP-CAS-LAC, WP-INUL-LAC y WP-CAS-INUL-LAC sin tratar térmicamente (TT) y tratados a 66, 70 o 75 °C durante 30 min.

El sistema STT compuesto únicamente por WPI (sistema WP), presentó una distribución monomodal con diámetro medio de 238 ± 39 nm (Figura 2.8), en concordancia con lo publicado por (Gao et al., 2019) demostrando la presencia de agregados de proteínas de suero en el sistema. Al agregar caseinato (sistema WP-CAS) se obtuvo una distribución bimodal. La primera población, cuyo diámetro estuvo en el rango 19–28 nm, probablemente corresponda a submicelas de caseína desagregadas de la micela. La segunda población presentó una media de 323 ± 20 nm. Por lo tanto, la incorporación de caseína implicó un aumento significativo ($P < 0,05$) del tamaño medio de partícula, respecto al sistema WP. La fuente de caseína utilizada en el presente estudio fue caseinato de calcio, que comprende agregados de caseínas de tamaño variable, y en general, de mayor tamaño que los agregados encontrados en otras fuentes de caseína, como el caseinato de sodio (Srinivasan et al., 2003). La adición de inulina, por su parte, no modificó la forma de la curva de DTP ni afectó significativamente ($P > 0,09$) el diámetro medio. A su vez, el agregado tanto de caseína como inulina (sistema WP-CAS-INUL) resultó en una DTP bimodal, similar a

la obtenida para el sistema WP-CAS. La segunda población presente en el sistema WP-CAS-INUL presentó un diámetro promedio de 316 ± 16 nm, que fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que el obtenido para WP STT, pero similar ($P > 0,05$) al obtenido para WP-CAS STT, lo que sugiere que la DTP de los sistemas no calentados estuvo afectada principalmente por la presencia de caseína, mientras que la inulina no ejerció un efecto significativo.

La incorporación de lactosa (Figura 2.9) no implicó un cambio en la forma de la DTP ni en el diámetro medio de la población principal ($P > 0,05$) en los sistemas WP y WP-INUL. Es decir, comparando los diámetros medios de las poblaciones principales en los sistemas STT se obtuvo que: WP = WP-LAC y WP-INUL = WP-INUL-LAC. Por otro lado, en los sistemas que contenían caseína (en presencia o ausencia de inulina), la incorporación de lactosa implicó una reducción significativa ($P < 0,05$) del diámetro medio de la población principal, es decir: WP-CAS > WP-CAS-LAC y WP-CAS-INUL > WP-CAS-INUL-LAC (Figuras 2.8 y 2.9). A su vez, la población de menor tamaño de partícula observada en los sistemas STT que contenían caseína en la Figura 2.8, también apareció en presencia de lactosa, aunque con diámetros medios levemente más altos, en los sistemas WP-CAS-LAC y WP-CAS-INUL-LAC (Figura 2.9), reforzando la hipótesis de que dicha población corresponde a caseínas.

La aplicación de TT a 66 o 70 °C no modificaron la DTP de WP. Sin embargo, luego del TT a 75 °C – 30 min, se obtuvo un aumento significativo ($P < 0,0001$) en el diámetro medio, que pasó a promediar 932 ± 57 nm, lo que indica que hubo agregación proteica (Figura 2.8).

La DTP del sistema WP-CAS tampoco presentó cambios importantes en su forma luego de los TT a 66 o 70 °C, mientras que luego del TT a 75 °C desapareció la población de menor diámetro y se ensanchó la población principal. Este cambio en la forma de la DTP luego del TT a 75 °C podría explicarse por la agregación de caseínas individuales. Si bien el sistema WP-CAS presentó una DTP distinta, no se obtuvo un aumento significativo en el diámetro medio de la población principal, a diferencia de lo observado en WP. Para comprender los cambios observados en WP-CAS, se midió la DTP de un sistema compuesto únicamente por caseinato de calcio (CAS), en las mismas condiciones que los restantes sistemas modelo, STT y tratado a 66 y 75 °C (Figura 2.10). El sistema de caseinato sin WP también presentó una distribución bimodal con un primer pico a ~ 25 nm, sugiriendo que ese pico corresponde a caseínas. A diferencia de lo observado en el sistema WP-CAS, luego del TT a 75 °C, en el sistema CAS se mantuvo la población de menor tamaño y el pico principal no se ensanchó, lo que sugiere que el cambio en la forma observado en WP-CAS tratado a 75 °C se explicaría por interacciones entre WP y caseínas (Figura 2.8).

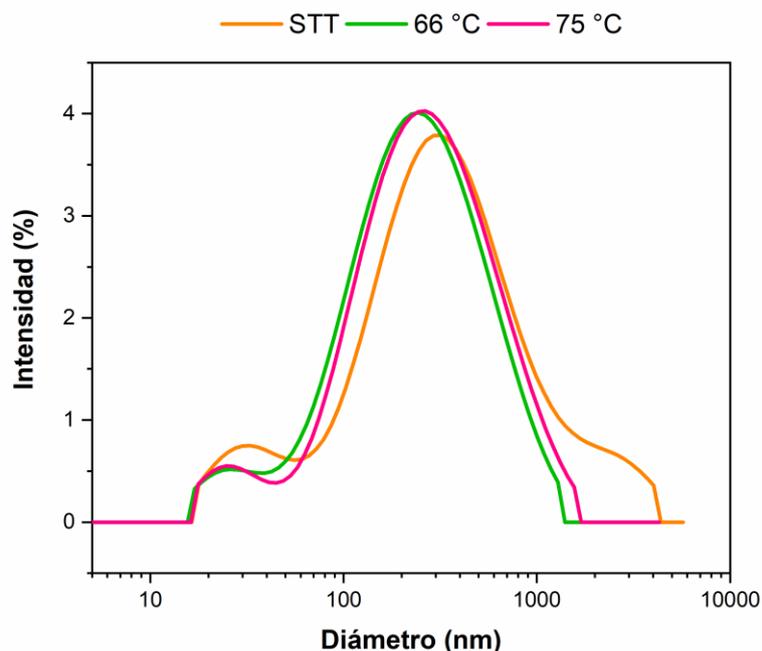


Figura 2.10. Distribución de tamaño de partícula de un sistema puro de caseinato de calcio (CAS) sin tratar térmicamente (STT) y tratado a 66 y 75 °C por 30 min.

El sistema WP-INUL se comportó de manera similar a WP, dado que no se observó la presencia de grandes agregados hasta luego del TT a 75 °C. Sin embargo, y a diferencia de lo observado para WP, el sistema WP-INUL calentado a 75 °C presentó una distribución bimodal, cuyos diámetros medios promediaron 312 ± 14 nm y 2048 ± 107 nm. En su estudio, Guo et al. (2018) obtuvieron DTP multimodales en mezclas de WPI (4-8 %) e inulina (1-5 %) calentadas a 85 °C durante 30 min. El diámetro medio se mantuvo constante ($P > 0,05$) con los tratamientos térmicos, hasta luego del TT a 75 °C, cuya segunda población presentó un diámetro significativamente mayor ($P < 0,05$) que los obtenidos en los restantes TT. Por lo tanto, el sistema WP-INUL presentó agregación durante el calentamiento a 75 °C.

El sistema WP-CAS-INUL presentó un comportamiento similar a WP-CAS, con presencia de submicelas de caseína en las muestras STT y tratadas a 66 y 70 °C y ausencia de grandes agregados (Figura 2.8). Por lo tanto, las caseínas interactuaron con las WP durante el calentamiento a 75 °C y evitaron la formación de grandes agregados, incluso en presencia de inulina.

Analizando el efecto del TT sobre la DTP de los sistemas que contenían lactosa (Figura 2.9), se observa que, al igual que en ausencia de lactosa, los sistemas WP-LAC y WP-INUL-LAC presentaron distribuciones monomodales antes y después de los TT a 66 y 70 °C. En dichos sistemas, el diámetro medio no varió significativamente ($P > 0,05$) entre los tratamientos STT, 66 y 70 °C, y estuvo entre 195-248 nm en WP-LAC y entre 232-254 nm WP-INUL-LAC. Luego del

calentamiento a 75 °C, tanto WP-LAC como WP-INUL-LAC presentaron distribuciones bimodales, con una primera población con diámetro medio ~288 nm y una segunda población de diámetro significativamente mayor a los obtenidos en los TT anteriores (Figura 2.9). Por lo tanto, al igual que en ausencia de lactosa, en los sistemas cuya única fuente proteica eran las WP, el TT a 75 °C indujo la formación de agregados proteicos, hecho que no cambió con el agregado de la inulina. Aunque en ambos sistemas se detectó una población aparentemente de menor grado de agregación.

Al incorporar caseína, al igual que lo que ocurrió en los sistemas sin lactosa, en WP-CAS-LAC y WP-CAS-INUL-LAC no se observó la aparición de una población de gran tamaño luego del calentamiento a 75 °C (Figura 2.9). Por lo tanto, tanto en los sistemas con y sin lactosa, la adición de caseína parecería haber evitado la agregación proteica durante el TT a 75 °C (Figuras 2.8 y 2.9). Este resultado coincide con estudios previos que mostraron que los agregados formados en presencia de caseína suelen tener menor tamaño que aquellos formados en su ausencia (Gaspard et al., 2017; Guyomarc'h et al., 2009; Kehoe & Foegeding, 2011; Mounsey & O'Kennedy, 2009). WP-CAS-LAC y WP-CAS-INUL-LAC STT habían presentado una pequeña población de menor diámetro atribuida a submicelas de caseína desagregadas, al igual que en WP-CAS y WP-CAS-INUL. En el caso de los sistemas sin lactosa (WP-CAS y WP-CAS-INUL) dicha población había desaparecido luego del calentamiento a 75 °C (Figura 2.8). Sin embargo, en presencia de lactosa (WP-CAS-LAC y WP-CAS-INUL-LAC) dicha población dejó de ser detectable con tratamientos a menores temperaturas (Figura 2.9).

En líneas generales, los principales cambios en las DTP de los sistemas modelo ocurrieron luego del TT a 75 °C (Figuras 2.8 y 2.9). Todos los sistemas STT que no contenían caseína fueron monomodales. Los sistemas con caseína presentaron una pequeña población de menor tamaño, cuyo diámetro a su vez, fue mayor en presencia de lactosa. Estas partículas de pequeño diámetro no fueron detectables en ningún sistema luego del calentamiento a 75 °C. Además, el calentamiento a 75 °C provocó un importante cambio en las DTP, que se tradujo en la aparición de una población de gran tamaño, o el corrimiento de la única población presente, hacia diámetros de tamaño significativamente mayores, en todos los sistemas que no contenían caseína. De hecho, en los sistemas tratados a 75 °C, la población principal presentó un diámetro medio significativamente mayor ($P < 0,05$) en los sistemas sin caseína que en aquellos con caseína. Por otra parte, en los sistemas tratados a 75 °C el agregado de lactosa pareció aumentar el diámetro medio de pico, en comparación con el mismo sistema sin lactosa, pero a su vez los picos obtenidos en los sistemas con lactosa fueron más angostos, indicando menor variabilidad de tamaño de partícula. Finalmente, el agregado de inulina (en presencia o ausencia de caseína y/o lactosa) no generó un impacto significativo, en cuanto a que no previno la aparición de agregados proteicos en ausencia de caseína ni generó la aparición de agregados en presencia de caseína.

4.2.2. *Perfil proteico por SDS-PAGE*

Los sistemas modelos se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras, a fin de evaluar la presencia de puentes disulfuro en los agregados, inducidos por el tratamiento térmico. En las Figuras 2.11 y 2.12 se presentan los resultados obtenidos por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras, para los sistemas sin y con lactosa, respectivamente.

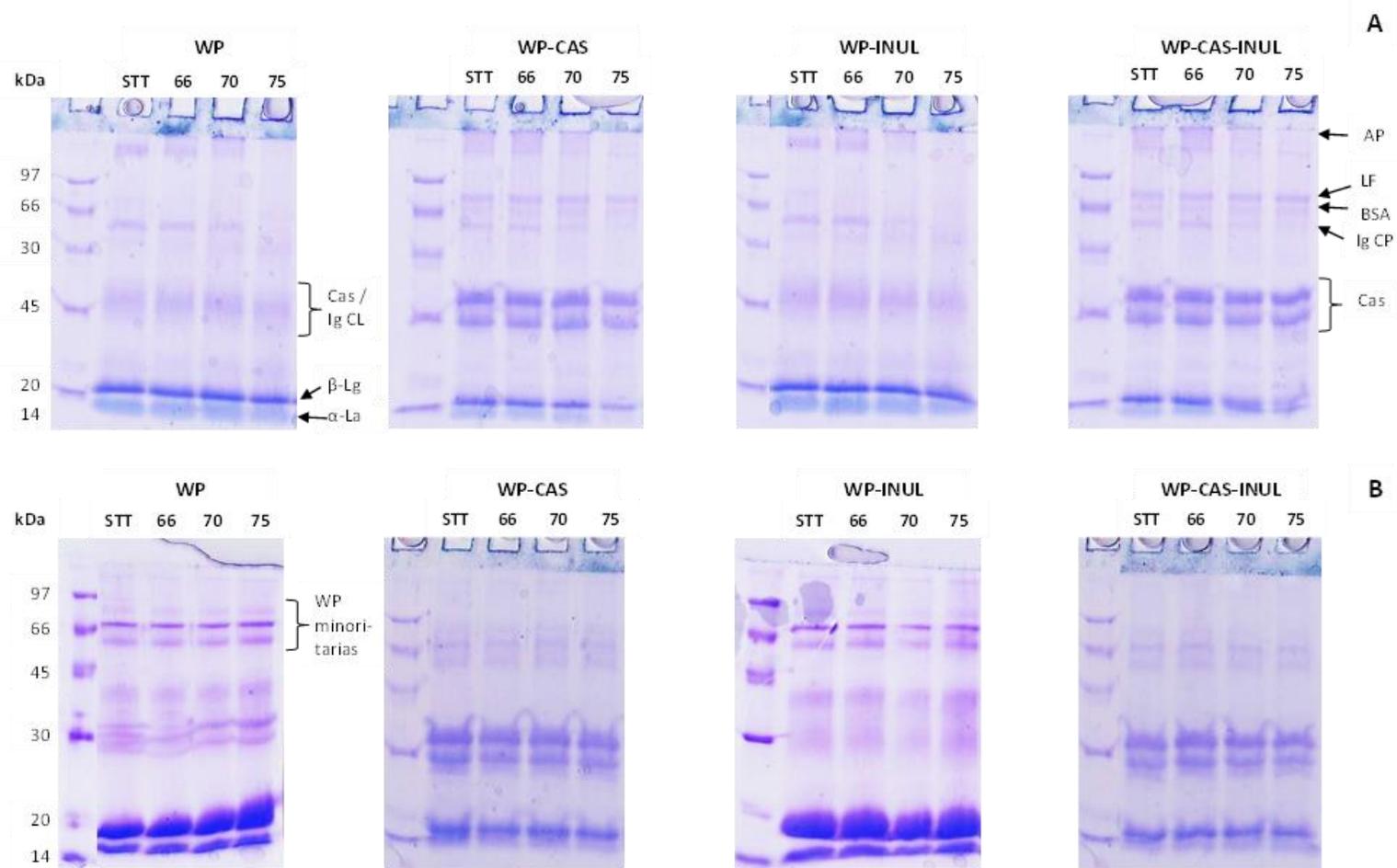


Figura 2.11. SDS-PAGE de los sistemas modelo sin lactosa, sin tratar térmicamente (STT) y tratados térmicamente a 66, 70 o 75 °C durante 30 min, en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B).

Cas: caseínas, Ig: inmunoglobulina, CL: cadena liviana, CP: cadena pesada, β-Lg: β-Lactoglobulina, α-La: α-Lactoalbúmina, AP: agregados proteicos, LF: lactoferrina, BSA: seroalbúmina bovina.

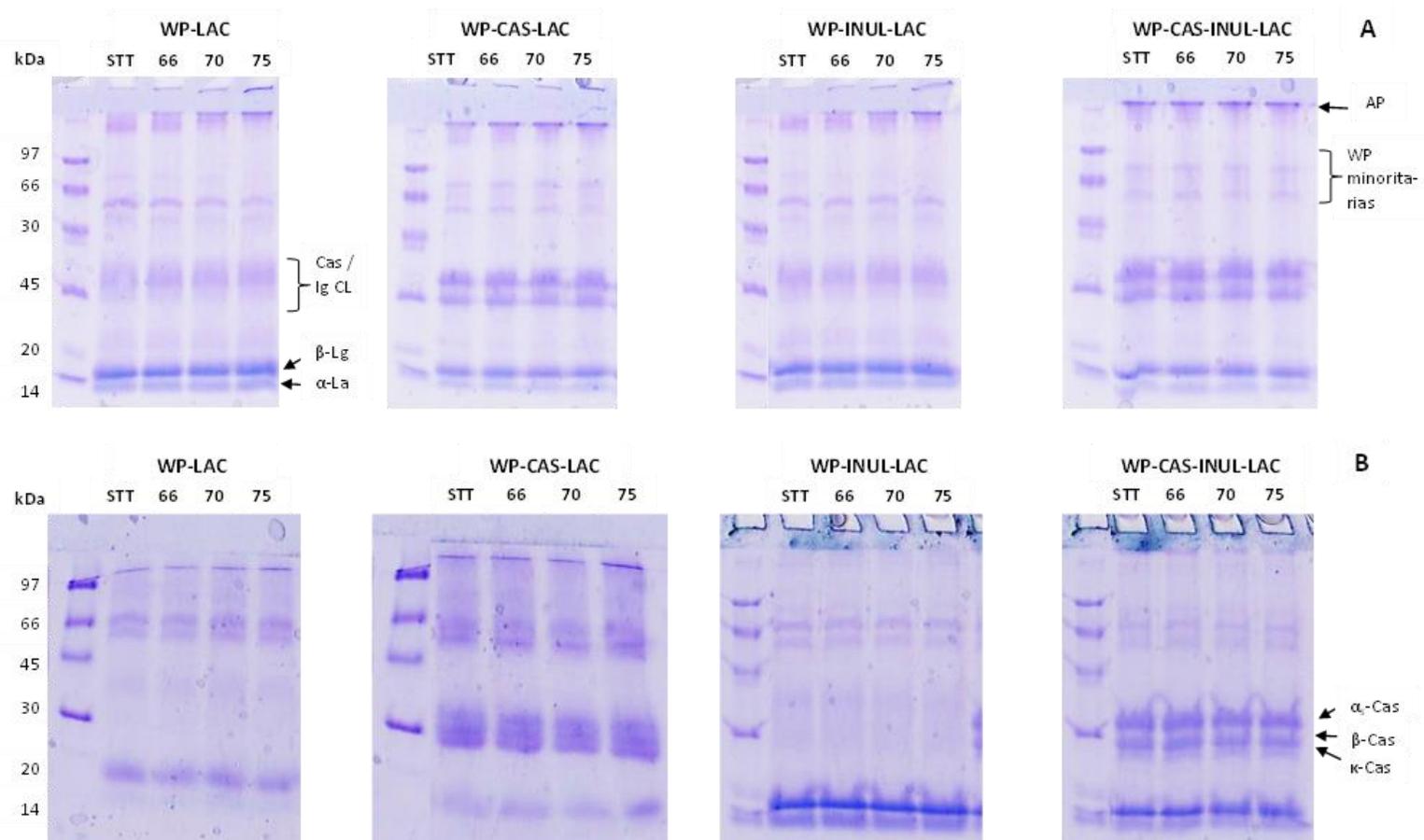


Figura 2.12. SDS-PAGE de los sistemas modelo con lactosa, sin tratar térmicamente (STT) y tratados térmicamente a 66, 70 o 75 °C durante 30 min, en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B).

Cas: caseínas, Ig: inmunoglobulina, CL: cadena liviana, β-Lg: β-Lactoglobulina, α-La: α-Lactoalbúmina, AP: agregados proteicos, WP: proteínas del suero.

Analizando el perfil proteico del sistema WP STT, se observó que presentó varias bandas correspondientes a las proteínas del suero (Figura 2.11). La banda más ancha fue la correspondiente a la β -Lg (18,3 kDa), que es la mayoritaria, representando aproximadamente el 50 % del total de WP, seguida por la banda a 14,4 kDa, correspondiente a la α -La (~20 % del total de WP) (O'Mahony & Fox, 2013). También se obtuvieron las bandas correspondientes a WP minoritarias, lactoferrina (80 kDa) (Lønnerdal & Suzuki, 2013) y/o lactoperoxidasa (78 kDa) (O'Mahony et al., 2013), BSA (66 kDa) e Inmunoglobulina de cadena pesada (50-70 kDa) (Butler, 1969). Además, se detectaron bandas tenues a alrededor de 30 kDa, que podrían corresponder a trazas de caseína que permanecen en el WPI luego de su separación de la leche. Las mismas bandas se detectaron en todos los sistemas STT cuya única fuente de proteína eran las WP (WP-INUL, WP-LAC, WP-INUL-LAC), aunque en el caso de los sistemas con lactosa las bandas presentaron menor intensidad (Figuras 2.11B y 2.12B). En los sistemas STT conteniendo caseína (WP-CAS, WP-CAS-INUL, WP-CAS-LAC, WP-CAS-INUL-LAC), en condiciones reductoras, además de las bandas correspondientes a WP, se observaron las bandas correspondientes a las caseínas. La separación de caseínas mediante SDS-PAGE depende no solo del PM sino también de las características de cada fracción proteica. β -Cas, cuya hidrofobicidad superficial es muy elevada, une una cantidad de SDS desproporcionadamente alta y, en consecuencia, tiene una mayor movilidad electroforética que la α_{s1} -Cas, a pesar de tener mayor tamaño molecular (O'Mahony & Fox, 2013). El SDS-PAGE en condiciones reductoras permite separar las caseínas en cuatro bandas correspondientes a α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -Cas, en orden creciente de movilidad electroforética (Dupont et al., 2013). En la presente tesis, se lograron distinguir tres bandas correspondientes a las α_s -, β - y κ -Cas, en los sistemas que contenían caseinato de calcio. El ancho de banda obtenido para las distintas caseínas es consistente con su concentración, dado que α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -Cas representan aproximadamente el 40, 10, 35 y 12 % del total de caseínas bovinas (Huppertz, 2013; O'Regan et al., 2009).

En cuanto al efecto del TT, bajo condiciones reductoras no se observaron diferencias en las bandas para ninguno de los sistemas (Figuras 2.11B y 2.12B). En contraste, en condiciones no reductoras, sí se observaron diferencias como resultado del TT (Figuras 2.11A y 2.12A). En el sistema WP, se observó que a medida que aumenta la temperatura, las bandas correspondientes a WP minoritarias, tales como lactoferrina (80 kDa) e inmunoglobulina de cadena pesada (50-70 kDa), dismiyen, al tiempo que aparecen agregados de alto PM en la parte superior del gel (Figura 2.11A). La formación de grandes agregados en la parte superior del gel ha sido reportada previamente (Dissanayake, Ramchandran et al., 2013; Markoska et al., 2019; Triani & Foegeding, 2019). En particular, para el sistema WP tratado a 75 °C los agregados no son visibles, dado que su alto PM les impidió la entrada al gel. El hecho de que estos cambios no se hayan detectado en condiciones reductoras (Figura 2.11B) indica que, a medida que la temperatura aumenta, se

forman agregados de alto PM estabilizados por puentes disulfuro. En presencia de β -mercaptoetanol estos enlaces se rompen, por lo que no se advierten los agregados de alto PM ni la menor proporción de las proteínas que forman los agregados. El sistema WP-INUL presentó el mismo comportamiento que WP (Figura 2.11A).

El agregado de caseinato tanto en presencia como en ausencia de inulina (WP-CAS y WP-CAS-INUL) modificó el comportamiento, porque no se observó la reducción en la intensidad de las bandas de WP minoritarias (Figura 2.11A), lo que sugiere que la presencia de caseína podría afectar la formación de agregados mediados por puentes de disulfuro entre las WP.

El perfil proteico obtenido por SDS-PAGE en condiciones no reductoras para los sistemas con lactosa se presenta en la Figura 2.12A. Se observa claramente que el tratamiento térmico a 66, 70 o 75 °C no generó una disminución en la intensidad de bandas y que, en todos los casos, se observaron agregados proteicos en la parte superior del gel. Por lo que se podría pensar que la incorporación de lactosa induce la formación de agregados de menor tamaño, visibles en la parte superior del gel, que aquellos obtenidos en los sistemas sin lactosa.

Cuando al WP se le adicionó lactosa y caseína (WP-CAS-LAC, WP-CAS-INUL-LAC), todas las bandas obtenidas fueron iguales incluso luego del TT a 75 °C (Figura 2.12A), lo que sugiere que ambos componentes contribuirían a la prevención de la formación de agregados.

Los resultados obtenidos por SDS-PAGE son coherentes con los obtenidos para el tamaño de partícula y permitieron dilucidar que las interacciones entre proteínas a temperaturas iguales o superiores a 75 °C estarían mediadas por puentes disulfuro (Figura 2.8). Cabe señalar que estos ensayos no permiten analizar las interacciones no covalentes que son afectadas por la presencia de SDS.

4.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía FT-IR provee información sobre la composición bioquímica y conformacional general del material en estudio. En la Figura 2.13 se presentan los espectros obtenidos en las ventanas espectrales del IR medio, para los sistemas modelo STT sin y con lactosa. En los sistemas WP y WP-CAS las principales bandas de absorción fueron las correspondientes a amida I (1700–1600 cm^{-1}) y amida II (1600–1480 cm^{-1}). La banda amida I representa principalmente el estiramiento C=O del grupo amida y está directamente relacionado con la conformación de la “columna vertebral” de la proteína mientras que la banda amida II resulta de la flexión de vibración de N—H y el estiramiento de vibración de C—N en proteínas y péptidos. La banda amida III (1320 – 1220 cm^{-1}), asignada al estiramiento C—N y flexión N—H, que también es conformacionalmente sensible (Fabian & Mäntele, 2006), también estuvo presente, aunque con menor intensidad. La “región de carbohidratos” (1200 – 900 cm^{-1}), atribuida a vibraciones C—OH, C—O—C y C—O en polisacáridos (Naumann, 2000), surge prominentemente en los sistemas que contienen inulina (WP-INUL y WP-CAS-INUL) debido a la absorbancia de este

oligosacárido (Wang et al., 2019). Tanto WP-INUL como WP-CAS-INUL presentaron picos a 933 y 1031 cm^{-1} que representan la absorción del esqueleto de la inulina y a 1131 cm^{-1} que corresponde a vibraciones de estiramiento del enlace glicosídico (Y. Li et al., 2019).

En los sistemas modelo que contenían lactosa (Figura 2.13B), predominó la banda correspondiente a la “región de carbohidratos” debido a la alta concentración relativa de lactosa en las muestras (Tabla 2.1). En dichos sistemas también se obtuvieron las bandas amida I y amida III y la banda amida II fue menos preponderante. La gran proporción de lactosa en los sistemas redujo las diferencias entre los espectros (Figura 2.13B), dificultando el análisis de las bandas relevantes para el estudio de la conformación proteica. Por lo tanto, el análisis de los espectros FT-IR se realizó únicamente sobre los sistemas sin lactosa.

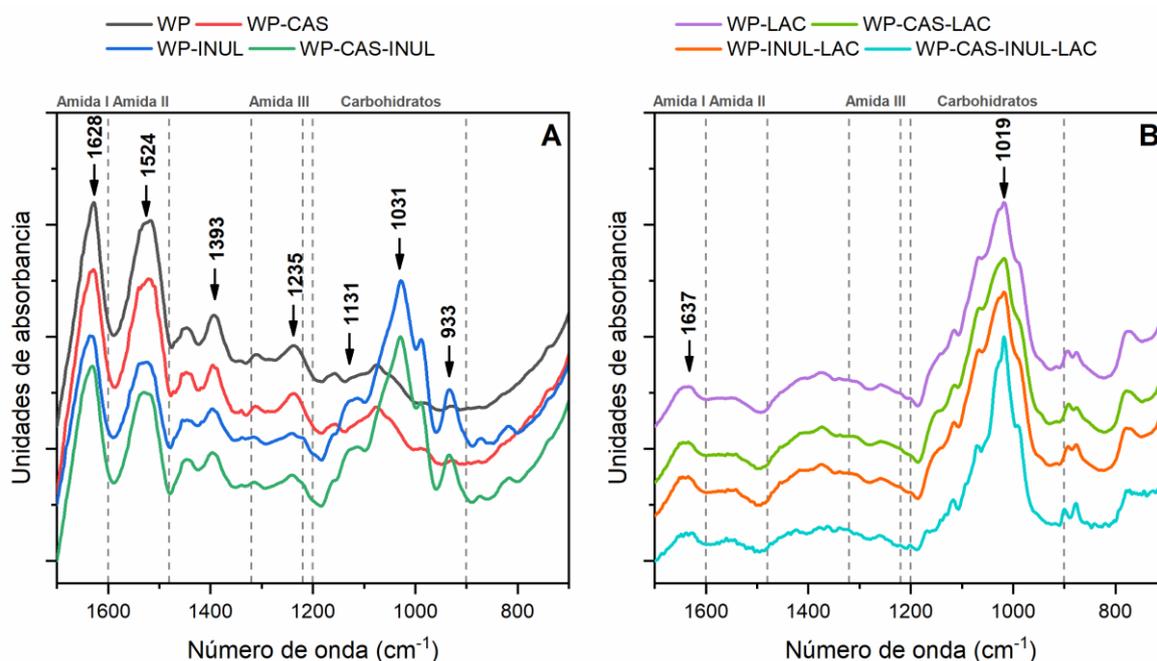


Figura 2.13. Espectros ATR/FT-IR de los sistemas modelo WP, WP-CAS, WP-INUL, WP-CAS-INUL (A) y WP-LAC, WP-CAS-LAC, WP-INUL-LAC y WP-CAS-INUL-LAC (B) sin tratar térmicamente en la región espectral 1700 – 700 cm^{-1} .

Se indican las regiones espectrales asociadas a grupos funcionales y vibraciones conformacionales en proteínas: amida I (1700 – 1600 cm^{-1}), amida II (1600 - 1480 cm^{-1}), amida III (1320 – 1220 cm^{-1}) y región de carbohidratos (1200 – 900 cm^{-1}).

Se realizó un análisis multivariado de *clusters* en las regiones amida sensibles a conformaciones proteicas (amida I, II y III). El dendrograma obtenido (Figura 2.14), separó los espectros de los sistemas modelo estudiados (tratados y STT), en dos *clusters* principales dominados por la composición química. Todos los sistemas WP, STT y calentados incluso hasta a 75 °C, se agruparon en un *cluster* separado de los restantes sistemas. Este *cluster* agrupa con las muestras WP-CAS tratadas térmicamente. El segundo *cluster* esta conformado por el sistema modelo WP

CAS sin tratar y todos los sistemas que contienen inulina. Es importante destacar que en este *cluster* se encuentran las muestras con inulina tratadas térmicamente agrupadas con las correspondientes muestras sin tratar.

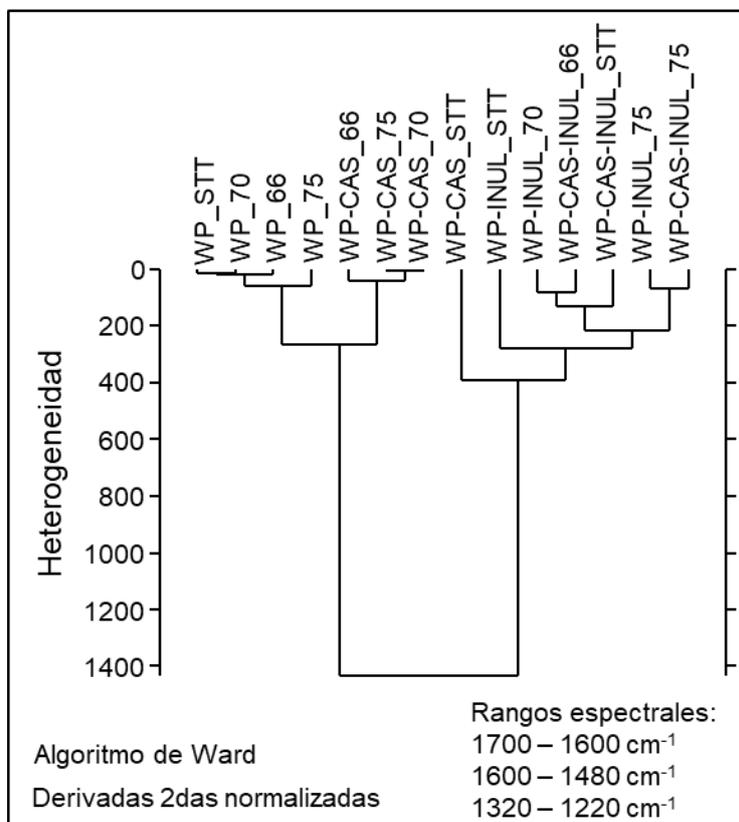


Figura 2.14. Análisis de *clusters* obtenido con las derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo normalizados vectorialmente en el rango completo ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$).

Para analizar en mayor profundidad el efecto de los distintos componentes en la conformación de las WP tratadas térmicamente, se analizaron las derivadas segundas del espectro normalizado en la región amida I. Esta banda, que ocurre en la región $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$, es la más intensa y útil para analizar la estructura secundaria de proteínas, y representa principalmente las vibraciones de estiramiento C=O de los grupos amida, aunque acoplado en el plano a la flexión de los enlaces N—H y estiramiento de los enlaces C—N (Fabian & Mäntele, 2006). El análisis de la región amida I por FT-IR da información valiosa debido a que los segmentos de proteína adoptan estructuras secundarias que difieren en la geometría y fuerza de los enlaces de hidrógeno. En consecuencia, las estructuras secundarias dan lugar a vibraciones ubicadas en números de onda específicos. Sin embargo, como estos números de onda son muy próximos entre sí, deben ser separados mediante tratamientos matemáticos tales como la deconvolución de Fourier o la derivada segunda (Lefèvre & Subirade, 1999).

En la Figura 2.15 se presentan las derivadas segundas de los espectros FTIR de los sistemas modelo STT.

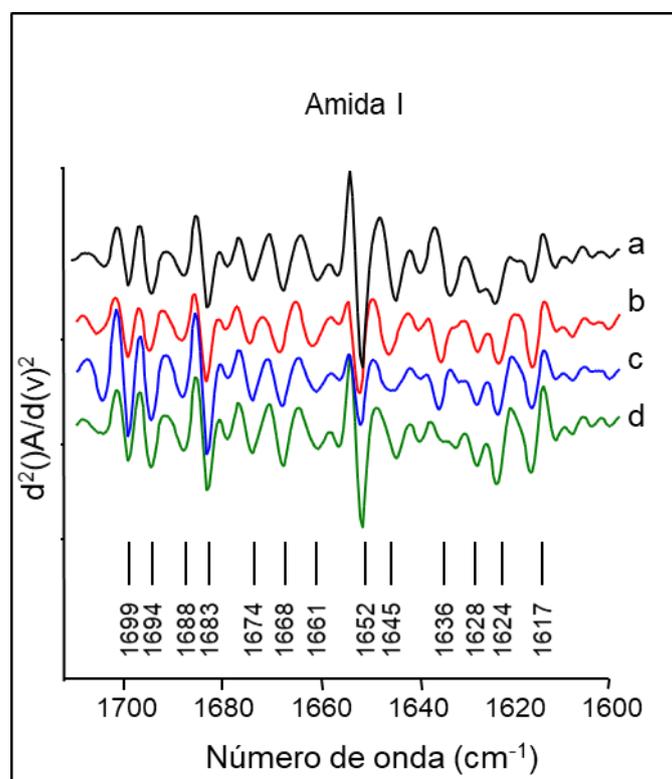


Figura 2.15. Derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo WP (a), WP-CAS (b), WP-INUL (c) y WP-CAS-INUL (d) sin tratar térmicamente, en la región amida I (1700-1600 cm^{-1}).

El análisis de la Figura 2.15 evidencia cambios en la posición de absorción de los picos y/o en sus intensidades al incorporar caseína e inulina solas o combinadas en los sistemas. Sin embargo, los efectos más notorios se observaron en las hojas β , que sufrieron corrimientos, rearrreglos e incrementos o descensos en sus intensidades. En particular, dichos cambios fueron observados en picos a 1617, 1624 y 1628 cm^{-1} (asignados a hoja β intermolecular), y 1688 y 1694 cm^{-1} (asignados a hoja β intermolecular agregada) (Grewal et al., 2017, 2018; Mediwaththe et al., 2018; Rahaman et al., 2015).

Se realizó entonces un análisis de *clusters* para evaluar el efecto de los TT en la agregación de WP en presencia de inulina y/o caseína (Figura 2.16). Para esto, se utilizó la región espectral asociada a la conformación hoja β de alta energía (1700 – 1675 cm^{-1}), que incluye picos a 1694 y 1688 cm^{-1} , y la región de baja energía debida a hoja β antiparalela (1631 - 1610 cm^{-1}), que incluye picos a 1628, 1624 y 1617 cm^{-1} .

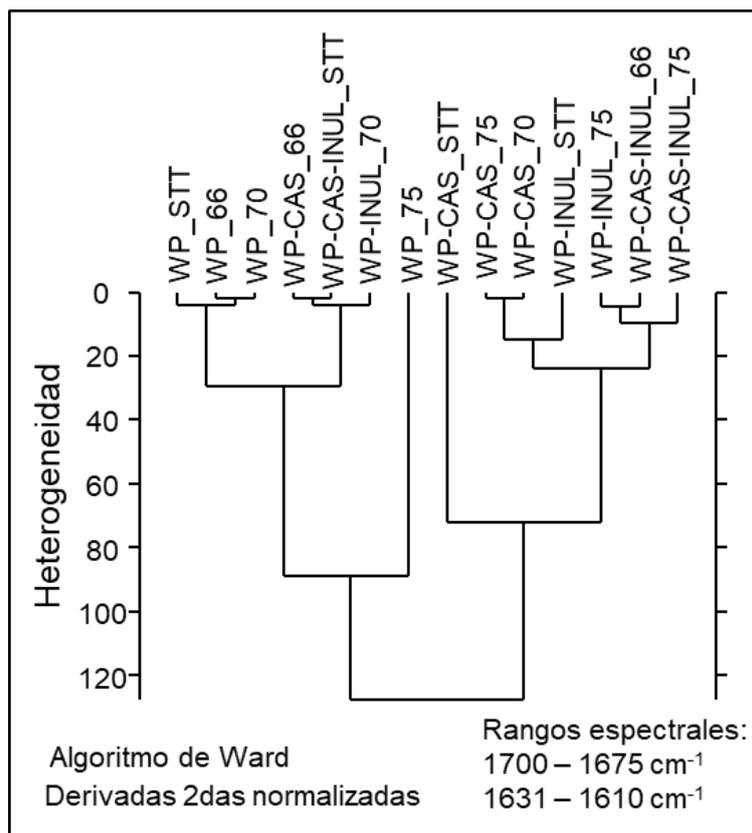


Figura 2.16. Análisis de *clusters* obtenido con las derivadas segundas del espectro promedio de los sistemas modelo normalizados vectorialmente, en las regiones asociadas a agregación: hojas β agregada de alta energía ($1700 - 1675 \text{ cm}^{-1}$) y hojas β intermoleculares de baja energía ($1631 - 1610 \text{ cm}^{-1}$).

El resultado más destacable fue que el sistema WP tratado a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ quedó ubicado solo en una categoría, separado a una alta distancia espectral del resto de los sistemas WP (STT, $66 \text{ }^\circ\text{C}$ y $70 \text{ }^\circ\text{C}$). Esta diferencia espectral puso en evidencia que ocurrieron cambios significativos en la agregación cuando WP se sometió a alta temperatura ($75 \text{ }^\circ\text{C}$) sin caseína o inulina. WP-CAS STT también se ubicó solo y bastante separado de todos los sistemas WP-CAS-INUL (Figura 2.16). Este resultado podría explicarse por la contribución de agregados de caseína de distintos tamaños que se encuentran en WP-CAS, tal como se observó en los resultados de DTP (Figura 2.8). Este resultado coincide con un estudio de caracterización de caseína por FT-IR, en el que se abordó el hecho de que las caseínas se comportan en forma diferente a otras proteínas debido a la interacción de aminoácidos que resulta en una conformación que se asemeja a la de una proteína globular desnaturada (Siročić et al., 2016).

En la Figura 2.17 se presenta la derivada segunda de los espectros correspondientes a los sistemas modelo, sometidos a los distintos TT, en la región amida I.

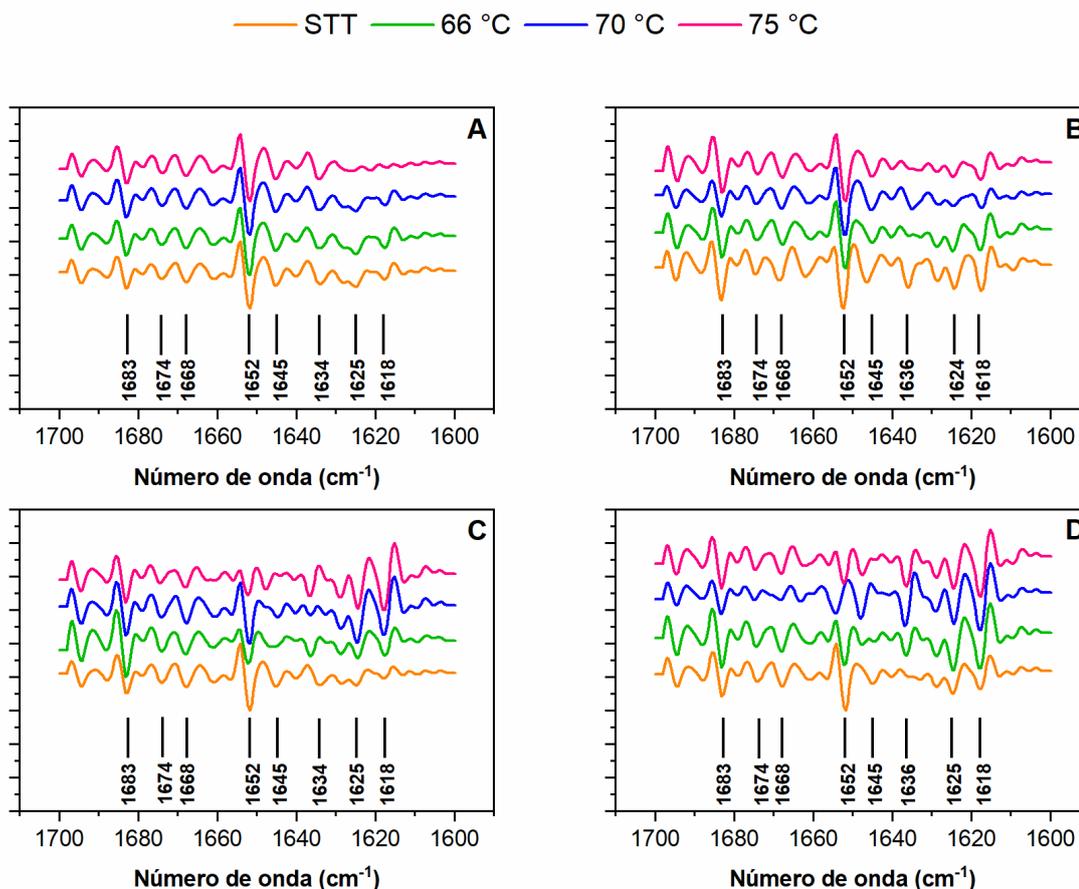


Figura 2.17. Derivada segunda de los espectros FT-IR en la región amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) de los sistemas modelo WP (A), WP-CAS (B), WP-INUL (C) y WP-CAS-INUL (D), sin tratar térmicamente (STT) y sometidos a tratamientos a $66 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.

El sistema WP STT presentó algunos picos predominantes, que se atribuyen a la presencia de estructura α -helicoidal (1652 cm^{-1}), hoja β antiparalela intermolecular (1625 y 1618 cm^{-1}), previamente atribuidos a dos monómeros de β -Lg en su forma de dímero (Lefèvre & Subirade, 1999), hoja β intramolecular (1634 cm^{-1}), *random coil* (1645 cm^{-1}), giros β (1674 cm^{-1}) y hoja β agregada intermolecular (1694 y 1683 cm^{-1}) (Figura 2.17A). Integrando las áreas de los picos obtenidos al aplicar la derivada segunda se obtuvo que en WP STT, de la banda amida I total las proteínas presentaban 44 % de hoja plegada β total, 18 % de α -hélice, 12 % de giros β y 7 % de *random coil*. Estos resultados son comparables a valores previamente reportados para proteínas del suero nativas (Bogahawaththa et al., 2019; Haque et al., 2015; Hussain et al., 2012).

En general, los principales cambios al calentar el sistema WP ocurrieron luego del TT a $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y se observaron predominantemente en las regiones asociadas a hojas β , giros β (1674 y 1668 cm^{-1}) y α -hélices (1652 cm^{-1}). Las modificaciones en las hojas β incluyeron corrimientos ($1626 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 1625 \text{ cm}^{-1}$ y $1618 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 1621 \text{ cm}^{-1}$) y cambios de intensidad (Figura 2.17A). Esta región

está asociada con las hojas β antiparalelas intermoleculares entre dos monómeros de β -Lg. Estos dímeros se encuentran en las WP nativas y su disociación en monómeros genera los corrimientos (Liyanaarachchi & Vasiljevic, 2018). Estudios previos han sugerido que durante el calentamiento de la β -Lg los dímeros se disocian a su forma monomérica (Liyanaarachchi et al., 2015). Otro de los cambios observados a nivel de las hojas β en el sistema WP calentado a 75 °C estuvo dado por un incremento del pico a 1683 cm^{-1} , atribuido a la agregación. Este resultado coincide con los resultados obtenidos por SDS-PAGE, así como también con resultados de estudios previos (Bogahawaththa et al., 2019; Liyanaarachchi & Vasiljevic, 2018; Markoska et al., 2019).

La incorporación de caseína al sistema provocó cambios en las características espectrales en la región amida I, incluso antes del tratamiento térmico (Figura 2.17B). Las caseínas carecen de una conformación definida debido principalmente al alto contenido de prolina en su estructura primaria, mientras que, por otro lado, las WP en estado nativo se encuentran plegadas en estructuras conformacionales bien definidas, principalmente estabilizadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares. Por este motivo, los picos obtenidos en la región amida I en los sistemas que contienen ambos tipos de proteína, se atribuyen a la estructura de las WP (Liyanaarachchi et al., 2015). Sin embargo, la presencia de algunos elementos de estructura secundaria también ha sido reportado para las caseínas (Markoska et al., 2021; Mediwaththe et al., 2018). Los principales cambios detectados en los sistemas con caseína fueron una disminución de la proporción de α -hélice (de 18 a 10 %), y un incremento de la proporción de hoja β total (de 44 a 50 %), observándose en particular picos más intensos a 1618 y 1636 cm^{-1} . Mediwaththe et al. (2018) obtuvieron un menor contenido de α -hélice por FTIR, en caseína micelar que en leche descremada. Los autores atribuyeron esta diferencia a una mayor presencia de α -hélice en β -Lg y α -La, lo que coincidiría con los resultados obtenidos en la presente tesis. Al comparar el sistema WP-CAS sometido a diferentes TT, no se observaron las modificaciones obtenidas en el sistema WP (Figura 2.17B). La diferencia fue particularmente evidente a nivel de hoja β donde el tratamiento térmico solo provocó una disminución del 8 %. Estos resultados coinciden con los resultados de DTP y SDS-PAGE, que habían mostrado que el agregado de caseína inhibió la formación de agregados de alto PM (Figuras 2.8 y 2.11). En la misma línea, Liyanaarachchi & Vasiljevic (2018) y Liyanaarachchi et al. (2015) observaron, por FT-IR, una reducción de la agregación al aumentar la concentración de caseína en sistemas de WP y caseínas. Murphy et al. (2014) reportaron que la incorporación de fosfocaseína retrasó la pérdida de hoja β por acción de la temperatura.

Los cambios en las características espectrales de la región amida I por efecto de la inulina, fueron evidentes durante el tratamiento térmico (Figura 2.17C). A diferencia de lo observado en los sistemas WP y WP-CAS, el calentamiento a 66 °C ya provocó modificaciones en el sistema WP-INUL, principalmente a nivel de hoja β y α -hélice.

Analizando los cuatro sistemas modelo (Figura 2.17) se observó que la incorporación de inulina, tanto sola como en combinación con caseína, generó más modificaciones en las características espectrales generales, que la incorporación de caseína sola. Esto coincide con los resultados obtenidos en el análisis de *clusters* en las regiones amida I, II y III (Figura 2.14), donde se había obtenido un efecto más significativo por la presencia de inulina que de caseína, lo que se podría explicar por interacciones proteína-carbohidrato.

4.2.4. Temperatura y grado de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de DSC se utilizó para determinar la temperatura y el grado de desnaturalización de WP en los distintos sistemas luego de los TT aplicados. En la Figura 2.18A se presenta el termograma obtenido para el sistema WP STT, cuya forma fue similar a la de termogramas previamente reportados en la literatura (Fitzsimons et al., 2007; Murphy et al., 2014). El sistema WP STT presentó un mínimo (Td) a $74,6 \pm 0,2$ °C (Tabla 2.4), que coincide con la Td de la β -Lg (Boye & Alli, 2000). La Td de la α -La se identificó como un hombro a ~ 65 °C (Figura 2.18A), en coincidencia con lo reportado por Boye & Alli (2000). Se analizó también por DSC una suspensión de caseinato de calcio STT, que es la otra fuente de proteína presente en algunos de los sistemas estudiados. Como se observa en la Figura 2.18B, para el caseinato se obtuvo un termograma plano. Paulsson & Dejmek (1990) analizaron por DSC α -, β - y κ -caseína puras disueltas en SMUF y obtuvieron termogramas planos. Esto se explica porque, contrariamente a lo que ocurre con las WP, que son proteínas globulares, las caseínas presentan una alta estabilidad térmica. Se ha reportado que el caseinato de sodio puede calentarse a 140 °C durante varias horas sin cambios aparentes, probablemente debido a su falta de estructuras secundaria y terciaria típicas (O'Mahony & Fox, 2013). Sin embargo, no existe actualmente un consenso en este punto. El desarrollo de nuevas metodologías, como FTIR o dicroísmo circular, han revelado que, tanto las caseínas purificadas como sus mezclas, presentan bandas características con cantidades razonables de giros β y hojas β y menor cantidad de α -hélices, pero no se pliegan en estructuras globulares compactas. Por lo tanto, se ha sugerido que las caseínas pertenecen al área de estudio emergente denominada por Dunker et al. (2008) como “*unfoldomics*” (Farrell Jr et al., 2013). Por lo tanto, considerando que el caseinato da termogramas planos en el rango de temperatura ensayado, los picos endotérmicos de desnaturalización obtenidos en todos los sistemas corresponden a las WP y, para poder comparar, las entalpías de desnaturalización obtenidas en todos los sistemas, con distintas concentraciones de proteína, se expresaron en J por g de WP.

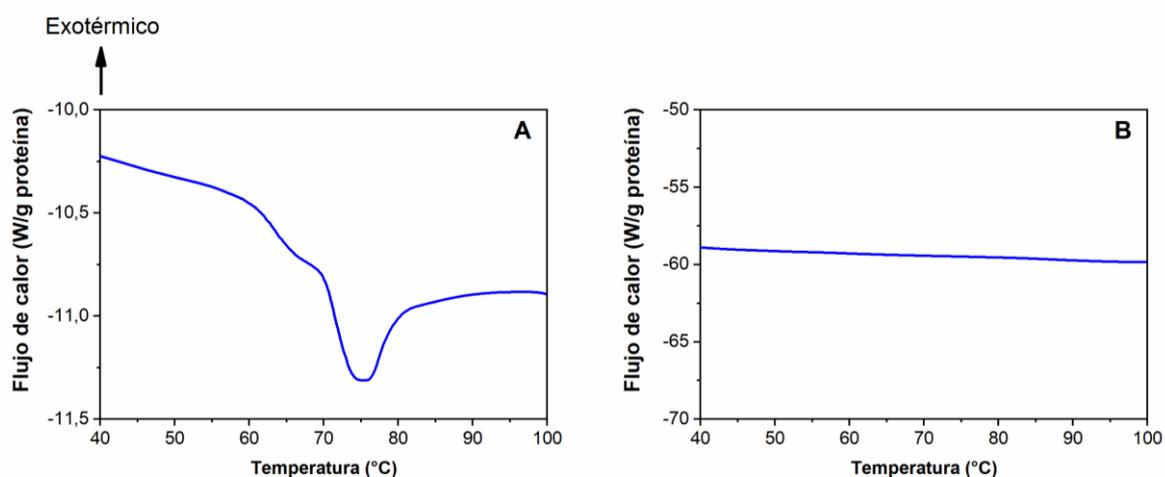


Figura 2.18. Termogramas obtenidos para el sistema WP (A) y para una suspensión de caseinato de calcio (B) sin tratar térmicamente.

Tabla 2.4. Temperaturas de desnaturalización (°C) obtenidas para los sistemas modelo sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.

Sistema modelo	STT	66 °C	70 °C	75 °C
WP	74,6 ± 0,2 ^{aA}	74,6 ± 0,1 ^{aA}	74,7 ± 0,2 ^{aA}	77,6 ± 0,2 ^{bA}
WP-CAS	74,8 ± 0,3 ^{aAB}	74,6 ± 0,3 ^{aA}	77,5 ± 0,4 ^{bC}	80,1 ± 0,7 ^{cBC}
WP-INUL	75,7 ± 0,4 ^{aC}	75,6 ± 0,0 ^{aB}	75,4 ± 0,3 ^{aB}	79,3 ± 0,1 ^{bAB}
WP-CAS-INUL	75,4 ± 0,2 ^{aBC}	76,0 ± 0,3 ^{aB}	78,8 ± 0,1 ^{bD}	81,5 ± 1,1 ^{cC}

STT: sin tratar térmicamente. Promedio ± desviación estándar (n = 3). Letras minúsculas distintas entre columnas indican diferencia significativa (P < 0,05) entre tratamientos térmicos. Letras mayúsculas distintas entre filas indican diferencia significativa (P < 0,05) entre sistemas modelo.

Los termogramas obtenidos para los sistemas WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL sin tratar y sometidos a los distintos TT, se presentan en la Figura 2.19. Al agregar otros componentes en el sistema (caseína y/o inulina), la concentración de WP se reduce y, por lo tanto, los picos de desnaturalización en los sistemas STT no presentan la forma característica observada para WP. Además, la reducción de la concentración de WP total en los sistemas WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL implica a su vez que la concentración de α -La pase a ser muy baja (representa aproximadamente el 20 % del total de WP) y, por lo tanto, el hombro asignado a la desnaturalización de la α -La en el sistema WP STT (Figura 2.19A), no fue detectable en los restantes sistemas. En líneas generales, en todos los sistemas se observa claramente la disminución de la entalpía de desnaturalización (área del pico endotérmico), al aumentar la temperatura del TT (Figura 2.19).

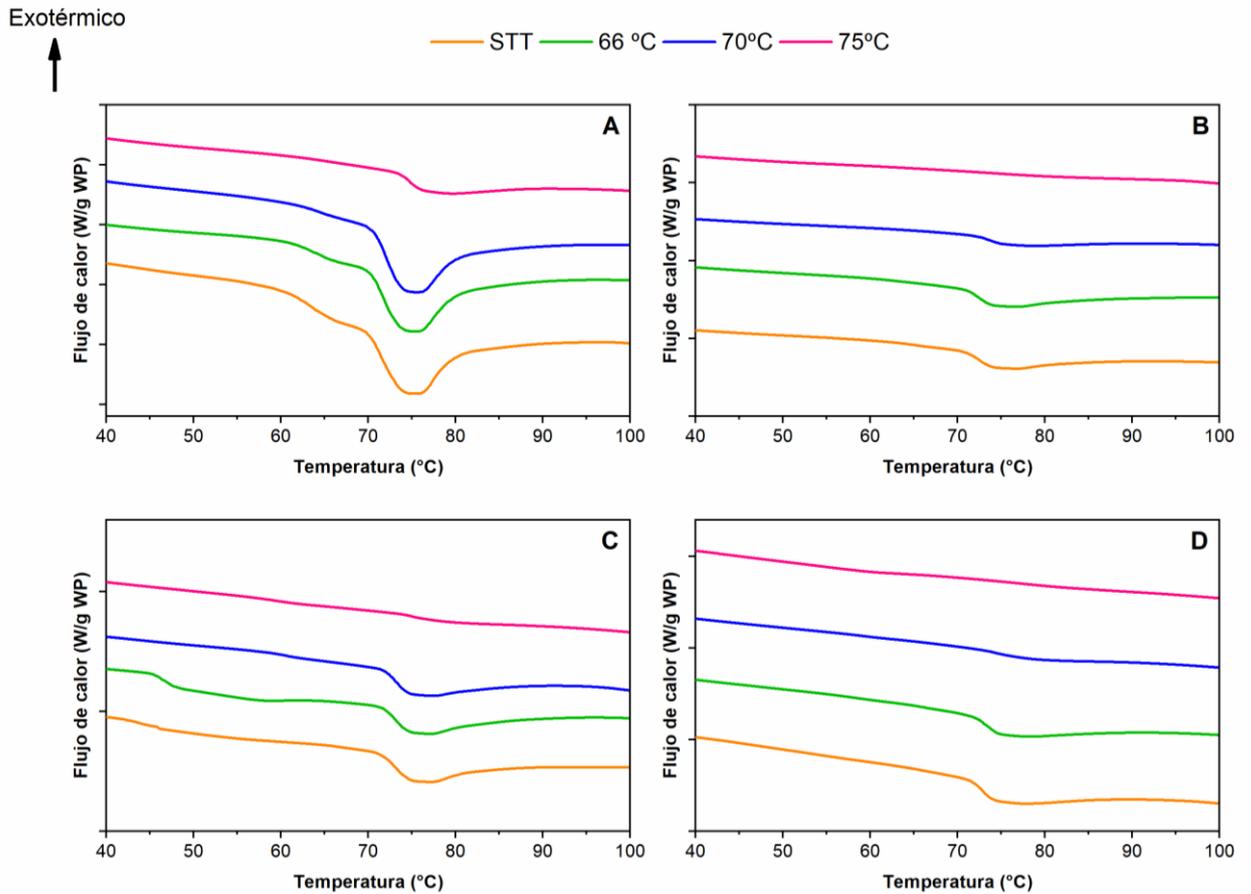


Figura 2.19. Termogramas obtenidos para los sistemas modelo WP (A), WP-CAS (B), WP-INUL (C) y WP-CAS-INUL (D) sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 o 75 °C por 30 min.

La incorporación de caseinato y/o inulina disminuyó significativamente ($P < 0,05$) la entalpía desnaturalización (ΔH) de los sistemas STT (Tabla 2.5), lo que indica que ocurrió algún tipo de modificación de las WP en presencia de inulina y/o caseína, sugiriendo que ambos componentes podrían afectar la desnaturalización térmica de la WP. En cuanto al efecto de la composición en la temperatura de desnaturalización de los sistemas STT, la adición de caseinato no modificó significativamente ($P > 0,05$) la Td de WP, en coincidencia con lo reportado por Kehoe & Foegeding (2011), quienes no obtuvieron un cambio significativo de la Td de la β -Lg al incorporar β -caseína. Por otro lado, la incorporación de inulina al sistema generó un aumento significativo ($P < 0,05$) de Td tanto en ausencia como en presencia de caseinato (WP-INUL o WP-CAS-INUL) (Tabla 2.4).

Tabla 2.5. Entalpías de desnaturalización (ΔH) obtenidas para los sistemas modelo sin tratar térmicamente (STT).

Sistema modelo	ΔH (J/g WP)
WP	$10,60 \pm 0,41^b$
WP-CAS	$7,89 \pm 0,66^a$
WP-INUL	$7,20 \pm 0,73^a$
WP-CAS-INUL	$7,99 \pm 0,34^a$

WP: proteínas del suero. Promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre sistemas modelo.

Analizando el efecto del TT sobre la Td (Tabla 2.4), se observa que en el sistema WP se mantuvo constante ($P > 0,05$) hasta el calentamiento a $75\text{ }^\circ\text{C}$, luego del cual la Td aumentó significativamente ($P < 0,05$). Este aumento puede explicarse porque el pico endotérmico, aún detectable luego de 30 min a $75\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 2.19A), corresponde a proteínas con mayor estabilidad térmica. Se obtuvieron resultados similares durante el TT del sistema WP-INUL, mientras que la Td de los sistemas WP-CAS y WP-CAS-INUL aumentó significativamente ($P < 0,05$) tanto luego del calentamiento a $70\text{ }^\circ\text{C}$ como a $75\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 2.4).

El grado de desnaturalización térmica obtenido luego de los TT en los sistemas WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL se presenta en la Figura 2.20. El grado de desnaturalización de WP aumentó significativamente ($P < 0,05$) con cada TT, aunque el mayor incremento en la desnaturalización se obtuvo luego del calentamiento a $75\text{ }^\circ\text{C}$, cuando se alcanzó $79,9 \pm 0,6\%$ de desnaturalización. Si bien la desnaturalización no es un proceso puntual, sino que ocurre dentro de un rango de temperaturas, considerando que la Td de la β -Lg en WP STT era $74,6\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 2.4), era esperable obtener un importante grado de desnaturalización luego de someter al sistema a una $T > T_d$ por 30 min. El sistema WP-CAS presentó un importante aumento del grado de desnaturalización tanto luego del TT a $70\text{ }^\circ\text{C}$ como luego del TT a $75\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 2.20), que coincide con el incremento observado en la Td luego de calentar el sistema a estas temperaturas (Tabla 2.4). WP-CAS presentó mayor grado de desnaturalización térmica que WP luego de los tratamientos a 70 y $75\text{ }^\circ\text{C}$, finalizando con un $93,0 \pm 1,8\%$ de desnaturalización de WP, al cabo de los 30 min a $75\text{ }^\circ\text{C}$. Cuando solo se incorporó inulina, se observó un aumento del grado de desnaturalización luego del TT a $66\text{ }^\circ\text{C}$ (mayor desnaturalización que WP), que no aumentó luego del calentamiento a $70\text{ }^\circ\text{C}$ ($P > 0,05$) y volvió a aumentar significativamente ($P < 0,05$) al finalizar el tratamiento a $75\text{ }^\circ\text{C}$ ($84,1 \pm 2,3\%$). El alto grado de desnaturalización obtenido en el sistema WP-INUL tratado a $66\text{ }^\circ\text{C}$, en comparación con el resto de los sistemas sometidos al mismo TT, coincide con lo observado por FT-IR (Figura 2.14C), donde se obtuvieron cambios a nivel de estructura secundaria (aumento de hoja β y reducción de α -hélice), al cabo de dicho TT. El sistema WP-CAS-INUL presentó el mayor nivel de desnaturalización térmica luego de todos los tratamientos térmicos, excepto por $66\text{ }^\circ\text{C}$ donde la desnaturalización de WP-INUL fue

significativamente más elevada ($P < 0,05$). La tendencia general de WP-CAS-INUL fue similar a WP-CAS, ya que durante el calentamiento a 70 °C se obtuvo un aumento del 61 % en el grado de desnaturalización, a diferencia de lo observado para WP y WP-INUL. Luego del calentamiento a 75 °C, WP-CAS-INUL presentó el mayor grado de desnaturalización ($97,4 \pm 0,8$ %), seguido por WP-CAS, WP-INUL y WP (Figura 2.20).

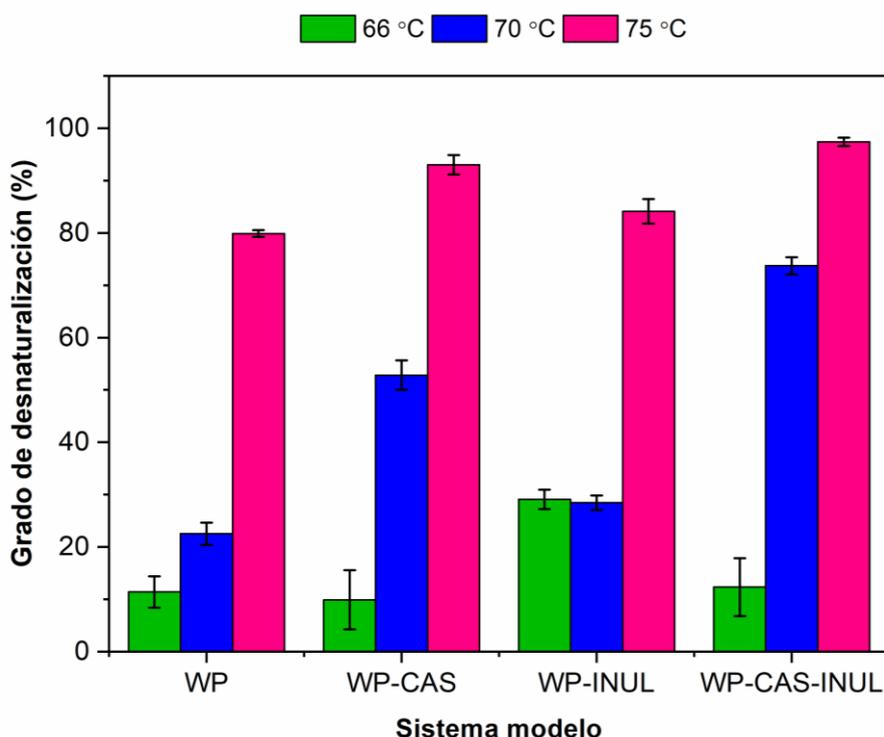


Figura 2.20. Grado de desnaturalización de los sistemas WP, WP-CAS, WP-INUL y WP-CAS-INUL, calentados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.

Las barras representan la desviación estándar ($n = 3$).

La desnaturalización de las WP no pudo evaluarse por DSC en los sistemas que contenían lactosa, porque se obtuvo un pico endotérmico de alta entalpía que se superponía con el de desnaturalización (Figura 2.21). En el termograma se indica la región de transición vítrea de la lactosa y la entalpía endotérmica mencionada, que se expresa en g de sólidos totales y no en g de proteína porque ese pico no se corresponde con la desnaturalización proteica. Dado el alto contenido de lactosa en los sistemas (Tabla 2.1), es probable que el pico observado corresponda a su solubilización. Para confirmarlo se prepararon suspensiones proteína (WPI+CAS) con distintos niveles de lactosa (Tabla 2.6).

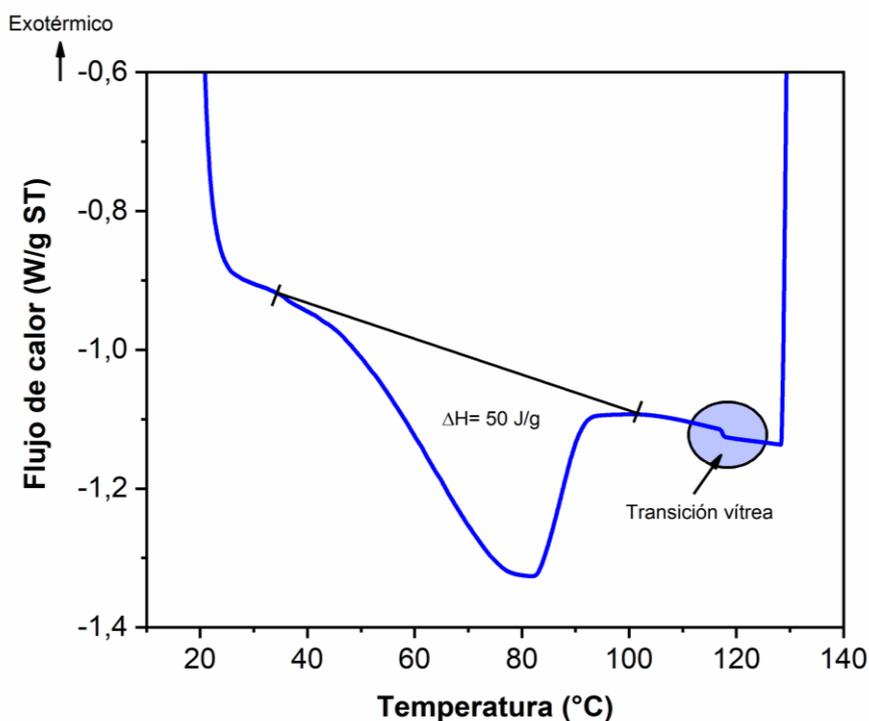


Figura 2.21. Termogramas obtenidos para el sistema WP-LAC sin tratar térmicamente, liofilizado y resuspendido en agua al 50 % (p/v).

El flujo de calor está expresado en W por g de sólidos totales (ST) presentes en el sistema.

Tabla 2.6. Composición de las suspensiones acuosas preparadas para evaluar el efecto de la lactosa.

Identificación	Proteína del suero (% m/v)	Proteína de caseína (% m/v)	Lactosa (% m/v)	Sólidos totales (% p/v)	Relación proteína total:lactosa
A	10,5	7,1	0,0	20,0	1,0:0,0
B	10,5	7,1	5,0	25,0	1,0:0,3
C	10,5	7,1	10,1	30,2	1,0:0,6
D	10,5	7,1	20,0	40,1	1,0:1,1
E	10,5	7,1	30,0	50,0	1,0:1,7
F	10,5	7,1	40,1	60,1	1,0:2,3

Las suspensiones se prepararon con los mismos insumos utilizados para la preparación de los sistemas modelo (4.1.1.).

En la Figura 2.22 se presentan los termogramas obtenidos al analizar por DSC las suspensiones acuosas descritas en la Tabla 2.6. La relación WP:CAS en las suspensiones analizadas es la misma que la presente en los sistemas modelo (1,5:1,0). En la suspensión sin lactosa (A), a pesar de tener un contenido de ST menor (20 %, p/v) al obtenido al resuspender los sistemas modelo antes de su análisis por DSC (30 %, p/v), se obtuvo un termograma de forma similar que para el sistema WP-CAS STT (Figura 2.98B), pudiéndose identificar el pico correspondiente a la desnaturalización de las WP. Lo mismo ocurrió al incorporar 5 y 10 % lactosa (suspensiones B y

C, respectivamente). Al agregar 20 % de lactosa (suspensión D) la desnaturalización proteica es apenas perceptible y se observa también una transición endotérmica a temperaturas más bajas (40-60 °C). Esta transición correspondiente a un pico endotérmico muy ancho que se incrementa al aumentar la concentración de lactosa a 30 % (E). Finalmente, cuando la concentración de lactosa alcanza 40 % (F) el pico adquiere un tamaño considerable, abarcando temperaturas de entre 40 y 100 °C y es imposible distinguir el cambio en el flujo de calor correspondiente a la desnaturalización de las WP.

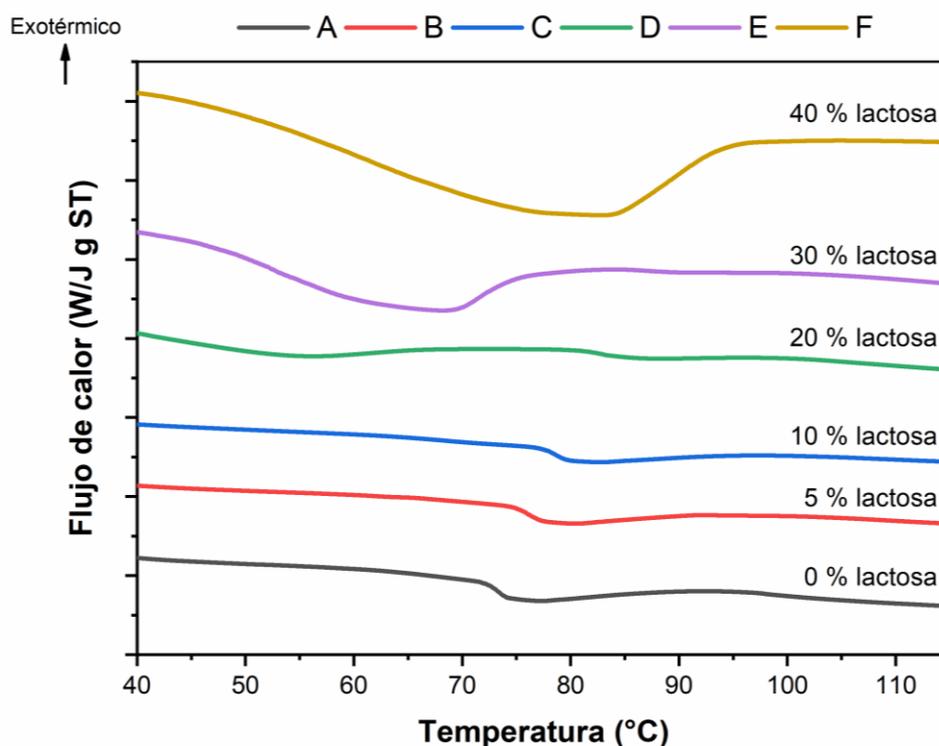


Figura 2.22. Termogramas de las suspensiones acuosas conteniendo 10,5 % de proteínas del suero y 7,1 % de caseínas y concentraciones crecientes de lactosa: 0,0 % (A), 5,0 % (B), 10,1 % (C), 20,0 % (D), 30,0 % (E) y 40,1 % (F).

El flujo de calor está expresado en W por g de sólidos totales (ST) presentes en el sistema.

Estos resultados parecen confirmar que el pico observado en el sistema WP-LAC (Figura 2.21) corresponde a la solubilización de la lactosa, porque aumenta su área y su temperatura de pico al aumentar la concentración (al haber más lactosa se requiere mayor temperatura para solubilizarla y una mayor absorción de calor). Por lo tanto, no fue posible analizar la desnaturalización de las WP por DSC, en los sistemas modelo que contenían lactosa.

4.2.5. Solubilidad proteica

Finalmente se determinó el efecto de la composición y el tratamiento térmico en la solubilidad proteica. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.23.

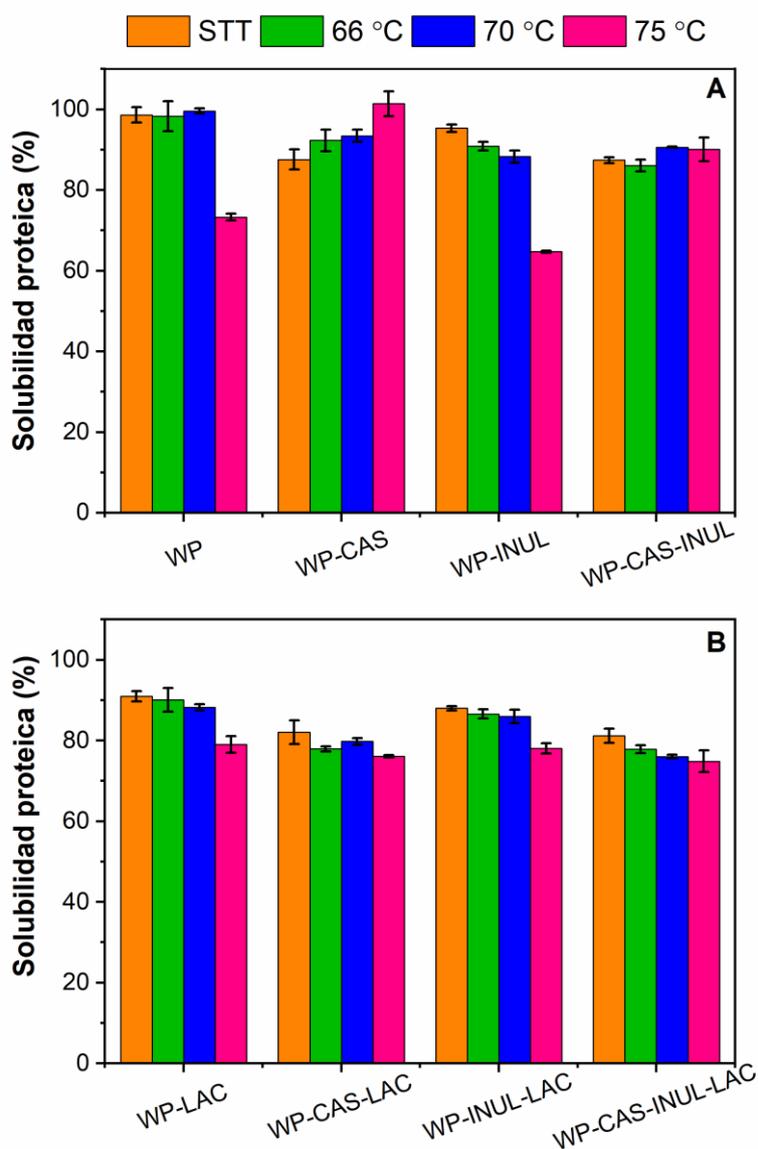


Figura 2.23. Solubilidad proteica (% p/p) de los sistemas modelo sin lactosa (A) y con lactosa (B) sin tratar térmicamente (STT) y tratados a 66, 70 y 75 °C por 30 min.

Las barras representan la desviación estándar (n = 3).

En los sistemas STT sin lactosa, la solubilidad varió entre $98,6 \pm 1,9$ % para WP y $87,4 \pm 0,7$ % para WP-CAS-INUL (Figura 2.23A). Antes del TT, la adición de caseinato al sistema WP resultó en una reducción significativa ($P < 0,05$) de la solubilidad proteica, mientras que la adición de inulina no la afectó ($P > 0,05$). Así, comparando la solubilidad de los sistemas STT sin lactosa se observa que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre WP y WP-INUL, y su solubilidad

fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la de WP-CAS y WP-CAS-INUL, no detectándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la solubilidad de estos últimos.

A su vez, el agregado de lactosa generó una reducción significativa ($P < 0,05$) de la solubilidad en todos los sistemas: $WP > WP-LAC$, $WP-CAS > WP-CAS-LAC$, $WP-INUL > WP-INUL-LAC$ y $WP-CAS-INUL > WP-CAS-INUL-LAC$. La lactosa se encontraba en una concentración considerablemente más alta (~15 %) que los componentes restantes (1,2-1,8 %) (Tabla 2.1). Por lo tanto, el agregado de lactosa a los sistemas implicó un incremento significativo de los ST y, por ende, una reducción del agua disponible para la solubilización de las proteínas, lo que podría explicar el descenso obtenido en la solubilidad. Por otro lado, la tendencia en la solubilidad de los sistemas con lactosa fue igual a la observada en los sistemas sin lactosa: la inulina no afectó la solubilidad ($P > 0,05$) pero el caseinato generó una reducción significativa ($P < 0,05$). El efecto del agregado de caseinato no puede atribuirse a la reducción de los ST, dado que se agregó una concentración (1,2 %) marcadamente menor que la lactosa e incluso su concentración fue menor que la de inulina (1,5 %) que no afectó la solubilidad. Incluso, las solubilidades de los sistemas WP-CAS y WP-LAC fueron iguales desde el punto de vista estadístico ($P > 0,05$), a pesar de que el nivel de ST de WP-CAS (3,4 %) era menor que el de WP-LAC (17,2 %). La disminución en la solubilidad proteica total no se debe a que las caseínas tengan menor solubilidad en esta concentración, dado que, como se había verificado en el ensayo preliminar de la Parte I, un sistema CAS (compuesto únicamente por caseinato de calcio en la misma concentración en la que se utilizó en los sistemas modelo) fue 100 % soluble (Figura 2.4). Estos resultados sugieren que, en los sistemas no calentados, existe algún tipo de interacción entre las WP y las caseínas, que reduce su solubilidad.

Los resultados obtenidos para los sistemas STT confirman aquellos obtenidos en el ensayo preliminar (Parte I), en cuanto al efecto de la inulina, la caseína y la lactosa en la solubilidad proteica. El agregado de inulina no afectó ($P > 0,05$) la solubilidad ni del sistema WP ($WP = WP-INUL$), ni en presencia de caseína ($WP-CAS = WP-CAS-INUL$) y/o lactosa ($WP-LAC = WP-INUL-LAC$, $WP-CAS-LAC = WP-CAS-INUL-LAC$). El agregado de lactosa, probablemente debido a la reducción del agua disponible para la solubilización, redujo ($P < 0,05$) la solubilidad de todos los sistemas, tanto en presencia como en ausencia de caseína e/o inulina. El agregado de caseinato también disminuyó significativamente la solubilidad proteica de los sistemas en presencia o ausencia de inulina y/o lactosa. En este caso, la reducción no es atribuible a una menor solubilidad del caseinato ni al aumento de los ST, lo que sugeriría la interacción entre componentes.

El TT a 66 y 70 °C no tuvo efecto significativo sobre la solubilidad de WP ($P > 0,05$), pero el calentamiento a 75 °C generó una reducción significativa del 25 % (Figura 2.23A). En el sistema WP-CAS, la solubilidad se mantuvo constante ($P > 0,05$) durante todos los tratamientos térmicos, excepto 75 °C, donde se obtuvo un aumento significativo, alcanzándose la máxima solubilidad

(~100 %). Por otro lado, en el sistema WP-INUL se observó una reducción significativa de la solubilidad luego de cada TT (STT > 66 °C > 70 °C > 75 °C). El sistema WP-INUL presentó una mayor pérdida de solubilidad luego del TT a 75 °C que el sistema WP, lo que podría explicarse por la diferencia observada anteriormente en la forma de las DTP, dado que WP-INUL presentó una DTP bimodal y WP una DTP monomodal (Figura 2.8). Al agregar ambos componentes juntos (WP-CAS-INUL), la solubilidad del sistema fue prácticamente constante con el TT. Analizando el efecto de la caseína en los resultados anteriores se observa que, la presencia de caseinato alteró el comportamiento de las WP durante el TT. En presencia de caseína los agregados proteicos formados luego del TT a 75 °C fueron de menor tamaño que aquellos obtenidos en ausencia de caseína (Figuras 2.8 y 2.9). A su vez, en los sistemas con caseína el SDS-PAGE no reveló la presencia de agregados estabilizados por uniones covalentes, como sí se habían observado en los sistemas WP y WP-INUL (Figuras 2.11 y 2.12).

La actividad chaperona de las caseínas, que protege a las WP contra la agregación, ha sido descrita en la literatura, aunque su mecanismo aún no se ha dilucidado completamente. Gaspard et al. (2017) reportaron que la κ -caseína estabilizó agregados de WP durante su calentamiento y que la presencia de α_s - y β -caseína favorecieron aún más la estabilidad. Kehoe & Foegeding (2011) estudiaron la actividad chaperona de la β -caseína y propusieron que la β -caseína compete con las WP, formando agregados de menor tamaño que los agregados WP-WP, lo que aumenta su solubilidad. El efecto en la solubilidad también ha sido verificado en el presente estudio (Figura 2.23). Mientras que la solubilidad del sistema WP disminuyó significativamente ($P < 0,0001$) luego del calentamiento a 75 °C por 30 min, la solubilidad de WP-CAS aumentó significativamente en 8,5 % luego del mismo TT. En consecuencia, los resultados obtenidos apoyan la teoría de la actividad chaperona de las caseínas. La inhibición de la formación de grandes agregados ha sido demostrada previamente en la literatura para diferentes fuentes de caseína, como caseinato de sodio, MPC y α_{s1} -, β - y κ -caseína (Gaspard et al., 2017; Guyomarc'h et al., 2009; Kehoe & Foegeding, 2011; O'Kennedy & Mounsey, 2006; Singh et al., 2019), y, en la presente tesis, para caseinato de calcio. La estabilización dada por las β - y α_{s1} -caseína ha sido explicada por interacciones hidrofóbicas preferenciales entre las caseínas y las WP nativas, mientras que en la actividad chaperona de la κ -caseína también podrían estar involucrados puentes disulfuro, dada la presencia de residuos de cisteína en dicha caseína (Guyomarc'h et al., 2009).

En cuanto al efecto de la lactosa, al agregarla sola (WP-LAC) se observó la misma tendencia que para el sistema WP, la solubilidad se mantuvo constante luego del calentamiento por 30 min a 66 y 70 °C, y finalmente se observó una reducción significativa al finalizar el TT a 75 °C. Sin embargo, a pesar de que la solubilidad inicial (STT) había disminuido al agregar la lactosa, al cabo del TT a 75 °C el sistema WP-LAC presentó una solubilidad significativamente mayor (79 %) que el sistema WP (73 %). Al combinar la lactosa con la inulina (WP-INUL-LAC) se obtuvo

el mismo comportamiento que para WP-LAC (la solubilidad sólo disminuyó luego del TT a 75 °C). Cuando se agregó lactosa en conjunto con caseína tanto en ausencia (WP-CAS-LAC) como en presencia de inulina (WP-CAS-INUL-LAC) la solubilidad proteica no varió ($P > 0,05$) con los TT. Estos resultados son coincidentes con los de tamaño de partícula (Figura 2.9) y SDS-PAGE (Figura 2.12), donde se observó una reducción de la agregación proteica por efecto de la lactosa. Estudios previos han reportado que la lactosa actúa como un agente hidrofílico protector de las proteínas del suero durante su secado o aplicación de tratamientos térmicos. Anema, Siew et al. (2006) estudiaron el efecto de incrementar los sólidos solubles no proteicos y la concentración de lactosa en la leche, en la desnaturalización irreversible de β -Lg y α -La. Los autores reportaron que, tanto al aumentar la lactosa como los sólidos solubles no proteicos totales, disminuyó la velocidad de desnaturalización irreversible de ambas proteínas, y lo explicaron por la teoría de la hidratación preferencial, de acuerdo con la cual, la presencia de azúcares en altos niveles favorecería la autoasociación de las proteínas. En proteínas globulares como β -Lg y α -La, aumentar la concentración de solutos, como la lactosa, incrementa el nivel de ordenamiento del agua alrededor de las moléculas proteicas, lo que excluye a la lactosa del ambiente proteico resultando en un incremento desfavorable de la energía libre del sistema. Como estos efectos aumentan al aumentar el área superficial de las proteínas, las proteínas desplegadas presentarán más interacciones proteína-agua desfavorables que las proteínas nativas, estabilizándose la estructura nativa. Dissanayake, Kasapis et al. (2013) también observaron que la adición de lactosa aumenta la resistencia de las WP a la desnaturalización durante la aplicación de altas presiones hidrostáticas. Los autores concluyeron que la lactosa favorece las interacciones intramoleculares dentro de la estructura globular compacta de las moléculas proteicas, que de esta forma presentan menor reactividad en ambientes acuosos.

5. Conclusiones

- En el presente capítulo se demostró que la desnaturalización, agregación y pérdida de solubilidad de las WP, por efecto del tratamiento térmico, son afectadas por la presencia de caseína, inulina o lactosa.
- Las WP sufrieron desnaturalización por efecto del calentamiento en presencia de caseína, tal como se observó por DSC. Sin embargo, las caseínas ejercieron una actividad chaperona previniendo la agregación y pérdida de solubilidad de las WP, aún luego de un tratamiento térmico a 75 °C durante 30 min.
- La inulina indujo cambios conformacionales en las WP, que pudieron detectarse por DSC y FT-IR. Además, la adición de inulina en el sistema STT redujo la solubilidad proteica en 10 %. La presencia de inulina no inhibió la formación de agregados de alto peso molecular luego del tratamiento térmico a 75 °C, tal como se reflejó en la distribución de tamaño de partícula de los sistemas.

- La presencia de lactosa inhibió en cierta medida la formación de agregados de alto peso molecular luego del calentamiento a 75 °C, que se reflejó en los resultados de DTP y SDS-PAGE. Además, si bien el agregado de lactosa, que implicó un importante incremento de los ST del sistema, disminuyó la solubilidad inicial (STT) de los sistemas, también redujo la pérdida de solubilidad por acción del tratamiento térmico.
- La actividad chaperona de las caseínas, protegiendo contra la agregación de las WP, se mantuvo en presencia de inulina y/o lactosa.

CAPÍTULO 3:

Efecto de las etapas y condiciones de producción *wet-mix* sobre las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales de fórmulas infantiles

1. Introducción

Las fórmulas infantiles en polvo se producen comúnmente a partir de leche de vaca, por el método *wet-mix* o de mezcla húmeda. Este proceso típicamente involucra la rehidratación y dispersión de ingredientes secos en agua o leche descremada, seguida por la pasteurización, homogeneización para crear una emulsión, evaporación para concentrar la mezcla y secado spray para producir el polvo (Blanchard et al., 2013). Las condiciones bajo las cuales se procesa la mezcla húmeda tienen implicancias tecnológicas, nutricionales y funcionales.

La pasteurización es un punto crítico del proceso, que se requiere para reducir la carga microbiana y asegurar la calidad del producto que será consumido por recién nacidos. En los estudios publicados sobre fórmulas infantiles se utilizan habitualmente temperaturas de pasteurización próximas a 100 °C (Kelly et al., 2016; Masum et al., 2019; McCarthy et al., 2012; Murphy et al., 2015). Sin embargo, las altas temperaturas pueden generar reacciones indeseables. Como consecuencia del calentamiento, en las primeras etapas de la reacción de Maillard se forman los compuestos de Amadori, que provocan que la lisina, un aminoácido esencial, deje de estar biológicamente disponible (Krause et al., 2003). Además, la fracción proteica de las fórmulas infantiles suele estar compuesta por un 60 % de proteínas del suero (WP), que son termosensibles y sufren cambios conformacionales, como la desnaturalización y la agregación (Fenelon et al., 2018), tal como se discutió en el capítulo anterior. Sin embargo, tanto la temperatura a la que ocurren estos cambios como el grado en el que se desarrollan, dependen de las características de la mezcla húmeda, tales como pH, fuerza iónica, presencia de otros componentes y contenido de sólidos totales (ST), como de la duración y el tipo de tratamiento térmico (directo/indirecto) (Akkerman et al., 2016; Anema, Siew et al., 2006; Anema & Li, 2003; Guyomarc'h et al., 2009; Marx & Kulozik, 2018; Oldfield et al., 2001). Las reacciones de desnaturalización y agregación pueden causar pérdida de solubilidad, que impactaría negativamente aspectos nutricionales (digestibilidad reducida), tecnológicos (*fouling*) y tecno-funcionales (capacidad emulsionante) (Anandharamakrishnan et al., 2008; Carbonaro et al., 1998; Dapuetto et al., 2019; Petit et al., 2013). Por otro lado, estas reacciones pueden generar un aumento en la viscosidad de la mezcla húmeda, que a su vez reduce la eficiencia de las bombas y afecta las propiedades físicas del polvo final (Q. T. Ho et al., 2019). El tamaño de las gotas creadas durante la atomización en el secador spray afecta el tamaño de partícula del polvo y está directamente influenciado por la viscosidad del líquido a la entrada del secador (Schuck, Méjean et al., 2005).

En la producción de fórmulas infantiles, normalmente se utilizan niveles bajos de ST en la mezcla húmeda (20-30 %), para evitar problemas vinculados a la viscosidad. Sin embargo, antes de la etapa del secado spray, la mezcla se concentra hasta 45-55 % ST a través de un proceso de evaporación, con el objetivo de reducir los costos asociados al secado, y mejorar la calidad del polvo resultante (Blanchard et al., 2013). Aumentar los ST durante la preparación de la mezcla

húmeda reduciría los costos de energía asociados a la remoción de agua durante las etapas de evaporación y secado spray, y podría incluso permitir suprimir la etapa de evaporación (Murphy et al., 2013). Sin embargo, el nivel de ST en la mezcla húmeda está limitado por el aumento de viscosidad alcanzado.

El proceso de producción *wet-mix* tiene varios parámetros que pueden modificarse con el fin de mejorar la eficiencia del proceso y la calidad del producto. Aumentar el nivel de ST de la mezcla húmeda es deseable para reducir costos asociados al gasto energético. A su vez, aplicar tratamientos térmicos menos intensos podría contribuir a mejorar la calidad de la fórmula, siempre que no afecte la seguridad del producto, que está destinado a una población sensible. Por otro lado, es necesario considerar el impacto que pueden generar los cambios en dichos parámetros.

2. Objetivo

Evaluar el efecto de las variables del proceso, nivel de sólidos totales y temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, en las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales de las fórmulas infantiles, a lo largo de su proceso de producción.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Los ingredientes utilizados para la producción de las fórmulas modelo fueron:

- Leche en polvo descremada *low-heat* (Bützower Dauermilchwerk), obtenida de Procudan (Kolding, Dinamarca).
- Aislado de proteínas del suero (WPI, Procudan ®, 89 % proteína), obtenido de Arla Food Ingredients (Viby J, Dinamarca).
- Lactosa (Variolac 992), obtenida de Arla Food Ingredients (Viby J, Dinamarca).
- Fructo-oligosacáridos (FOS, Beneo Orafiti P95) con grado de polimerización 2-8, donado por Alsiano (Birkerød, Dinamarca).
- Galacto-oligosacáridos (GOS, Promovita ®), donado por Dairy Crest Limited (Newport, Reino Unido).
- Aceite de girasol comercial, adquirido en un supermercado local (Copenhague, Dinamarca).

Para estimar las cantidades requeridas de cada ingrediente se requirió conocer la concentración de los componentes relevantes para la producción, que se presentan en la Tabla 3.1. En el caso del aceite de girasol se asumió que su composición era 100 % materia grasa.

Tabla 3.1. Composición porcentual (% p/p) de los macrocomponentes relevantes para la producción de las fórmulas en los ingredientes, según los certificados de análisis de lote.

Ingrediente	Concentración de componentes relevantes
Leche descremada en polvo	Proteína = 35,2 % (p/p, b.h.) ^{1*} , Lactosa = 52,8 % (p/p, b.h.), materia grasa = 1,08 % (p/p, b.h.)
WPI	Proteína = 88,5 % (p/p, b.h.) ^{2*} , Lactosa = 52,5 % (p/p, b.h.)
Lactosa	Lactosa = 99,8 % (p/p, b.h.)
Galacto-oligosacáridos (GOS)	GOS = 70 % (p/p, b.h.)
Fructo-oligosacáridos (FOS)	FOS = 100 % (p/p, b.h.)

b.h.= base húmeda. ¹Se asumió que del total de proteínas en la leche 80 % correspondía a caseína y 20 % a proteínas del suero. ²Se asumió que el 100 % de las proteínas del WPI eran proteínas del suero. *Las concentraciones de proteína consignadas en los certificados de la leche en polvo descremada y el WPI fueron verificados mediante determinación por Kjeldahl.

3.2. Producción de fórmulas modelo

3.2.1. Diseño experimental

Las fórmulas infantiles modelo se produjeron bajo cuatro condiciones de procesamiento (dos variables en dos niveles): sólidos totales en la mezcla húmeda = 50 o 60 % (p/p) y pasteurización 75 o 100 °C por 18 s (Tabla 3.2). Cada fórmula se elaboró por duplicado y las réplicas (lotes) se produjeron en días independientes.

Tabla 3.2. Diseño experimental.

Condición	Sólidos totales en mezcla húmeda (% p/p)	Temperatura de pasteurización (°C)	Número de lotes de producción
50%-75°C	50	75	2
50%-100°C	50	100	2
60%-75°C	60	75	2
60%-100°C	60	100	2

3.2.2. Formulación modelo

Las mezclas húmedas se formularon de modo de obtener relaciones proteína total:lactosa = 1:5, proteína total:aceite = 1:2,5 y proteínas del suero:caseínas en la fracción proteica = 60:40. La cantidad de oligosacáridos (90 % GOS, 10 % FOS) agregados a la mezcla se calcularon de forma de obtener 0,6 g de oligosacáridos en 100 mL de fórmula reconstituida (12,5 %, p/v). La composición objetivo de las fórmulas en polvo fue: 11,2 % proteína, 56,0 % lactosa, 28,0 % materia grasa, 4,32 % GOS y 0,48 % FOS, que se seleccionó de forma de cumplir los requerimientos de la legislación europea vigente (Comisión Europea, 2016).

3.2.3. Producción de las fórmulas modelo

Las fórmulas infantiles modelo se produjeron a escala piloto (lote = 15 kg) por el método *wet-mix*, en la planta piloto de lácteos del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Copenhague, según el esquema presentado en la Figura 3.1.

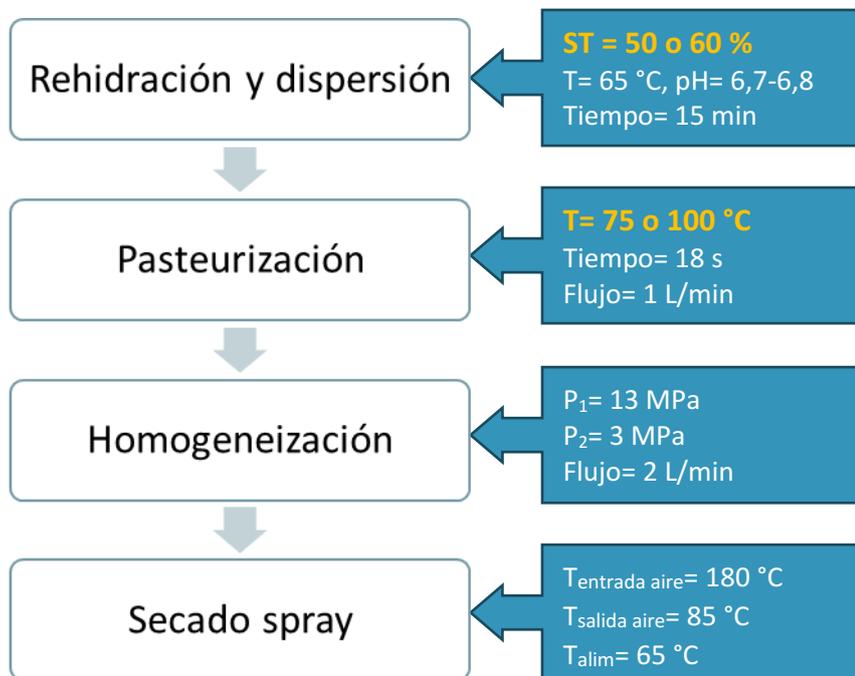


Figura 3.1. Esquema de producción de fórmulas infantiles modelo por el método *wet-mix*.

3.2.3.1. Rehidratación y dispersión

Se calentó agua desionizada a 65 °C en un tanque con agitación y vacío Scanima tipo SRB-20 (Aalborg, Dinamarca). La temperatura se seleccionó de manera de asegurar la completa disolución de la lactosa y evitar enmascarar el efecto del tratamiento térmico que se buscaba estudiar. Los ingredientes se agregaron en las cantidades presentadas en la Tabla 3.3, calculados según su composición (Tabla 3.1), dependiendo del nivel de ST que se quería obtener. Los ST (50 y 60 %, p/p) se seleccionaron de forma de obtener mezclas húmedas con alta materia seca lo que permitiría evitar la etapa de evaporación previa al secado spray y reducir el gasto energético. En primer lugar, se agregó la lactosa y se agitó hasta observar su completa disolución, luego se agregó aproximadamente el 10 % de la cantidad total de aceite para reducir la formación de espuma, seguido por el WPI, leche en polvo descremada, GOS, FOS y, por último, el aceite restante. El pH de la mezcla se ajustó a 6,7-6,8 utilizando KOH 2 M y la mezcla se agitó durante 15 min a 65 °C.

Una vez finalizada la etapa de dispersión, y antes de pasar a la pasteurización, se tomaron muestras para verificar el contenido de ST de las mezclas húmedas. Los ST se determinaron por triplicado, por secado en estufa a 102 °C (ISO, 2010) y los resultados se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Cantidades de ingredientes utilizados (por lote de 15 kg) en las fórmulas modelo con distintos niveles de ST y nivel de ST real obtenido luego de la etapa de dispersión.

ST (%)	Agua (kg)	Lactosa (kg)	LPD (kg)	WPI (kg)	Aceite (kg)	GOS (kg)	FOS (kg)	ST post-dispersión (% p/p) ¹
50	7,50	3,42	1,14	0,45	2,01	0,44	0,034	48,9 ± 0,7
60	6,00	4,10	1,37	0,54	2,41	0,53	0,041	58,3 ± 1,1

¹Promedio ± desviación estándar (n = 4). LPD= Leche en polvo descremada, WPI= aislado de proteínas del suero, GOS= galacto-oligosacáridos, FOS= fructo-oligosacáridos.

3.2.3.2. Tratamiento térmico

Inmediatamente luego de la dispersión, las mezclas se pasteurizaron a 75 o 100 °C durante 18 s en un intercambiador de calor tubular MicroThermics Lab (Carolina del Norte, Estados Unidos) a un flujo de 1 L/min. El tiempo de pasteurización se seleccionó según la configuración del equipo y se mantuvo en 18 s para ambos tratamientos, de forma de que la única variable del proceso fuera la temperatura. La temperatura de 100 °C se seleccionó porque es la usualmente reportada en la literatura para este tipo de productos (Kelly et al., 2016; Masum et al., 2019; McCarthy et al., 2012; Murphy et al., 2015). El tratamiento a 75 °C se seleccionó por ser la temperatura de pasteurización legal para productos con más de 18 % de sólidos totales, de acuerdo con la normativa vigente en Estados Unidos (FDA, 2017). La temperatura de las mezclas húmedas a la salida del pasteurizador fue aproximadamente 60 °C.

3.2.3.3. Homogeneización

Con el objetivo de formar una emulsión, las mezclas húmedas pasteurizadas se homogeneizaron en un homogeneizador APV B5-14-38 (Søborg, Dinamarca) de doble etapa, $P_{1era\ etapa} = 13\ MPa$ y $P_{2da\ etapa} = 3\ MPa$ con una velocidad de flujo de 2 L/min.

3.2.3.4. Secado spray

Las mezclas húmedas pasteurizadas y homogeneizadas fueron finalmente secadas en un secador spray piloto GEA Mobile Niro I (Copenhague, Dinamarca) equipado con una tobera de presión. La alimentación (mezclas húmedas) se mantuvo a 65 °C en agitación. Las temperaturas de entrada y salida del aire fueron 180 y 85 °C, respectivamente. Una vez colectados los polvos, se envasaron al vacío en bolsa multicapa y se almacenaron en cámara refrigerada a 5 °C hasta el momento del análisis, a no ser que se indique lo contrario.

3.3. Estimación del consumo energético

Para estimar las diferencias en el consumo de energía entre las condiciones de procesamiento estudiadas (ST = 50 o 60 %, temperatura de pasteurización = 75 o 100 °C), se realizaron balances de masa y energía para las etapas de pasteurización y secado spray, considerando que fueron los pasos del proceso donde potencialmente los consumos de energía podrían diferir.

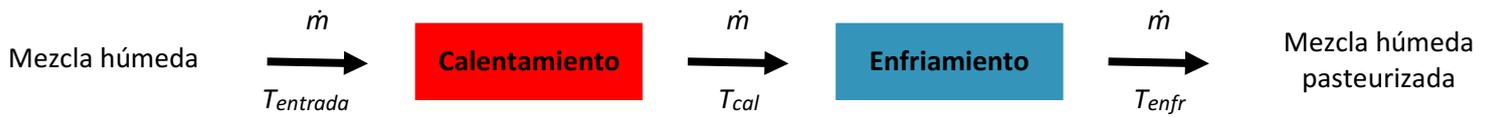


Figura 3.2. Representación del balance de energía en el pasteurizador.

La energía requerida para calentar (ΔH_{cal} , kJ/s) y enfriar (ΔH_{enf} , kJ/s) durante la pasteurización se estimó de acuerdo con los balances presentados en las Ecuaciones 3.1 y 3.2, esquematizados en la Figura 3.2.

$$Q_{cal} = \dot{m} \times (Cp_{cal} \times T_{cal} - Cp_{entrada} \times T_{entrada}) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$Q_{enf} = \dot{m} \times (Cp_{cal} \times T_{cal} - Cp_{enf} \times T_{enf}) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

- \dot{m} es el flujo másico de la mezcla húmeda a través del pasteurizador = 0,02 kg/s
- $T_{entrada}$ es la temperatura de la mezcla húmeda a la entrada del pasteurizador = 65 °C
- T_{cal} es la temperatura de pasteurización = 75 o 100 °C
- T_{enf} es la temperatura de la mezcla húmeda a la salida del pasteurizador = 60 °C
- Cp_{cal} , $Cp_{entrada}$ y Cp_{enf} son los calores específicos de las mezclas húmedas a T_{cal} , $T_{entrada}$ y T_{enf} , respectivamente.

Los valores de Cp para cada mezcla húmeda se calcularon considerando su composición y la temperatura a la que se sometieron, según el modelo propuesto por Choi & Okos (1986) descrito por Singh & Heldman (2014). Así, de acuerdo con las ecuaciones de Choi & Okos (1986) (Tabla 3.4) se calcularon los Cp para cada componente y temperatura, y considerando la composición, se obtuvo el Cp de cada mezcla a todas las temperaturas requeridas para los balances de energía (Tabla 3.5).

Tabla 3.4. Ecuaciones para obtener los calores específicos (C_p) de cada componente de las mezclas húmedas en función de la temperatura (Singh & Heldman, 2014).

Componente	C_p (kJ/kg K)
Agua*	$C_p = 4,1762 - 9,0864 \times 10^{-5}T + 5,4731 \times 10^{-6}T^2$
Proteína	$C_p = 2,0082 + 1,2089 \times 10^{-3}T - 1,3129 \times 10^{-6}T^2$
Grasa	$C_p = 1,9842 + 1,4733 \times 10^{-3}T - 4,8008 \times 10^{-6}T^2$
Carbohidratos	$C_p = 1,5488 + 1,9625 \times 10^{-3}T - 5,9399 \times 10^{-6}T^2$
Fibra	$C_p = 1,8459 + 1,8306 \times 10^{-3}T - 4,6509 \times 10^{-6}T^2$
Ceniza	$C_p = 1,0926 + 1,8896 \times 10^{-3}T - 3,6817 \times 10^{-6}T^2$

*Para el rango de temperatura: 0 a 150 °C.

Tabla 3.5. Valores de calor específico (C_p) estimados para cada mezcla húmeda en cada etapa de la pasteurización.

Condición	$C_{p\text{entrada}}$ (kJ/kg K)	$C_{p\text{cal}}$ (kJ/kg K)	$C_{p\text{enf}}$ (kJ/kg K)
50%-75°C	3,03 ± 0,02	3,04 ± 0,03	3,03 ± 0,02
50%-100°C	3,03 ± 0,02	3,06 ± 0,02	3,03 ± 0,02
60%-75°C	2,82 ± 0,03	2,83 ± 0,04	2,81 ± 0,03
60%-100°C	2,82 ± 0,03	2,84 ± 0,01	2,81 ± 0,03

Promedio ± desviación estándar entre lotes (n = 2). $C_{p\text{entrada}}$ = calor específico a la entrada del pasteurizador (T= 65 °C), $C_{p\text{cal}}$ calor específico en el pasteurizador (T= 75 o 100 °C) y $C_{p\text{enf}}$ = calor específico a la salida del pasteurizador (T= 60 °C).

Para estimar el calor de evaporación requerido durante el secado spray de cada mezcla húmeda se realizó un balance de energía basado en el balance de masa del producto, según el esquema de la Figura 3.3.

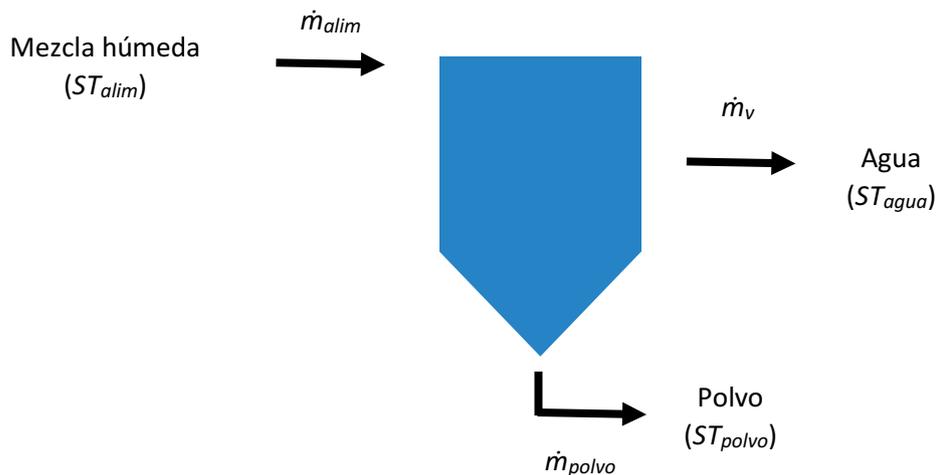


Figura 3.3. Representación del balance de masa en el secador spray.

En la Ecuación 3.3 se presenta el balance de masa total en el secador spray y en la Ecuación 3.4 el balance de masa de sólidos.

$$\dot{m}_{alim} = \dot{m}_{polvo} + \dot{m}_v \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$\dot{m}_{alim} \times ST_{alim} = \dot{m}_{polvo} \times ST_{polvo} + \dot{m}_v \times ST_{agua} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde:

- \dot{m}_{alim} es el flujo másico en la alimentación (mezcla húmeda) del secador spray
- \dot{m}_{polvo} es el flujo másico de polvo a la salida del secador spray
- \dot{m}_v es el flujo másico de vapor de agua
- ST_{alim} y ST_{polvo} son los sólidos totales en la alimentación (mezcla húmeda) y el polvo, respectivamente
- ST_{agua} son los sólidos totales en el vapor de agua, que se asumen iguales a 0 %.

A su vez, considerando el balance de energía (Ecuación 3.5) y las Ecuaciones 3.3 y 3.4 se obtiene la Ecuación 3.6.

$$Q_{evap} = \dot{m}_v \times \Delta H_{vap} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$$Q_{evap} = \dot{m}_{alim} \times \left(1 - \frac{ST_{alim}}{ST_{polvo}}\right) \times \Delta H_{vap} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Donde:

- \dot{m}_v es el flujo másico de vapor de agua
- ΔH_{vap} (2258 kJ/kg) es el calor específico de vaporización del agua a presión atmosférica
- \dot{m}_{alim} es el flujo másico en la alimentación del secador spray (0,0011 kg/s para las mezclas húmedas de 50 % ST y 0,0009 kg/s para las mezclas húmedas con 60 % ST)
- ST_{alim} y ST_{polvo} son los sólidos totales en la alimentación (mezcla húmeda) y el polvo, respectivamente

3.4. Cuantificación de las proteínas del suero nativas

El nivel de WP nativas luego de cada etapa del proceso (pasteurización, homogeneización y secado spray) se determinó por cuantificación de las proteínas solubles a pH= 4,6 por HPLC en fase reversa, utilizando el método descrito por Anandharamakrishnan et al. (2008), con modificaciones. La concentración de WP nativas se determinó como la suma de las concentraciones de β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactoalbúmina (α -La) solubles, obtenidas luego de precipitar las caseínas y WP desnaturalizadas a pH= 4,6 (Marx & Kulozik, 2018). Las muestras obtenidas para cada lote, luego de cada etapa del proceso, se analizaron por duplicado.

3.4.1. Obtención de las proteínas del suero solubles

Las muestras de mezcla húmeda (obtenidas luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización) o polvo (obtenidas luego del secado spray) se pesaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Las cantidades a pesar se calcularon de forma de obtener una concentración de proteína constante de 6,25 g/L en la dilución final. Se agregaron aproximadamente 15 mL de agua Milli-Q y se agitó vigorosamente durante 5 min. Luego, el pH de la dispersión se ajustó a 4,6 agregando HCl 0,1 N y se agitó suavemente durante 30 min. El pH se mantuvo a 4,6 durante este período. Al cabo de los 30 min, la dispersión se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con agua Milli-Q. Las dispersiones fueron posteriormente centrifugadas a 9834×g a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se filtró primero utilizando papel de filtro cualitativo y luego a través de filtro jeringa Ministart de 0,45 µm.

3.4.2. Condiciones del HPLC

La determinación se realizó en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 series (Santa Clara, Estados Unidos). Veinte µL de muestra se inyectaron en una columna Zorbax 300SB-C18, 4,6 × 150-mm, 3,5 µm (Agilent Technologies, California, Estados Unidos). Los solventes utilizados para la elución fueron: A (fase acuosa): ácido trifluoroacético 0,1 % en agua Milli-Q y B (fase orgánica): ácido trifluoroacético 0,1% y acetonitrilo 90 % en agua Milli-Q. Se realizó el siguiente gradiente de elución: 0-10 min 10 % B, 10-32 min 10-55% B, 32-33 min 55-100% B, 33-43 min 60-36 % B y 15 min de equilibración de columna. La velocidad de flujo fue 1 mL/min y se midió la absorbancia a 210 y 280 nm.

3.4.3. Cálculos y expresión de resultados

Para cada muestra se sumaron las áreas correspondientes a la β-Lg y α-La. El contenido de WP nativas se calculó para cada etapa del proceso se acuerdo a la Ecuación 3.7, asumiendo que las proteínas luego de la dispersión eran 100 % nativas.

$$WP\ nativas_i\ (\%) = \frac{(A_{\beta-Lg} + A_{\alpha-La})_i}{(A_{\beta-Lg} + A_{\alpha-La})_o} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Donde:

- $A_{\beta-Lg}$ es el área correspondiente a la β-Lg (tiempos de retención ~30 y 31 min, para β-Lg B y A, respectivamente).
- $A_{\alpha-La}$ es el área correspondiente a la α-La (tiempo de retención ~28 min).
- i corresponde a la etapa del proceso: luego de la dispersión, luego de la pasteurización, luego de la homogeneización y luego del secado spray.
- o corresponde a las muestras iniciales (luego de la dispersión).

3.5. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones

Se determinó el efecto de cada etapa del proceso en la distribución de tamaño de partícula (DTP) de las mezclas húmedas por dispersión de luz láser, utilizando un Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). El Mastersizer 3000 está equipado con una fuente de luz LED ($\lambda = 470$ nm) y un láser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) y puede medir tamaño de partícula en el rango 0,1 – 3000 μm (Malvern Panalytical, s.f.).

La DTP de las mezclas húmedas se midió luego de su dispersión, pasteurización y homogeneización, así como luego del secado spray y su reconstitución en agua destilada a 40 °C (12,5 %, p/v), imitando las condiciones de reconstitución doméstica.

La DTP se determinó dos veces por muestra y cada medida se realizó por triplicado en el equipo. Los parámetros ópticos utilizados para la medida fueron: índice de refracción de partícula = 1,46, índice de refracción del dispersante = 1,33 e índice de absorbancia de partícula = 0,001, de acuerdo con Murphy et al. (2015). Además de la DTP, se obtuvo el diámetro volumétrico (D[4,3]) total en la muestras, así como los D[4,3] individuales para cada una de las poblaciones de partículas presentes en la muestra. El cálculo de este parámetro se basa en obtener la media de los diámetros de esferas de volumen equivalente al de las partículas presentes en la muestra, según la Ecuación 3.8.

$$D[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^4}{\sum_{i=1}^N d_i^3} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Donde: d es el diámetro de partícula y N es el total de partículas en la población.

3.6. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas

Las propiedades reológicas de cada mezcla húmeda se determinaron durante el procesamiento, luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización, en un reómetro ARES-G2 (TA instruments, New Castle, Estados Unidos) con una geometría de cilindros concéntricos. En esta geometría, un cilindro se posiciona concéntricamente (coaxialmente) dentro de un vaso que contiene un determinado volumen del fluido. El cilindro gira y el arrastre del fluido se mide por medio de un sensor de torque. Cambiando la velocidad de rotación (velocidad de corte, $\dot{\gamma}$) es posible obtener datos de viscosidad en un amplio rango de condiciones de cizallamiento (Rao, 2014).

Para el ensayo, $\dot{\gamma}$ se aumentó de 0 a 300 s^{-1} en 5 min, se mantuvo a 300 s^{-1} por 2 min y luego se disminuyó hasta 0 s^{-1} en 5 min, según Drapala et al. (2017). Para imitar las condiciones de procesamiento, la temperatura se mantuvo a 65 °C durante el ensayo, que corresponde a la temperatura a la que estuvieron las mezclas húmedas durante el proceso de producción. La

viscosidad aparente promedio se determinó a 300 s^{-1} (η_{300}). Se obtuvieron las curvas de flujo, para cada condición y etapa del proceso, graficando esfuerzo de corte (τ) vs. $\dot{\gamma}$. Las curvas de flujo fueron ajustadas al modelo de Ley de Potencia (Ecuación 3.9) por el método de mínimos cuadrados:

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 3.9}$$

Donde:

- τ es el esfuerzo de corte (Pa)
- $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte (s^{-1})
- K es el coeficiente de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)
- n es el índice de comportamiento de flujo

Para obtener los parámetros del modelo de Ley de Potencia se linealizaron las curvas de flujo graficando $\log(\tau)$ vs $\log(\dot{\gamma})$. Entonces:

$$\log \tau = \log K + n \log \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

Donde la pendiente corresponde al índice de comportamiento de flujo (n) y $\log(K)$ corresponde a la ordenada en el origen. El coeficiente de consistencia, K , es el esfuerzo de corte a una velocidad de corte de $1,0 \text{ s}^{-1}$, mientras que el parámetro adimensional n refleja cuánto se asemeja el flujo al de un fluido Newtoniano. Así, $n = 1$, para fluidos Newtonianos, $n < 1$ para fluidos pseudoplásticos y $n > 1$ para fluidos dilatantes. En el caso particular de $n = 1$, K es igual a la viscosidad del fluido (Rao, 2014).

El modelo de Ley de Potencia es ampliamente utilizado para la caracterización de alimentos fluidos debido a su sencillez, ya que contiene sólo dos parámetros (K y n), y su aplicabilidad en un amplio rango de velocidad de corte (10^1 - 10^4) (Rao, 2014).

3.7. Características de las emulsiones post reconstitución

3.7.1. Microestructura

La microestructura de las emulsiones fue analizada por microscopía óptica. Las fórmulas infantiles en polvo (luego del secado spray) se reconstituyeron (12,5 % p/v) en agua o dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % (p/v) y se observaron en un microscopio óptico Olympus CX21 (Olympus Corporation of the Americas, Pennsylvania, Estados Unidos) utilizando portaobjetos cóncavos para evitar la deformación de las gotas de aceite. Se tomaron micrografías con una cámara DinoEye Digital Eye Piece Camera AM4023X (Dino-Lite, California, Estados Unidos) a una magnificación $100\times$.

3.7.2. Composición proteica en la interfase aceite/agua

3.7.2.1. Reconstitución de las muestras

Las fórmulas infantiles en polvo (luego del secado spray) se reconstituyeron en agua destilada a 40 °C a una concentración final de 1,4 % de proteína (p/v) y se agitaron en plancha a 1500 rpm durante 15 s.

3.7.2.2. Extracción de las proteínas adsorbidas en la interfase

El procedimiento se realizó por duplicado para cada fórmula, según Puppo et al. (2005) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se realizó la separación de fases. Para eso, a 5 mL de fórmula reconstituida se le adicionaron 5 mL de solución de sacarosa al 50 % (p/v) y la mezcla se homogeneizó en vortex. De dicha mezcla se tomaron 4 mL, que se depositaron con cuidado en el fondo de un tubo Falcon conteniendo 10 mL de solución de sacarosa al 5 % (p/v), evitando mezclar las fases. Los tubos luego se centrifugaron durante 2 horas a 3000×g y 10 °C en una centrífuga SIGMA 6-16KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania).

Luego, se procedió a extraer las proteínas adsorbidas en la interfase. Se tomaron 300 µL del sobrenadante (fase oleosa) a los que se le agregaron 150 µL de SDS 1 % (p/v), esta mezcla se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 10.000×g durante 20 min a temperatura ambiente en una centrífuga Spectrafuge 24D (Labnet, New Jersey, Estados Unidos). La fase inferior obtenida luego de esta centrifugación contiene las proteínas desorbidas de la superficie de las gotas de aceite.

3.7.2.3. Identificación de las proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras

Se identificaron tanto las proteínas presentes en las fórmulas reconstituidas como aquellas adsorbidas en la interfase aceite/agua, en condiciones reductoras y no reductoras. En tubos Eppendorf se mezclaron las soluciones y volúmenes detallados en la Tabla 3.6, para cada caso, y se congelaron hasta el día de su análisis.

Tabla 3.6. Volúmenes utilizados para la preparación de las muestras para SDS-PAGE.

Solución	Fórmula completa		Interfase aceite/agua	
	Reductoras	No reductoras	Reductoras	No reductoras
Fórmula reconstituida ¹	18 µL	18 µL	--	--
Solución proteínas desorbidas ²	--	--	120 µL	120 µL
SDS 1,5 mg/mL	240 µL	240 µL	138 µL	138 µL
Agua ultrapura	--	6 µL	--	6 µL
β-mercaptoetanol	6 µL	--	6 µL	--

¹Fórmulas reconstituidas según 3.7.2.1. ²Solución obtenida de fase inferior de tubo luego de aplicar el procedimiento obtenido en 3.7.2.2 para separar las fases y desorber las proteínas de la interfase.

El contenido de los tubos descrito en la Tabla 3.6 se mezcló con buffer de muestra (buffer HCl-Tris 0,05 M pH= 6,8, 25 % glicerol, 2 % SDS, 0,1 % azul de bromofenol) reductor (con β -mercaptoetanol 0,72 mM) o no reductor (sin β -mercaptoetanol), según correspondiera, en una proporción 4:1 (mezcla:buffer). En el caso de la electroforesis en condiciones no reductoras, esta mezcla se sembró directamente, mientras que, en el caso de la electroforesis en condiciones reductoras, la mezcla se llevó a ebullición en baño de agua por 5 min, luego se centrifugó a $12.000\times g$ por 5 min a temperatura ambiente (Spectrafuge 24D, Labnet, New Jersey, Estados Unidos), y se sembró el sobrenadante obtenido. El volumen de siembra fue 15 μL , tanto para las fórmulas reconstituidas como para las proteínas adsorbidas en la interfase, y 10 μL , para el marcador de peso molecular 10-180 kDa #26616 (Thermo Scientific, Estados Unidos). La electroforesis se realizó en un omniPAGE WAVE Maxi System (Clever Scientific, Rugby, Reino Unido) a 200 V, utilizando geles separadores y de apilamiento de 15 y 5 % acrilamida, respectivamente y, como buffer de corrida pH= 8,3, Tris 0,025 M, glicina 0,15 M y SDS 0,8 %. Se utilizó Comassie Brilliant Blue R250 como agente colorante.

En la Figura 3.4 se resume el proceso de reconstitución, separación y extracción realizado para la identificación de proteínas.

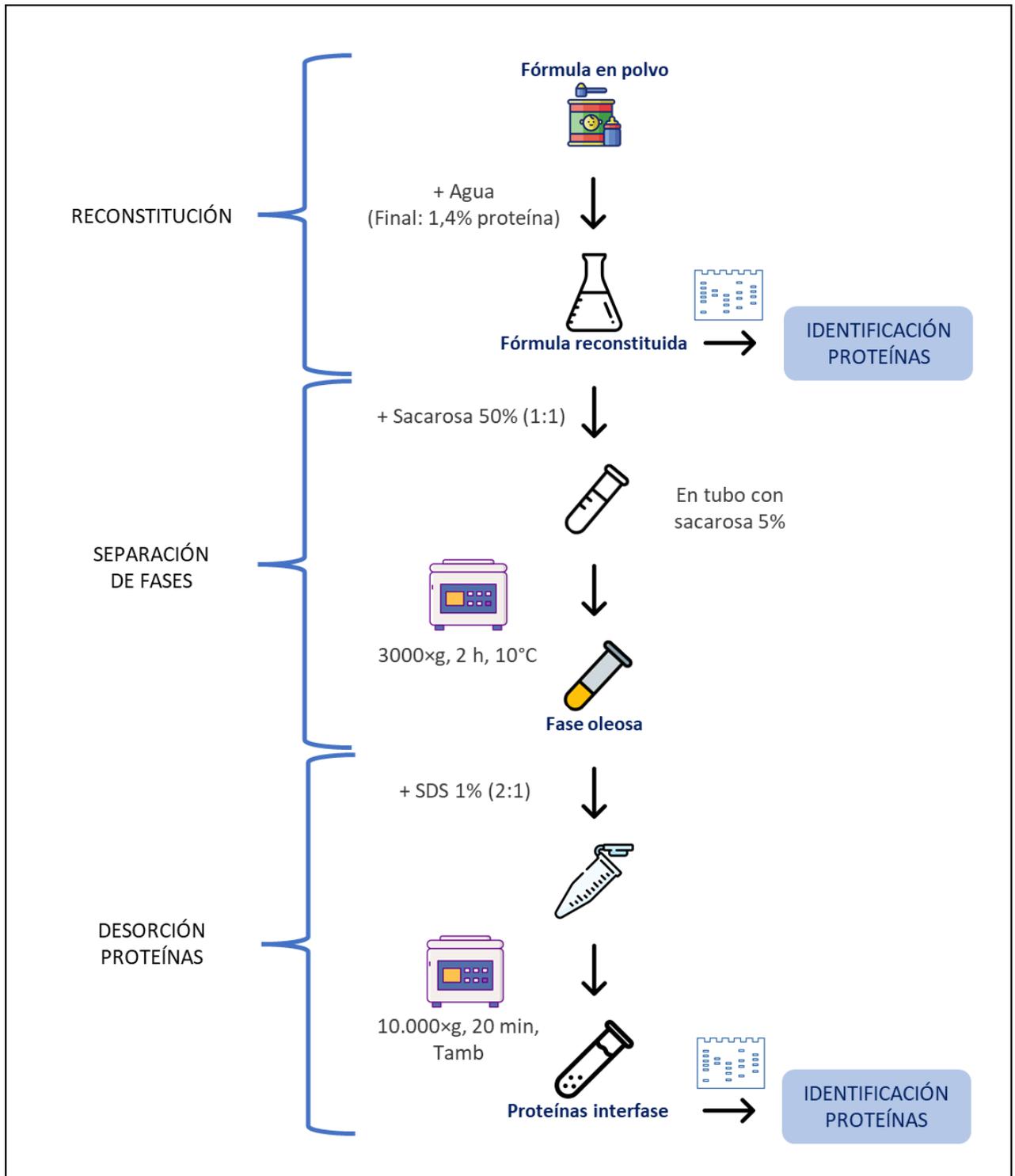


Figura 3.4. Proceso de reconstitución de las fórmulas, separación de fases y extracción de proteínas adsorbidas en la interfase aceite/agua, para su identificación.

3.7.3. Estabilidad de la emulsión post reconstitución

La estabilidad de las fórmulas infantiles reconstituidas se analizó utilizando un Turbiscan MA 2000 (Formulation, Toulouse, Francia). Cada muestra en polvo (luego del secado spray) se

reconstituyó por duplicado (12,5 % p/v de agua desionizada a 40 °C) y se agitó en plancha con agitación magnética a 1500 rpm por 15 s. Luego, 5 mL de muestra reconstituida se transfirieron a un tubo cilíndrico de vidrio. Se determinó el *backscattering* (BS) de la muestra reconstituida luego de su almacenamiento durante 0:00, 1:20, 2:00, 3:00, 5:00 y 24:00 h, a 20 ± 1 °C.

El índice de estabilidad Turbiscan (TSI) es ampliamente utilizado para medir la estabilidad de las emulsiones (Ecuación 3.11) (Luo et al., 2017). En la presente tesis, se calculó el índice de estabilidad de emulsión, una modificación del TSI, que consistió en expresar el cambio en el *backscattering* respecto a la fórmula recién reconstituida (tiempo 0) y se presenta en la Ecuación 3.12.

$$TSI = \sum_i \frac{\sum_h |BS_i(h) - BS_{i-1}(h)|}{h_T} \quad \text{Ecuación 3.11}$$

$$\text{Índice de estabilidad de emulsión} = \frac{\sum_h |BS_i(h) - BS_0(h)|}{h_T} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

Donde:

- TSI es el índice de estabilidad Turbiscan
- $BS_i(h)$ es el *backscattering* (%) al tiempo i para la posición h
- $BS_0(h)$ es el *backscattering* (%) al tiempo 0 para la posición h
- h_T es la altura total de muestra en el cilindro

3.8. Lisina disponible

La lisina disponible se cuantificó en las mezclas húmedas luego de la dispersión, pasteurización y homogeneización, y en los polvos (luego del secado spray), por el método de unión con *Acid Orange 12*, validado por Aalaei et al. (2016). El método se basa en la unión del pigmento, cargado negativamente, a los aminoácidos básicos, cargados positivamente, de las proteínas. Así, los grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lisina, imidazol de la histidina y guanidino de la arginina, se combinan estequiométricamente con los grupos sulfonilos del pigmento, formando rápidamente un complejo proteína-pigmento. Mediante el agregado de anhídrido propiónico se logra neutralizar la alcalinidad de la lisina, y de esta forma, el pigmento reacciona únicamente con la histidina y la arginina, lo que permite estimar el contenido de lisina por diferencia (Aalaei et al., 2016).

Previo al análisis, las muestras de mezcla húmeda fueron liofilizadas, mientras que las muestras en polvo (post secado spray) se analizaron directamente. Los análisis se realizaron por duplicado (4 condiciones de procesamiento \times 2 lotes/condición \times 4 etapas del proceso \times 2 réplicas de ensayo). A continuación, se describe el procedimiento de ensayo realizado, según la modificación del método de Hurrell et al. (1979) propuesta por Aalaei et al. (2016).

Capítulo 3

3.8.1. Preparación de soluciones

- Solución buffer

Cuarenta g de ácido oxálico anhidro y 6,8 g de fosfato monopotásico se disolvieron en un pequeño volumen de agua destilada. Luego, se agregaron 120 mL de ácido acético glacial y finalmente se agregó agua destilada hasta completar un volumen total de 2 L, que se agitó en plancha de agitación magnética durante aproximadamente 1 h, hasta obtener una solución homogénea y transparente. Esta solución se preparó diariamente.

- Solución de pigmento Acid orange 12 (1,35 mg/mL de solución buffer)
- Solución de acetato de sodio 16,4 %

3.8.2. Procedimiento analítico

Trescientos mg de muestra liofilizada (post dispersión, pasteurización y homogeneización) o secada por atomización (post secado spray) y 2 mL de solución de acetato de sodio, se mezclaron durante 20 min en un *shaker* orbital de laboratorio (GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Alemania). Luego, se agregaron 200 μ L de anhídrido propiónico a la mitad de los matraces, que se agitaron nuevamente por 20 min. El anhídrido propiónico actúa como sustancia bloqueante evitando que el colorante se una a los residuos de lisina. Al cabo de este tiempo, se agregaron 40 mL de la solución de pigmento y se agitó por 60 min. Durante este tiempo, se forma el complejo proteína-colorante, que luego es separado por centrifugación a $2599\times g$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min en una centrífuga 3K15 (Sigma, Osterode, Alemania). Después de centrifugar, se filtró 1 mL de sobrenadante utilizando filtros jeringas Q-max $0,45\text{ }\mu\text{m}$ y 100 μL de muestra filtrada se diluyeron con el buffer hasta un volumen final de 10 mL. La absorbancia se midió a 475 nm en un espectrofotómetro UV-Vis UV-1280 (Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando la solución buffer como blanco.

3.8.3. Curva de calibración

La curva de calibración se preparó midiendo la absorbancia a 475 nm de distintas diluciones de la solución stock de pigmento (1,35 mg/mL). La curva obtenida (Figura 3.5) cubrió el rango 0,0048-0,015 mg/mL de solución de pigmento y 0,24-0,80 de absorbancia. La curva de calibración se ajustó a una recta por mínimos cuadrados obteniéndose la Ecuación 3.13 con $R^2= 0,9972$.

$$y = 54,06x - 0,01 \quad \text{Ecuación 3.13}$$

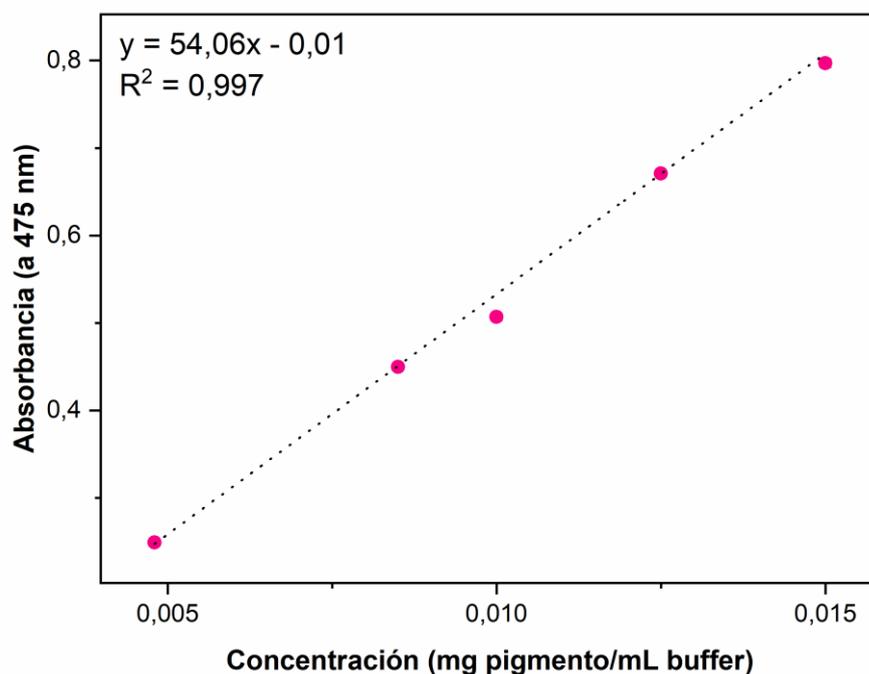


Figura 3.5. Curva de calibración obtenida para la determinación de lisina disponible por el método de unión con colorante.

3.8.4. Cálculo y expresión de resultados

En primer lugar, se calculó la concentración de pigmento unido a proteína (mg/mL), restando a la concentración total de pigmento inicial (1,35 mg/mL), la concentración de pigmento que permanece en solución, que se obtiene a partir de la absorbancia y la curva de calibración (Ecuación 3.13). Luego, para calcular la concentración de lisina disponible (mg/mL), se calculó la diferencia entre la concentración de pigmento unido a proteína en los tubos de muestra sin anhídrido propiónico y la concentración de pigmento unido a proteína en los tubos de la misma muestra, pero con anhídrido propiónico.

Por último, para expresar el contenido de lisina disponible en % de materia seca de muestra, se consideró la masa de muestra por mL de solución y su concentración de sólidos totales (% p/p).

3.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para determinar los efectos de la temperatura de pasteurización (75 o 100 °C), el nivel de sólidos totales de la mezcla húmeda (50 o 60 % p/p), la etapa de procesamiento (pasteurización, homogeneización o secado spray) y sus interacciones, en el nivel de proteínas del suero nativas, propiedades reológicas, propiedades emulsionantes y lisina disponible de las fórmulas.

Se realizaron ANOVA monofactoriales para determinar si existían diferencias significativas en todas las variables estudiadas entre las fórmulas obtenidas por las cuatro condiciones de producción (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C). Se utilizó el test de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95 % para detectar diferencias significativas entre muestras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), con un nivel de confianza de 95 % ($P < 0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1. Estimación del consumo energético

Con el objetivo de estimar las diferencias en la energía requerida para producir las fórmulas bajo las distintas condiciones de producción evaluadas, se realizaron balances de energía para las etapas de pasteurización y secado spray, basados en los experimentos a escala piloto llevados a cabo en este estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que la reducción de la temperatura de pasteurización de 100 a 75 °C para mezclas húmedas con 50 o 60 % ST, disminuye el gasto energético en aproximadamente 72 % en la zona de calentamiento y 63 % en la zona de enfriamiento. Además, en promedio, se requirió aproximadamente 6 % más de energía para pasteurizar las mezclas húmedas con 50 % ST que aquellas con 60 % ST (Tabla 3.7). Este resultado puede explicarse por la mayor concentración de agua presente en las mezclas con 50 % ST, que genera un cambio en el calor específico de las mezclas húmedas (aprox. 3,1 kJ/kg K para las mezclas con 50 % ST frente a aprox. 2,8 kJ/kg K para aquellas con 60 % ST, Tabla 3.5).

En el secador spray, la energía requerida para la evaporación de agua fue 32 % mayor para las mezclas con 50 % ST (Tabla 3.7). Este resultado era esperable dada la diferencia en la cantidad de agua presente las mezclas.

De acuerdo con las estimaciones realizadas para las producciones a escala piloto, aumentar los ST de 50 a 60 % permitió reducir el gasto de energía en un 17 % y un 13 % para mezclas pasteurizadas a 75 °C y 100 °C, respectivamente. A su vez, el aumento de los ST de la mezcla de 50 a 60 % junto con la reducción de la temperatura de pasteurización de 100 a 75 °C, generaron una reducción total de energía del 59 %.

Tabla 3.7. Consumo de energía estimado durante las operaciones de pasteurización y secado spray piloto.

Condición	Pasteurización			Secado spray		Energía total
	\dot{m} (kg/s)	Q_{cal} (kJ/s)	Q_{enfr} (kJ/s)	\dot{m}_{alim} (kg/s)	Q_{evap} (kJ/s)	Q_{total} (kJ/s)
50%-75°C	0,020	0,56 ± 0,01 ^b	0,83 ± 0,01 ^b	0,0011	1,34 ± 0,01 ^b	2,73 ± 0,02 ^b
50%-100°C	0,020	1,96 ± 0,01 ^d	2,23 ± 0,01 ^d	0,0011	1,34 ± 0,03 ^b	5,53 ± 0,04 ^d
60%-75°C	0,020	0,52 ± 0,01 ^a	0,78 ± 0,01 ^a	0,0009	0,96 ± 0,09 ^a	2,26 ± 0,10 ^a
60%-100°C	0,020	1,83 ± 0,01 ^c	2,09 ± 0,01 ^c	0,0009	0,88 ± 0,04 ^a	4,80 ± 0,02 ^c

\dot{m} : flujo másico en el pasteurizador, Q_{cal} : energía requerida en la zona de calentamiento del pasteurizador, Q_{enfr} : energía requerida en la zona de enfriamiento del pasteurizador, \dot{m}_{alim} : flujo de alimentación en el secador spray, Q_{evap} : energía requerida para evaporar el agua durante el secado spray, Q_{total} : energía requerida para pasteurizar + energía requerida para evaporar agua durante el secado spray. Promedio ± desviación estándar entre lotes de producción. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre condiciones (dentro de cada columna).

4.2. Análisis general del efecto de las etapas y parámetros del proceso sobre las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales

En la Tabla 3.8 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado para evaluar el efecto de los factores: sólidos totales (ST) en la mezcla húmeda (niveles = 50 o 60 % p/p), temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda (niveles = 75 o 100 °C) y etapa del proceso de producción (niveles = post-dispersión, post-pasteurización, post-homogeneización y post-secado spray) y sus interacciones, en el grado de desnaturalización de WP, tamaño de la gota de aceite y contenido de lisina disponible de las fórmulas. También se evaluó el efecto de esos factores en las propiedades reológicas de las mezclas húmedas, con la salvedad de que la reología se evaluó sólo en las etapas post-dispersión, post-pasteurización y post-homogeneización.

Tabla 3.8. Resumen de resultados del análisis de varianza factorial de las variables: proteínas del suero nativas, parámetros reológicos (η_{300} , K y n), tamaño de gota de aceite (D[4,3]) y lisina disponible.

Variable	Factor			Interacciones significativas
	ST	T	Etapas del proceso	
Desnaturalización de WP				
% WP nativas	NS	P < 0,0001	P < 0,0001	T×Etapas: P < 0,0001
Parámetros reológicos¹				
η_{300}	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	ST×T: P = 0,0055, ST×Etapas: P < 0,0001, T×Etapas: P < 0,0016
K	P < 0,0001	P = 0,0058	P < 0,0001	ST×T: P = 0,0060, ST×Etapas: P < 0,0001, T×Etapas: P = 0,0288, ST×T×Etapas: P = 0,0296
n	P < 0,0001	P = 0,0007	P < 0,0001	ST×T: P = 0,0042, ST×Etapas: P < 0,0001, T×Etapas: P = 0,0407, ST×T×Etapas: = 0,0212
Tamaño de partícula en la mezcla húmeda				
D[4,3] global	P = 0,0049	NS	P < 0,0001	T×Etapas: P = 0,0240
Contenido de lisina disponible				
Lisina disponible	NS	P = 0,0010	P < 0,0001	T×Etapas: < 0,0001

ST en la mezcla húmeda: sólidos totales, T: temperatura de pasteurización, NS: no significativo ($P > 0,05$).

¹En el caso de los parámetros reológicos las etapas del proceso evaluadas fueron: dispersión, pasteurización y homogeneización, no se evaluó el secado spray.

Como se observa en la Tabla 3.8, el grado de desnaturalización de las WP y la lisina disponible fueron independientes de los ST de la mezcla húmeda. Tanto la desnaturalización como la lisina disponible estuvieron afectadas significativamente por la etapa del proceso, la temperatura de pasteurización y su interacción. Por su parte, el D[4,3] global varió significativamente con los ST de la mezcla húmeda y la etapa del proceso, y la interacción entre la etapa y la temperatura del tratamiento térmico fue significativa ($P < 0,05$). En el caso de los parámetros reológicos de las mezclas húmedas, los tres parámetros evaluados (η_{300} , K y n) estuvieron afectados significativamente por los tres factores estudiados (ST, temperatura de pasteurización y etapa del proceso) así como por sus interacciones. A continuación, se describen los resultados obtenidos para las fórmulas producidas bajo las cuatro condiciones ensayadas (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C), durante el proceso de producción.

4.3. Desnaturalización de las proteínas del suero

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza factorial (Tabla 3.8), la temperatura del tratamiento térmico, la etapa del proceso y su interacción afectaron significativamente ($P < 0,001$) el contenido de WP nativas en las fórmulas. Por otro lado, la desnaturalización no varió significativamente ($P > 0,05$) con el nivel de ST en la mezcla húmeda.

Para determinar el porcentaje de WP que no se desnaturalizó durante cada paso del proceso, se asumió que las proteínas inicialmente y luego de la etapa de dispersión (antes de la pasteurización) eran 100 % nativas. Si bien en los ingredientes utilizados como fuente de WP (leche descremada en polvo y WPI) podría existir cierto grado de desnaturalización éste es usualmente bajo tanto en

el WPI, como en la leche descremada en polvo baja temperatura (*low-heat*), que fue seleccionada por este motivo

En el proceso de pasteurización a 75 °C, el contenido de WP nativas se mantuvo en un 90 % en las mezclas húmedas tanto con 50 y 60 % ST (Figura 3.6). Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó a 100 °C se observó una reducción drástica del porcentaje de proteínas nativas quedando aproximadamente un 20 % de proteína nativa tanto en las mezclas con 50 como 60 % ST. Las etapas de homogeneización y secado spray consiguientes, en las condiciones utilizadas en el presente estudio, no contribuyeron a la desnaturalización en ninguna de las muestras. Estos resultados coinciden con estudios previos que reportaron que el principal paso responsable de la desnaturalización irreversible de proteínas del suero durante la manufactura de leche en polvo es la pasteurización (Guyomarc'h et al., 2000; Murphy et al., 2013; Oldfield et al., 2005). Durante el secado spray, la temperatura de las gotas varía entre la temperatura de bulbo húmedo y la temperatura de salida del aire. El aire caliente a la entrada evapora el agua de la superficie, enfriando la gota. A medida que la gota cae a lo largo del secador spray, la temperatura aumenta acercándose a la temperatura de salida del aire, pero sólo la alcanza cuando la mayor parte del agua ha sido evaporada y las proteínas no pueden sufrir cambios conformacionales (Guyomarc'h et al., 2000; Oldfield et al., 2005).

Los ST en la mezcla húmeda no afectaron significativamente el nivel de WP nativas ($P > 0,05$). Anema, Siew et al. (2006) demostraron que la desnaturalización se reduce al aumentar los ST, debido a que aumenta la concentración de lactosa, que ejerce un efecto protector sobre la β -Lg. Este efecto no fue evidente en las condiciones ensayadas en la presente tesis. Esto podría deberse a que la diferencia en la concentración de lactosa para ambos niveles de ST (27 % de lactosa en las mezclas húmedas con 60 % ST y 23 % en las mezclas húmedas con 50 % ST) no fue lo suficientemente alta como para permitir observar un efecto significativo o bien con la concentración de lactosa de 23 % ya se alcanzó la máxima protección.

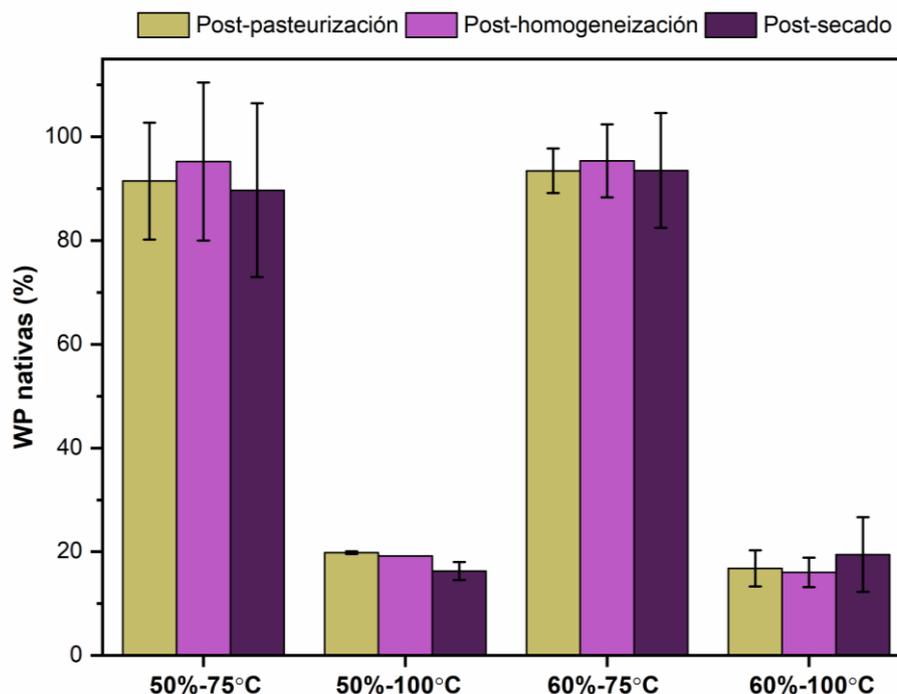


Figura 3.6. Contenido de proteínas nativas del suero (WP) en las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s) luego de las etapas de pasteurización, homogeneización y secado spray, expresado como porcentaje de proteína nativa en la etapa de dispersión.

Las barras representan la desviación estándar obtenida entre lotes de producción (n = 2).

4.4. Distribución de tamaño en partícula de las emulsiones

La dispersión láser mide la DTP mediante la variación del ángulo de la intensidad de la luz dispersada al hacer pasar un rayo láser a través de una dispersión de las partículas. Las partículas de mayor tamaño dispersan la luz en ángulos pequeños respecto al rayo láser, mientras que partículas de menor tamaño dispersan la luz en ángulo más grandes.

En la Figura 3.7 se presentan las curvas de DTP obtenidas para las cuatro mezclas húmedas luego de cada etapa del proceso, donde se indican los valores de D[4,3] de cada una de las poblaciones. Además, en la Tabla 3.9 se presentan los valores de D[4,3] globales promedio obtenidos para cada muestra en cada paso del proceso.

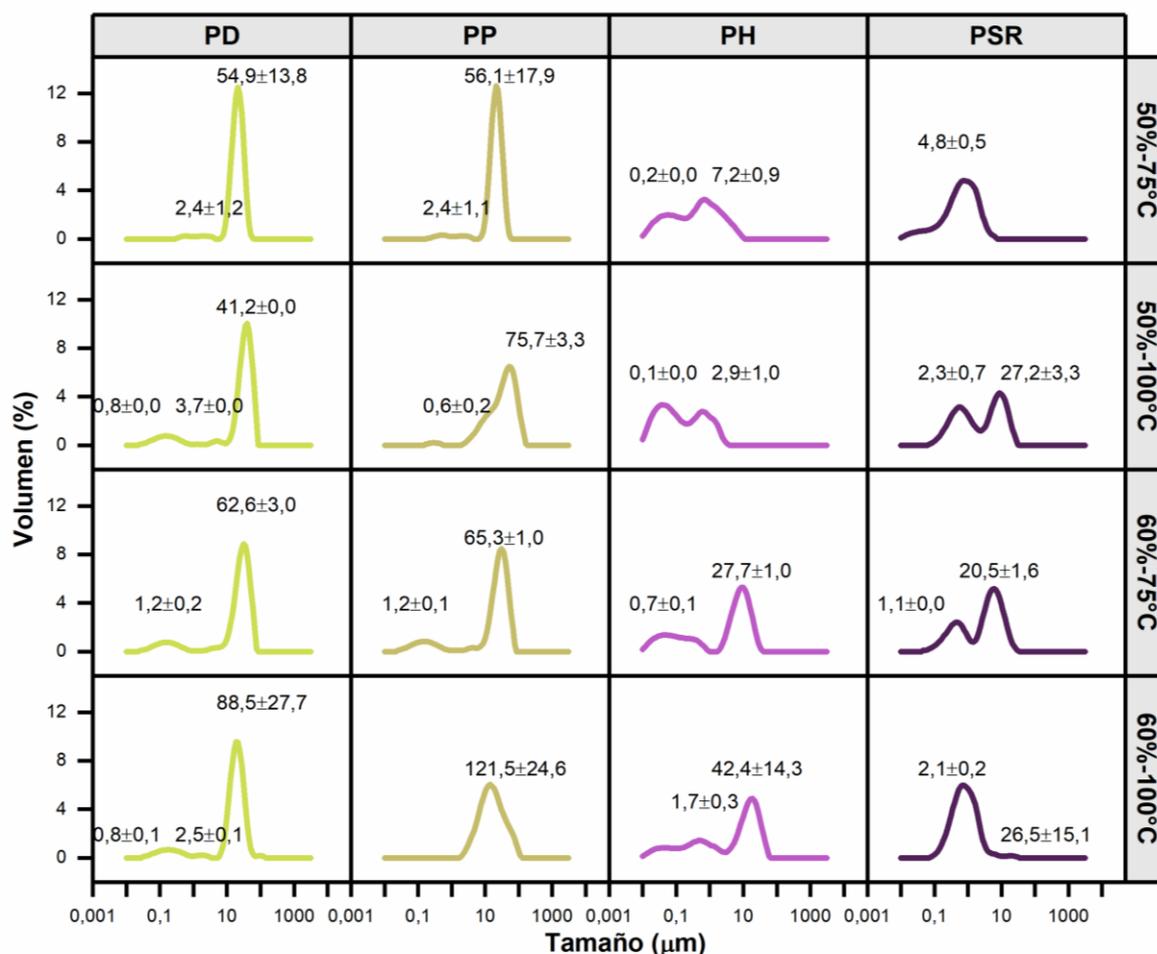


Figura 3.7. Distribución del tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), luego de las etapas de dispersión (PD), pasteurización (PP) y homogeneización (PH) y luego de la etapa de secado spray y reconstitución (PSR).

Los valores indicados en la figura corresponden a los D[4,3] (promedios ± desviación estándar entre lotes de producción), para cada población individual, expresados en µm.

Tabla 3.9. Diámetro volumétrico medio global (D[4,3]; µm) de las fórmulas infantiles modelo luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización (en mezclas húmedas) y luego de la etapa de secado spray (en polvos reconstituidos).

Condición	Post-dispersión	Post-pasteurización	Post-homogeneización	Post-secado spray y reconstitución
50%-75°C	26,1 ± 4,8 ^{aB}	28,1 ± 7,5 ^{aB}	0,8 ± 0,1 ^{aA}	1,0 ± 0,2 ^{aA}
50%-100°C	22,2 ± 1,2 ^{aB}	24,2 ± 3,0 ^{aB}	0,7 ± 0,0 ^{aA}	6,8 ± 0,1 ^{cA}
60%-75°C	30,8 ± 3,6 ^{aB}	31,8 ± 4,2 ^{aB}	5,7 ± 4,6 ^{abA}	4,9 ± 1,0 ^{bcA}
60%-100°C	23,0 ± 3,1 ^{aBC}	27,4 ± 2,7 ^{aC}	14,8 ± 4,3 ^{bB}	2,3 ± 1,4 ^{abA}

Promedio ± desviación estándar de duplicados de análisis y duplicados de lotes de producción. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre condiciones (dentro de cada columna). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre etapas del proceso (dentro de cada fila).

Inicialmente (post-dispersión), la única diferencia entre las muestras radica en el nivel de ST, dado que la pasteurización a distinta temperatura es una etapa posterior. En ese paso del proceso, las mezclas húmedas presentaron una población principal con medias de entre 40 y 90 μm . Estas partículas podrían corresponder a gotas de aceite o flóculos, ya que el método de medida no permite diferenciarlos. A su vez, los $D[4,3]$ globales iniciales de las cuatro mezclas variaron entre 22 y 30 μm y no hubo diferencias significativas entre ellas ($P > 0,05$, Tabla 3.9).

Las etapas de pasteurización y homogeneización generaron un cambio significativo en la DTP de las mezclas húmedas, que dependió del tratamiento térmico aplicado y los ST de la mezcla húmeda.

Luego de la pasteurización, las muestras 50%-75°C y 60%-75°C presentaron distribuciones con forma y tamaños muy similares a las obtenidas post-dispersión (Figura 3.7), por lo tanto, el tratamiento térmico a 75 °C no afectó la DTP de las mezclas con 50 o 60 % ST. Por otro lado, la pasteurización a 100 °C modificó la DTP de ambas muestras (50%-100°C y 60%-100°C), que presentaron un pico más ancho, indicando una mayor variabilidad del tamaño de partícula (Figura 3.7). Esta mayor dispersión en los tamaños de partícula puede vincularse a la desagregación de los flóculos y aparición de flóculos más grandes en las muestras y/o coalescencia. Como se observó en la Figura 3.6, el tratamiento térmico a 100 °C redujo notoriamente el contenido de WP nativas, indicando desnaturalización y/o agregación, hecho que podría alterar su comportamiento en superficie, modificando el tamaño de gotas y la distribución de flóculos. Los cambios observados en la DTP de las muestras pasteurizadas a 100 °C no se reflejaron en cambios en el $D[4,3]$ medio de la distribución global, que no cambió significativamente ($P > 0,05$) luego de la pasteurización para ninguna mezcla húmeda (Tabla 3.9). Sin embargo, del análisis del valor de $D[4,3]$ de la población principal se puede concluir que en las muestras tratadas a 100 °C se produjo un aumento del tamaño de partícula, siendo este efecto más pronunciado en las muestras con mayor contenido de ST. Euston et al. (2000) observaron que, en presencia de proteínas desnaturalizadas, existe un mecanismo de floculación mediado por interacciones entre las proteínas adsorbidas en la superficie de la gota y proteínas no adsorbidas presentes en la fase continua, dado que las interacciones entre proteínas adsorbidas son poco probables, porque su hidrofobicidad superficial suele ser baja. Sin embargo, las proteínas desnaturalizadas en la fase continua presentan alta hidrofobicidad como consecuencia de su desplegamiento, lo que permite su interacción con las proteínas adsorbidas (Figura 3.8). A su vez, comparando ambas mezclas pasteurizadas a 100 °C se puede observar que el efecto fue más pronunciado en 60%-100°C que en 50%-100°C (Figura 3.7). Esta diferencia puede explicarse por una mayor proximidad de las moléculas al aumentar los ST, en concordancia con lo expresado por Liang et al. (2013), quienes reportaron que en las emulsiones con alta concentración de WP, las proteínas no adsorbidas son responsables de la desestabilización inducida por el tratamiento térmico.

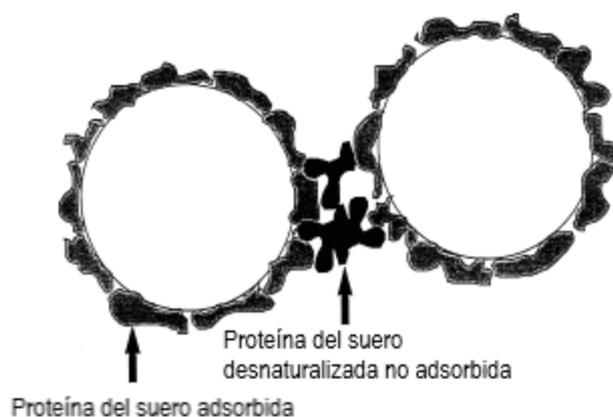


Figura 3.8. Representación esquemática de la posible estructura de agregados presentes en una emulsión con proteínas del suero tratadas térmicamente. El agregado se forma por interacción entre proteínas del suero desnaturalizadas no adsorbidas y proteínas del suero adsorbidas en la superficie de la gota. (Adaptada de: Euston et al. (2000)).

Luego de la pasteurización, las mezclas húmedas son homogeneizadas con el objetivo de reducir el tamaño de la gota de aceite. En las muestras homogeneizadas se observó por primera vez en el proceso una diferencia significativa entre los $D[4,3]$ globales de las mezclas húmedas: el $D[4,3]$ de las mezclas con 50 % ST fue menor al de 60 % ST (Tabla 3.9). Sin embargo, es necesario considerar que las DTP en esa etapa del proceso no eran monomodales (Figura 3.7) por lo que el $D[4,3]$ global no representa a una población en particular. Las mezclas húmedas homogeneizadas presentaron distribuciones bimodales, cuyas medias variaron entre 0,1-0,2 μm y entre 2-7 μm en las mezclas con 50 % ST, y entre 0,7-2 μm y entre 27-42 μm en las mezclas con 60 % ST. Por lo tanto, y a pesar de que la homogeneización redujo significativamente ($P < 0,05$) el $D[4,3]$ de todas las mezclas, esta etapa fue más efectiva para reducir el tamaño de partícula en las mezclas húmedas con 50 % ST (Figura 3.7, Tabla 3.9).

Para un nivel de ST dado, las muestras tratadas a 100 °C mostraron la misma tendencia que las tratadas a 75 °C, por lo que la temperatura de pasteurización no parece ejercer un efecto significativo en la DTP de las mezclas homogeneizadas. Sin embargo, en las muestras tratadas a 100°C la disminución del tamaño de partícula fue superior a las muestras con igual contenido de sólidos tratadas a 75°C lo que sugeriría que la desnaturalización estaría modificando el comportamiento de las proteínas en superficie. Las mezclas húmedas con mayor contenido de ST (60 %) y pasteurizadas a la mayor temperatura (100 °C) presentaron el mayor tamaño de partícula. Al aumentar los ST, la distancia intermolecular se reduce y las interacciones entre proteínas adsorbidas y no adsorbidas en la interfase se ven favorecidas. Como se explicó anteriormente, estas interacciones pueden llevar a la formación de flóculos de gotas de aceite y emulsiones con viscosidades más altas (Buggy et al., 2017).

Luego del secado spray, en las fórmulas reconstituidas, se observaron algunos cambios en la DTP. En la muestra 50%-75°C se obtuvo una distribución monomodal. Por su parte, en la muestra 50%-100°C se observaron dos poblaciones, caracterizadas por un D[4,3] de 2,3 y 27 μm , respectivamente (Figura 3.7), por lo tanto se detectó la aparición de una población de partículas de mayor tamaño. Esta última población podría atribuirse a la floculación o coalescencia de pequeñas gotas de aceite durante la reconstitución. Drapala et al. (2017) estudiaron la DTP de fórmulas infantiles modelo, producidas con distintos tipos de emulsionantes, y también observaron la aparición de partículas de mayor tamaño en todas ellas luego del secado spray y reconstitución, en comparación con los valores obtenidos antes del secado. Los autores también atribuyeron estas diferencias a la floculación y/o coalescencia de glóbulos grasos.

Los polvos obtenidos de mezclas húmedas con 60 % ST también presentaron diferencias en sus DTP luego de la reconstitución. La fórmula 60%-100°C en polvo reconstituida presentó un corrimiento del pico hacia partículas de menor tamaño (Figura 3.7) y, fue la única muestra que presentó una reducción significativa del D[4,3] global luego del secado y reconstitución (Tabla 3.9). Este resultado coincide con trabajos previos que reportaron una reducción del tamaño de partícula luego del secado spray, generada por la disrupción de las gotas de aceite durante la atomización (McCarthy et al., 2012; Ye et al., 2007) o la desagregación de los flóculos. En el caso de la muestra 60%-75°C, la población de partículas de mayor tamaño obtenida luego de la homogeneización se mantuvo en tamaño y proporción en las fórmulas en polvo reconstituidas. Las características de las emulsiones en las fórmulas reconstituidas se analizarán en detalle en 4.6.

4.5. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas

Los alimentos líquidos y semisólidos exhiben comportamientos reológicos muy variables y la construcción de curvas de flujo permite obtener información para identificar el tipo de comportamiento en el alimento en estudio (Rao, 2014). Las curvas de flujo (Figura 3.9) representan el esfuerzo de corte (τ) en función de la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$). En fluidos Newtonianos, la velocidad de corte es directamente proporcional al esfuerzo de corte y la curva comienza en el origen. El resto de los fluidos son no Newtonianos y se dividen, a su vez, en distintos subgrupos. En los fluidos pseudoplásticos, la curva comienza desde el origen, pero son cóncavos hacia arriba, mientras que, en los dilatantes, la curva también comienza desde el origen, pero presentan una curvatura hacia abajo. Por otro lado, los fluidos plásticos de Bingham requieren que se supere un valor de esfuerzo de corte umbral (τ_0) para comenzar a fluir y luego se sigue un comportamiento lineal, y los fluidos de Herschel-Bulkley presentan un comportamiento no lineal luego de superarse un τ_0 .

La viscosidad es la fricción interna de un fluido o su resistencia a fluir. En los fluidos Newtonianos, la viscosidad (η) no depende de $\dot{\gamma}$, mientras que, en fluidos no Newtonianos, la

viscosidad aparente (η_a) se define a cada $\dot{\gamma}$ como la viscosidad de un fluido newtoniano que pasa por dicho punto de la curva según la Ecuación 3.14.

$$\eta_a = \frac{\dot{\gamma}}{\tau} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

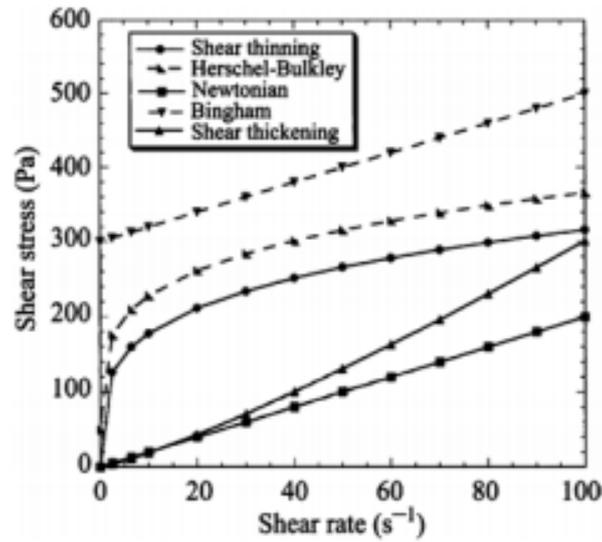


Figura 3.9. Curvas de flujo de los distintos tipos fluidos (Rao (2014)).

Las mezclas húmedas producidas bajo distintas condiciones presentaron diferencias en el comportamiento de flujo luego de la dispersión, tratamiento térmico y homogeneización, que se muestran en la Figura 3.10.

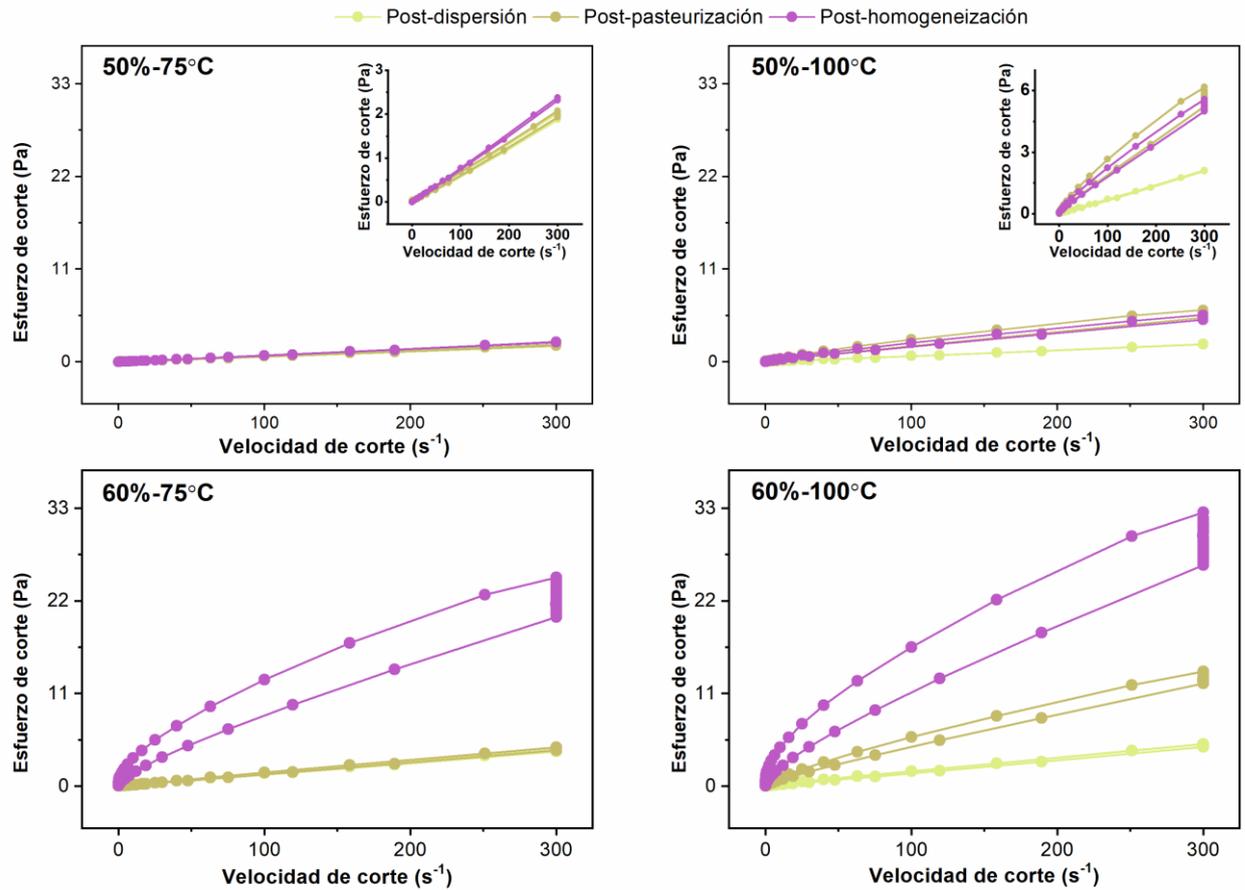


Figura 3.10. Curvas de flujo de las mezclas húmedas de fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s) luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización.

La viscosidad aparente (η_{300}), el coeficiente de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n) fueron afectados significativamente ($P < 0,01$) por los ST, tratamiento térmico, etapa del proceso y todas sus interacciones (Tabla 3.8). Los parámetros reológicos obtenidos para cada mezcla húmeda a lo largo del proceso se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Propiedades reológicas de las mezclas húmedas obtenidas luego de las etapas de dispersión, pasteurización y homogeneización.

Condición	Post-Dispersión	Post-pasteurización	Post-homogeneización
	η_{300} (mPa.s)		
50 %-75°C	6,3 ± 0,6 ^{aA}	6,5 ± 0,2 ^{aA}	7,7 ± 0,2 ^{aA}
50%-100°C	7,6 ± 0,8 ^{aA}	18,8 ± 0,4 ^{bB}	17,6 ± 0,5 ^{bB}
60%-75°C	15,7 ± 2,1 ^{bA}	15,9 ± 1,5 ^{bA}	49,5 ± 1,9 ^{cB}
60%-100°C	16,0 ± 0,2 ^{bA}	46,7 ± 2,9 ^{cB}	95,9 ± 1,0 ^{dC}
K (Pa.s ⁿ ; ×10 ²)			
50%-75°C	0,7 ± 0,0 ^{aA}	0,7 ± 0,1 ^{aA}	0,6 ± 0,2 ^{aA}
50%-100°C	0,7 ± 0,0 ^{aA}	0,8 ± 0,3 ^{aA}	0,7 ± 0,0 ^{aA}
60%-75°C	2,3 ± 0,5 ^{bA}	2,2 ± 0,4 ^{aA}	47,8 ± 0,2 ^{aB}
60%-100°C	3,0 ± 0,3 ^{bA}	26,7 ± 13,8 ^{aA}	139,8 ± 33,2 ^{bB}
n			
50%-75°C	0,98 ± 0,01 ^{aA}	0,99 ± 0,01 ^{bA}	1,06 ± 0,06 ^{bA}
50%-100°C	0,98 ± 0,04 ^{aA}	0,99 ± 0,03 ^{bA}	1,02 ± 0,00 ^{bA}
60%-75°C	0,94 ± 0,02 ^{aB}	0,95 ± 0,01 ^{bB}	0,62 ± 0,01 ^{aA}
60%-100°C	0,90 ± 0,03 ^{aB}	0,71 ± 0,08 ^{aAB}	0,55 ± 0,04 ^{aA}

η_{300} = viscosidad aparente medida a 300 s⁻¹ and 65 °C, K = coeficiente de consistencia y n = índice de comportamiento de flujo. Promedio ± desviación estándar de triplicados de análisis y duplicados de lotes de producción. Para un parámetro dado (η_{300} , K o n), letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre etapas del proceso.

Las mezclas húmedas dispersas con 60 % ST presentaron una viscosidad aparente significativamente mayor que las mezclas con 50 % ST (Tabla 3.10). En el caso del coeficiente de consistencia se obtuvieron resultados similares, mientras que n no se vio afectado significativamente ($P > 0,05$) por los ST, y promedió 0,95 ± 0,04 para todas las mezclas dispersas, lo que indica que tuvieron un comportamiento Newtoniano. Este comportamiento también se verificó en las curvas de flujo, donde se observó un incremento lineal del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidad de deformación, para las mezclas húmedas analizadas luego de la etapa de dispersión (Figura 3.10).

El efecto del tratamiento térmico dependió de la temperatura. La pasteurización a 100 °C modificó notoriamente las curvas de flujo (Figura 3.10). El calentamiento a 75 °C no afectó significativamente ($P > 0,05$) la viscosidad, mientras que ésta aumentó significativamente ($P < 0,05$) en las mezclas pasteurizadas a 100 °C (Tabla 3.10). Estos resultados podrían explicarse por la desnaturalización y agregación de las proteínas del suero durante el calentamiento a 100 °C (Figura 3.16). Cuando las proteínas se desnaturalizan, aumenta la voluminosidad de las WP y el volumen efectivo de las micelas de caseína, como resultado de las interacciones entre WP y las caseínas y también de la asociación entre micelas de caseína (Journink & De Kruif, 1993). La β -Lg, proteína del suero mayoritaria, es una proteína globular que contiene dos puentes disulfuro y un grupo sulfhidrilo por monómero. Como se discutió en el Capítulo 2, al desnaturalizarse, este

grupo sulfhidrido libre queda expuesto y disponible para participar en intercambios disulfuro-sulfhidrido, dando lugar a reacciones de agregación WP-WP y WP-caseína (principalmente κ -caseína) (Wijayanti et al., 2019). La desnaturalización ocurrida durante la pasteurización a 100 °C afectó las diferencias en viscosidad entre mezclas, que antes del calentamiento (post-dispersión) estaban dadas únicamente por los ST. Es así, que post-pasteurización no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre 50%-100°C y 60%-75°C (Tabla 3.10), debido a que el efecto del calentamiento a 100 °C compensó el efecto de la diferencia de ST. Además, las diferencias entre 50%-75°C y 60%-100°C se acentuaron, porque al efecto de los ST se sumó el de la temperatura.

A su vez, los efectos de la pasteurización observados sobre las propiedades de flujo de las mezclas húmedas coinciden con los efectos observados sobre la DTP (Figura 3.7). Mientras la pasteurización a 75 °C no generó cambios significativos en las curvas de flujo y las DTP de las mezclas, el aumento en la viscosidad observado luego de la pasteurización a 100 °C (Figura 3.10 y Tabla 3.10), provocado por la desnaturalización y agregación proteica (Figura 3.6), también se había visto reflejado en un ensanchamiento de pico en la DTP (Figura 3.7), que indica una mayor dispersión en el tamaño de las partículas. Como se explicó anteriormente, la desnaturalización proteica ocurrida en las mezclas pasteurizadas a 100 °C favoreció la agregación de gotas de aceite mediante interacciones entre las proteínas adsorbidas en la superficie de las gotas y proteínas desnaturalizadas ubicadas en la fase acuosa. Por lo tanto, el aumento de viscosidad en las mezclas pasteurizadas a 100 °C puede explicarse tanto por la desnaturalización y agregación proteica, como por la floculación de gotas de aceite.

El calentamiento a 100 °C de las mezclas con 60 % ST provocó un cambio en el comportamiento reológico de Newtoniano a pseudoplástico ($n = 0,71$). Por otro lado, a pesar de que las curvas de flujo de las mezclas 50%-100°C mostraron una tendencia de cambio de comportamiento de Newtoniano a pseudoplástico tixotrópico luego de la pasteurización (Figura 3.10), esto no se reflejó en una variación significativa de n (Tabla 3.10, $P = 0,3965$).

El efecto de la homogeneización estuvo fuertemente influenciado por el nivel de ST. Mientras que en las mezclas con 50 % ST la homogeneización no se manifestó en un cambio en el comportamiento de flujo, en las mezclas con 60 % ST generó incrementos significativos de los parámetros η_{300} y K junto a reducciones significativas de n (Figura 3.10, Tabla 3.10). Estos resultados coinciden con los de DTP, donde se había observado que la etapa de homogeneización provocaba un corrimiento importante hacia tamaños de partícula de menor tamaño en las mezclas húmedas con 50 % ST, mientras que en las mezclas húmedas homogeneizadas con 60 % ST todavía se podían detectar poblaciones de tamaño de partícula grande (Figura 3.17).

El aumento de viscosidad generado por la homogeneización de mezclas húmedas con 60 % ST coincide con reportes previos que indican un aumento de la viscosidad de la mezcla húmeda post homogeneización (Kelly et al., 2016). Además, el n de las mezclas homogeneizadas con 60 % ST

($n \sim 0,6$) fue significativamente menor ($P = 0,0003$) que el de las mezclas homogeneizadas que contenían 50 % ST ($n \sim 1,0$), explicable debido al aumento en la viscosidad y un comportamiento pseudoplástico más preponderante. El aumento de viscosidad observado en las mezclas húmedas con 60 % ST junto con su comportamiento pseudoplástico sugieren la aparición de flóculos en las emulsiones. En las emulsiones floculadas aumenta la viscosidad, tanto por el incremento del volumen hidrodinámico ocurrido a causa de la agregación de las gotas de aceite, como también debido a las moléculas de agua retenidas por las proteínas asociadas a la interfase y en el seno de la fase continua atrapada entre flóculos, que colaboran con el aumento del volumen efectivo de las partículas (Keowmaneechai & McClements, 2002). A su vez, el comportamiento pseudoplástico en emulsiones floculadas se podría atribuir a la deformación y desagregación de los flóculos al aumentar el esfuerzo de corte (Demetriades et al., 1997; Keowmaneechai & McClements, 2002).

Para poder analizar en más detalle el comportamiento reológico de las mezclas húmedas luego de la etapa de homogeneización, se graficó la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte, en el rango $1-300 \text{ s}^{-1}$ (Figura 3.11). Además de las diferencias de viscosidad ya discutidas, la Figura 3.11 permite apreciar claramente cómo en las mezclas húmedas homogeneizadas con 60 % ST, la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de corte, comportamiento característico de los fluidos pseudoplásticos, en coincidencia con el índice de comportamiento de flujo (n) < 1 obtenido al ajustar los datos conforme a la Ley de Potencia (Tabla 3.10).

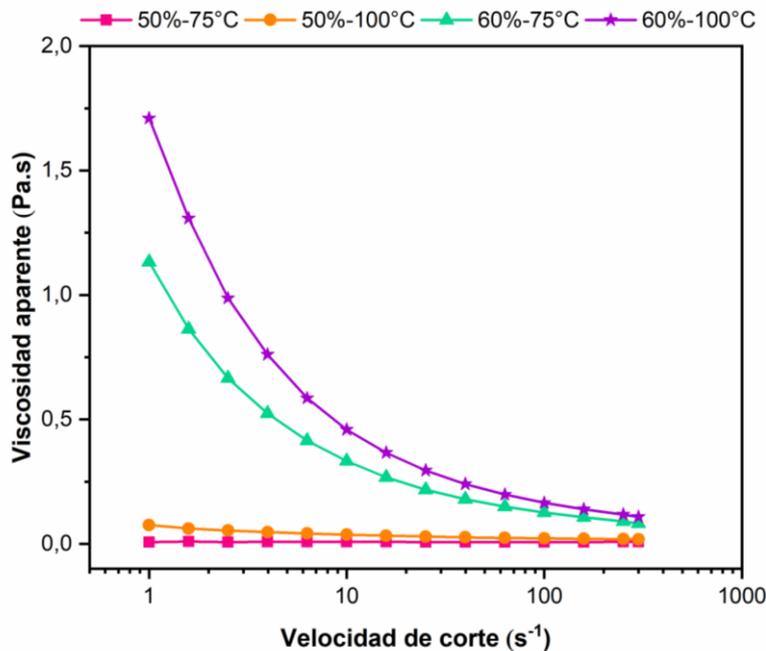


Figura 3.11. Viscosidad aparente (η) de las mezclas húmedas post-homogeneización en función de la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$).

A su vez, las muestras homogeneizadas con 60 % ST presentaron mayor histéresis (Figura 3.10). Las curvas de la rampa ascendente estuvieron por encima de las curvas de la rampa descendente de velocidad de corte, indicando un comportamiento tixotrópico. La presencia de tixotropía sugiere una ruptura de la estructura generada por la cizalla.

En las mezclas homogeneizadas, se observaron importantes diferencias en el comportamiento de flujo entre 60%-100°C y 50%-75°C (Tabla 3.10, Figura 3.10) y en el tamaño de partícula (Tabla 3.9, Figura 3.7). Este resultado está en línea con publicaciones anteriores que demostraron que a menor tamaño de partícula luego de la homogeneización, la viscosidad es menor (Floury et al., 2000; Kelly et al., 2016; Maher et al., 2014).

La viscosidad y el comportamiento reológico del líquido a la entrada del secador spray afectan directamente el tamaño de partícula del polvo resultante. Además, a altas viscosidades la eficiencia del secado disminuye debido a la formación de gotas de gran tamaño. Westergaard (2011) sugirió que la viscosidad de leche entera concentrada a la entrada del secador spray debía estar por debajo de 60 mPa.s, mientras que Blanchard et al. (2013) recomendaron no exceder los 200 mPa.s. En el presente estudio, la máxima viscosidad aparente en la alimentación del secador spray, medida a 300 s⁻¹ y 65 °C, se obtuvo para la mezcla húmeda 60%-100°C y fue 95,9 ± 1,0 mPa.s (Tabla 3.10), excediendo el valor máximo recomendado por Westergaard (2011), aunque por debajo del límite establecido por Blanchard et al. (2013).

4.6. Características de las emulsiones post reconstitución

En la Figura 3.12 se presentan las DTP obtenidas para las distintas fórmulas luego de su reconstitución en agua, que habían sido presentadas por separado en la Figura 3.7. En función de las diferencias de tamaño de partícula observadas, se decidió analizar en más detalle las emulsiones post reconstitución para intentar comprender las causas de estas diferencias y su posible impacto en la estabilidad.

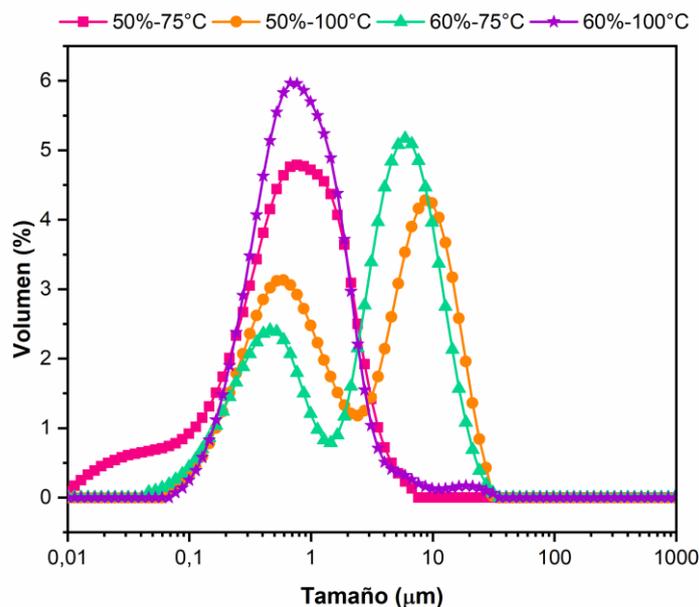


Figura 3.12. Distribución del tamaño de partícula de fórmulas infantiles modelo en polvo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).

4.6.1 Microestructura de las emulsiones post reconstitución

El método de dispersión de luz laser utilizado para determinar la DTP tiene limitaciones al momento de analizar emulsiones floculadas. Por ese motivo, las fórmulas reconstituidas fueron también analizadas por microscopía óptica, que es una técnica sencilla y confiable para distinguir la floculación de otros procesos como coalescencia o maduración de Ostwald (Dickinson, 2010). El análisis de DTP había mostrado que las fórmulas 50%-100°C y 60%-75°C luego de su secado spray y reconstitución en agua presentaban poblaciones bimodales, cuya población principal tenía un tamaño de partícula medio mayor que 50%-75°C y 60%-100°C (Figura 3.12). Estos resultados coinciden con lo observado en el microscopio óptico, sin embargo, la microscopía permitió diferenciar las características de las emulsiones 50%-100°C y 60%-75°C (Figura 3.13). Mientras que la primera presentó gotas de aceite de gran tamaño, la segunda presentó gotas individuales de menor tamaño con alto grado de aglomeración. Para identificar la existencia de fenómenos de coalescencia y/o floculación, las fórmulas se reconstituyeron en SDS 1 %. La floculación y la coalescencia constituyen dos procesos de desestabilización de emulsiones. En la floculación las gotas se acercan formando agregados manteniendo su integridad individual, mientras que en la coalescencia dos o más gotas se unen formando una gota de mayor tamaño (McClements, 2016). El SDS es un surfactante aniónico que genera fuertes fuerzas electrostáticas repulsivas que previenen que las gotas se agreguen (McClements, 2016). La presencia de SDS generó la

Capítulo 3

desagregación de las gotas en 60%-75°C, indicando que el fenómeno presente en la fórmula reconstituida en agua correspondía a floculación. Este cambio no se observó al incorporar SDS a 50%-100°C, que a su vez había presentado un aumento del tamaño de partícula luego del secado y reconstitución (Figura 3.7), que puede por lo tanto atribuirse a la coalescencia de gotas de aceite.

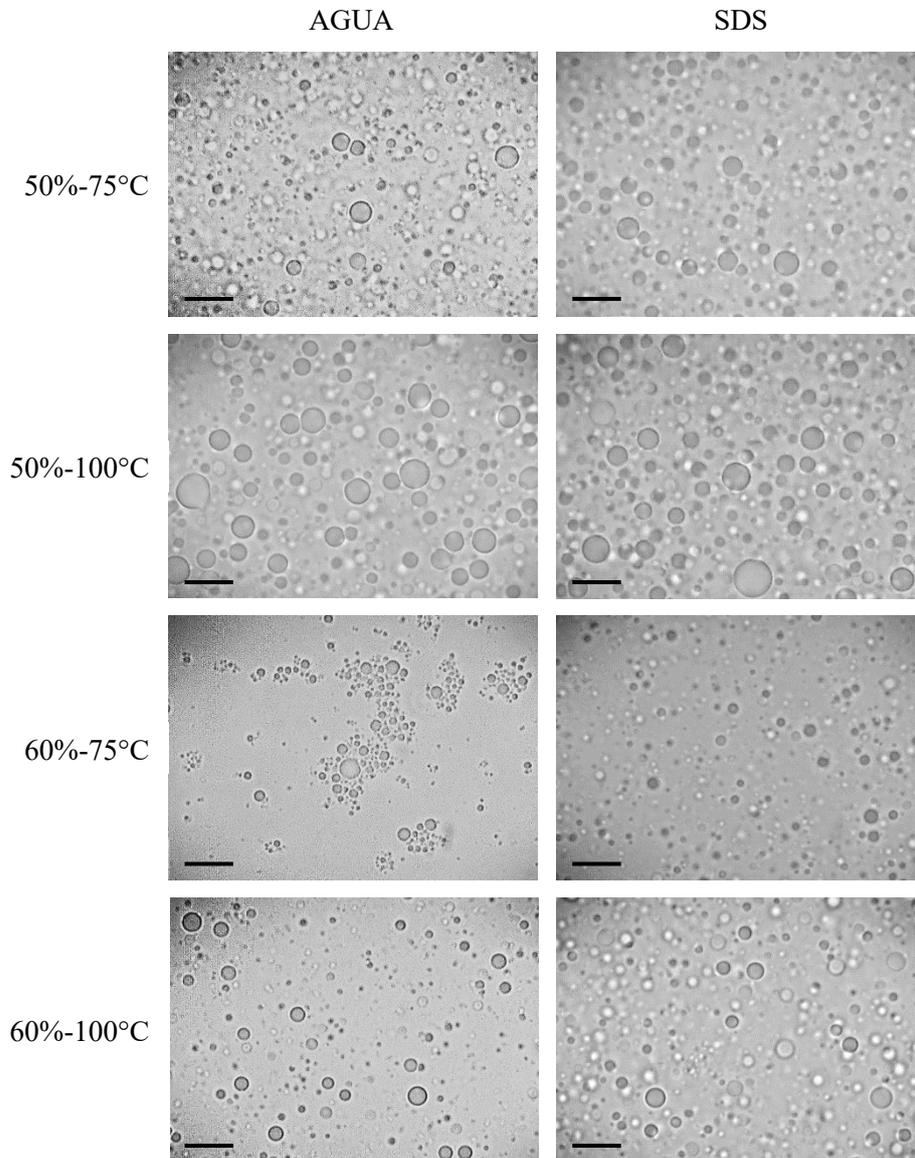


Figura 3.13. Micrografías de las fórmulas infantiles modelo en polvo (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C, 60%-100°C) reconstituidas al 12,5 % (p/v) en agua o SDS 1%, obtenidas por microscopía óptica con magnificación 100×.

Las barras representan: 50 μm .

Comparando la microestructura de las cuatro fórmulas en estudio, en el caso de aquellas producidas a partir de mezclas húmedas con 50 % ST, si bien antes del secado spray ambas

presentaron DTP similares y con tamaños de partícula relativamente pequeños, luego del secado y reconstitución se obtuvo un aumento del tamaño de partícula en las fórmulas pasteurizadas a 100 °C (Figura 3.7), que podría explicarse por la coalescencia de las gotas de aceite. Similarmente, Dapuetto et al. (2019) reportaron que el diámetro de las gotas de aceite, determinado por análisis de imágenes obtenidas por microscopía óptica, aumentaba con el grado de desnaturalización en emulsiones estabilizadas por proteínas del suero y lo atribuyeron a que la reducción de la concentración de proteínas nativas disminuye su capacidad de estabilizar las nuevas interfases creadas durante el proceso de homogeneización, redundando en gotas de aceite de mayor tamaño y curvas de DTP más anchas. En el caso de las fórmulas obtenidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST, antes del secado spray se habían obtenido elevados tamaños de partícula, indicando que la homogeneización no había sido completamente efectiva a esos niveles de ST (Figura 3.7). La homogeneización en dos etapas, como la utilizada en este estudio, fuerza a la emulsión a pasar por dos válvulas consecutivas. En la primera, generalmente a mayor presión (13 MPa en el presente estudio), se busca romper las gotas para reducir su tamaño, mientras que en la segunda etapa a menor presión (3 MPa en el presente estudio) se busca desagregar los flóculos que podrían haberse formado tras la primera etapa (Masum et al., 2020c; McClements, 2016). Los resultados de DTP para las mezclas húmedas con 60 % ST mostraron que alguna de estas dos etapas no fue efectiva. Sin embargo, luego del secado y reconstitución de 60%-100°C sí se observó una reducción del tamaño de partícula (Figura 3.7), mientras que en 60%-75°C esta reducción no ocurrió y, la microscopía óptica permitió constatar que el elevado tamaño de partícula correspondía a flóculos y no gotas individuales (Figura 3.13). Es importante destacar en este punto, que el método utilizado para el cálculo del tamaño de partícula asume que las partículas corresponden a esferas aisladas, mientras que en las emulsiones floculadas se obtienen agregados de formas heterogéneas y, por lo tanto, los tamaños de partícula obtenidos deben considerarse aproximados (Demetriades et al., 1997). Considerando los resultados de tamaños de partícula y propiedades reológicas, se podría hipotetizar que en las mezclas húmedas con 60 % ST la primera etapa de la homogeneización fue efectiva, logrando reducir el tamaño de las gotas de aceite individuales, pero la segunda etapa no fue efectiva en lograr la disrupción de los flóculos formados. La presencia de flóculos en las mezclas homogeneizadas con 60 % ST explica tanto el elevado tamaño de partícula obtenido en esa etapa (Figura 3.7), como el incremento de la viscosidad y el cambio de comportamiento Newtoniano a pseudoplástico obtenido sólo para dichas mezclas (Tabla 3.10, Figuras 3.10 y 3.11). El descenso de la viscosidad al aumentar el esfuerzo de corte, característico de fluidos pseudoplásticos, puede explicarse por la disrupción de los flóculos al aumentar la cizalla (Demetriades et al., 1997). En cuanto a los resultados obtenidos para las fórmulas en polvo reconstituidas, se podría pensar que el pasaje de la mezcla húmeda a través de la boquilla de presión del secador spray actuó como una tercera etapa de homogeneización, en el que se logró la desagregación de las gotas de aceite únicamente para 60%-

100°C, hecho que podría asociarse a la presencia de flóculos de mayor tamaño y presencia de proteínas desnaturalizadas en el seno de la emulsión generando interacciones factibles de desestabilizarse durante el secado spray (Tabla 3.10).

En la Figura 3.14 se presenta otra micrografía de la fórmula 60%-75°C reconstituida en agua, con una sección ampliada.

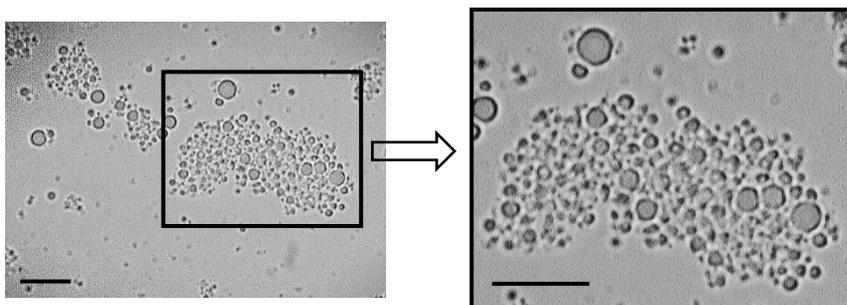


Figura 3.14. Micrografía de la fórmula infantil modelo en polvo 60%-75°C, reconstituidas al 12,5 % (p/v) en agua, 1%, por microscopía óptica con magnificación 100×. La imagen de la derecha corresponde a una ampliación del recuadro indicado en la imagen de la izquierda.

Las barras representan: 50 μm .

Existen diferentes tipos de estructura de flóculos, dependiendo de la intensidad de la fuerza de atracción entre gotas. Cuando la atracción entre las gotas es alta se forman estructuras abiertas en las que cada gota está unida únicamente a dos o tres gotas circundantes (Figura 3.15B), mientras que cuando la atracción entre las gotas es relativamente débil se forman flóculos de estructura más compacta que retiene menos fase continua (Figura 3.15A) (McClements, 2016). El primer tipo de floculación, con fuerzas de interacción altas entre partículas, corresponde al mecanismo de formación de puentes, que suele ocurrir cuando la relación proteína/aceite durante la homogeneización es baja. Mientras que cuando la atracción es más débil suele tratarse de la floculación por depleción, que suele ocurrir cuando hay un exceso de proteína en la fase continua (Dickinson, 2010).

Comparando las estructuras esquematizadas por McClements (2016) y presentadas en la Figura 3.15, con las obtenidas en 60%-75°C (Figura 3.14), parecería que los flóculos obtenidos en la fórmula infantil corresponden a los de estructura más compacta y cerrada, con menor fuerza de atracción entre gotas, que suelen deberse a la floculación por depleción (McClements, 2016). La floculación por depleción es un fenómeno que ocurre cuando partículas coloidales no adsorbidas (tales como proteínas) presentes en la fase continua incrementan la fuerza de atracción entre las gotas de aceite debido a un efecto osmótico asociado con la exclusión de estas partículas de la región próxima a las gotas. Cuando la fuerza de atracción es lo suficientemente alta para superar las interacciones repulsivas entre las gotas, ocurre la floculación (McClements, 2016). Este tipo

de floculación es débil y reversible, por lo que podría haberse obtenido no sólo en 60%-75°C sino también en 60%-100°C luego de la homogeneización de las mezclas húmedas y haberse desagregado al pasar por la tobera del secador spray, en el caso de 60%-100°C.

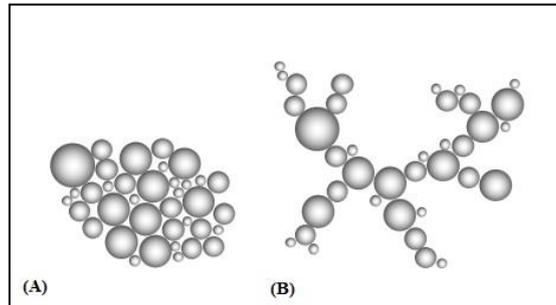


Figura 3.15. Representación esquemática de un flóculo con estructura cerrada (A) y un flóculo con estructura abierta (B) (adaptada de: McClements (2016)).

4.6.2 Composición proteica en la interfase aceite/agua

Para obtener más información sobre las emulsiones en las fórmulas reconstituidas, se analizó por SDS-PAGE la composición de las proteínas adsorbidas en la interfase aceite/agua. Los resultados se presentan en la Figura 3.16.

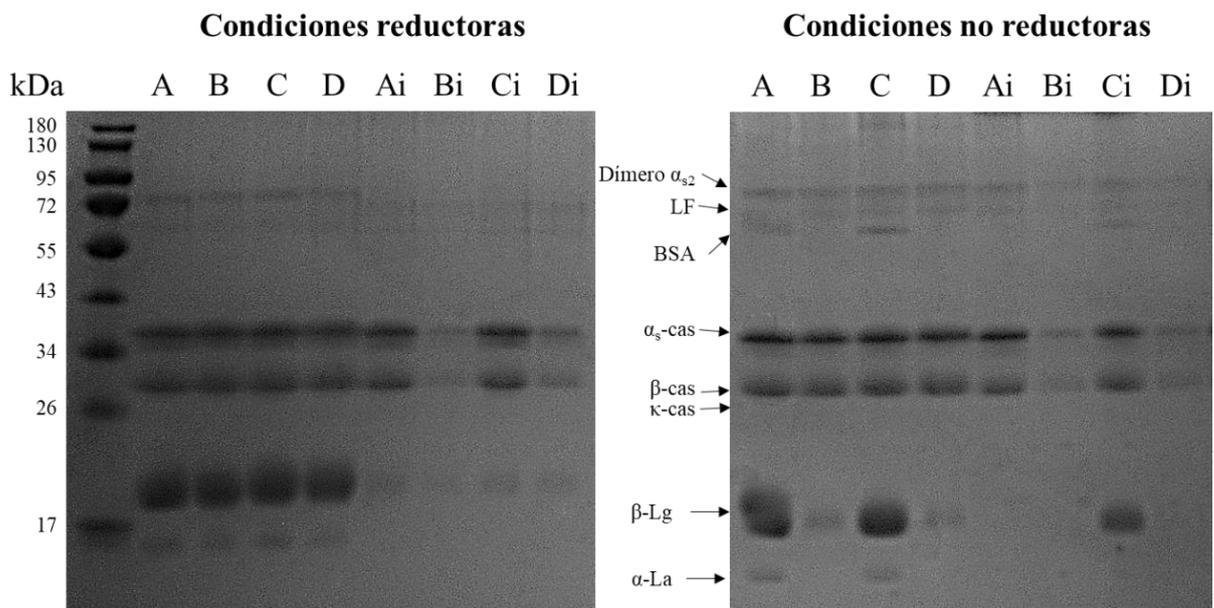


Figura 3.16. SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D). Las calles A, B, C, D corresponden a las fórmulas reconstituidas completas y las calles identificadas con una i corresponden a las proteínas adsorbidas en la interfase en la fórmula correspondiente.

LF= lactoferrina, BSA= seroalbúmina bovina, cas= caseína, β -Lg= β -Lactoglobulina, α -La= α -Lactoalbúmina.

En presencia de β -mercaptoetanol (condiciones reductoras), el perfil proteico de las fórmulas reconstituidas completas no presentó variaciones significativas. Las muestras se formularon para contener 60 % WP y 40 % caseína, por lo tanto, considerando que la β -Lg representa aproximadamente el 50 % de las WP, en las fórmulas modelo constituye aproximadamente el 30 % del total de proteínas (O'Mahony & Fox, 2013). El β -mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro y, por lo tanto, las proteínas agregadas generalmente aparecen en su forma monomérica en los geles obtenidos en condiciones reductoras (Dissanayake & Vasiljevic, 2009).

En condiciones no reductoras, ocurren únicamente disociaciones de enlaces no covalentes, y por lo tanto, es de esperar que los agregados vía enlaces disulfuro permanezcan intactos (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). En las fórmulas completas 50%-100°C (B) y 60%-100°C (D), las bandas correspondientes a las proteínas del suero α -La y BSA fueron casi imperceptibles y la banda correspondiente a β -Lg se redujo notoriamente (Figura 3.16). Estos cambios no se obtuvieron para 50%-75°C (A) y 60%-75°C (C), lo que indica que la pasteurización a 100 °C provocó la agregación proteica, probablemente por medio de puentes disulfuro, generándose agregados de alto peso molecular que no ingresaron al gel y, por lo tanto, no se detectaron en condiciones no reductoras.

Al analizar el perfil de las proteínas adsorbidas en la interfase aceite/agua de las fórmulas reconstituidas en condiciones reductoras, se observó una mayor presencia de caseínas que de WP, a pesar de estar en menor concentración en la fórmula completa. La banda correspondiente a la α -La no se detectó en las proteínas adsorbidas, indicando que no se encontraba en la interfase y la banda correspondiente a la β -Lg se detectó de forma muy tenue (Figura 3.16). La adsorción preferencial de la fracción de caseína sobre la de WP en sistemas lácteos ha sido ampliamente reportada en la literatura (Britten & Giroux, 1991; McCarthy et al., 2015; Tomas et al., 1994; Ye et al., 2007). Las caseínas poseen mayor flexibilidad e hidrofobicidad, lo que aumenta su tendencia a adsorberse en la interfase (Dalglish et al., 2002).

Los resultados de DTP (Figura 3.12) y microscopía óptica (Figura 3.14) demostraron la floculación de la fórmula 60%-75°C, que como se observa en la Figura 3.16, fue mayoritariamente estabilizada por caseína. El mecanismo de floculación por depleción ha sido reportado en emulsiones estabilizadas por distintos tipos de proteína, como caseinato de sodio, caseína micelar, β -caseína o mezclas de β - y α -caseína (Casanova & Dickinson, 1998; Huck-Iriart et al., 2016; Lazzaro et al., 2017; Radford & Dickinson, 2004).

Comparando el perfil de las proteínas adsorbidas en las cuatro muestras estudiadas, se observó mayor presencia de caseínas y de β -Lg, en 50%-75°C (Ai) y 60%-75°C (Ci) que en 50%-100°C (Bi) y 60%-100°C (Di). La menor presencia de proteínas interfaciales en las fórmulas pasteurizadas a 100 °C puede explicarse por la desnaturalización de las WP y la formación de agregados de WP y WP-caseínas. Al agregarse, la flexibilidad de las proteínas se reduce y así su

eficiencia para ubicarse en la interfase (Liang et al., 2017; Raikos, 2010). La menor presencia de proteína en la interfase también podría atribuirse a un mayor tamaño de gota, que redundaría en una menor área superficial y, por lo tanto, menor carga proteica. Este mayor tamaño de gota fue evidente en la fórmula 50%-100°C (Figura 3.12) y, aunque los resultados de tamaño de partícula parecieron indicar un tamaño de gota grande en 60%-75°C, según se pudo observar por microscopía óptica, la emulsión estaba floculada y el elevado tamaño obtenido correspondía a agregados y no a gotas individuales (Figuras 3.13 y 3.14).

En cuanto a los resultados obtenidos para las proteínas adsorbidas en condiciones no reductoras, las bandas correspondientes a la β -Lg desaparecieron por completo en todas las muestras excepto 60%-75°C (Figura 3.16). El hecho de que las tenues bandas correspondientes a β -Lg detectadas en condiciones reductoras no se hayan observado en condiciones no reductoras indica que esas proteínas ubicadas en la interfase se encontraban interactuando mediante enlaces que se rompieron al agregar el agente reductor. Por otro lado, en el caso de la fórmula 60%-75°C, la β -Lg que fue casi imperceptible en condiciones reductoras presentó una banda de importante intensidad en ausencia de β -mercaptoetanol hecho que resulta difícil de explicar con los resultados con los que se cuenta.

La comparación de los perfiles proteicos de las fórmulas 60%-75°C y 60%-100°C permiten inferir las causas de las diferencias observadas en las características de la emulsión. De acuerdo con los resultados de DTP y propiedades reológicas de las mezclas húmedas previo a su secado (post-homogeneización), se había concluido que ambas emulsiones se encontraban floculadas y que el secado spray había actuado como una tercera etapa de homogeneización, disruptiendo los flóculos formados en 60%-100°C y no en 60%-75°C. Observando los geles obtenidos en condiciones reductoras, se observa que ambas fórmulas reconstituidas presentaban β -Lg pero sólo una pequeña proporción se había adsorbido en la interfase aceite/agua, por lo que esta WP se ubicó mayoritariamente en la fase continua. A su vez, de la comparación de perfiles de las fórmulas completas en condiciones reductoras y no reductoras, se pudo concluir que la β -Lg presente en la fase continua no se encontraba asociada por uniones disulfuro en las fórmulas 60%-75°C, mientras que en las fórmulas 60%-100°C se encontraba desnaturalizada y agregada mediante puentes disulfuro. Por lo tanto, es posible que la presencia de β -Lg desnaturalizada en la fase continua haya permitido estabilizar la emulsión en aquellas fórmulas conteniendo 60% ST y tratadas a 100°C, impidiendo su floculación durante la reconstitución, a través del aumento de la viscosidad de la fase continua.

4.6.3 Estabilidad de la emulsión post reconstitución

La estabilidad de las fórmulas infantiles reconstituidas se midió en el Turbiscan. Este equipo permite determinar la estabilidad mediante la medida de la transmitancia y *backscattering* (o retrodispersión) de un sistema opaco atravesado por un pulso de luz correspondiente al infrarrojo

cercano ($\lambda = 880 \text{ nm}$). El detector de transmitancia se ubica a 180° respecto a la muestra y recibe la luz que atraviesa la emulsión, mientras que el detector de *backscattering* se ubica a 135° y recibe la luz dispersada por la muestra (Huck-Iriart et al., 2014). La Figura 3.17 muestra el esquema de funcionamiento del equipo. Las muestras se colocan en tubos cilíndricos de vidrio (como se muestra en la Figura 3.18) que son atravesados por el pulso de luz y los detectores barren la longitud completa de la muestra. Cuando la muestra es transparente, el detector de transmitancia recibe la mayor parte de la luz y, a medida que aumenta la turbidez de la muestra, el haz de luz se dispersa y atraviesa la muestra cada vez en menor proporción, reduciéndose la transmitancia a la vez que aumenta el *backscattering*. Durante el proceso de desestabilización de una emulsión, las fases se separan por lo que aparece una zona de clarificación, aumentando la transmitancia y disminuyendo el *backscattering* (Huck Iriart et al., 2014).

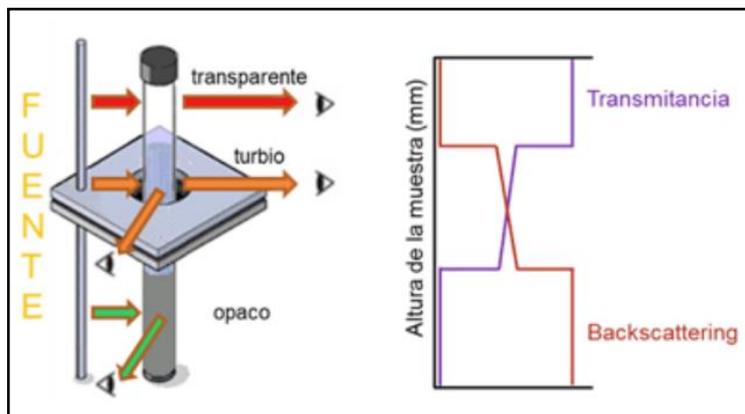


Figura 3.17. Esquema de funcionamiento del Turbiscan (Huck-Iriart et al., 2014).

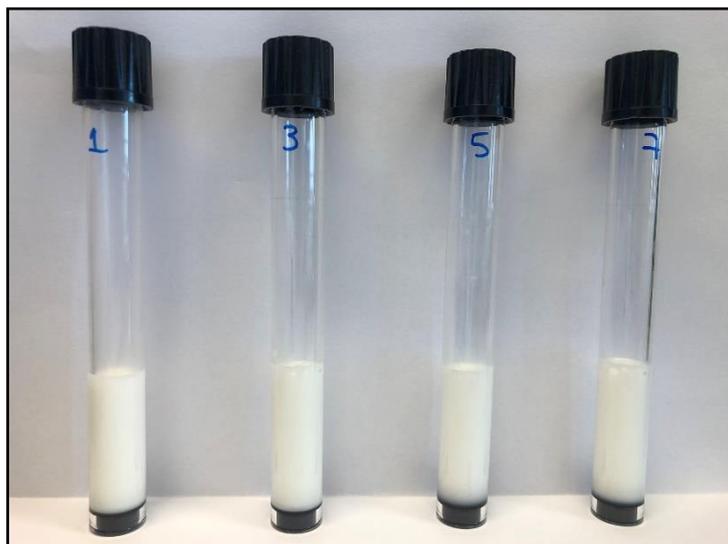


Figura 3.18. Imagen de tubos de Turbiscan conteniendo muestra reconstituida.

Capítulo 3

En la Figura 3.19 se presentan los resultados de *backscattering* en función de la altura de tubo, obtenido para las distintas muestras reconstituidas, a lo largo del tiempo. Un aumento del *backscattering* en la parte superior del tubo (mayor altura) junto con una reducción en la parte inferior, indica la aparición de cremado y/o floculación. Este fenómeno se observó en las fórmulas obtenidas bajo las cuatro condiciones de procesamiento, pero únicamente después de 24 horas de almacenamiento a 20 °C.

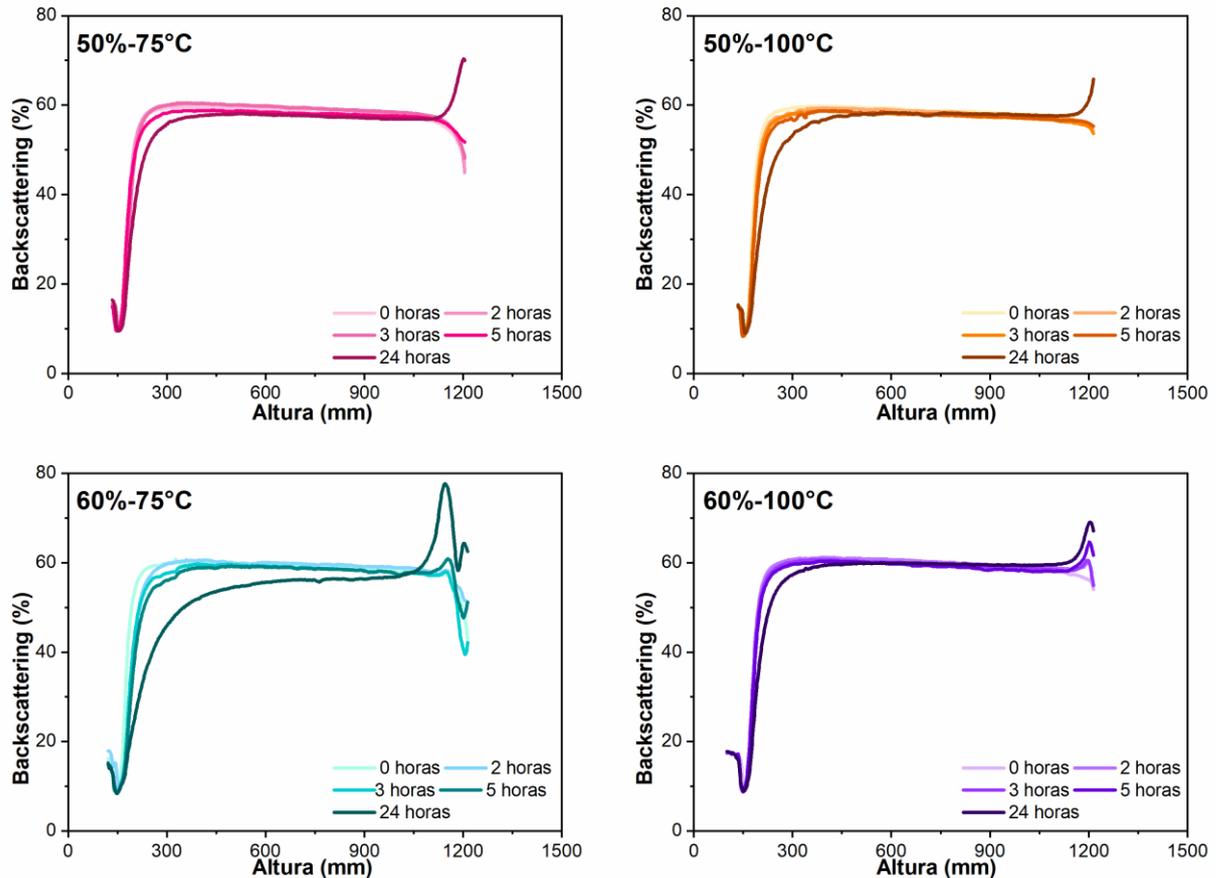


Figura 3.19. Medidas de *backscattering* de las fórmulas reconstituidas en función del tiempo.

El cálculo del índice de estabilidad de la emulsión (Ecuación 3.12) facilitó la comparación de las muestras. Como se observa en la Figura 3.20, a las 24 horas, la muestra 60%-75°C presentó la mayor inestabilidad.

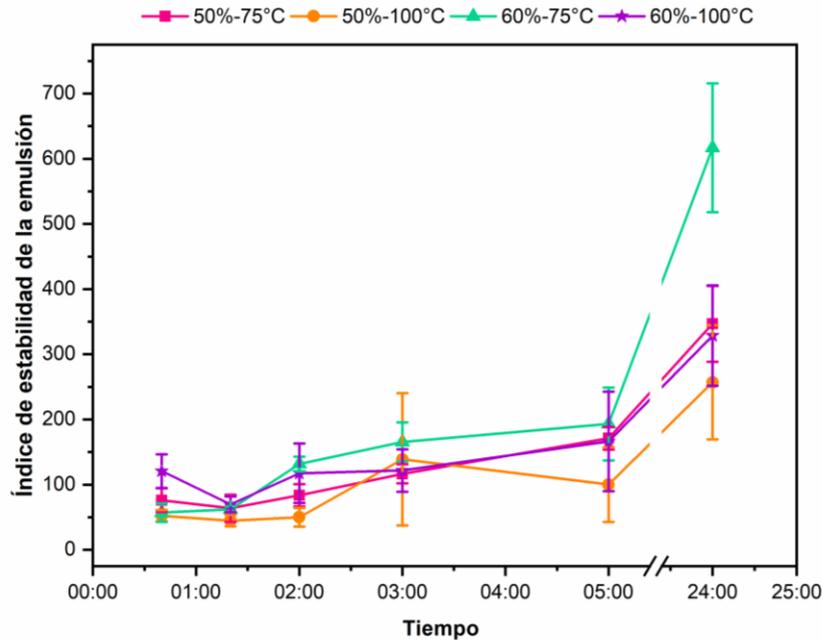


Figura 3.20. Índice de estabilidad de emulsión de las fórmulas infantiles modelo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), durante el almacenamiento a 20 °C.

Mayores valores del índice de estabilidad de la emulsión indican menor estabilidad.

Para poder analizar en más detalle los procesos de desestabilización de las distintas fórmulas reconstituidas, se calcularon los índices de estabilidad de la emulsión en las zonas baja (altura = 2–3 cm) y alta (altura = 10–12 cm) de los tubos, que se muestran en la Figura 3.21. Vale aclarar que el índice se calcula considerando el valor absoluto de la diferencia de *backscattering* a un tiempo determinado respecto a la condición inicial (Ecuación 3.12). Por eso, a pesar de que la desestabilización implica una reducción del *backscattering* en la zona baja y un aumento en la zona alta, debido a los procesos de clarificación y cremado/floculación, respectivamente, ésta se refleja en un aumento del índice de estabilidad en ambas zonas del tubo.

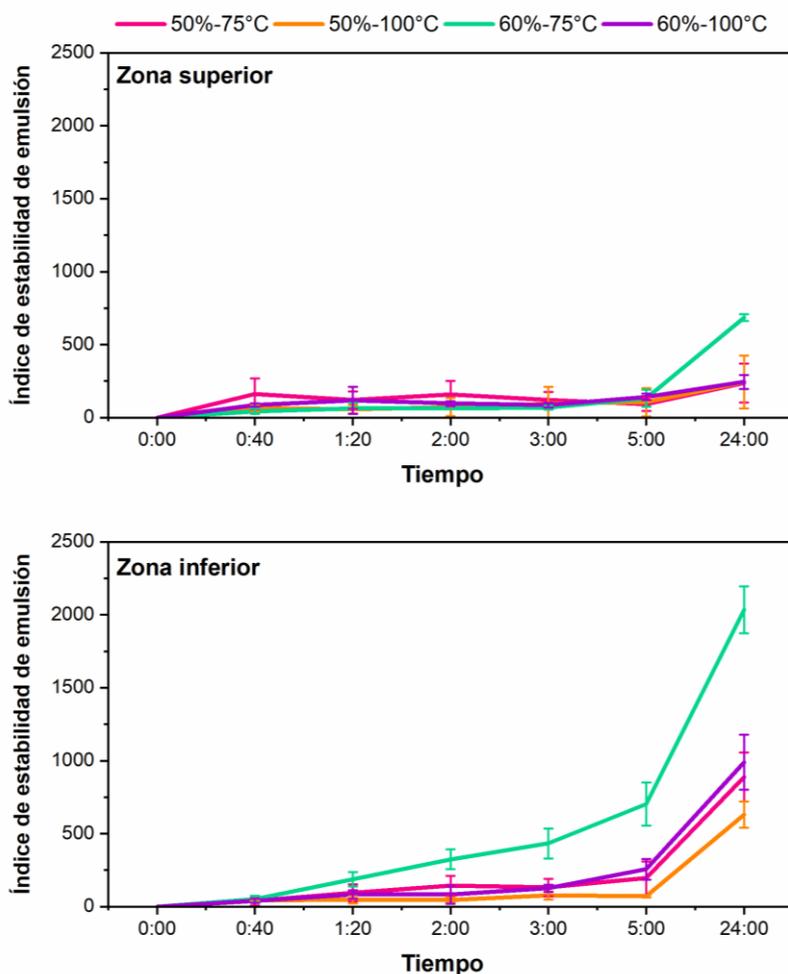


Figura 3.21. Índice de estabilidad de emulsión de las fórmulas infantiles modelo reconstituidas, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s), durante el almacenamiento a 20 °C, en las zonas inferior (altura = 2-3 cm) y superior (altura = 10 – 12 cm) del tubo.

Mayores valores del índice de estabilidad de la emulsión indican menor estabilidad.

En el caso de las muestras obtenidas a partir de mezclas húmedas con 50 % ST, en la zona baja del tubo, se obtuvieron cambios significativos en los índices de estabilidad sólo luego de 24 horas de almacenamiento a 20 °C, mientras que en la zona alta del tubo no se obtuvieron diferencias en ningún tiempo de almacenamiento ($P = 0,1206$ para 50%-75°C y $P = 0,1157$ para 50%-100°C). En la muestra 60%-100°C se observó desestabilización a las 5 y 24 horas luego de la reconstitución, en las zonas baja y alta del tubo, respectivamente. Finalmente, y en línea con los resultados obtenidos para el índice de estabilidad global de la emulsión (Figura 3.20), la muestra 60%-75°C fue la primera en presentar cambios significativos en ambas zonas del tubo: a las 2 horas en la zona baja y a las 5 horas en la zona alta. En todas las muestras, los cambios de estabilidad se observaron primero en la zona inferior del tubo (altura = 2-3 cm), indicando que primero ocurrió una clarificación seguida de cremado en la zona alta (altura = 10-12 cm),

acompañada o no de floculación. La clarificación ocurre cuando las gotas de aceite suben, generándose una disminución de la concentración de gotas en la zona inferior del tubo y, por lo tanto, una reducción del *backscattering* en esa región. A su vez, este movimiento hacia arriba de las gotas de aceite aumenta su concentración en la zona superior generando el cremado (Chanamai & McClements, 2000). Cabe señalar que en el caso de 60%-75°C la emulsión ya se encontraba floculada antes de su almacenamiento.

Las fórmulas infantiles obtenidas bajo las condiciones de producción 50%-75°C, 50%-100°C y 60%-100°C presentaron una estabilidad muy alta luego de su reconstitución, mientras que 60%-75°C fue la primera en mostrar signos de desestabilización (Figuras 3.20 y 3.21). De acuerdo con la Ley de Stokes (Ecuación 3.15), la velocidad de cremado o sedimentación depende directamente de la diferencia de densidades de las fases continua y dispersa y del tamaño de gota y es inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua (McClements, 2016):

$$v_s = \frac{2gr^2(\rho_0 - \rho)}{9\eta_0} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Donde: v_s es la velocidad de sedimentación o cremado, g es la aceleración de la gravedad, r es el radio de la gota, ρ es la densidad de la fase dispersa, ρ_0 es la densidad de la fase continua y η_0 es la viscosidad de la fase continua.

En el caso de las fórmulas 50%-75°C y 60%-100°C la mayor estabilidad puede explicarse por el menor tamaño de partícula obtenido en las muestras reconstituidas (Figura 3.12), que en el caso de 60%-100°C probablemente se deba a la desagregación de flóculos durante la atomización en el secado spray.

La fórmula 60%-75°C presentó la mayor inestabilidad (Figuras 3.19-3.21). Como se discutió anteriormente, esta fórmula presentó floculación (Figuras 3.13 y 3.14). En emulsiones diluidas, como es el caso de las fórmulas reconstituidas, la floculación favorece el cremado porque aumenta el tamaño efectivo de las partículas (McClements, 2016). Por otro lado, la fórmula 50%-100°C, que también había presentado un elevado tamaño de partícula explicado por la coalescencia de gotas durante la reconstitución (Figura 3.12), presentó buena estabilidad (Figura 3.20). A diferencia de 60%-75°C, las partículas presentes en 50%-100°C correspondían a gotas individuales de gran diámetro y no a agregados, como se observó por microscopía (Figura 3.13). A su vez, el mayor grado de desnaturalización y/o agregación obtenidos, como resultado de la pasteurización a 100 °C (Figura 3.6), y la presencia de β -Lg desnaturalizada en la fase continua (Figura 3.16), podrían haber contribuido a estabilizar la emulsión.

Es necesario resaltar que las fórmulas infantiles obtenidas bajo las cuatro condiciones de producción fueron estables por al menos 2 horas luego de su reconstitución, que puede considerarse un período representativo del tiempo que transcurre normalmente entre que las

fórmulas son preparadas y consumidas (Murphy et al., 2015). También cabe señalar que las fórmulas modelo fueron producidas sin agregado de emulsionantes no proteicos, tal como lecitina, que se utilizan comúnmente en la producción de fórmulas comerciales (McSweeney, 2008).

4.7. Lisina disponible

Los parámetros temperatura de pasteurización y etapa del procesamiento, así como su interacción, impactaron significativamente el contenido de lisina disponible ($P < 0,01$, Tabla 3.8). La concentración de lisina disponible en las mezclas tratadas térmicamente a 75°C se mantuvo constante ($P > 0,05$) durante el procesamiento, para ambos niveles de ST (Tabla 3.11). Sin embargo, en las mezclas húmedas pasteurizadas a 100°C se observó una pérdida significativa ($P < 0,05$) de lisina disponible durante el secado spray: se produjo una reducción del 32 y 40 % en las fórmulas infantiles con 50 y 60 % ST, respectivamente. Por lo tanto, la disminución de lisina ocurrió por la combinación de factores: pasteurización a 100°C y secado spray.

Tabla 3.11. Lisina disponible (% en materia seca) en las fórmulas infantiles modelo luego de las etapas de dispersión, pasteurización, homogeneización y secado spray.

Condición	Post-dispersión	Post-pasteurización	Post-homogeneización	Post-secado spray
50%-75°C	0,70 ± 0,03 ^{aA}	0,72 ± 0,02 ^{aA}	0,70 ± 0,01 ^{aA}	0,70 ± 0,02 ^{bA}
50%-100°C	0,74 ± 0,04 ^{aB}	0,74 ± 0,01 ^{aB}	0,75 ± 0,01 ^{bB}	0,51 ± 0,02 ^{aA}
60%-75°C	0,70 ± 0,01 ^{aA}	0,69 ± 0,01 ^{aA}	0,69 ± 0,01 ^{aA}	0,73 ± 0,01 ^{bA}
60%-100°C	0,71 ± 0,04 ^{aB}	0,71 ± 0,01 ^{aB}	0,75 ± 0,02 ^{bB}	0,43 ± 0,06 ^{aA}

Promedio ± desviación estándar de duplicados de análisis y duplicados de lotes de producción. Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre condiciones. Letras mayúsculas distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre etapas del proceso.

La pérdida de lisina disponible ocurre durante las etapas tempranas de la reacción de Maillard, donde los grupos ϵ -amino de la lisina reaccionan con los grupos carbonilo de carbohidratos reductores, tales como la lactosa (Schmitz-Schug et al., 2013). El tratamiento térmico a 100°C redujo significativamente el nivel de WP nativas en comparación con el tratamiento térmico a 75°C (Figura 3.6). Cuando las WP se desnaturalizan, su estructura nativa globular se despliega exponiendo sus grupos reactivos. Por lo tanto, es de esperar que la desnaturalización aumente la accesibilidad de los grupos involucrados en la reacción de Maillard, reduciendo así la concentración de lisina disponible, mientras que la reacción de agregación genere el efecto opuesto (O'Mahony et al., 2019). Los resultados obtenidos muestran que las mezclas húmedas sometidas a mayores temperaturas y con menor porcentaje de WP nativas, sufren una pérdida significativamente mayor ($P < 0,05$) de lisina disponible. Sin embargo, la pérdida es evidente sólo luego del secado spray. Las condiciones óptimas para la pérdida de lisina incluyen un estado seco y una baja a moderada a_w (Schmitz-Schug et al., 2013). A su vez, el secado spray ha sido

identificado como una etapa crítica para la reducción de lisina disponible durante el procesamiento de fórmulas infantiles por el método *wet-mix* (Ferrer et al., 2000). Considerando lo expuesto anteriormente, podría plantearse que durante la pasteurización a 100 °C los grupos amino presentes en las WP pasan a estar más accesibles, pero no es hasta el secado spray que se alcanzan las condiciones óptimas para que se desarrolle la reacción de Maillard (baja a_w , mayores concentraciones de proteínas y carbohidratos), provocándose la pérdida de lisina disponible.

Aalaei et al. (2019) determinaron el contenido de lisina disponible en cuatro fórmulas infantiles comerciales en polvo, por el método de unión con colorantes con *Acid orange 12*, y obtuvieron concentraciones mayores (0,95-1,13 % en materia seca) que las obtenidas en el presente estudio para las muestras luego del secado spray (Tabla 3.11). Esta diferencia podría explicarse por una diferencia en la intensidad de los tratamientos aplicados, los ingredientes utilizados y su historia térmica, que se desconoce en el mencionado estudio.

5. Conclusiones

- Se logró producir fórmulas infantiles a escala piloto partiendo de mezclas húmedas con 50 y 60 % ST.
- Los ST de las mezclas húmedas y la temperatura de pasteurización afectaron las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales de las fórmulas, y el gasto energético requerido para su producción.
- Aumentar los ST de la mezcla húmeda de 50 a 60 % ST permitió reducir el gasto energético en 17 % para tratamientos térmicos a 75 °C y en 13 % para tratamientos térmicos a 100 °C. Al aumentar los ST de 50 a 60 % ST y, al mismo tiempo, reducir la temperatura de pasteurización de 100 a 75 °C se logró disminuir el consumo de energía en 59 %.
- La única etapa del proceso que generó un aumento significativo de la desnaturalización de las WP fue la pasteurización realizada a 100 °C × 18 s. Comparando el nivel de desnaturalización de las fórmulas finales (polvos) respecto a las mezclas húmedas iniciales (post dispersión), aquellas pasteurizadas a 75 °C presentaron sólo 8 % de desnaturalización mientras que en aquellas pasteurizadas a 100 °C la desnaturalización ascendió al 82 %.
- La desnaturalización y agregación ocurridas luego de la pasteurización a 100 °C promovieron el aumento del tamaño de partícula y de la viscosidad de dichas mezclas húmedas.
- La homogeneización redujo el tamaño de partícula en las mezclas con 50 % ST. Sin embargo, en aquellas con 60 % ST no se obtuvo la reducción esperada, observándose además un incremento de la viscosidad y un cambio del comportamiento de flujo de

Newtoniano a pseudoplástico, consistente con el comportamiento de emulsiones floculadas.

- Todas las emulsiones de las fórmulas finales reconstituidas presentaron buena estabilidad (≥ 2 h), siendo 60%-75°C la primera en mostrar signos de desestabilización
- El análisis de las características de las emulsiones post reconstitución reveló que, en todas ellas, el film interfacial estaba principalmente conformado por caseínas, aunque en aquellas pasteurizadas a 100 °C se obtuvo menor presencia de caseína en la interfase.
- El secado spray no pareció haber modificado el comportamiento de la emulsión en las fórmulas pasteurizadas a 75 °C, que presentaron tamaños de partícula similares antes y después de esta etapa. En el caso de 60%-75°C se confirmó que la emulsión se encontraba floculada, lo que explicó su menor estabilidad.
- La fórmula 50%-100°C presentó coalescencia durante el secado y/o reconstitución mientras que en 60%-100°C se observó una reducción del tamaño de partícula explicada por una desagregación de los flóculos durante el secado.
- El contenido de lisina disponible disminuyó significativamente en las fórmulas pasteurizadas a 100 °C, pero la reducción sólo se evidenció luego del secado spray. Al cabo de la producción (polvos), las fórmulas pasteurizadas a 100 °C presentaron en promedio una concentración de lisina disponible 34 % menor que aquellas pasteurizadas a 75 °C.

CAPÍTULO 4:

Efecto de las condiciones de producción *wet-mix* sobre las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de fórmulas infantiles en polvo

1. Introducción

En el Capítulo 3 se analizaron los efectos de las etapas y condiciones de producción en las propiedades reológicas, emulsionantes y nutricionales de fórmulas infantiles. Los resultados arrojaron que variar los ST de la mezcla húmeda entre 50 y 60 % así como la temperatura de pasteurización entre 75 y 100 °C, además de impactar en el gasto energético del proceso de producción, afecta significativamente las propiedades reológicas de la mezcla húmeda y el contenido de lisina disponible en los polvos finales, así como el grado de desnaturalización y las propiedades emulsionantes de las fórmulas. Por lo tanto, en el presente capítulo se planteó evaluar las consecuencias de esas variaciones de los parámetros del proceso en las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales del producto en polvo final.

Debido a su compleja composición, durante el procesamiento y almacenamiento de fórmulas infantiles pueden ocurrir interacciones entre nutrientes, lo que impacta directamente en la calidad del polvo final (Schuck et al., 2016). La transición vítrea es una propiedad de gran relevancia para la calidad y estabilidad durante el almacenamiento. Polvos con bajas temperaturas de transición vítrea (T_g) son propensos a desarrollar pegajosidad, apelmazamiento y cristalización (Roos, 2002). Las fórmulas infantiles son ricas en lactosa que, a temperaturas por debajo de su T_g se comporta como un cristal amorfo, con alta viscosidad interna y movilidad molecular limitada. Durante el calentamiento, la lactosa pasa de estado vítreo a viscoelástico, adquiriendo mayor movilidad molecular y menor estabilidad. La T_g de las fórmulas infantiles depende de variables composicionales, tales como la presencia de maltodextrina, galacto-oligosacáridos (GOS) y fructo-oligosacáridos (FOS) o la concentración proteica (Masum et al., 2019; McCarthy et al., 2013; Saxena et al., 2019; Schuck, 2017). A su vez, las variables del proceso de producción también pueden influir en la T_g del producto. Masum et al. (2020b) reportaron que aumentar la temperatura de entrada de aire del secador spray, de 180 a 200 °C, disminuyó significativamente ($P < 0,05$) la T_g de fórmulas infantiles en polvo. Sin embargo, los efectos de variables asociadas a etapas del proceso *wet-mix* previas al secado spray, han sido menos investigados.

La fluidez de los polvos representa un desafío tecnológico para la industria, dado que se requieren polvos que fluyan libremente durante el manejo y transporte en cañerías y tolvas. Las propiedades de flujo de los polvos dependen de varios factores, tales como la cohesión entre las partículas, que a su vez está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), tipo de stress aplicado y las características fisicoquímicas de los polvos (tamaño y forma de partícula, densidad, contenidos superficiales de grasa y humedad, T_g) (Enferad et al., 2020; Fournaise et al., 2020). A altas temperaturas o humedades relativas, ocurre la transición vítrea que desemboca, tal como se indicó previamente, en pegajosidad y apelmazamiento, perjudicando la capacidad de fluir (Roos, 2002). La grasa libre superficial también afecta negativamente las propiedades de flujo de los polvos, generando pegajosidad a través de la formación de puentes

líquidos entre las partículas (Kim et al., 2005). Adicionalmente, el tamaño de partícula también afecta la fluidez de los polvos: las partículas más pequeñas son más susceptibles a la pegajosidad, dado que tienen mayores áreas superficiales, lo que promueve la interacción entre partículas (Crowley et al., 2014; O'Donoghue et al., 2019).

La capacidad de rehidratación es una propiedad funcional esencial de las fórmulas infantiles en polvo. Éstas deben reconstituirse fácilmente para evitar inconvenientes domésticos, rechazo organoléptico y una solubilización incompleta que conlleva una contribución nutricional reducida. El proceso de rehidratación de los polvos usualmente se describe como un conjunto de etapas consecutivas, y en ocasiones solapadas (Figura 4.1). Primero, las partículas de polvo entran en contacto con el líquido y se rodean de él, llevando al hundimiento de las partículas bajo la superficie del líquido. Luego, los agregados de polvos se desagregan en la masa de líquido y, finalmente, las partículas individuales se disuelven formando una solución (Fitzpatrick et al., 2016). La composición química y superficial de los polvos alimentarios, así como sus características físicas (tamaño y forma de partícula, densidad, porosidad), afectan las propiedades de rehidratación (Birchal et al., 2005; Gaiani et al., 2010, 2011; McSweeney et al., 2020; Murphy et al., 2020).

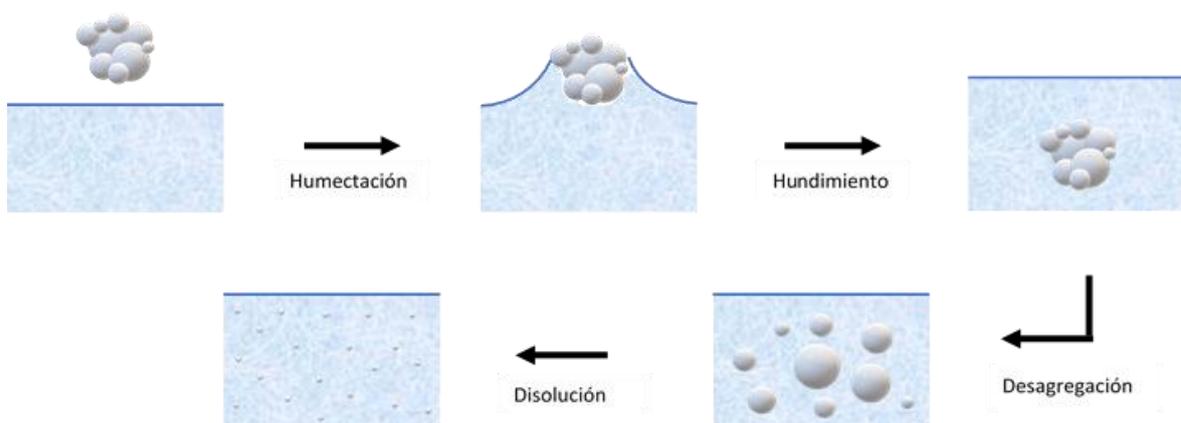


Figura 4.1. Esquema representativo de las etapas de rehidratación (adaptado de: Forny et al. (2011)).

2. Objetivo

Estudiar el efecto del nivel de sólidos totales y temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, en las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de fórmulas infantiles en polvo.

3. Materiales y métodos

3.1. Fórmulas infantiles modelo

Las fórmulas infantiles modelo utilizadas en este capítulo se produjeron según se describió en el Capítulo 3. Así, de acuerdo con el nivel de ST de la mezcla húmeda (50 o 60 % p/p) y las condiciones de pasteurización (75 o 100 °C × 18 s) utilizados durante la producción, se obtuvieron cuatro fórmulas infantiles modelo en polvo: 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C.

3.2. Propiedades fisicoquímicas

3.2.1. Composición nutricional

La composición nutricional de cada lote se determinó por triplicado y todos los resultados se expresaron en % (p/p).

3.2.1.1. Humedad

La humedad de las fórmulas en polvo se determinó gravimétricamente por secado en estufa a 102 °C hasta peso constante (menos de 0,0010 g de diferencia entre dos pesadas consecutivas), según el método GEA Niro No. A1a (GEA Niro, 2006a).

3.2.1.2. Proteína

El contenido de proteína bruta ($N_{total} \times 6,25$, según Codex Alimentarius (2007) y Comisión Europea (2016)) se determinó por el método de Kjeldahl (ISO, 2001).

3.2.1.3. Materia grasa

El contenido de materia grasa fue analizado en Eurofins Steins Laboratorium (Vejen, Dinamarca) por el método Röse Gottlieb (ISO, 2008).

3.2.1.4. Lactosa

El contenido de lactosa fue analizado en Eurofins Steins Laboratorium (Vejen, Dinamarca) por cromatografía líquida según el método AOAC 982.14 (AOAC International, 2019).

3.2.1.5. Cenizas

Las cenizas se determinaron gravimétricamente por incineración a 525 °C hasta la aparición de cenizas blancas y peso constante (Schuck et al., 2012).

3.2.1.6. Oligosacáridos

Finalmente, el contenido de oligosacáridos (GOS+FOS) se obtuvo por diferencia, según la Ecuación 4.1.

$$\text{Oligosacáridos (\%, } m/m) = 100 - H - P - G - L - C \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Donde: H , P , G , L y C son los contenidos de humedad, proteína, materia grasa, lactosa y cenizas de la muestra, respectivamente, expresados en % p/p.

3.2.2. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) de las fórmulas modelo en polvo se midió a 20 °C por triplicado en cada uno de los lotes, con un Aqualab Series 3 TE (Decagon Devices Inc., Washington, Estados Unidos) calibrado con agua ($a_w \sim 1,00$) y soluciones saturadas de LiCl ($a_w = 0,11$) y MgCl₂ ($a_w = 0,495$).

3.2.3. Grasa libre superficial

La concentración de grasa libre superficial de las fórmulas modelo en polvo se determinó por duplicado para cada lote de producción, según el método GEA Niro No. A10a (GEA Niro, 2005a). Se pesaron $10,00 \pm 0,01$ g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 50 mL de éter de petróleo 40-60 °C. Los matraces se agitaron en una plancha de agitación magnética a 485 rpm hasta cumplidos 15 min desde el momento de agregado del éter. Las muestras se filtraron a través de un papel de filtro cualitativo y el filtrado se recogió en un matraz de 100 mL. Se tomaron 20 mL de muestra filtrada y se descargaron en una placa de aluminio previamente pesada. Las placas destapadas conteniendo la muestra filtrada se dejaron bajo campana hasta evaporar el solvente y luego se llevaron a estufa a 105 °C durante 1 h. Una vez retiradas de la estufa, se esperó a que alcancen temperatura ambiente en un desecador y se registró el peso de las placas junto con el residuo. El contenido de grasa libre superficial se calculó de acuerdo con la Ecuación 4.2.

$$\text{Grasa libre superficial (\%, } m/m) = \frac{a \times 50 \times 100}{\left(b - \frac{a}{0,94}\right) \times c} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Donde:

- a es el residuo obtenido luego de la evaporación (g)
- b es el volumen de filtrado tomados (20 mL)
- c es la toma de muestra en polvo (g)
- $0,94$ es el valor estimado de densidad de la grasa libre (g/mL)

3.2.4. Color

Los parámetros instrumentales de color, L^* , a^* y b^* , de las fórmulas infantiles en polvo se midieron con un colorímetro BYK-Gardner Color Guide 45/0 (BYK-Gardner CB-6692, Gerestried, Alemania), calibrado con la placa de calibración blanca. De cada lote se tomaron tres porciones de muestra y se midió el color en seis regiones distintas de cada porción.

Capítulo 4

La luminosidad (L^*) varía de 100= blanco a 0= negro, el parámetro a^* indica el grado de componente rojo a verde ($a^* > 0$: rojo; $a^* < 0$: verde) y el parámetro b^* indica el grado de componente amarillo a azul ($b^* > 0$: amarillo; $b^* < 0$: azul) (Figura 4.2).

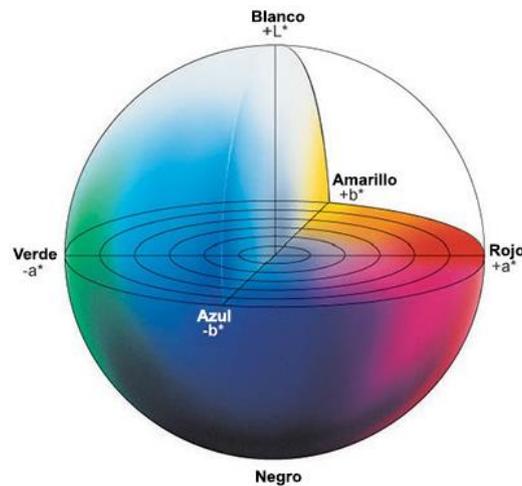


Figura 4.2. Representación gráfica del espacio de color.

3.2.5. Distribución de tamaño de partícula del polvo

La DTP de las fórmulas infantiles en polvo se determinó por difracción de luz láser en un Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), descrito en el punto 3.4.2, equipado con una celda de dispersora de polvo seco (Aero S). Los índices de refracción y absorción seleccionados para el análisis fueron 1,46 y 0,01, respectivamente (Drapala et al., 2017). Las medidas se realizaron por triplicado. Los parámetros utilizados para expresar los resultados fueron: $D[4,3]$ (diámetro medio del volumen equivalente) y D_{10} , D_{50} y D_{90} , que representan los diámetros máximos debajo los cuales se encuentran el 10, 50 y 90 % de las partículas en la muestra, respectivamente.

3.2.6. Microestructura

La morfología superficial de las partículas de polvo se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica consiste en barrer la superficie de la muestra con un rayo focalizado de electrones, produciendo principalmente la emisión de electrones secundarios y retrodispersados, que se recogen con un sistema de detección adecuado.

Las muestras de polvo se montaron en portamuestras con cintas de carbón de doble adhesivo y se recubrieron con oro/paladio por 60 s, para obtener una superficie conductora, antes de su análisis en un microscopio electrónico de barrido Quanta 200 (FEI Company, Oregon, Estados Unidos).

3.2.7. Densidad de partícula

La densidad de partícula de las muestras en polvo se determinó según el método GEA Niro No. A11a (GEA Niro, 2006b) en un picnómetro AccuPyc 1330 (Micromeritics Instruments Corporation, Georgia, Estados Unidos). El análisis de densidad de partícula fue realizado en GEA Process Engineering A/S (Søborg, Dinamarca).

3.2.8. Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las fórmulas en polvo se determinó por calorimetría diferencial de barrido. La T_g es la temperatura a la que ocurre un cambio en el calor específico de la muestra y corresponde, en realidad, a un rango de temperaturas (Figura 4.3). La temperatura a la que comienza el cambio se conoce como T_g inicial, la temperatura a la que finaliza se conoce como T_g final y la temperatura media, que corresponde al punto de inflexión, se conoce como T_g media.

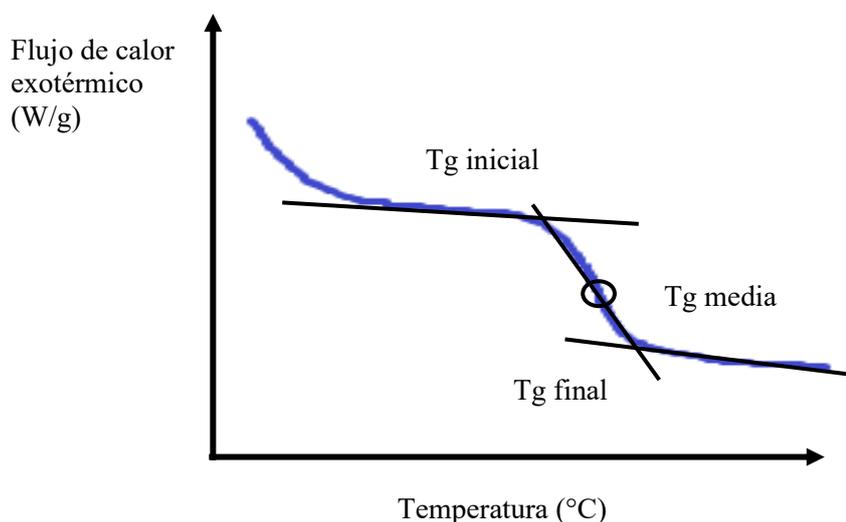


Figura 4.3. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido para ejemplificar la obtención de las temperaturas de transición vítrea.

Esta propiedad depende de la a_w por lo que todas las muestras fueron equilibradas a una a_w de 0,23 previo a su análisis. Para ello, 1 g de cada muestra se pesó en una placa que se colocó destapada dentro de un desecador que contenía una solución saturada de CH_3COOK , y se almacenó en una habitación con temperatura controlada a 20 °C durante 7 días (HR= 23 % aproximadamente).

Luego de su equilibración, 10 ± 1 mg de muestra se pesaron en celdas de aluminio de 40 μL de capacidad que se sellaron herméticamente y se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido (DSC 1, Star^e System, Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) utilizando una celda vacía como referencia. Las muestras primero se calentaron de 0 a 100 °C a una velocidad de 5 °C/min, luego

se enfriaron hasta 0 °C a 10 °C/min y finalmente se calentaron hasta 140 °C a 5 °C/min. La temperatura de transición vítrea inicial, así como la Tg media se determinaron utilizando el programa STAR^e Evaluation Software provisto con el equipo, en la segunda rampa de calentamiento, para eliminar la histéresis producida por la relajación térmica (Schuck et al., 2012).

3.3. Propiedades de rehidratación de las fórmulas infantiles en polvo

Se determinaron la humectabilidad, dispersabilidad e índice de solubilidad de las fórmulas infantiles en polvo. En los tres casos las condiciones de rehidratación (masa polvo/masa agua = 12,5/100 y temperatura del agua = 40 °C) se seleccionaron de manera de imitar las condiciones de reconstitución habituales para este producto.

3.3.1. Humectabilidad

La humectabilidad se determinó por el método GEA Niro No. A.5.a (GEA Niro, 2005b) con algunas modificaciones. Este método, por su principio, comprende tanto a la etapa de humectación como de hundimiento y no permite su diferenciación. Sin embargo, al resultado obtenido se lo conoce por convención como humectabilidad o tiempo de humectación.

Para la determinación, 100 mL de agua desionizada, previamente calentada a 40 °C en un baño de agua, se transfirieron a un vaso de bohemia de 600 mL (diámetro = 85 mm, altura = 120 mm), evitando humedecer las paredes internas del vaso por encima del nivel de agua. Luego, se colocó un embudo de material antiestático (diámetro externo = 95 mm, diámetro interno = 22 mm, largo = 80 mm) sobre el vaso y se cubrió el orificio del embudo con una mano de mortero de porcelana (largo = 130 mm). Se pesaron $12,50 \pm 0,05$ g de muestra en balanza granataria que se transfirieron al embudo, colocándola de forma tal que rodee la maja del mortero, como se observa en la Figura 4.4. Una vez dispuesta la muestra, se retiró la mano de mortero, dejando caer el polvo al agua, al tiempo que se inició el cronómetro. El cronómetro se detuvo cuando se dejó de observar polvo seco en la superficie del agua (ya sea porque las partículas se hundieron o porque se humedecieron). El tiempo registrado corresponde a la humectabilidad del polvo. El procedimiento se repitió hasta obtener como mínimo tres resultados que difieran en menos del 20 %. El resultado se expresó como el promedio de las tres réplicas \pm su desviación estándar, en s.



Figura 4.4. Imágenes de la determinación de humectabilidad.

3.3.2. Dispersabilidad

La dispersabilidad de las fórmulas modelo se determinó por el método GEA Niro No. A.6.a (GEA Niro, 2005c). Este método define la dispersabilidad del polvo en agua como su habilidad de desintegrarse en partículas que pasan a través de un filtro de 150 μm . Por lo tanto, a través de esta técnica se cuantifican tanto la etapa de dispersión como la de desagregación.

Se pesaron 100 g de agua desionizada precalentada a 40 °C en baño de agua en un vaso de bohemia de 250 mL. Se agregaron 12,5 g de muestra, a la vez que se inició el cronómetro. Durante 15 s se agitó enérgicamente con una varilla de vidrio de 15 cm de largo, dando exactamente 25 vueltas completas sobre el borde del vaso, en un sentido y en el opuesto. Al completarse los 15 s, el contenido del vaso se filtró a través de un tamiz de 150 μm y el filtrado se colectó en una botella de vidrio utilizando un embudo. La botella se almacenó en la heladera. Al día siguiente, se determinó el contenido de sólidos totales en el filtrado, por secado en estufa a 102 °C durante 4 h y luego hasta peso constante. Cada muestra se analizó por duplicado, y el contenido de ST del filtrado de cada duplicado se determinó por triplicado. La dispersabilidad se calculó de acuerdo con la Ecuación 4.3.

$$\text{Dispersabilidad (\%)} = \frac{(M+P) \times T}{P \times (100-w)} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Donde:

- M es la masa de agua en g (aprox. 100)
- T son los sólidos totales del filtrado en g/100 g
- w es el contenido de humedad de la muestra en polvo en g/100 g determinado según 3.2.1.1

Capítulo 4

- P es la toma de muestra en polvo en g (aprox. 12,5)

3.3.3. Índice de solubilidad

La solubilidad de las muestras se cuantificó por el método GEA Niro A.3.a (GEA Niro, 2006d). Para la determinación, 100 mL de agua destilada, precalentada a 40 °C en un baño de agua, se transfirieron a la jarra de la mezcladora para índice de solubilidad (Figura 4.5, Funke Gerber, Berlín, Alemania). Luego, se agregaron 2-3 gotas de silicona antiespumante y 12,5 g de muestra previamente pesada. Se mezcló por 90 s a 3800-4000 rpm y se dejó 15 min en reposo a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de agua y fórmula se agitó levemente con una espátula y se transfirió a dos tubos graduados de centrífuga de 50 mL. Los tubos se centrifugaron a 200×g a 25 °C por 5 min en una centrífuga SL 16R (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Se retiró el líquido sobrenadante hasta 5 mL por encima del sedimento, se agregó agua destilada hasta completar los 50 mL y se volvió a centrifugar a 200×g a 25 °C por 5 min. Una vez concluida la segunda etapa de centrifugación se leyó el volumen de sedimento y se calculó el índice de solubilidad, de acuerdo con la Ecuación 4.4.

$$\text{Índice de solubilidad (\%)} = 100 - \text{volumen de sedimento (mL)} \quad \text{Ecuación 4.4}$$



Figura 4.5. Mezcladora Funke Gerber para ensayo de índice de solubilidad.

3.3.4. Cinética de rehidratación por resonancia magnética nuclear de bajo campo (LF-NMR)

La cinética de rehidratación de las fórmulas modelo en polvo se monitoreó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de bajo campo ^1H (LF-NMR) utilizando un espectrómetro MQR Spectro-P (Oxford Instruments, Oxfordshire, Reino Unido) operando a 20 MHz por 1 h. Cada muestra se reconstituyó en agua destilada (12,5 %, p/p) en un tubo de NMR de 18 mm de diámetro y los datos se registraron cada 1 min, bajo agitación a 30 rpm, durante un total de 40 min. Los datos se analizaron utilizando la secuencia de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) a $25,0 \pm 1,0$ °C (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958). Los parámetros de CPMG se fijaron en: tiempo de repetición = 8 s; tiempo de desfase (τ) 400 μs y 1 scan. Se adquirieron datos de 8000 ecos con una ganancia del receptor de 5.0. Los tiempos de relajación transversal (T_{2n}) y las poblaciones relativas (M_n) de los diferentes componentes de relajación se obtuvieron utilizando un código *in-house* de MATLAB (versión R2019a, The MathWorks, Massachusetts, Estados Unidos), diseñado para el ajuste de curvas de relajación a una suma de decaimientos exponenciales, según la Ecuación 4.5.

$$I(t) = \sum_{n=1}^N M_n \times e^{-t/T_{2n}} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Donde: $I(t)$ corresponde a la intensidad de eco en función del tiempo, N es el número de componentes de relajación, T_{2n} es el tiempo de relajación transversal para el sitio n y M_n es la correspondiente abundancia del sitio n . Las medidas se realizaron por triplicado.

3.4. Propiedades de flujo de las fórmulas infantiles en polvo y densidad aparente

Las propiedades de flujo de las fórmulas en polvo se determinaron con un Powder Flow Tester (PFT) de Brookfield Engineering Laboratories Inc. (Massachusetts, Estados Unidos), conectado a una computadora provista del software Powder Flow Pro V1.2. El PFT cumple con el procedimiento de ensayo ASTM D6128 (ASTM International, 2016) utilizando las técnicas anulares y de cizalla de Jenike (1964). La función de flujo del polvo grafica la resistencia mecánica a la compresión (σ_c) versus el esfuerzo principal de consolidación (σ_1). Para las medidas de las funciones de flujo de las muestras se utilizó una tapa en forma de veleta. Los ensayos de función de flujo se llevaron a cabo utilizando la celda de cizallamiento de 38 cm^3 de volumen y ejecutando el programa de prueba de función de flujo estándar. Cada fórmula en polvo se cargó cuidadosamente en la celda de cizallamiento del equipo, mediante un procedimiento de tamizado, con el objetivo de compactarlas lo mínimo posible durante la preparación de muestra. El programa utilizado mide las propiedades de flujo en el rango de cinco esfuerzos principales de consolidación

en una progresión geométrica que genera valores de aproximadamente 1,6, 3,3, 6,9, 14,0 y 28,2 kPa.

La relación entre σ_1 y σ_c define el índice de factor de flujo (ffc) propuesto por Jenike (1964) (Ecuación 4.6). La fluidez de los polvos se clasificó según el ffc en: no fluye, $ffc < 1$; muy cohesivo, $1 < ffc < 2$; cohesivo, $2 < ffc < 4$; flujo fácil, $4 < ffc < 10$; y flujo libre, $10 < ffc$ (Schulze, 2008; Slettengren et al., 2016).

$$ffc = \frac{\sigma_1}{\sigma_c} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

Para la medida de la densidad aparente de las muestras, se utilizó una tapa de pared de fricción plana. La densidad aparente se midió utilizando la celda de cizallamiento de 38 cm³ y ejecutando el programa estándar de densidad aparente. Los resultados presentados corresponden a la densidad aparente suelta, es decir, sin someter a las muestras a ningún tipo de compactación.

Los valores de función de flujo y densidades aparentes presentados representan los promedios de tres medidas independientes. Todas las medidas se realizaron bajo condiciones ambiente de temperatura = 21 ± 1 °C y humedad relativa = $48,8 \pm 0,3$ %. Los ensayos se llevaron a cabo en RISE Research Institutes of Sweden (Gotemburgo, Suecia).

3.5. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA monofactoriales ($\alpha = 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas en todas las variables estudiadas entre las fórmulas obtenidas por las cuatro condiciones de producción (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C). Se utilizó el test de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95 % para detectar diferencias significativas entre muestras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), con un nivel de confianza de 95 % ($P < 0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1. Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades fisicoquímicas de las fórmulas infantiles modelo en polvo

4.1.1. Composición nutricional, contenido de grasa libre superficial y actividad de agua

La composición de las fórmulas modelo, su a_w y contenido de grasa libre superficial se presentan en la Tabla 4.1. Ninguno de estos parámetros varió significativamente ($P < 0,05$) entre las fórmulas obtenidas bajo las distintas condiciones de producción. El contenido de humedad fue inferior a 3 % y la a_w estuvo por debajo de 0,2 para todas las muestras, que son los valores recomendados para maximizar la estabilidad (Efstathiou et al., 2002; McSweeney, 2008).

Tabla 4.1. Composición nutricional, grasa libre superficial y actividad de agua (a_w) de las fórmulas infantiles modelo en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción.

Condición	Humedad (%, p/p)	Proteína ¹ (%, p/p)	Materia grasa (%, p/p)	Lactosa (%, p/p)	Oligosacáridos (%, p/p)	Cenizas (%, p/p)	Grasa libre superficial (%, p/p)	a_w
50%-75°C	0,85 ± 0,14	11,0 ± 0,19	25,8 ± 0,49	56,8 ± 1,34	3,85 ± 0,90	1,65 ± 0,01	1,36 ± 0,51	0,09 ± 0,00
50%-100°C	1,31 ± 0,66	11,3 ± 0,30	24,7 ± 3,11	57,0 ± 2,55	4,02 ± 0,24	1,65 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,11 ± 0,06
60%-75°C	0,88 ± 0,14	11,0 ± 0,01	28,5 ± 1,39	53,4 ± 1,34	4,56 ± 0,04	1,73 ± 0,06	0,62 ± 0,07	0,10 ± 0,03
60%-100°C	1,20 ± 0,16	11,4 ± 0,33	27,7 ± 0,42	54,0 ± 0,42	4,16 ± 0,49	1,61 ± 0,00	0,42 ± 0,19	0,13 ± 0,03

¹Proteína = Nitrógeno total × 6,25, según Comisión Europea (2016). Promedio ± desviación estándar de triplicados de análisis y duplicados de lotes de producción. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre condiciones de producción para ninguno de los parámetros.

Tabla 4.2. Cuadro comparativo de la composición nutricional de las fórmulas infantiles modelo obtenidas bajo distintas condiciones de producción y los requisitos de la Unión Europea.

Parámetro	Energía (kcal/100 mL)	Proteína ¹ (g/100 kcal)	Lípidos (g/100 kcal)	Carbohidratos (g/100 kcal)	Lactosa (g/100 kcal)	Oligosacáridos ² (g/100 mL)
Límites legales	60 – 70	1,5 – 2,8	4,4 – 6,0	9,0 – 14,0	> 4,5	< 0,8
50%-75°C	63,7 ± 0,0	2,2 ± 0,0	5,1 ± 0,1	11,2 ± 0,3		0,5 ± 0,1
50%-100°C	62,7 ± 2,3	2,3 ± 0,0	4,9 ± 0,4	11,4 ± 0,9		0,5 ± 0,0
60%-75°C	65,1 ± 0,9	2,1 ± 0,0	5,5 ± 0,2	10,2 ± 0,4		0,6 ± 0,0
60%-100°C	64,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	5,4 ± 0,1	10,5 ± 0,1		0,5 ± 0,1

¹Proteína = nitrógeno × 6,25. ²El reglamento establece el límite para “una combinación de 90 % de oligogalactosil-lactosa y 10 % de oligofructosil-sacarosa de elevado peso molecular”. Promedio ± desviación estándar de replicados de lotes de producción (n = 2). Los valores presentados para las fórmulas infantiles modelo se calcularon en base a fórmulas reconstituidas en una relación 12,5 g en 100 mL.

El Reglamento Delegado (UE) de la Comisión del 25 de setiembre de 2015 establece los requisitos de composición para los preparados para lactantes y de continuación, que rigen para la Unión Europea (Comisión Europea, 2016). Se seleccionó la normativa europea para la comparación, porque coincide con lo establecido por el Codex Alimentarius y el Código Alimentario Argentino (CAA) en los parámetros de energía total, lípidos y carbohidratos, pero exige un rango más acotado de proteína total (por lo tanto, cumpliendo la norma europea, se cumple con el Codex Alimentarius y el CAA) y establece un nivel máximo de oligosacáridos, que no está establecido en el Codex. En la Tabla 4.2 se presentan los límites establecidos para contenido de energía, proteína, lípidos, carbohidratos, lactosa y oligosacáridos aplicables a fórmulas infantiles (preparados para lactantes obtenidos a partir de leche de vaca) y su comparación con los valores obtenidos para las fórmulas elaboradas durante el presente estudio. Para los cálculos se consideró una reconstitución de las fórmulas en una relación 12,5 g/100 mL de agua y un aporte calórico de 4 kcal/g para proteínas y carbohidratos y 9 kcal/g para grasa. En el caso de los oligosacáridos, se consideró que su aporte calórico era 1,5 kcal/g (Madrigal & Sangronis, 2007). En las fórmulas infantiles modelo producidas, el contenido de carbohidratos coincide con el de lactosa porque ésta fue la única fuente de carbohidratos utilizada. Como se observa en la Tabla 4.2, todas las fórmulas elaboradas cumplieron los requisitos de la normativa europea.

El contenido de grasa libre superficial de las muestras varió entre 0,42 y 1,36 g/100 g (Tabla 4.1). Estos resultados son similares a los valores publicados para fórmulas infantiles comerciales (Hanley et al., 2011; Murphy et al., 2020). La muestra 50%-75°C presentó un valor más alto de grasa libre superficial en ambos lotes de producción ($1,00 \pm 0,08$ y $1,71 \pm 0,12$ g/100 g polvo). Sin embargo, la media no fue significativamente mayor ($P > 0,05$) que las obtenidas para las restantes muestras (Tabla 4.1), probablemente debido a la variabilidad entre lotes. El mismo resultado (diferencia no estadísticamente significativa) se obtuvo al expresar la grasa libre superficial como porcentaje de la materia grasa total (no se presentan los resultados). La grasa libre superficial es un parámetro de gran importancia para los polvos lácteos, que afecta negativamente su humectabilidad, propiedades de flujo y características organolépticas (Gaiani et al., 2010; Hanley et al., 2011; Kim et al., 2005). Su contenido está relacionado con la estabilidad de la emulsión en la mezcla húmeda, la temperatura de secado spray y el estado de la lactosa (Foerster et al., 2017; Gaiani et al., 2010; Saxena et al., 2020). Los resultados obtenidos en el Turbiscan mostraron que la fórmula 60%-75°C reconstituida presentaba la menor estabilidad de emulsión, sin embargo, esta menor estabilidad no estuvo asociada a un mayor contenido de grasa libre superficial en el polvo, sino a la floculación de las gotas de aceite.

4.1.2. Distribución de tamaño de partícula

Los resultados de DTP de las fórmulas infantiles en polvo se presentan en la Tabla 4.3 y Figura 4.6.

Tabla 4.3. Parámetros de distribución de tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo en polvo.

Condición	Distribución de tamaño de partícula			
	D[4,3] (µm)	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
50%-75°C	16,5 ± 2,29 ^a	4,90 ± 0,60 ^a	12,4 ± 1,81 ^a	33,6 ± 4,83 ^a
50%-100°C	29,5 ± 3,49 ^b	8,85 ± 2,67 ^{ab}	21,2 ± 2,24 ^b	57,7 ± 13,2 ^a
60%-75°C	55,5 ± 0,45 ^c	13,5 ± 0,57 ^c	38,9 ± 0,97 ^c	120 ± 0,47 ^b
60%-100°C	93,7 ± 2,72 ^d	22,1 ± 0,16 ^d	63,2 ± 0,17 ^d	214 ± 9,61 ^c

Promedio ± desviación estándar de réplicas de análisis y duplicados de lotes de producción. Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones.

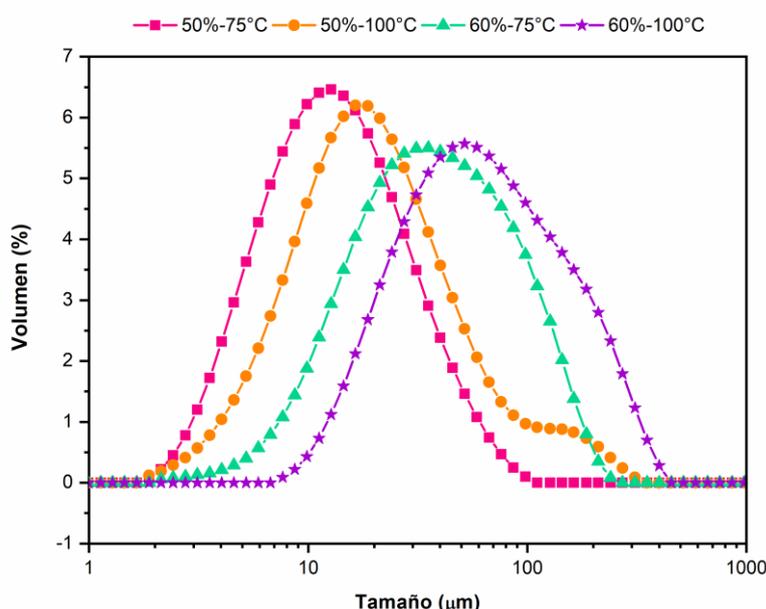


Figura 4.6. Distribución de tamaño de partícula de las fórmulas infantiles modelo en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).

Tanto el tratamiento térmico como los ST de la mezcla húmeda afectaron el tamaño de partícula de los polvos. La muestra 50%-75°C presentó el menor tamaño de partícula medio, seguido por 50%-100°C y 60%-75°C, mientras que 60%-100°C fue la condición que produjo polvos con mayor tamaño de partícula promedio. Las fórmulas infantiles obtenidas a partir de mezclas húmedas con 50 % ST presentaron las DTP más angostas (Figura 4.6). Las muestras pasteurizadas a 75 °C presentaron perfiles monomodales mientras que en las pasteurizadas a 100 °C se obtuvo un hombro a valores por encima de 100 µm.

El tamaño de partícula del polvo depende del tamaño de las gotas creadas durante la atomización en el secador spray, que a su vez está directamente relacionada con la viscosidad en la

alimentación del secador, para velocidades de alimentación y diseños de atomización constantes (Schuck, Méjean, et al., 2005). Esto fue verificado en el presente estudio, donde se obtuvo una correlación de Pearson positiva significativa ($r = 0,97$, $P = 0,00023$) entre la viscosidad de la mezcla húmeda en la alimentación del secador spray (post-homogeneización), que había sido analizada en el Capítulo 3 (Tabla 3.10), y el tamaño de partícula del polvo (Figura 4.7).

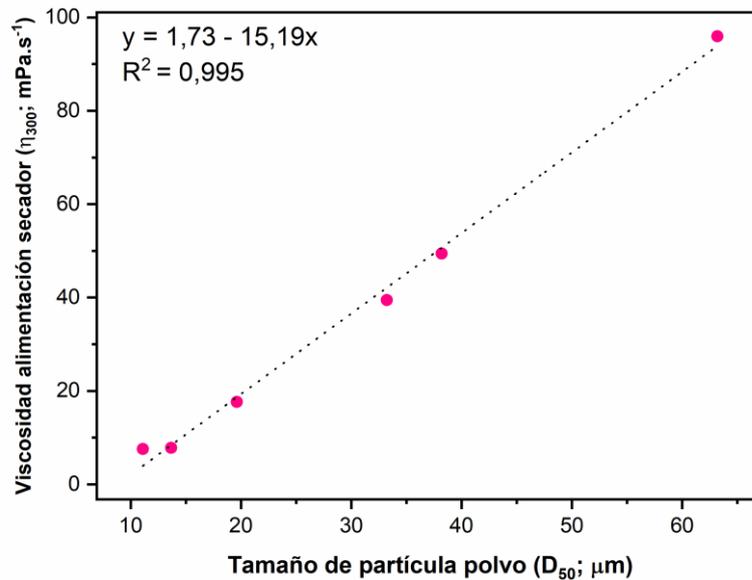


Figura 4.7. Relación entre la viscosidad aparente medida a 300 s^{-1} y 65 °C (η_{300}) de las mezclas húmedas en la alimentación del secador spray (post- homogeneización) y el tamaño de partícula de las fórmulas en polvo resultantes.

4.1.3. Color

Los parámetros instrumentales de color de las fórmulas en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Parámetros instrumentales de color de las fórmulas infantiles modelo en polvo.

Condición	Parámetros instrumentales de color		
	L*	a*	b*
50%-75°C	96,1 ± 1,72	-0,41 ± 0,43	4,68 ± 0,71
50%-100°C	96,1 ± 0,50	-0,78 ± 0,22	5,80 ± 0,70
60%-75°C	95,80 ± 0,44	-0,53 ± 0,06	7,05 ± 0,19
60%-100°C	94,23 ± 3,21	-1,14 ± 0,63	7,86 ± 1,74

Promedio ± desviación estándar de réplicas de análisis y duplicados de lotes de producción. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre fórmulas para ninguno de los tres parámetros evaluados.

No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los parámetros instrumentales de color, L*, a* y b* (Tabla 4.4). La diferencia en el tamaño de partícula de los polvos (Tabla 4.3) podría haberse traducido en diferencias en estos parámetros. A medida que el tamaño de partícula disminuye, el área superficial aumenta, permitiendo una mayor reflexión de luz (Ahmed et al., 2015). Sin embargo, el color aparente de las muestras no varió. Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo 3, las fórmulas infantiles precalentadas a 100 °C presentaron una concentración significativamente menor de lisina disponible (Tabla 3.11), lo que indica desarrollo de la reacción de Maillard, al menos en etapas tempranas. La formación de melanoidinas coloreadas con potencial de afectar el color de las fórmulas ocurre en etapas más avanzadas de la reacción de Maillard (O'Brien, 2009). Por lo tanto, era esperable que, en caso de haberse formado, las melanoidinas estuvieran presentes en las fórmulas infantiles precalentadas a 100 °C, donde el inicio del desarrollo de esta reacción fue detectado. La muestra 60% precalentada a 100 °C y con el mayor tamaño de partícula medio, no presentó un color significativamente distinto al resto de las muestras evaluadas (Tabla 4.4), lo que indicaría que las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard no se alcanzaron durante el procesamiento y que la diferencia de tamaño de partícula no fue suficiente como para alterar significativamente el color aparente de las fórmulas.

4.1.4. Microestructura

La diferencia en el tamaño de partícula de los polvos también fue evidente bajo el microscopio electrónico de barrido, que permitió estudiar la morfología superficial de las muestras (Figura 4.8). A pesar de que en las micrografías se observa un rango de tamaños de partículas, se distingue un orden en el tamaño medio de partícula: 60%-100°C > 60%-75°C > 50%-100°C > 50%-75°C, en coincidencia con los resultados obtenidos por difracción de luz láser (Tabla 4.3, Figura 4.6). El grado de aglomeración espontáneo de las partículas pareció aumentar con el tamaño de partícula medio, es decir, con la viscosidad de la mezcla húmeda. Drapala et al. (2017) obtuvieron resultados similares y explicaron que el aumento en la aglomeración indica interacciones cohesivas de las partículas durante el secado spray, que son mayores en mezclas húmedas con mayor viscosidad. Las muestras presentan una superficie homogénea e irregularidades y un interior poroso que se evidencia particularmente en las muestras obtenidas a 60%-100°C y, en

Capítulo 4

menor medida a 60%-75°C tal como se indica en la Figura 4.8. No se observaron cristales de lactosa en ninguna de las muestras.

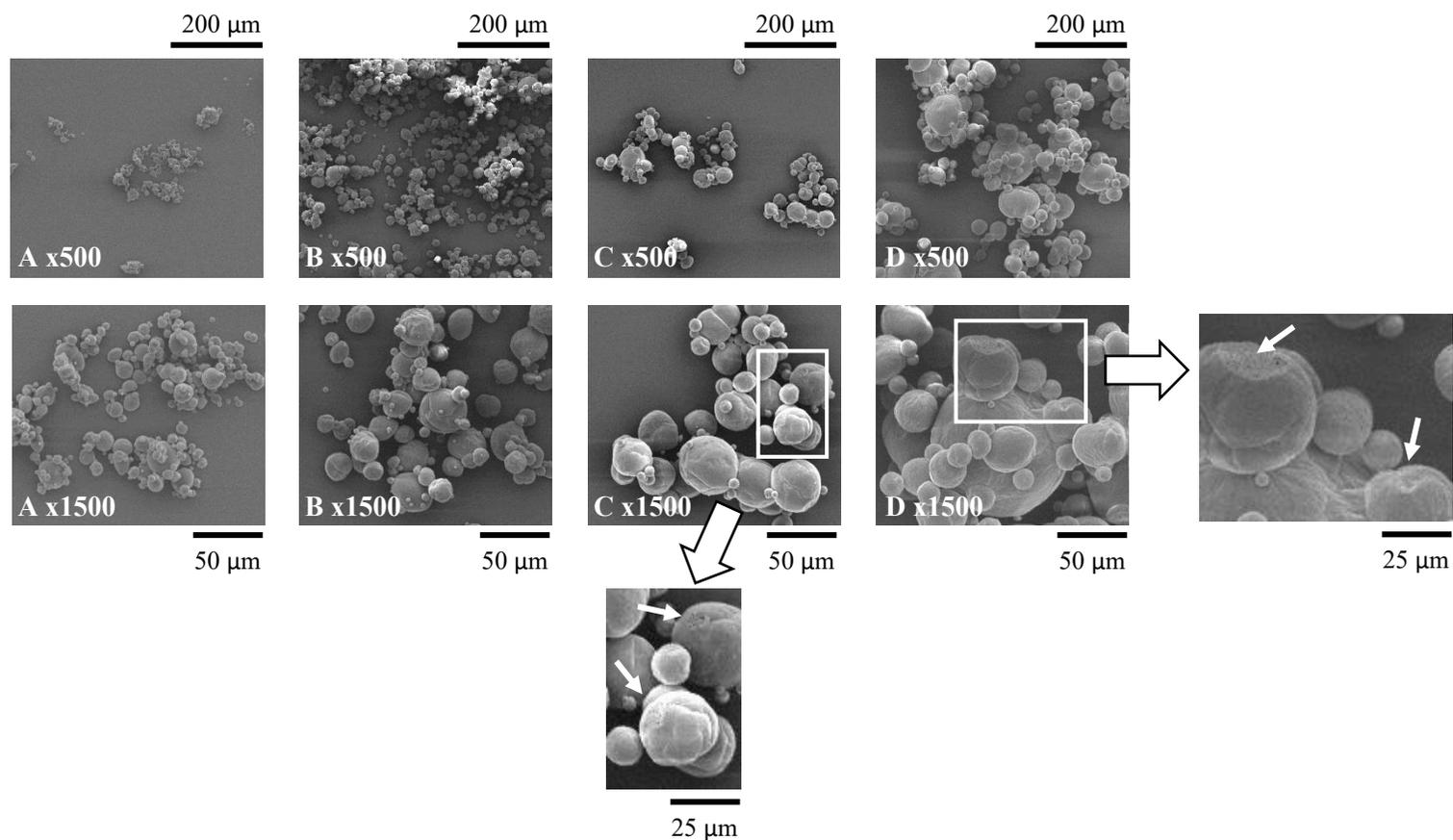


Figura 4.8. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (A: 50%-75°C, B: 50%-700°C, C: 60%-75°C, D: 60%-100°C) en dos niveles de magnificación: $\times 500$ y $\times 1500$.

Se aumentaron extractos de las figuras C $\times 1500$ y D $\times 1500$ y se utilizaron flechas blancas para indicar la presencia de poros.

Capítulo 4

4.1.5. Densidad

Los resultados de densidad de partícula y densidad aparente se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Densidad de partícula y densidad aparente de las fórmulas infantiles modelo en polvo.

Condición	Densidad (g/cm ³)	
	Partícula	Aparente
50%-75°C	1,24 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
50%-100°C	1,27 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,01 ^a
60%-75°C	1,24 ± 0,01 ^a	0,35 ± 0,03 ^b
60%-100°C	1,25 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,01 ^b

Promedio ± desviación estándar de réplicas de análisis y duplicados de lotes de producción. Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones.

La densidad de partícula se define como la masa de partículas que ocupan un volumen total de 1 cm³ y está vinculada a su composición química, a la densidad de cada uno de sus componentes y al aire ocluido en su interior (GEA Niro, 2006b; Schuck et al., 2012).

La densidad aparente es la masa de polvo dividida entre el volumen que ocupa en su estado natural, sin ningún tipo de compactación, y depende de la densidad de partícula y del aire intersticial (aire entre partículas). Esta propiedad está influenciada por las características de la mezcla húmeda y los parámetros de secado. La densidad aparente es una propiedad clave desde el punto de vista económico, tecnológico y comercial. Mayores densidades permiten empaquetar más producto en menos espacio, reduciendo costos de empaque, transporte y almacenamiento, además de favorecer su rehidratación (GEA Niro, 2006c; Schuck et al., 2012). A su vez, la densidad juega un rol muy importante en el caso particular de las fórmulas infantiles, porque la dosificación se realiza volumétricamente en condiciones domésticas y tiene una importante connotación nutricional.

La densidad de partícula de las fórmulas no varió significativamente ($P > 0,05$) entre las condiciones de producción (Tabla 4.5) y promedió entre 1,24 y 1,27 g/cm³ para todas las muestras. Estos valores fueron similares a los publicados por Hazlett et al. (2021b) para fórmulas infantiles. Por su parte, la densidad aparente varió significativamente ($P < 0,05$) con los ST en la mezcla húmeda, siendo mayor para las fórmulas producidas a partir de mezclas con 60 % ST (Tabla 4.5). Este resultado coincide con Schuck et al. (2012), que reportaron que la densidad aparente del polvo aumenta al incrementarse los ST en la alimentación del secador spray. A su vez, como se observa en la Figura 4.6, las fórmulas infantiles con 60 % ST produjeron polvos con distribuciones de tamaño de partícula más anchas. Esta heterogeneidad en el tamaño de partícula favorece su empaquetamiento aumentando la densidad (Schuck et al., 2012). Por el contrario, la presencia de espacios vacíos entre las partículas (aire intersticial) reduce la densidad aparente del polvo. En la Figura 4.9 se presentan imágenes de las muestras 50%-100°C y 60%-100°C durante la medición

de la densidad aparente, donde se puede observar la mayor presencia de espacios entre partículas en 50%-100°C, o un menor grado de empaquetamiento.

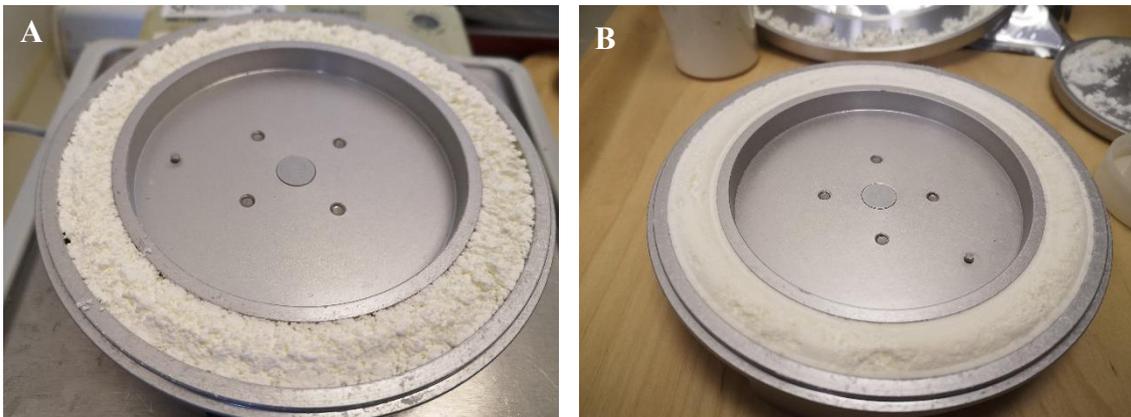


Figura 4.9. Imágenes de las muestras 50%-100°C (A) y 60%-100°C durante la determinación de densidad aparente.

4.1.6. Temperatura de transición vítrea

En la Figura 4.10 se presenta como ejemplo, uno de los termogramas obtenidos durante la determinación de la Tg por DSC. En la figura se puede observar el cambio en el calor específico durante la transición vítrea que se determinó en la segunda curva de calentamiento tal como se explicó en la sección Materiales y métodos (3.2.8) y se aprecia en la imagen. El termograma muestra también un pico exotérmico que corresponde a la cristalización de la lactosa.

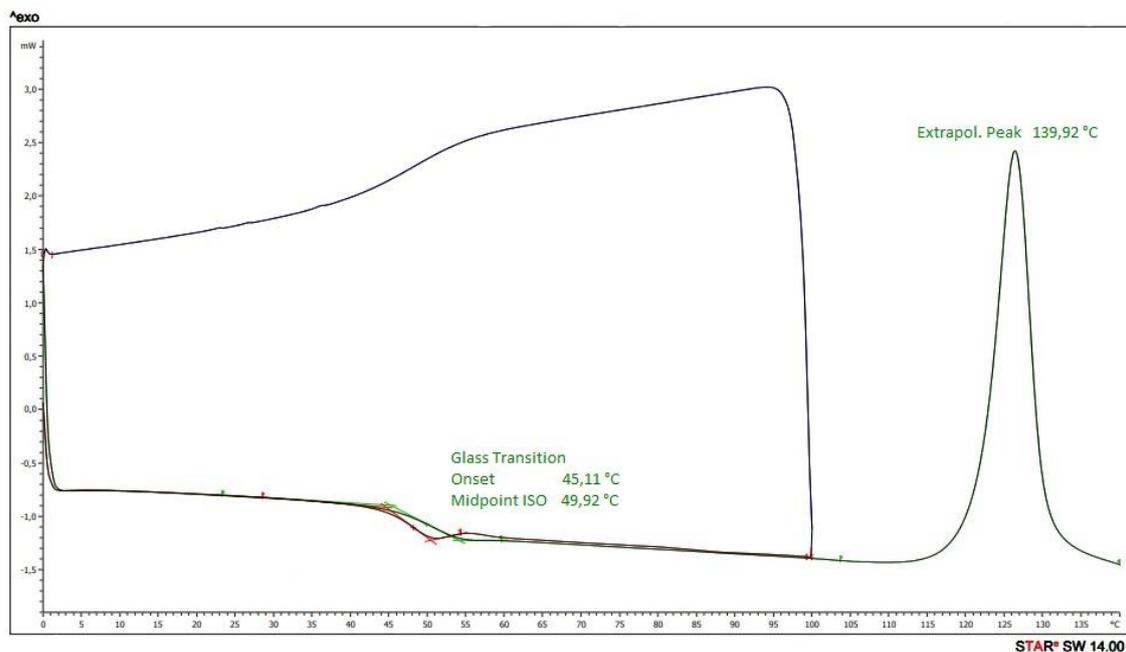


Figura 4.10. Ejemplo de termograma obtenido para la determinación de la temperatura de transición vítrea de las fórmulas infantiles en polvo.

Los resultados de Tg obtenidos para las fórmulas modelo en polvo, que se presentan en la Tabla 4.6, estuvieron dentro de los rangos publicados previamente para fórmulas infantiles en condiciones de a_w similares (Kelly et al., 2016; McCarthy et al., 2013). La muestra 50%-75°C presentó la menor Tg inicial, y no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las Tg iniciales de las restantes muestras, que presentaron valores entre 50,2 y 51,0 °C. Además, la Tg media de 50%-75°C fue significativamente menor ($P < 0,05$) que la de 50%-100°C.

Tabla 4.6. Temperatura de transición vítrea (Tg) de las fórmulas infantiles modelo en polvo.

Condición	Tg (°C)	
	Inicial	Media
50%-75°C	46,4 ± 1,36 ^a	51,0 ± 1,45 ^a
50%-100°C	50,9 ± 1,44 ^b	55,6 ± 1,05 ^b
60%-75°C	50,2 ± 1,12 ^b	54,4 ± 0,82 ^{ab}
60%-100°C	51,0 ± 0,16 ^b	55,0 ± 0,31 ^{ab}

Promedio ± desviación estándar de réplicas de análisis y duplicados de lotes de producción. Letras minúsculas distintas entre filas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones.

Las temperaturas de transición de sólidos lácteos y sus cambios fisicoquímicos asociados están usualmente más influenciados por los carbohidratos amorfos de bajo peso molecular que por los polisacáridos o proteínas, que tienen Tg más altas y son más estables (Hogan et al., 2010; Roos, 2002). Los valores de Tg obtenidos para las fórmulas modelo se explican principalmente por la transición de la lactosa, que representa más del 50 % (p/p) de los sólidos del polvo (Tabla 4.1). Cuando los polvos que contienen componentes amorfos, tales como la lactosa, se exponen a temperaturas por encima de su Tg, la movilidad molecular aumenta generando pegajosidad y apelmazamiento (Fitzpatrick et al., 2007). Por lo tanto, altas Tg son deseables para reducir riesgos durante el transporte o almacenamiento, donde pueden alcanzarse altas temperaturas. La muestra producida a partir de una mezcla húmeda con 50 % ST y pasteurizada a 75 °C presentó la menor Tg inicial (Tabla 3.15), aunque su Tg media no fue significativamente distinta ($P > 0,05$) a las de 60%-75°C y 60%-100°C. En consecuencia, puede inferirse que aumentar el nivel de ST de 50 a 60 % y/o aumentar la temperatura del tratamiento térmico de 75 a 100 °C, provocó un retraso significativo del inicio de la transición vítrea (aumento de Tg inicial). El mayor valor de Tg obtenido para las fórmulas pasteurizadas a 100 °C (50%-100°C y 60%-100°C) podría explicarse por la interacción entre moléculas de proteína y lactosa evidenciada por la disminución de lisina disponible descrita en el Capítulo 3 (Tabla 3.11) (Kelly et al., 2015). Estas interacciones pueden haber sido promovidas por la desnaturalización de proteínas ocurrida durante el calentamiento a 100 °C (Figura 3.6), según se determinó en el capítulo anterior. Por otro lado, en las fórmulas producidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST (60%-75°C y 60-100°C) la interacción entre

componentes podría ser atribuida a la mayor proximidad de las moléculas debida al aumento de los ST.

4.2. Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades de rehidratación de las fórmulas infantiles modelo en polvo

4.2.1. Humectabilidad

La fórmula 50%-75°C presentó un tiempo de humectación significativamente mayor ($P < 0,05$) que el resto de las muestras (Figura 4.11). Por lo tanto, la muestra 50%-75°C se clasificaría como “humectable” (humectabilidad < 60 s), mientras que los polvos 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C entrarían en la categoría de “muy humectables”, por tener una humectabilidad menor a 30 s (Schuck et al., 2012).

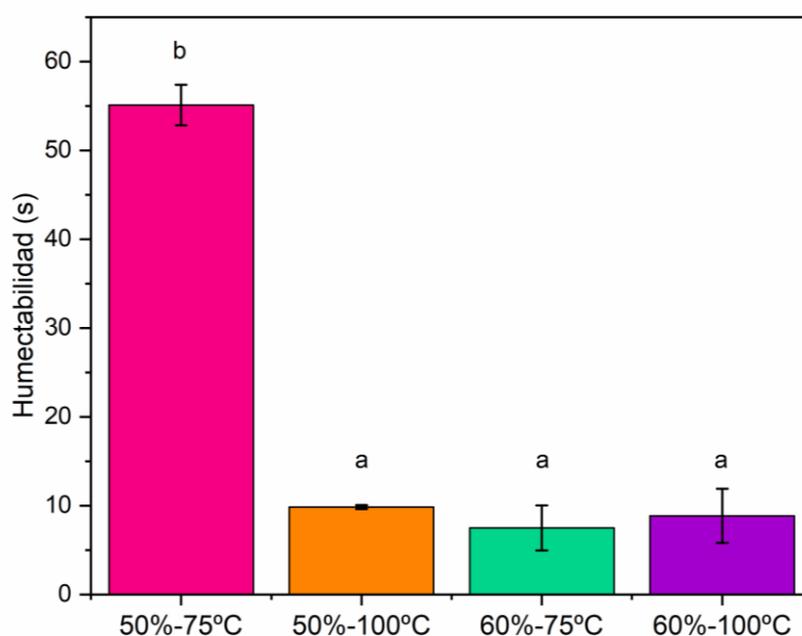


Figura 4.11. Humectabilidad de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s). Humectabilidades (o tiempos de humectación) más altas corresponden a muestras menos humectables. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre condiciones.

La humectabilidad es un parámetro que depende de múltiples factores. La fórmula con el mayor tiempo de humectación (“peor” humectabilidad) fue también la de menor tamaño de partícula (Tabla 4.3) y menor densidad aparente junto con 50%-100°C (Tabla 4.5). Los polvos con mayor concentración superficial de componentes hidrofóbicos, tales como los lípidos, presentan una pobre humectabilidad (Gaiani et al., 2010). En esta tesis, los polvos 50%-75°C también presentaron un mayor (aunque no estadísticamente significativo, $P = 0,0913$) contenido de grasa libre superficial (Tabla 4.1). Similarmente, los polvos con menor tamaño de partícula usualmente

presentan una peor humectabilidad que aquellos con partículas mayores, donde la relación superficie/volumen se reduce (Chever et al., 2017). Por último, una menor densidad aparente también contribuye al detrimento de la humectabilidad: a densidades más altas la hundibilidad de las partículas aumenta favoreciendo la rehidratación (Boiarkina & Young, 2019). En el Capítulo 3 se reportó que el grado de desnaturalización de las proteínas del suero en las fórmulas pasteurizadas a 75 °C fue, en promedio, aproximadamente 8 % independientemente del nivel de ST, mientras que las muestras precalentadas a 100 °C presentaron aproximadamente 82 % de desnaturalización (Figura 3.6). A pesar de que estudios previos han reportado que la presencia de proteínas desnaturalizadas puede disminuir la humectabilidad (Millqvist-Fureby et al., 2001), en el presente estudio y en línea con lo reportado por Gaiani et al. (2010), los polvos con los menores tiempos de humectación también presentaron el mayor nivel de desnaturalización. La humectabilidad de las muestras 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, que presentan mayor tamaño de partícula y más aglomeración (60%-100°C) (Figura 4.8) varió entre 7 y 10 s (Figura 4.11).

4.2.2. *Dispersabilidad*

En contraste con lo ocurrido con la humectabilidad, la fórmula 50%-75°C presentó una mayor dispersabilidad que las muestras obtenidas de mezclas húmedas con 60% ST (Figura 4.12), lo que indica que el menor tamaño de partícula no tuvo el mismo efecto negativo sobre la dispersabilidad que sobre la humectabilidad. Ji et al. (2016) explicaron que mientras la humectabilidad de los polvos lácteos puede mejorarse a través del aumento del tamaño de partícula por aglomeración, esto no ocurre con la dispersabilidad, que depende principalmente de la naturaleza de las partículas primarias. Las muestras 60%-75°C y 60%-100°C, que presentaron menor dispersabilidad que 50%-75°C, también tenían mayor densidad aparente (Tabla 4.5). Estos resultados coinciden con los resultados de Chever et al. (2017), que encontraron una correlación negativa tanto entre humectabilidad y dispersabilidad como entre dispersabilidad y densidad aparente, en polvos de mezclas de leche entera y azúcar.

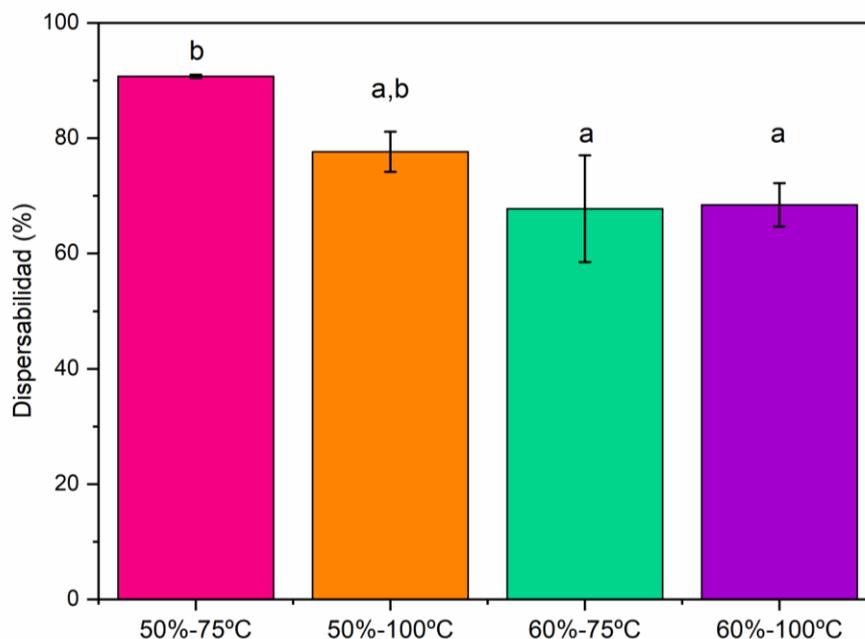


Figura 4.12. Dispersabilidad de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones.

4.2.3. Índice de solubilidad

No se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los índices de solubilidad de las fórmulas modelo. En todos los casos el índice de solubilidad fue mayor o igual 99,8 %, por lo que se puede concluir que las cuatro muestras presentaron buena rehidratación global. En el sector lácteo, un polvo se considera soluble si alcanza índices de solubilidad por encima de 99 % (Schuck et al., 2012).

4.2.4. Cinética de rehidratación por resonancia magnética nuclear de bajo campo (LF-NMR)

La resonancia magnética nuclear se basa en un fenómeno físico por el cual los núcleos atómicos con número impar de protones o neutrones (espín nuclear $I \neq 0$, no nulo) pueden absorber selectivamente energía, generalmente en el rango de la radiofrecuencia, al ser sometidos a la acción de un campo magnético. Una vez que los núcleos han absorbido la energía y cesa el aporte energético, éstos devuelven la energía absorbida para regresar a su situación de equilibrio termodinámico. Esta liberación energética induce una señal eléctrica en una antena receptora, a partir de la cual se puede obtener un espectro (García Álvarez, 2019).

Las fórmulas infantiles modelo en polvo se analizaron por LF-NMR, en base a la fuerza de unión del agua durante la rehidratación. En la Figura 4.13 se muestran los tiempos de relajación transversal (T_{21} y T_{22}) luego del ajuste bi-exponencial de las curvas CPMG. Durante la rehidratación se observaron dos poblaciones de protones, la fracción de agua ligada se caracterizó

por el tiempo de relajación transversal (T_{21}), mientras que el segundo componente de relajación (T_{22}) corresponde al agua libre.

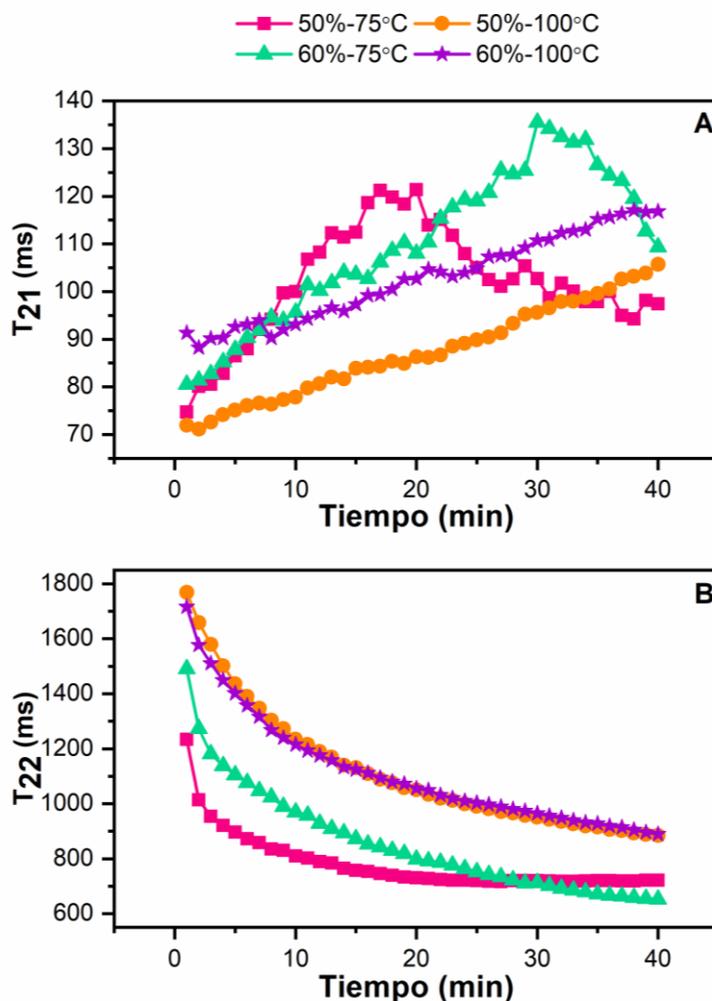


Figura 4.13. Tiempos de relajación (ms) de las fracciones de agua ligada (T_{21} , A) y agua libre (T_{22} , B) determinados por LF-NMR durante la rehidratación de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).

Durante la rehidratación de todas las muestras se observó un aumento de T_{21} (Figura 4.13A), mientras que el agua libre (T_{22}) disminuyó con el tiempo, lo que indica presencia de interacciones con las proteínas y demuestra la ocurrencia del proceso de rehidratación. El aumento de la temperatura de pasteurización de 75 a 100 °C disminuyó la velocidad de rehidratación de las fórmulas, que se representa en una caída más lenta del T_{22} (Figura 4.13B). El aumento más lento en el agua ligada (T_{21}) y la disminución más lenta en el agua libre (T_{22}) observada para las muestras con 50 % ST al aumentar la temperatura de 75 a 100 °C (Figura 4.13), no fue detectado

por los métodos tradicionales (Figuras 4.11 y 4.12). Una hipótesis para explicar este comportamiento sería que, mientras el mayor tamaño de partícula obtenido en 50%-100°C en comparación con 50%-75°C (Tabla 4.3, Figura 4.6) mejoró la humectabilidad (Figura 4.11), la presencia de proteínas desnaturalizadas, que se había determinado en el Capítulo 3 para 50%-100°C (Figura 3.6), afectó el proceso global de rehidratación. Este efecto de disminución de la velocidad de rehidratación con el aumento de la temperatura de tratamiento también se observó en las muestras producidas a partir de mezclas húmedas con 60 % de ST.

Asimismo, los ST de la mezcla húmeda afectaron la cinética de rehidratación. En las muestras pasteurizadas a 75 °C, incrementar el nivel de ST de 50 a 60 % aumentó el máximo valor alcanzado de T_{21} y disminuyó la velocidad de rehidratación, efecto que no fue evidente en las fórmulas precalentadas a 100 °C, donde la pendiente de las T_{21} de 50%-100°C y 60%-100°C fue muy similar durante el tiempo de ensayo. Esto podría explicarse por un efecto predominante de la desnaturalización y agregación proteica obtenida en las muestras tratadas térmicamente a 100 °C, que impidió la detección de diferencias vinculadas a los ST. Cabe recordar que en el capítulo anterior se observó que el tratamiento a 100 °C indujo la desnaturalización de las WP, que conlleva a una interacción con la κ -caseína, modificando su interacción con el agua. A su vez, se había determinado que en las muestras pasteurizadas a 100 °C se obtuvo una reducción del contenido de lisina disponible (Tabla 3.11), indicando una interacción con la lactosa. Todos estos factores podrían estar afectando la cinética de rehidratación.

En la Figura 4.13 puede observarse que aproximadamente luego de 20 y 30 min para 50%-75°C y 60%-75°C respectivamente, se obtuvo una caída en el nivel de agua ligada. Este resultado también puede asociarse al estado de las proteínas solas o a su interacción con otros componentes y/o a su distribución en el polvo deshidratado. Se podría interpretar que en las primeras etapas del proceso el agua interaccionaría con proteínas y lactosa hasta que comienza la solubilización del azúcar quedando solo el agua unida a la proteína que ya alcanzó su máxima hidratación. Este efecto no se detectó en los polvos precalentados a 100 °C que presentaron un alto grado de desnaturalización (Figura 3.6), al menos durante los 40 min que duró el ensayo.

4.3. Efecto del tratamiento y térmico y los sólidos totales en las propiedades de flujo de las fórmulas infantiles modelo en polvo

Al igual que en el caso de los fluidos plásticos, para que un polvo fluya la tensión de cizalla aplicada debe superar la tensión umbral. Sin embargo, en los polvos, a diferencia de lo que ocurre en los fluidos plásticos, la tensión umbral depende de las condiciones de consolidación a las que ha sido sometido el lecho de polvo y de la tensión normal que actúa sobre el plano de cizalla en el momento de inicio del flujo o rotura del lecho. Entonces, la caracterización de las propiedades de flujo de un polvo, a través de la función de flujo propuesta por Jenike (1964), se basa en

determinar la variación de la resistencia a la cizalla con la tensión normal, a una compacidad del lecho de polvo dada (Mallol Gasch, 2005).

La función de flujo es definida por Jenike (1964) como la variación de la resistencia mecánica a la compresión de un lecho de polvo (σ_c), libre de cualquier tensión, obtenido por compactación a una presión constante (σ_1). Aplicando distintas fuerzas de compresión (σ_1) a la muestra, se obtienen los pares de valores σ_1 , σ_c , que constituyen la función de flujo (Mallol Gasch, 2005; Schulze, 2008).

Las funciones de flujo de las fórmulas infantiles modelo se presentan en la Figura 4.14. La función de flujo representa la resistencia a la compresión mecánica de un polvo en función de los esfuerzos principales de consolidación. Una curva plana indica que el material fluye libremente mientras que una curva pronunciada indica mayores dificultades de flujo (Fitzpatrick et al., 2004).

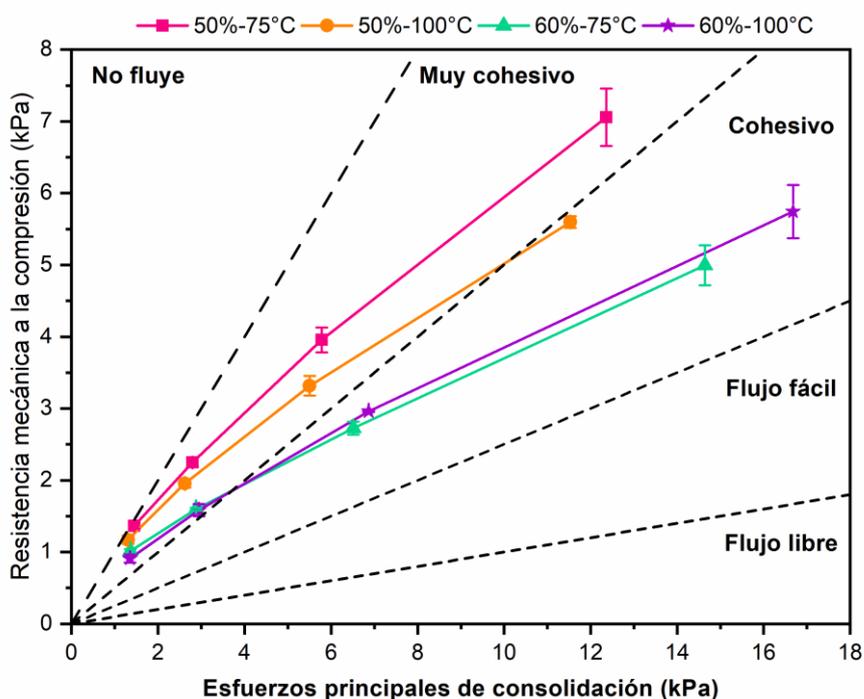


Figura 4.14. Funciones de flujo a diferentes esfuerzos principales de consolidación de las fórmulas infantiles modelo en polvo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción (sólidos totales = 50 o 60 %, pasteurización = 75 o 100 °C × 18 s).

Las fórmulas obtenidas a partir de mezclas húmedas con 50 % ST presentaron funciones de flujo en la zona de “muy cohesiva” (Figura 4.14). Aunque se observaron pequeñas diferencias entre las muestras 50 % ST pasteurizadas a 75 y 100 °C, ambas se encontraron en el área “muy cohesiva” bajo los distintos esfuerzos principales de consolidación aplicados. A bajos esfuerzos principales

de consolidación, todas las muestras se comportaron como “muy cohesivas”, mientras que, por encima del umbral de esfuerzo de 4 kPa, las muestras 60 % ST pasaron al área “cohesiva” de la curva, demostrando mejores propiedades de flujo que las muestras 50 % ST.

Las fórmulas 60%-75°C y 60%-100°C presentaron mayor tamaño de partícula (Tabla 4.3, Figura 4.6) y mayor densidad aparente (Tabla 4.5) que las fórmulas 50%-75°C y 50%-100°C. En general, el tamaño de partícula y las propiedades de flujo están correlacionadas: cuánto más fino es el polvo más cohesivo es su comportamiento (Xanthakis et al., 2015). Esta correlación parece coincidir con los resultados obtenidos para las muestras 50 % y 60 % ST. Para fluir, las partículas de polvo tienen que superar las interacciones superficiales entre ellas. A medida que el tamaño de partícula disminuye, el área de contacto superficial por unidad de masa de polvo aumenta y, por lo tanto, las fuerzas de van der Waals que atraen las partículas son mayores (Fitzpatrick, 2013). Además, la densidad aparente de los polvos puede ser un indicador de sus propiedades de flujo, dado que polvos más cohesivos presentan mayores fuerzas superficiales de atracción, de manera que las partículas pueden sostenerse alrededor de los espacios vacíos. Esto crea huecos de mayor tamaño dentro del lecho de polvo cuando éste es vertido por primera vez, produciendo un mayor volumen de vertido (o menor densidad aparente) (Fitzpatrick, 2013). Estas diferencias fueron evidentes durante el ensayo, como se observa en las imágenes de la Figura 4.9. Por otro lado, el tamaño de partícula de un polvo también se ha correlacionado con los puentes líquidos que se crean entre partículas desarrollando fuerzas de adhesión, que son mayores en polvos con partículas más pequeñas. (Schulze, 2008). Entonces, la mayor cohesividad en las muestras 50 % ST también podría vincularse a un mayor impacto de la adhesión creada por puentes líquidos de grasa libre superficial, debido al menor tamaño de partícula.

El tratamiento térmico no impactó la fluidez de los polvos obtenidos de mezclas húmedas con 60 % ST, mientras que se encontraron pequeñas diferencias entre las curvas de función de flujo de las muestras 50%-75°C y 50%-100°C (Figura 4.15). La fórmula 50%-75°C presentó una Tg inicial significativamente menor (Tabla 4.6) y un contenido de grasa libre superficial aparentemente mayor (aunque la diferencia no fue significativa, Tabla 4.1) que el resto de las muestras. Una mayor presencia de lípidos en la superficie de la partícula perjudica la fluidez del polvo al aumentar la pegajosidad de las partículas (Fournaise et al., 2020). A su vez, los polvos con menor Tg son más susceptibles a los cambios de temperatura y humedad relativa, que también provocan pegajosidad cuando la Tg se supera y la lactosa pasa del estado amorfo al cristalino.

A pesar de las diferencias obtenidas en las propiedades de flujo de los polvos, especialmente debidas al nivel de ST en la mezcla húmeda, todas las fórmulas tuvieron un comportamiento cohesivo o muy cohesivo, lo que significa que su fluidez es pobre. Los polvos cohesivos pueden crear estructuras durante su almacenamiento en tolvas (durante su empaque, por ejemplo), que pueden limitar o inhibir completamente el flujo y descarga desde silos y puede también afectar el transporte neumático en cañerías (Hazlett et al., 2021a).

5. Conclusiones

- En este capítulo se obtuvo información sobre el efecto de variables del proceso previas al secado spray, tales como los ST de la mezcla húmeda y la temperatura de pasteurización, sobre las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de fórmulas infantiles en polvo.
- Aumentar el nivel de ST en la mezcla húmeda de 50 a 60 % resultó en polvos con tamaño de partícula menos uniforme y mayor tamaño de partícula medio, densidad aparente y Tg inicial.
- El aumento de ST mejoró la funcionalidad de los polvos: las fórmulas infantiles obtenidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST presentaron mejor humectabilidad (menor tiempo de humectación) y mejor fluidez.
- Al aumentar la temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda de 75 a 100 °C, se obtuvieron polvos con mayor tamaño de partícula medio y Tg inicial.
- Los polvos pretratados a 100 °C, cuyas proteínas del suero se encontraban desnaturalizadas, presentaron una cinética de rehidratación más lenta que aquellos precalentados a 75 °C, según se determinó por LF-NMR.

CAPÍTULO 5:

Efecto de las condiciones de producción y almacenamiento en la estabilidad de fórmulas infantiles en polvo

1. Introducción

En los Capítulos 3 y 4 se analizaron las fórmulas infantiles modelo, obtenidas por el método *wet-mix*, variando el nivel de ST de la mezcla húmeda (50 o 60 %) y las condiciones de pasteurización (75 o 100 °C por 18 s), tanto a lo largo de la producción como en el producto final fresco (polvos recién producidos). Las fórmulas infantiles presentaron importantes diferencias en el grado de desnaturalización de proteínas del suero, propiedades fisicoquímicas (lisina disponible, DTP, densidad aparente, Tg), propiedades de rehidratación, estabilidad de la emulsión luego de la reconstitución y propiedades de flujo. Por otro lado, las fórmulas no se consumen inmediatamente, sino que pueden pasar varios meses entre que se producen, envasan y se consumen (almacenamiento, transporte, distribución, compra) y, luego de abiertas, pueden terminar de consumirse hasta en el plazo de un mes. Por lo tanto, es de interés estudiar si las diferencias debidas a las condiciones de producción de las fórmulas afectan su estabilidad durante el almacenamiento, tanto en el envase cerrado como después de abierto.

En la literatura existen varios reportes sobre los efectos del almacenamiento en las fórmulas infantiles. La mayoría de los trabajos publicados comparan la estabilidad durante el almacenamiento de fórmulas con variaciones en su composición química, como diferencias en la concentración de proteínas o lípidos, encontradas en las fórmulas destinadas a distintas edades (Cheng et al., 2017, 2019; Saxena et al., 2021b), con distinta relación lactosa/maltodextrina (Masum, Chandrapala, et al., 2020a) o con distinto grado de hidrólisis de las WP (Saxena et al., 2020). También a nivel de composición, se ha estudiado el efecto del almacenamiento sobre fórmulas infantiles con similar composición, pero obtenidas a partir de distintas fuentes de proteína (LDP, combinación de LDP y suero desmineralizado o combinación de LDP y WPC enriquecido en α -La (Tham et al., 2016, 2017). Por su parte, Masum, Chandrapala, et al., (2020b) almacenaron fórmulas en polvo obtenidas variando la combinación de temperaturas de entrada y salida de aire durante el secado spray (180-80 °C, 180-90 °C, 180-100 °C, 200-80 °C, 200-90 °C y 200-100 °C). Los autores concluyeron que los polvos secados a una temperatura de salida de aire de 100 °C mantenían una mayor estabilidad durante el almacenamiento debido a su menor contenido de humedad inicial. Sin embargo, no se encontraron reportes que comparen la estabilidad durante el almacenamiento de fórmulas obtenidas variando condiciones del proceso previas al secado spray.

2. Objetivos

Evaluar la estabilidad de fórmulas infantiles en polvo, obtenidas variando el nivel de sólidos totales y la temperatura de pasteurización de la mezcla húmeda, durante el almacenamiento imitando condiciones de envase cerrado y envase abierto, y estudiar el efecto de las variables de producción y almacenamiento sobre la digestibilidad de las fórmulas.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Las fórmulas utilizadas para el estudio de almacenamiento (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C) fueron las producidas en las condiciones descriptas en el Capítulo 3 (3.2). Las distintas fórmulas, que habían sido envasadas bajo vacío en bolsas multicapa, se almacenaron congeladas a – 20 °C hasta el momento de la realización del estudio de almacenamiento. De cada fórmula se utilizó un lote de producción para el ensayo de almacenamiento, considerando que la composición no varió significativamente entre lotes (Tabla 4.1, Capítulo 4). La composición nutricional de los lotes seleccionados, de acuerdo con los análisis realizados al momento de la producción (Capítulo 4), se presenta en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Composición nutricional de las fórmulas infantiles utilizadas para el ensayo de almacenamiento.

Condición	Humedad (%, p/p)	Proteína ¹ (%, p/p)	Materia grasa (%, p/p)	Lactosa (%, p/p)	Oligosa- cáridos (%, p/p) ²	Cenizas (%, p/p)
50%-75°C	0,75 ± 0,16	11,5 ± 0,4	25,5 ± 1,0	57,8 ± 8,7	2,8	1,65 ± 0,01
50%-100°C	0,84 ± 0,01	10,9 ± 0,1	26,9 ± 1,1	55,2 ± 8,3	4,4	1,67 ± 0,00
60%-75°C	0,78 ± 0,03	11,6 ± 0,1	29,5 ± 1,2	52,4 ± 7,9	3,9	1,77 ± 0,01
60%-100°C	1,08 ± 0,05	11,1 ± 0,0	28,0 ± 1,1	53,7 ± 8,1	4,5	1,61 ± 0,01

Promedio ± desviación estándar de triplicados de análisis. ¹Proteína = Nitrógeno total × 6,25, según Comisión Europea (2016). ²Calculado por diferencia.

3.2. Condiciones de almacenamiento

3.2.1. Condiciones de almacenamiento

El estudio se realizó bajo dos condiciones de almacenamiento distintas. En la primera condición, se pretendió imitar las condiciones a las que estarían sometidas las fórmulas en el envase cerrado (condiciones de estantería). Para eso, se decidió envasar las muestras en bolsa multicapa (envase impermeable y al abrigo de la luz) a 25 °C, durante 12 semanas.

En la segunda condición, se pretendió imitar las condiciones que podrían alcanzar las fórmulas una vez abiertas. Considerando que la humedad relativa media anual en Uruguay y Argentina (provincia de Buenos Aires) oscila entre 70 y 75 % (Severova, 1997) y que la lata suele abrirse varias veces por día para alimentar al lactante, se decidió realizar un almacenamiento a 58 % HR y 25 °C, durante 28 días.

3.2.2. Preparación de las muestras

Las cuatro fórmulas (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C), se mantuvieron a – 20 °C hasta el momento de la preparación de muestras para el ensayo de almacenamiento. Antes del fraccionamiento las muestras se descongelaron lentamente. Para eso, en primera instancia se

pasaron de cámara de congelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a cámara de enfriamiento ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), se mantuvieron allí por 24 horas, y luego se pasaron de la cámara de enfriamiento a una cámara a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Una vez cumplidas las 24 horas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, las bolsas multicapa conteniendo las fórmulas envasadas se abrieron, se homogeneizaron y se fraccionaron para su almacenamiento en ambas condiciones, como se describe a continuación, y se analizaron para establecer su condición inicial (tiempo 0).

3.2.2.1. Muestras para almacenamiento en condiciones de estantería

De cada fórmula se pesaron por duplicado 20 g que se envasaron en bolsas multicapa termoselladas (total = 8 bolsas). Por lo tanto, se obtuvieron dos unidades experimentales independientes de cada una de las fórmulas. Las bolsas se almacenaron en una cámara a $24,3 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 semanas. Todos los análisis se realizaron en el día en el que fueron retiradas de la cámara de almacenamiento, a no ser que se indique lo contrario.

3.2.2.2. Muestras para almacenamiento en condiciones de alta humedad

Cada una de las cuatro fórmulas se fraccionó en subunidades de 5 g, en placas de Petri destapadas de 5,5 cm de diámetro y 1,5 cm de altura. Las muestras se colocaron en las placas de forma de obtener una capa fina expuesta al ambiente. La mitad del total de placas de Petri de cada una de las fórmulas se seleccionó aleatoriamente y se dispuso, también aleatoriamente, en un desecador conteniendo una solución saturada de bromuro de sodio, de forma de obtener una HR ambiente dentro del desecador, de 58 %, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rockland, 1960). Las placas restantes se dispusieron aleatoriamente en otro desecador igual conteniendo el mismo volumen de la misma solución de bromuro de sodio. Por lo tanto, se obtuvieron dos unidades experimentales independientes. Los desecadores se colocaron en una cámara a $24,3 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por un total de 28 días. Cada 7 días, se retiraron, de cada uno de los desecadores, 5 placas de Petri de cada muestra, para su análisis. Todos los análisis fueron realizados en todos los tiempos (7, 14, 21 y 28 días) y en el día correspondiente, a no ser que se indique lo contrario.



Figura 5.1. Muestra 50%-100°C fraccionada, previo a su almacenamiento.



Figura 5.2. Cámara de almacenamiento a 25 °C, conteniendo las bolsas con muestra para almacenamiento en condiciones herméticas y los desecadores para almacenamiento a 58 % HR.

3.3. Propiedades fisicoquímicas

3.3.1. Actividad de agua

La a_w de las muestras se midió a 25 °C en un equipo Aqualab 47EV (Decagon Devices Inc., California, Estados Unidos) calibrado con LiCl 13,41 M.

3.3.2. *Humedad*

La humedad de las fórmulas en polvo se determinó gravimétricamente por secado en estufa a 102 °C hasta peso constante (menos de 0,0010 g de diferencia entre dos pesadas consecutivas), según el método GEA Niro No. A1a (GEA Niro, 2006a). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

3.3.3. *Temperatura de transición vítrea y temperatura de cristalización*

La temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de cristalización (T_{cr}) se determinaron por calorimetría diferencial de barrido por triplicado, en todas las muestras a lo largo de su almacenamiento. El principio del método fue explicado en el Capítulo 4 (3.2.8).

Para la determinación, se pesaron 8-12 mg de muestra en cápsulas de aluminio, que se sellaron herméticamente. Cada cápsula con muestra se sometió a la siguiente rampa de temperatura: 0-100 °C a 10 °C/min, 100-0 °C a 5 °C/min y 0-160 °C a 5 °C/min, en un DSC (Q2000, TA Instruments, Delaware, Estados Unidos), calibrado con indio, utilizando una cápsula vacía como referencia. Las muestras se escanearon dos veces para eliminar la histéresis de la relajación térmica típica de la transición vítrea (Schuck, Blanchard, et al., 2005). De los termogramas se obtuvo información sobre la transición vítrea y cristalización en las muestras en cada punto de almacenamiento, como se indica en la Figura 5.3.

Las T_g inicial, media y final se determinaron como se explicó en el inciso 3.2.8 del Capítulo 4. Además, se determinó la diferencia de capacidad calorífica (ΔC_p) en la transición vítrea como la diferencia de C_p entre la T_g inicial y final y se expresó en W/g lactosa, considerando la concentración de lactosa en cada fórmula a cada punto de almacenamiento.

La cristalización de la lactosa se observa en el termograma como un pico exotérmico. La temperatura de cristalización inicial (T_{cr} inicial) corresponde a la temperatura a la que comienza el pico exotérmico y la temperatura de cristalización (T_{cr}) al máximo del pico. Además, se calculó la entalpía de cristalización (ΔH_{cr}) como el área bajo el pico y se expresó en J/g lactosa. Las determinaciones se realizaron utilizando el software TA Universal Analysis 2000 Versión 4.5.A (TA Instruments, Delaware, Estados Unidos). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

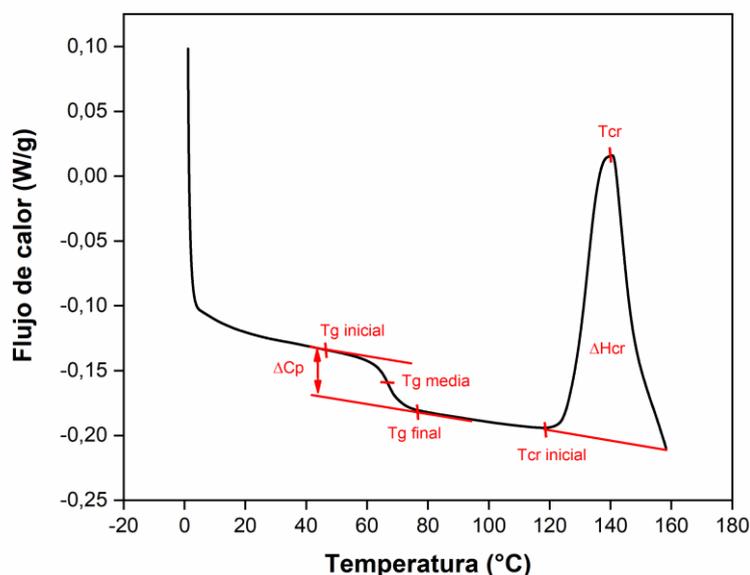


Figura 5.3. Ejemplo de termograma indicando cómo se determinan las temperaturas de transición vítrea (Tg) inicial, media y final, así como la diferencia de capacidad calorífica asociada (ΔC_p) y las temperaturas de cristalización (Tcr) y el cambio de entalpía asociado (ΔH_{cr}).

3.3.4. Cristalinidad por difracción de rayos X

La cristalinidad de las fórmulas modelo se determinó por difracción de rayos X (DRX) en el Laboratorio de Cristalografía, Química del Estado Sólido y Materiales (Cryssmat-Lab)/DETEMA de la Facultad de Química de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay). Los polvos se analizaron al tiempo 0, luego de 7, 14 y 28 días de almacenamiento a alta HR y luego de 12 semanas de almacenamiento hermético.

La DRX es una técnica no destructiva que permite la caracterización estructural de materiales que presentan cierto grado de cristalinidad. Cuando un haz de rayos X penetra un cristal, la difracción se asimila a un proceso de reflexión, en el que el rayo incidente es reflejado por los planos atómicos paralelos (Figura 5.4). Para que la intensidad de la difracción sea medible, la reflexión de estos planos individuales debe estar en fase. Así, la DRX se base en la Ley de Bragg (Ecuación 5.1), que establece una relación entre el ángulo de incidencia de la radiación (θ), su longitud de onda (λ) y la distancia entre planos cristalinos (d), siendo “ n ” un número entero (Unruh & Forbes, 2019).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Ecuación 5.1}$$

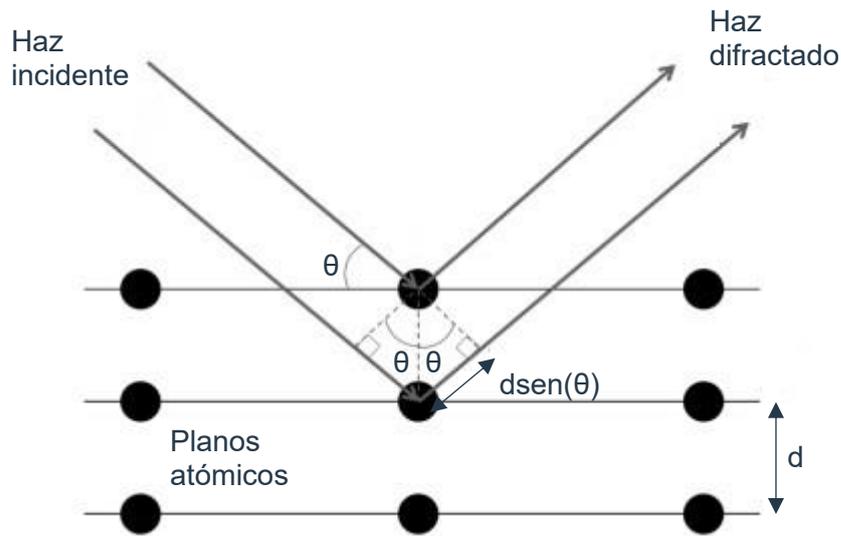


Figura 5.4. Esquema de la difracción de rayos X incidentes sobre planos atómicos paralelos de un sólido cristalino (adaptada de: Unruh & Forbes (2019)).

Los equipos de difracción de rayos X de polvos modernos convencionales constan de tres componentes principales: una fuente de rayos X, un portamuestras y un detector (Figura 5.5) y operan con radiación $\text{CuK}\alpha$ con geometría de reflexión, denominada Bragg-Brentano. Los rayos X son emitidos por la fuente y atraviesan una rendija de salida, que define el ángulo de divergencia, y alcanzan la muestra que se posiciona horizontalmente. Los rayos X difractados son emitidos por la muestra en forma convergente hacia una línea donde se ubican la rendija de recepción y el detector. La fuente y el receptor rotan coordinadamente manteniendo cada uno un ángulo θ respecto a la muestra (Igoa Saldaña, 2021)..

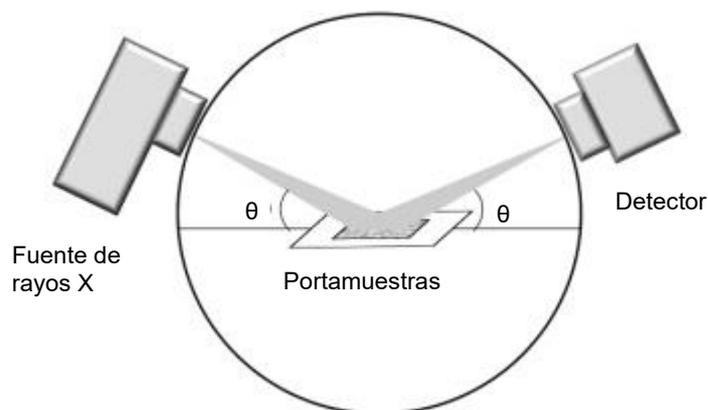


Figura 5.5. Representación esquemática de los componentes de un difractómetro de rayos X de polvos (adaptada de: Unruh & Forbes (2019)).

Cada material tiene una estructura cristalina diferente y, por lo tanto, cada patrón de rayos X es único y característico. La información sobre la posición, intensidad y perfil de los picos aportada por los difractogramas permite la identificación, caracterización y cuantificación de estructuras cristalinas en las muestras.

Cada fórmula modelo se pesó exactamente (0,66 g aprox.), se molió en mortero de ágata y se mezcló con 0,025 g aprox. de L-valina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) (Figura 5.6A). La L-valina se seleccionó como patrón interno por proporcionar picos de difracción intensos en posiciones que no se superponen con los picos característicos de la lactosa. Cabe señalar que, si bien la mezcla de la muestra con un patrón interno con las características mencionadas es deseable para mejorar la precisión del análisis y la cuantificación de la cristalización, en función de los resultados obtenidos (4.1.3), se optó por realizar un análisis cualitativo. La mezcla homogénea de muestra y patrón se montó, compactó y enrasó en un portamuestras de 20×20 mm y 0,3 mm de profundidad (Figura 5.6B), que se colocó horizontalmente en un difractómetro de polvos Rigaku ULTIMA IV (Tokio, Japón) (Figura 5.6C). El difractómetro utilizado opera con un tubo sellado de rayos X de ánodo de Cu a 40 kv/30 mA, cuya emisión es filtrada con un monocromador curvo de Ge en el haz difractado, lo que provee la radiación característica del doblete Cu- $K\alpha_{1-2}$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente con una configuración θ - θ Bragg-Brentano. La colección de datos para la obtención de los difractogramas se realizó en el rango 5 – 80° en 2θ , con pasos de 0,02°, a una velocidad de 30 s/paso.

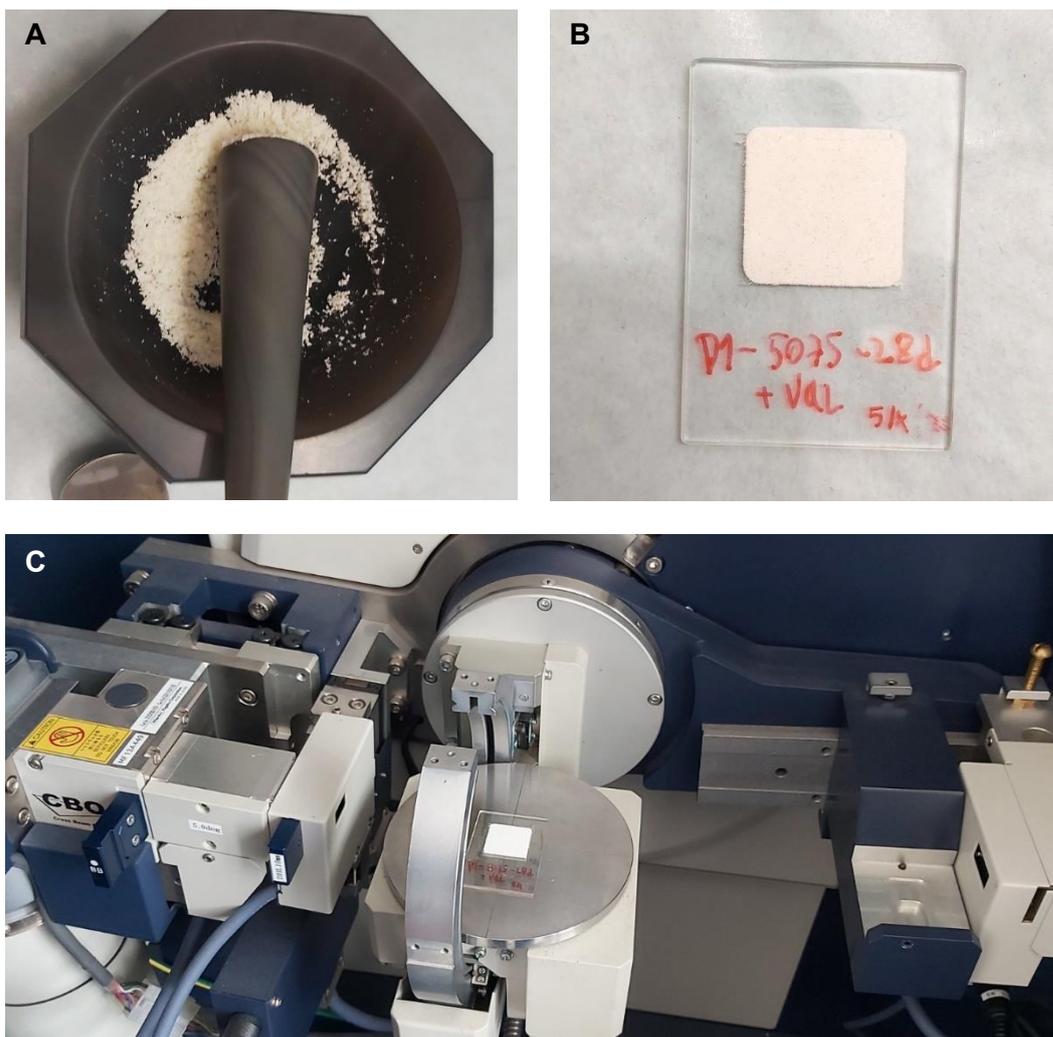


Figura 5.6. Preparación de la muestra (A), compactación en el portamuestras (B) y ubicación en el equipo de Difracción de Rayos de X (C).

3.3.5. Grasa libre superficial

El contenido de grasa libre superficial (GLS) en las muestras a lo largo del almacenamiento se determinó por triplicado, por el método descrito por Kim et al. (2009a) con pequeñas modificaciones. El principio del método se basa en que la grasa libre ubicada en la superficie de una partícula de polvo se disuelve rápidamente por una breve exposición a un solvente orgánico. Se optó por un método de análisis distinto al utilizado en el Capítulo 4 (3.2.3) debido a la limitante en la cantidad de muestra disponible en cada tiempo de almacenamiento.

Para la determinación, se colocó un papel de filtro MN 617 (Macherey-Nagel, Alemania), equivalente a Whatman N°4, sobre un embudo posicionado sobre un matraz Erlenmeyer de 50 mL previamente identificado y pesado en balanza analítica. Se pesó 1 g de muestra en balanza analítica, que se colocó sobre el papel de filtro. El polvo se lavó con cuatro porciones de 50 mL de éter de petróleo 30-65°. Se retiró el embudo con el papel y se dejaron los embudos bajo

campana de extracción hasta evaporar el exceso de solvente. Luego, los matraces se llevaron a estufa a 50 °C durante 1 hora. Una vez retirados de la estufa, se dejaron alcanzar temperatura ambiente y se pesaron en balanza analítica. El contenido de GLS, expresado en g por 100 g de materia grasa total se calculó según la Ecuación 5.2.

$$GLS \text{ (g/100 g grasa total)} = \frac{(P_{M+G} - P_M)}{Toma \times \frac{MG_{total}}{100}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2}$$

Donde:

- P_M es el peso del matraz Erlenmeyer vacío (g)
- P_{M+G} es el peso del matraz Erlenmeyer conteniendo la grasa extraída (g)
- $Toma$ es la cantidad de muestra pesada para el ensayo (~1 g).
- MG_{total} es el contenido de materia grasa total en la muestra, expresado en g/100g, y calculado de acuerdo con la Ecuación 5.3.

$$MG_{total} = \frac{MG_{fresca} \times (100 - H_{muestra})}{(100 - H_{fresca})} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Donde:

MG_{fresca} es la concentración de materia grasa total en base húmeda, en la muestra recién producida, presentado en la Tabla 5.1, expresado en g/100 g.

H_{fresca} es la concentración de humedad, en la muestra recién producida, presentado en la Tabla 5.1, expresado en g/100 g.

$H_{muestra}$ es la concentración de humedad, en la muestra analizada, determinado según 3.3.2, expresado en g/100 g.

3.3.6. Microscopía confocal de barrido láser

Además de cuantificar la GLS (3.3.5), su presencia determinó cualitativamente por microscopía confocal de barrido láser (CLSM). Esta técnica se basa en la aplicación de un láser a una determinada longitud de onda que hace que las moléculas excitadas emitan fluorescencia (ya sea autofluorescencia o fluorescencia asociada a fluorocromos artificiales) a una longitud de onda superior a la aplicada. Además, la luz fluorescente procedente de los planos fuera de foco se elimina, lo que aumenta la nitidez de la imagen. La utilización de un láser como fuente de luz permite iluminar muy intensamente una región muy pequeña de la muestra, y mediante un sistema de barrido punto por punto se obtienen imágenes de diferentes planos focales lo que permite realizar un análisis tridimensional (Centro Científico Tecnológico Rosario, s.f.; Sampedro et al., 1995).

Las observaciones se realizaron sobre las cuatro fórmulas en polvo (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C) antes del almacenamiento (tiempo 0) y al final del almacenamiento a alta HR (28 días) y en condiciones herméticas (12 semanas), en la Unidad de Bioimagenología Avanzada del Institut Pasteur de Montevideo (Uruguay).

Para la preparación de las muestras, se distribuyeron algunos mg de polvo sobre el portaobjetos y se agregaron 10 µL de una mezcla de 0,1 g/L Rojo Nilo (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en propilenglicol y 0,01 g/L Fast Green FCF (Biopack, Argentina) en agua destilada, que se utilizaron para marcar grasas y proteínas, respectivamente. Luego, se colocó el cubreobjetos y se dejó reposar durante 5 minutos antes de observarlas en un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Oberkochen, Alemania) utilizando lentes objetivo 10×, 20× y 63×. Para el Rojo Nilo la longitud de onda de excitación fue 488 nm y la emisión se colectó entre 500 y 600 nm, mientras que para el Fast Green la longitud de onda de excitación fue 633 nm y la emisión entre 655 y 755 nm. Para el canal de luz transmitida se utilizó un detector ESID. El software de adquisición utilizado fue el Zen blue v.2.5 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y para el análisis de las imágenes se utilizó el software Fiji (Schindelin et al., 2012). Cada micrografía presentada está compuesta por un mosaico de 25 imágenes de la muestra.

3.3.7. Color

Los parámetros instrumentales de color L^* , a^* y b^* se midieron con un colorímetro LabScan® XE (HunterLab, Virginia, Estados Unidos). De cada muestra y tiempo de almacenamiento, se midió el color de la muestra en dos placas de Petri (en el caso de las muestras almacenadas a 58 % HR se tomaron directamente dos placas y en el caso del tiempo 0 y las muestras almacenadas en condiciones herméticas se transfirieron 5 g de muestra a dos placas). En cada placa se tomaron medidas en tres zonas de la placa. A partir de los parámetros L^* , a^* y b^* se calculó el parámetro índice de pardeamiento (IP) de acuerdo con la Ecuación 5.4 (Maskan, 2001).

$$IP = \frac{100 \times \left(\frac{a^* + 1,75L^*}{5,472 + a^* - 3,012b^*} - 0,31 \right)}{0,17} \quad \text{Ecuación 5.4}$$

3.3.8. Evaluación visual de las características físicas macroscópicas

Todas las muestras (inicial, durante el almacenamiento a 58 % HR y luego del almacenamiento en bolsa hermética) se examinaron para evaluar la presencia de *caking* o apelmazamiento. Las muestras almacenadas a alta HR se evaluaron dentro de las placas de Petri donde se almacenaron, y las muestras a tiempo 0 y luego del almacenamiento en bolsa hermética también se transfirieron a placa de Petri para su evaluación.

Las fórmulas se observaron y se presionaron suavemente con una espátula para examinar su apariencia y características físicas. Las placas se taparon y movieron y giraron suavemente para evaluar la fluidez de los polvos.

3.4. Microestructura

La morfología superficial de las partículas de polvo se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM), en todas las muestras al tiempo 0, luego de 7, 14 y 28 días de almacenamiento a alta HR, y luego de 12 semanas de almacenamiento en condiciones herméticas. Las muestras de polvo se metalizaron con oro durante 120 s a 30 mA y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-5900LC (JEOL USA, Inc., Massachusetts, Estados Unidos).

3.5. Solubilidad

La solubilidad de las muestras se determinó por la adaptación del método GEA Niro No. A3a (GEA Niro, 2006d) propuesta por Saxena et al. (2021b), con algunas modificaciones.

Diez mL de agua destilada precalentada a 40 °C se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL de capacidad, previamente pesado. Se agregó 1 g de muestra y se agitó vigorosamente en vortex durante 90 s. Luego, los tubos se dejaron en reposo durante 15 min antes de centrifugarlos durante 10 min a 1280×g y 20 °C en una centrífuga SIGMA 6-16KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania). Con una pipeta se retiró el líquido del tubo (incluyendo la fase oleosa), dejando únicamente el precipitado. Los tubos se dejaron destapados dentro de un desecador conteniendo sílica gel durante toda la noche, para remover el agua remanente y al otro día se pesaron. La solubilidad de todas las muestras a lo largo del almacenamiento se determinó por triplicado y se calculó según la Ecuación 5.5.

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left(1 - \frac{P_{T+R} - P_T}{Toma \times \frac{100-H}{100}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Donde:

- P_T es el peso del tubo Falcon vacío (g)
- P_{T+R} es el peso del tubo Falcon conteniendo el residuo insoluble seco (g)
- $Toma$ es la toma de muestra (g)
- H es la humedad de la muestra determinada según 3.3.2 (g/100g)

3.6. Digestibilidad

3.6.1. Digestión *in vitro* de las fórmulas reconstituidas

Las cuatro fórmulas (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C) al tiempo 0, luego de 28 días de almacenamiento a alta HR, y luego de 12 semanas de almacenamiento en condiciones herméticas, fueron sometidas a digestión gástrica e intestinal estática *in vitro*, de acuerdo con el método propuesto por Ménard et al. (2018), para simular la digestión de lactantes nacidos a término. Los autores excluyeron la fase oral por tratarse de un alimento líquido, cuyo tiempo de residencia en la boca es muy corto, y de acuerdo con lo sugerido en el consenso internacional para digestión en adultos (Minekus et al., 2014). El método aplicado se resume en la Figura 5.7. Una de las diferencias más notorias entre el método utilizado para simular la digestión de recién nacidos y la de adultos descrita por Minekus et al. (2014) radica en el pH de la fase gástrica, que es 3 para adultos y 5,3 para recién nacidos (Figura 5.7), de acuerdo con Ménard et al. (2018). A continuación, se describe en más detalle el método utilizado.

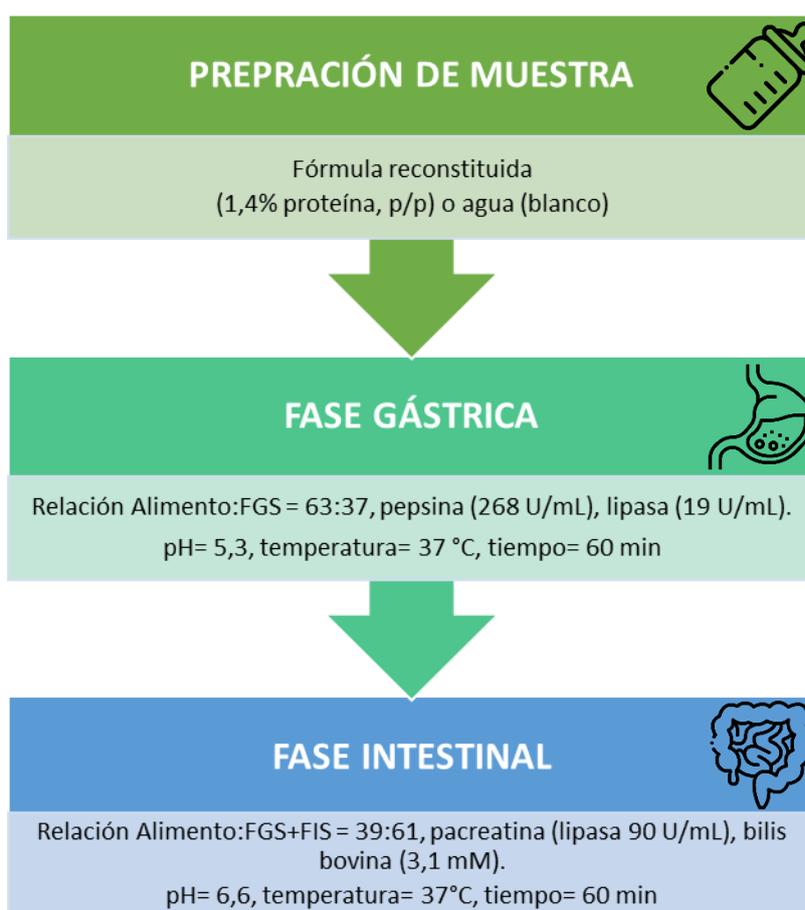


Figura 5.7. Condiciones de digestión estática *in vitro*.

FGS: fluido gástrico simulado, FIS: fluido intestinal simulado.

Capítulo 5

3.6.1.1. Preparación de soluciones

- Fluido gástrico simulado (FGS): NaCl 94 mM, KCl 13 mM, pH= 5,3.
- Fluido intestinal simulado (FIS): NaCl 164 mM, KCl 10 mM, NaHCO₃ 85 mM, pH= 6,6.
- Pepsina 5360 U/mL

Se preparó una solución de pepsina porcina CAS 9001-75-6 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de 13,4 mg/mL, según la actividad enzimática declarada por el fabricante (400 U/mg). Esta solución se preparó en el día y se conservó en heladera hasta el momento de su utilización.

La actividad en esta solución se seleccionó de manera de obtener la actividad enzimática deseada en la dilución final.

- Lipasa 380 U/mL

Se preparó una solución de lipasa de páncreas porcino CAS 9001-62-1 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de 12,7 mg/mL, según la actividad enzimática declarada por el fabricante (30 U/mg). Esta solución se preparó en el día y se conservó en heladera hasta el momento de su utilización.

La actividad en esta solución se seleccionó de manera de obtener la actividad enzimática deseada en la dilución final.

- Pancreatina: actividad lipasa 1454 U/mL

Se preparó una solución de pancreatina CAS 8049-47-6 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de 48,5 mg/mL, según la actividad lipasa (30 U/mg). Esta solución se preparó en el día y se conservó en heladera hasta el momento de su utilización.

La actividad en esta solución se seleccionó de manera de obtener la actividad enzimática deseada en la dilución final.

- Bilis bovina 0,05 mmol/mL

Se preparó una solución de bilis bovina CAS 8008-63-7 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de 20,5 mg/mL. Esta solución se preparó en el día y se conservó en heladera hasta el momento de su utilización.

La actividad en esta solución se seleccionó de manera de obtener la concentración deseada en la dilución final.

- Cloruro de calcio 0,018 mmol/mL

3.6.1.2. Preparación de las muestras

Las fórmulas con distintos tiempos de almacenamiento se reconstituyeron en agua destilada hasta una concentración total de proteína de 1,4 % (p/p) y se dejaron durante toda la noche con agitación

magnética a ~650 rpm. Para calcular la masa de polvo a reconstituir se calculó la concentración de proteína en la fórmula según la Ecuación 5.6.

$$Proteína (g/100g) = \frac{P_{fresca} \times (100 - H_{muestra})}{100 - H_{fresca}} \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Donde:

- P_{fresca} es la concentración de proteína en base húmeda, en la muestra recién producida, presentada en la Tabla 5.1, expresado en g/100 g.
- H_{fresca} es la concentración de humedad, en la muestra recién producida, presentada en la Tabla 5.1, expresado en g/100 g.
- $H_{muestra}$ es la concentración de humedad, en la muestra analizada, determinada según 3.3.2, expresado en g/100 g.

3.6.1.3. Procedimiento

A continuación, se describe el procedimiento de digestión *in vitro* realizado tanto para las muestras con distintos tiempos de almacenamiento, como a blancos, en los que el volumen de fórmula reconstituida se sustituyó por agua. El proceso de digestión (fase gástrica e intestinal) se realizó por duplicado.

Fase gástrica

- i. Se mezclaron 18 mL de FGS precalentado a 37 °C con 42 mL de fórmula reconstituida (o agua en el caso del blanco) y se ajustó el pH a 5,3 con HCl 1 M. En este punto se tomaron muestras para análisis correspondientes a las fórmulas sin digerir, que se identificaron como G0.
- ii. Se transfirieron 18 mL de la mezcla FGS+alimento a dos tubos Falcon de 50 mL. A cada uno de ellos se le agregó 1 mL de solución de pepsina y 1 mL de solución de lipasa. De esta forma, los tubos contenían una relación alimento:fluido gástrico de 63:37, con una actividad de pepsina de 268 U/mL y una actividad de lipasa de 19 U/mL. Se midió y ajustó el pH nuevamente a 5,3, en caso de ser necesario.
- iii. Los tubos se llevaron a un baño de agua a 37 °C con agitación (50 rpm) durante 60 min.
- iv. Luego de la incubación se ajustó el pH de los tubos a 7,0 con NaOH 1 M para detener la acción de las enzimas gástricas. En este punto se tomaron muestras para análisis (10 mL de cada tubo) correspondientes a las fórmulas sometidas a digestión gástrica, que se identificaron como G60.

Fase intestinal

- i. En cada uno de los tubos conteniendo el remanente de alimento y fluido gástrico, se agregaron 3,15 mL de FSI precalentado a 37 °C y se ajustó el pH a 6,6 con HCl 1 M.
- ii. Luego, se agregó a cada tubo 1 mL de las soluciones de bilis, CaCl₂ y pancreatina. De esta forma, los tubos contenían una relación alimento:fluido gástrico+intestinal de 39:61, con una actividad lipasa de pancreatina de 90 U/mL y concentraciones de bilis en el volumen total y de CaCl₂ en el volumen de FSI de 3 mmol/L. Se midió y ajustó el pH nuevamente a 6,6, en caso de ser necesario.
- iii. Los tubos se llevaron a un baño de agua a 37 °C con agitación (50 rpm) durante 60 min.
- iv. Luego de la incubación, el manejo de las muestras correspondientes a las fórmulas sometidas a digestión gástrica + intestinal, que se identificaron como I60, dependió del análisis, como se explica en la descripción de los métodos correspondientes.

3.6.2. Grado de proteólisis

Se determinó el grado de hidrólisis proteica sobre las muestras antes de la digestión (G0), luego de la digestión gástrica (G60) y luego de la digestión gastrointestinal (I60).

En el caso de G0 no había actividad enzimática porque la muestra se tomó luego de agregar el FGS y ajustar el pH a 5,3 pero antes de agregar las enzimas gástricas (3.6.1.3- Fase gástrica. i) y, en el caso de G60, la muestra se tomó luego de detener la acción de las enzimas gástricas por ajuste de pH a 7,0 (3.6.1.3- Fase gástrica. iv). En el caso de I60, las muestras se tomaron al finalizar los 60 min de digestión intestinal simulada (3.6.1.3- Fase intestinal. iv), y se llevaron a baño de agua a 85 °C por 10 min para inactivar las enzimas. Todas las muestras (G0, G60 e I60) fueron centrifugadas a 4000×g y 20 °C por 20 min en una centrifuga Thermo Scientific Sorvall™ ST 8R (Massachusetts, Estados Unidos). Luego, se retiró con cuidado la fase oleosa y el sobrenadante acuoso se congeló y liofilizó en un liofilizador de mesa BIOBASE BK-FD10S (Shandong, China). Los sobrenadantes acuosos liofilizados se congelaron hasta el momento de su análisis.

Para cuantificar el grado de hidrólisis se determinaron los aminos libres por el método de o-ftaldialdehído (OPA) (Nielsen et al., 2001). Este método se basa en un mecanismo de dos pasos. En primer lugar, el reactivo OPA reacciona con el grupo tiol en el buffer de reacción y, en segundo lugar, el producto intermedio OPA-tiol reacciona con los grupos aminos de las proteínas para formar isoindoles 1-alkil(aril)tio-2-alkil-sustituídos (Figura 5.8), que pueden cuantificarse a través de la medida de absorbancia a 340 nm (Mulcahy et al., 2017).

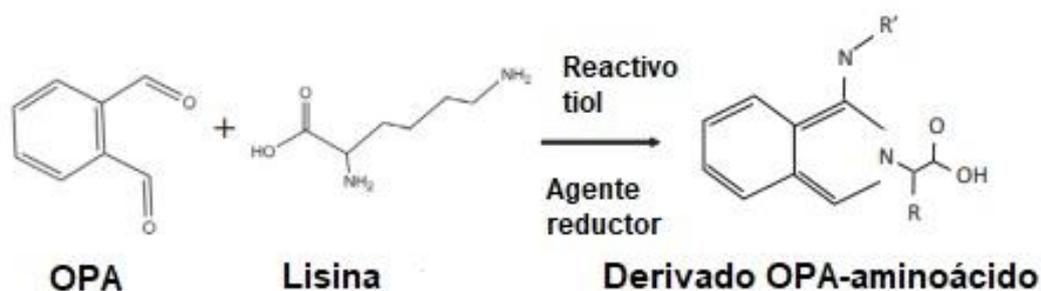


Figura 5.8. Reacción del reactivo OPA con los grupos aminos libres (aminoácidos terminales o grupo ε-amino de la lisina) en presencia de un agente reductor, para formar un isoindol detectable por UV. (Adaptada de: Mulcahy et al. (2017)).

3.6.2.1. Preparación de soluciones

- Buffer borato 0,15 M SDS 0,15 %
- Reactivo color

Se pesaron 40 mg de reactivo OPA (Sigma Aldrich, Estados Unidos), se disolvieron en 1 mL de etanol y se trasvasaron cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL. Se agregaron 100 μL de β-mercaptoetanol y 34 mL de buffer borato 0,15 M SDS 0,15 % (concentración final borato 0,1 M SDS 0,1 %) y se llevó a volumen con agua. El reactivo se preparó en el día y se almacenó al resguardo de la luz.

- Buffer borato 0,1 M SDS 0,1 %

Se realizó una dilución 2:3 del buffer borato 0,15 M SDS 0,15 %.

- Patrón de leucina 7,6 mM

Se realizó una solución 1 mg/mL de L-leucina (Merck, Estados Unidos) en buffer borato 0,1 M SDS 0,1 %.

3.6.2.2. Curva de calibración

Se realizó una dilución 1:8 de la solución patrón de leucina 7,6 mM en buffer borato 0,1 M SDS 0,1 %, para obtener una concentración de 0,95 mM. En cada día de análisis se realizó una curva de calibración agregando los volúmenes de leucina 0,95 mM, buffer y reactivo color indicados en la Tabla 5.2. Cada punto de la curva se determinó por triplicado. Luego de agregar el reactivo de color, los tubos se homogeneizaron en vortex durante 5 s y se midió la absorbancia a 340 nm exactamente a los 2 min en un espectrofotómetro Mettler Toledo UV5 (Ohio, Estados Unidos), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se graficó la absorbancia a 340 nm en

función de los μmol de NH_2 /tubo. En la Figura 5.9 se presenta una de las curvas de calibración obtenidas durante los análisis, a modo de ejemplo. Las pendientes de las curvas obtenidas fueron $2,36 \pm 0,03$.

Tabla 5.2. Volúmenes de soluciones utilizadas para la determinación de la curva de calibración de OPA.

Tubo	Buffer borato 0,1 M SDS 0,1 % (μL)	Solución leucina 0,95 mM (μL)	Reactivo color (μL)	$\mu\text{mol NH}_2$ /tubo
Blanco	200	0	1500	0
1	160	40	1500	0,019
2	120	80	1500	0,038
3	80	120	1500	0,057
4	40	160	1500	0,076
5	0	200	1500	0,095

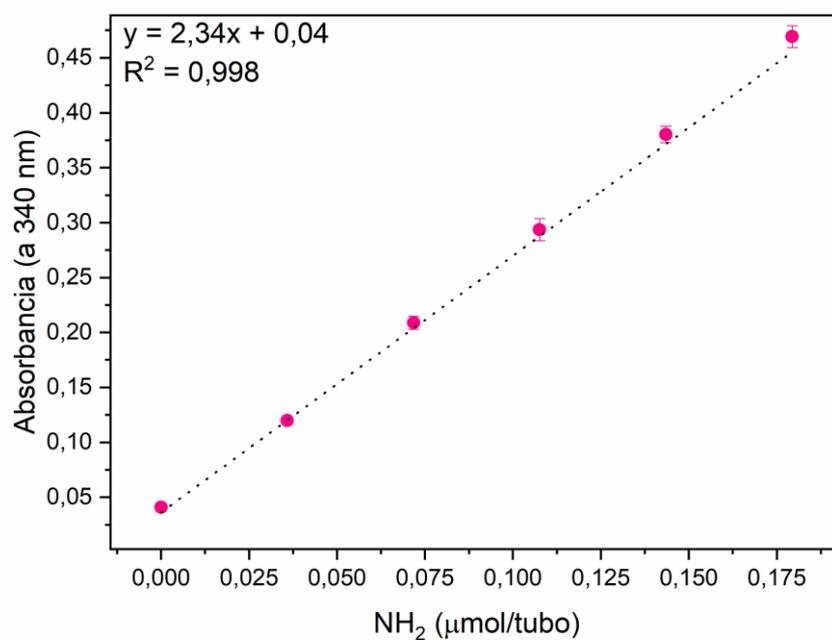


Figura 5.9. Curva de calibración obtenida para la determinación de aminos libres por el método de OPA.

3.6.2.3. Preparación de las muestras

Se pesaron 0,01 g de cada muestra liofilizada y se reconstituyeron en 1 mL de buffer borato 0,1 M SDS 0,1 % y se homogeneizaron en vortex.

Capítulo 5

3.6.2.4. Procedimiento analítico

A 200 μL de una dilución en buffer borato 0,1 M SDS 0,1 % de muestra reconstituida (según 3.6.2.3), se agregaron 1500 μL de reactivo color y se agitó en vortex durante 5 s. Exactamente 2 min después se midió la absorbancia a 340 nm en una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico en un espectrofotómetro Mettler Toledo UV5 (Ohio, Estados Unidos).

3.6.2.5. Cálculos y expresión de resultados

Los $\mu\text{moles NH}_2$ en el tubo de reacción se obtuvieron a partir de la curva de calibración, según la Ecuación 5.7.

$$\mu\text{mol NH}_2 / \text{tubo} = \frac{A_{340\text{nm}} - b}{a} \quad \text{Ecuación 5.7}$$

Donde: $A_{340\text{nm}}$ es la absorbancia del tubo medida a 340 nm y b y a son la ordenada del origen y la pendiente, respectivamente, obtenidas de la ecuación de la recta de la curva de calibración.

Luego, considerando la concentración de proteína en cada muestra y las diluciones correspondientes se obtuvieron los $\mu\text{moles NH}_2$ por mg de proteína en cada muestra y cada punto de digestión y el grado de hidrólisis proteica (GH) se calculó de acuerdo con la Ecuación 5.8.

$$GH (\%) = \frac{(NH_{2t} - NH_{2t=0}) \times 100}{NH_{2\infty} - NH_{2t=0}} \quad \text{Ecuación 5.8}$$

Donde:

- NH_{2t} son los $\mu\text{moles NH}_2$ por mg de proteína obtenidos para la muestra al finalizar la digestión gástrica o intestinal (en muestras G60 o I60).
- $NH_{2t=0}$ son los $\mu\text{moles NH}_2$ por mg de proteína obtenidos para la misma muestra antes de comenzar la digestión (en muestra G0).
- $NH_{2\infty}$ son los $\mu\text{moles NH}_2$ por mg de proteína que se obtendrían si todos los enlaces peptídicos de la muestra se encontraran hidrolizados, que se calculó según la Ecuación 5.9.

$$NH_{2\infty} (\mu\text{mol} / \text{mg proteína}) = 8,456 = \left(\frac{\% \text{Lys}}{PM_{\text{Lys}}} + \frac{100}{PM_{\text{AA prom.}}} \right) \times 10 \quad \text{Ecuación 5.9}$$

Donde:

- $\% \text{Lys} = 8,5$ y corresponde a los g de lisina por 100 g de proteína en la fórmula. Se calculó considerando que la fórmula tiene 60 % de proteínas del suero y 40 % de

caseínas, y que las fracciones proteicas contienen 8,7 y 8,2 % de lisina, respectivamente (Pellegrino et al., 2013).

- $PM_{Lys} = 146$ g/mol
- $PM_{Aaprom.} = 127$ g/mol, considerando que tanto las proteínas del suero como las caseínas presentan ese PM aminoacídico promedio (Medina Hernández & García Álvarez-Coque, 1992; Spellman et al., 2003).

Nielsen et al. (2001) reportaron valores de $NH_{2\infty}$ de 8,2 y 8,8 para la caseína y WP, respectivamente. Por lo tanto, considerando que la proteína de las fórmulas estaba compuesta por un 40 % caseína y 60 % WP, el $NH_{2\infty}$ obtenido a partir de datos bibliográficos sería 8,6, que es comparable al calculado en la presente tesis (8,456 μ mol/mg proteína).

3.6.3. Identificación de proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras

3.6.3.1. Tratamiento de muestras

Las muestras identificadas como G0 y G60 y las muestras I60 inmediatamente después de cumplidos los 60 min de incubación intestinal y sin tratamiento posterior, fueron mezcladas con una solución de SDS 1,5 mg/mL y 2-mercaptoetanol, en las cantidades presentadas en la Tabla 5.3, y posteriormente congeladas hasta el momento de su análisis.

Tabla 5.3. Volúmenes tomados para la preparación de muestra previo al análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Muestra	Volumen muestra (μ L)	Volumen SDS 1,5 mg/mL (μ L)	Volumen β -mercaptoetanol (μ L)
G0	27	231	6
G60	30	228	6
I60	48	210	6

Al momento del análisis, los tubos conteniendo las soluciones descritas en la Tabla 5.3 se descongelaron. El contenido de los tubos se mezcló con buffer muestra reductor, en una proporción 4:1 (mezcla:buffer). La mezcla se llevó a ebullición en baño de agua por 5 min, luego se centrifugó a 12.000 \times g por 5 min a temperatura ambiente, y se sembró el sobrenadante obtenido. El volumen de siembra fue 15 μ L para las muestras y 10 μ L para el marcador de peso molecular 10-180 kDa #26616 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Las condiciones en las que se realizó la electroforesis son las detalladas en el Capítulo 3 (3.7.2.3).

3.6.4. Grado de lipólisis

El grado de lipólisis se determinó únicamente sobre las muestras G0 (previo a la digestión) e I60 (sometidas a digestión gastrointestinal), que se tomaron inmediatamente luego de la incubación (en caso de I60) y sin tratamiento posterior, y fueron congeladas hasta el momento del análisis.

La determinación se realizó por medio de la cuantificación del porcentaje de ácidos grasos liberados (AGL) durante la digestión, por el método AOAC 947.05 (AOAC International, 2016), que se basa en la neutralización de los AGL con una solución de NaOH.

Se tomaron 5 mL de cada muestra (G0 o I60) y se titularon con NaOH 0,1 N hasta obtener un pH= 8,4. Las determinaciones se realizaron por duplicado y el grado de lipólisis, expresado en g de ácido oleico por 100 mL de fórmula reconstituida, se calculó según la Ecuación 5.10, considerando las distintas diluciones en cada una de las muestras G0 e I60. Se seleccionó el ácido oleico por ser el mayoritario en el aceite de girasol, que era la única fuente de materia grasa en las fórmulas.

$$AGL (g/100 mL) = \frac{(G_{NaOH} - G_B) \times 0,1011 \times 282,47}{Toma \times 10 \times D} \quad \text{Ecuación 5.10}$$

Donde:

- G_{NaOH} es el gasto de solución de NaOH obtenido (mL)
- G_B es el gasto de solución de NaOH obtenido al titular el blanco del mismo punto de digestión (G0, G60 o I60) (mL)
- 0,1011 es la normalidad de la solución de NaOH utilizada (mEq/mL)
- 282,47 es el peso equivalente del ácido oleico (g/Eq)
- $Toma$ es la toma de muestra (mL)
- D es el factor de dilución que tenían las distintas muestras y es igual a 0,7 y 0,39 para G0 e I60, respectivamente.

3.7. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVA monofactoriales ($\alpha = 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas en las variables estudiadas entre las fórmulas obtenidas (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C), para cada condición y tiempo de almacenamiento. Se realizaron ANOVA monofactoriales ($\alpha = 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas en las variables estudiadas entre tiempos de almacenamiento a 25 °C y 58,8 % HR, para cada fórmula. Se utilizó el test de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95 % para detectar diferencias significativas entre muestras.

Se utilizó la prueba t de Student ($\alpha = 0,05$) para determinar si existían diferencias significativas en las variables estudiadas entre el tiempo 0 y 12 semanas a 25 °C en bolsa hermética, para cada fórmula modelo.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), con un nivel de confianza de 95 % ($P < 0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1. Propiedades fisicoquímicas

En primer lugar, se analizaron los cambios en las propiedades fisicoquímicas: a_w , humedad, Tg y Tcr por DSC, cristalinidad por DRX, grasa libre superficial, color y apariencia macroscópica, de las fórmulas modelo en polvo obtenidas bajo distintas condiciones de producción (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C, 60%-100°C) durante 4 semanas de almacenamiento a 25 °C y alta HR (58 %) y luego de 12 semanas en envase cerrado hermético a 25 °C.

4.1.1. Actividad de agua y humedad

En la Figura 5.10 se presentan los resultados de a_w y contenido de humedad de las fórmulas, que inicialmente variaron entre 0,11 y 0,15 y entre 0,8 y 1,2 g/100 g, respectivamente.

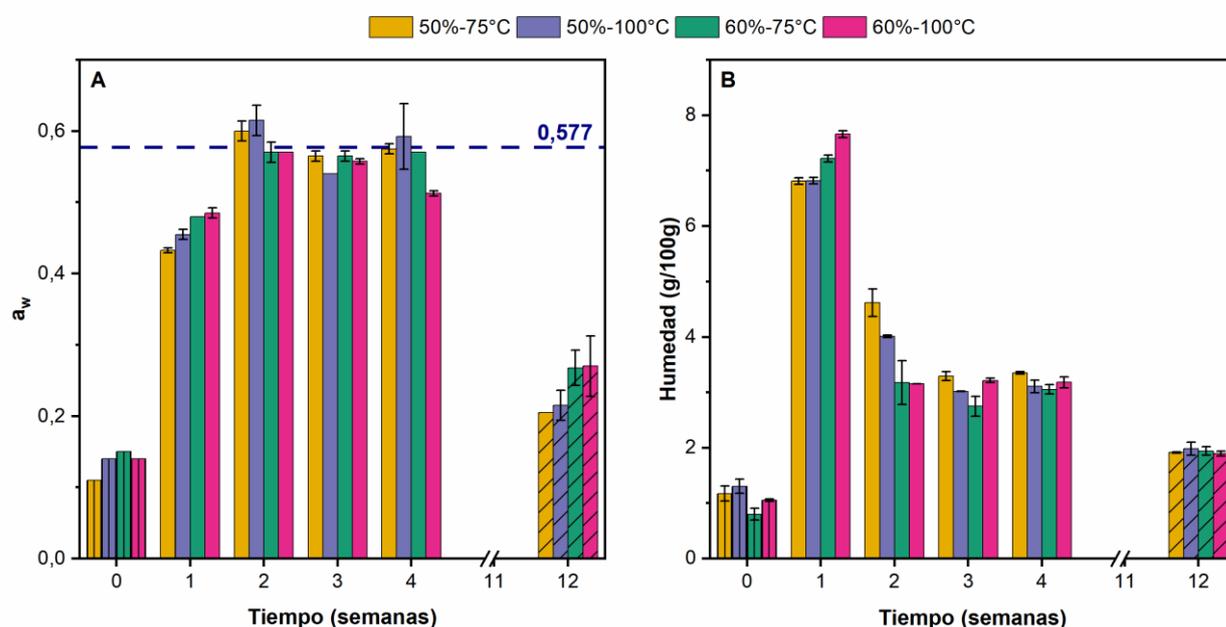


Figura 5.10. Actividad de agua (A) y contenido de humedad (B) de las fórmulas infantiles modelo, obtenidas bajo distintas condiciones de producción, antes de su almacenamiento (barras con rayas verticales), durante su almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (barras lisas), y luego de 12 semanas de almacenamiento a 25 °C en envase hermético (barras con rayas en diagonal).

Las barras de error representan la desviación estándar ($n = 4$). La línea punteada en el gráfico A indica la HR ambiente.

Al almacenar las fórmulas a 25 °C y 58 % de HR se observó un aumento de la a_w hasta la segunda semana de almacenamiento inclusive (Figura 5.10A), mientras que se obtuvo un importante aumento del contenido de humedad a la semana 1 y luego un descenso de la humedad en la semana 2 de almacenamiento (Figura 5.10B).

Analizando el comportamiento individual de cada una de las fórmulas, se observa que, luego de 1 semana de almacenamiento, los polvos producidos a partir de mezclas húmedas con 60 % ST (60%-75°C y 60%-100°C) presentaban mayores ($P < 0,0001$) valores de a_w (0,48-0,49) y contenido de humedad (7,2-7,6 g/100g) que 50%-75°C y 50%-100°C ($a_w = 0,43-0,46$, humedad = 6,8 g/100g). Además, al cabo de dos semanas de almacenamiento a HR= 58 %, las fórmulas 60% ya habían alcanzado el equilibrio con el ambiente (Figura 5.10A), mientras que 50%-75°C y 50%-100°C presentaban actividades acuosas levemente por encima del equilibrio (0,60-0,62) y contenidos de humedad más elevados ($P < 0,001$) que 60%-75°C y 60%-100°C (Figura 5.10). Luego, en la tercera semana de almacenamiento, las fórmulas 50% ya habían alcanzado el equilibrio con el ambiente. Estas pequeñas diferencias entre muestras y en el tiempo en el cual alcanzaron el equilibrio, podría deberse a una mayor velocidad de absorción de agua por parte de 60%-75°C y 60%-100°C.

El incremento de la a_w por encima del equilibrio y el descenso del contenido de humedad observados (Figura 5.10) podrían explicarse por la cristalización de la lactosa. Es posible distinguir distintas etapas en las curvas de sorción de agua de las fórmulas. Inicialmente ocurre la adsorción superficial sin cambios importantes en la estructura. Luego, aumenta la velocidad de absorción, a medida que el agua se mueve hacia el interior del polvo y se aproxima a la región de transición vítrea. Al aumentar la a_w ocurre un importante descenso de la T_g y, cuando la temperatura del polvo supera a la T_g , ocurre la cristalización, en la que los materiales amorfos se relajan pasando a un estado termodinámicamente más estable (Burnett et al., 2004; Kelly et al., 2016). Como la lactosa cristalina tiene menor capacidad de retención de agua que la lactosa amorfa, la cristalización induce la liberación de agua, disminuyendo el contenido de humedad de la muestra (Palzer, 2010). Los resultados obtenidos sugieren que la cristalización ocurrió en todas las muestras entre las semanas 1 y 2 de almacenamiento, esto es, a a_w (a 25 °C) en el rango 0,43-0,61 para 50%-75°C, 0,46-0,61 para 50%-100°C y 0,48-0,57 para 60%-75°C y 60%-100°C. Estos resultados coinciden con resultados reportados previamente, en los que se estimó que la transición de la lactosa del estado amorfo al cristalino en leche entera en polvo ocurrió aproximadamente a $a_w = 0,54$ (20 °C) (Murrieta-Pazos et al., 2011).

En cuanto al efecto de la temperatura de pasteurización, comparando las fórmulas producidas a partir de mezclas húmedas con igual contenido de ST, se observaron leves diferencias durante el almacenamiento a alta HR. A la semana de almacenamiento, 60%-100°C presentó un contenido

de humedad más alto que 60%-75°C y a las 2 semanas de almacenamiento la diferencia estuvo entre 50%-75°C y 50%-100°C (Figura 5.10).

En el caso del almacenamiento en condiciones herméticas (envase cerrado), al cabo de 12 semanas se obtuvo un aumento significativo ($P < 0,05$) en la humedad y a_w de todas las muestras (Figura 5.10). Dado que se eligió un envase con baja permeabilidad al agua y que no se envasó al vacío ni en atmósfera modificada, el aumento de humedad observado puede explicarse por la absorción de agua presente en el espacio de cabeza del envase. En la semana 12, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los contenidos de humedad de las muestras, sin embargo, a dicho tiempo de almacenamiento las fórmulas 60 % presentaron mayor ($P = 0,0017$) a_w (0,27) que las fórmulas 50 % ($a_w = 0,21-0,22$). No se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre fórmulas pasteurizadas a distintas temperaturas en a_w o contenido de humedad, para ninguno de los niveles de ST (50 o 60 %). Si bien en todas las muestras se obtuvieron valores de a_w y humedad más elevados que al tiempo 0, la a_w y contenido de humedad de las muestras a los 3 meses de almacenamiento en envase cerrado estuvieron muy por debajo que los obtenidos a los 7 días en atmósfera a 58 % HR. La temperatura de pasteurización no afectó significativamente ($P > 0,05$) la a_w o humedad de los polvos, durante el almacenamiento en condiciones herméticas.

4.1.2. Transición vítrea y cristalización

La transición vítrea es una de las características más importantes de los sólidos amorfos y la T_g un parámetro crítico para evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de polvos lácteos (R. Li et al., 2019; Phosanam et al., 2020). Los materiales que contienen componentes amorfos vítreos (como la lactosa en las fórmulas) están en un estado termodinámico metaestable de mayor energía, con alta viscosidad y menor movilidad molecular. Las moléculas en estado vítreo no pueden cambiar sus arreglos espaciales para formar estructuras cristalinas ordenadas (estado de equilibrio) y menor energía libre, debido a restricciones difusionales. Sin embargo, si la temperatura aumenta por encima de la T_g o el material es plastificado (“ablandado”) por el agua, la viscosidad disminuye favoreciendo la difusión y movilidad traslacional, lo que a su vez induce la nucleación y crecimiento de cristales (Biliaderis et al., 2002). Los cambios en el contenido de calor de un sólido amorfo varían muy levemente al aumentar la temperatura, hasta alcanzar la región de la transición vítrea donde ocurren cambios abruptos. La región por debajo de la T_g se conoce como “región vítrea” y la región por encima de la T_g se conoce como “región gomosa”. Las propiedades fisicoquímicas en ambas regiones son significativamente distintas (R. Li et al., 2019).

En la Figura 5.11 se presentan como ejemplo los termogramas obtenidos para la fórmula 50%-100°C al tiempo 0, luego de 7 y 14 días a 58 % HR y luego de 12 semanas en envase hermético. En todas las fórmulas, los termogramas presentaron formas similares para cada punto de

almacenamiento, con diferencias en las temperaturas de transición vítrea y cristalización, que se discutirán a continuación.

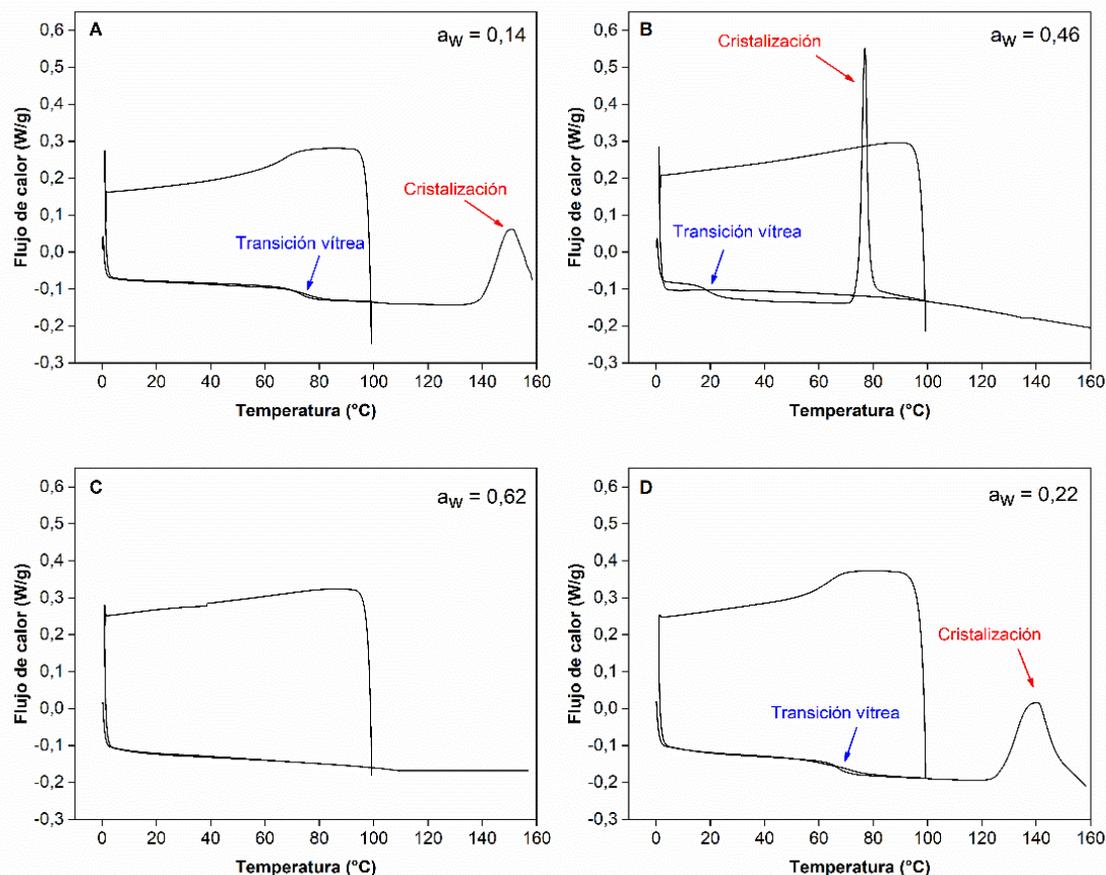


Figura 5.11. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para la fórmula modelo 50%-100°C al tiempo 0 (A), luego de 7 días de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (B), luego de 14 días de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR (C) y luego de 12 semanas en envase hermético a 25 °C (D).

Los termogramas obtenidos para las fórmulas almacenadas durante 21 y 28 días a 25 °C y 58 % HR presentaron la misma forma que para el almacenamiento en las mismas condiciones por 14 días (C)

Los resultados de temperaturas y ΔC_p de transición vítrea obtenidos por DSC se presentan en la Tabla 5.4. Antes del almacenamiento (tiempo 0), no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre muestras para las T_g inicial, media o final. En el Capítulo 4, al analizar los polvos frescos (recién producidos) para 50%-75°C se había obtenido un valor de T_g inicial significativamente ($P < 0,05$) menor que para resto de las muestras (4.1.6, Capítulo 4). La diferencia de resultados puede explicarse por la a_w de los polvos, de la que depende la T_g . En el Capítulo 4, las muestras fueron acondicionadas previo a su análisis y la T_g se midió para una $a_w = 0,23$ en todas las muestras. En este capítulo, las muestras no se acondicionaron y las T_g se midieron a las a_w de las muestras (0,1-0,15, Figura 5.11). Los valores de T_g obtenidos fueron ampliamente superiores a la temperatura de almacenamiento (25 °C), la mínima diferencia obtenida entre la temperatura de transición vítrea de inflexión (T_g media) y la temperatura de

almacenamiento ($T_g - T$) fue 94 °C. Esto indica que todos los polvos se encontraban en la región amorfa vítrea.

ΔC_p tampoco varió significativamente ($P > 0,05$) entre muestras al tiempo 0 (Tabla 5.4). Este parámetro es representativo del grado de modificaciones bioquímicas que ocurren durante la transición vítrea, o sea, se relaciona con la magnitud de los cambios que ocurren durante dicha transición (Schuck, Blanchard, et al., 2005). Schuck et al. (2005) reportaron una alta variabilidad de los valores de ΔC_p entre distintas matrices lácteas a una a_w dada. En la presente tesis, los valores similares de ΔC_p son esperables, dado que se trata de fórmulas con igual composición y con lactosa en estado amorfo en todos los casos.

La T_{cr} y su entalpía asociada no pudieron calcularse con exactitud al tiempo 0, debido a que el pico de cristalización no se completó antes de los 160 °C (temperatura máxima de la rampa utilizada para la determinación) (Figura 5.11A). Sin embargo, sí se pudo observar que en todos los casos $T_{cr} > 150$ °C. La T_{cr} inicial sí se determinó para todas las fórmulas, no detectándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas.

Luego de 1 semana de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR, se obtuvo una reducción importante de las T_g y T_{cr} . La disminución de la T_g en fórmulas infantiles y otros polvos lácteos al aumentar la HR ha sido ampliamente reportada en la bibliografía (Cheng et al., 2019; Haque & Roos, 2004; Masum, Chandrapala, et al., 2020b; Phosanam et al., 2020; Schuck, Blanchard, et al., 2005). El agua actúa como un plastificante favoreciendo la movilidad de los componentes (Fitzpatrick et al., 2007). Al calentar las muestras durante el ensayo de DSC ocurrió la cristalización irreversible durante la primera rampa de calentamiento (a temperaturas < 100 °C), lo que llevó a que durante la segunda rampa no se detecten cambios en los flujos de calor y, por lo tanto, los valores de T_g y T_{cr} presentados en las Tablas 5.4 y 5.5 para este tiempo de almacenamiento, corresponden a los obtenidos en el primer calentamiento (Figura 5.11B). Todas las T_g medias obtenidas a este tiempo fueron inferiores a la temperatura a la cual se almacenaron las muestras (25 °C), lo que indica que, luego de 1 semana, las muestras ya se encontraban en la región amorfa gomosa. Las T_g de las muestras 60 % fueron significativamente menores ($P < 0,05$) que las obtenidas para las muestras 50 % (Tabla 5.4). Estos resultados parecieran estar en concordancia con la pequeña diferencia de a_w y humedad observada en las muestras 60% (Figura 5.10). Los valores de ΔC_p obtenidos durante la transición vítrea no variaron significativamente entre muestras ni respecto a los valores obtenidos al tiempo 0. Los valores de T_{cr} inicial, T_{cr} y ΔH disminuyeron en el siguiente orden: 50%-75°C > 50%-100°C > 60%-75°C > 60%-100°C. De acuerdo con los resultados obtenidos, para un mismo valor de a_w (~0,44 en muestras 50 % y ~0,48 en muestras 60 %), las fórmulas tratadas térmicamente a 75 °C durante la producción presentaban mayor T_{cr} que aquellas tratadas térmicamente a 100 °C, lo que se asocia con una mayor estabilidad. En su estudio, Jouppila et al. (1997) demostraron que la velocidad de cristalización de la lactosa

aumenta con la HR, el contenido de humedad y la diferencia entre la temperatura del polvo ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la de transición vítrea ($T - T_g$). Considerando el valor inicial y/o final de T_g , la diferencia $T - T_g$ fue mayor para 50%-100 $^{\circ}\text{C}$ que para 50%-75 $^{\circ}\text{C}$, lo que explicaría la mayor velocidad de cristalización (dada por menores valores de T_{cr} inicial, T_{cr} y ΔH_{cr}). Por otra parte, la diferencia en los parámetros de cristalización obtenida entre las muestras 60 % no se explicaría por la diferencia $T - T_g$ (dado que no hubo diferencias entre ambas fórmulas para ninguno de los puntos de transición vítrea), pero sí podría explicarse por el contenido de humedad de las muestras, que a la semana de almacenamiento fue significativamente mayor ($P < 0,05$) para 60%-100 $^{\circ}\text{C}$ que para 60%-75 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.10).

A partir de la segunda semana de almacenamiento a alta HR, no se detectaron cambios de flujo de calor en los termogramas de ninguna de las cuatro fórmulas (Figura 5.11C). Esto indica que las muestras ya estaban completa e irreversiblemente cristalizadas, lo que coincide con los resultados de a_w y humedad (Figura 5.10). En la misma línea, Cheng et al. (2019) reportaron la desaparición de la T_g de fórmulas infantiles comerciales luego de dos semanas de almacenamiento a $a_w = 0,53$ y 40 $^{\circ}\text{C}$.

En las muestras analizadas a las 12 semanas de almacenamiento en envase cerrado también se obtuvo una reducción de la T_g y la T_{cr} respecto a los valores iniciales, que se puede relacionar con el aumento de humedad en las muestras (Tablas 5.4 y 5.5). Sin embargo, en todos los casos la T_g fue $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la $T_{cr} > 135\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicando que la lactosa presente aún estaba en estado amorfo (Figura 5.11D). El ΔC_p asociado a la transición vítrea no varió significativamente entre muestras ni respecto al resto de los puntos de almacenamiento (Tabla 5.4). Las muestras 60 % volvieron a presentar valores de T_g menores que las fórmulas 50 %, explicados por su mayor a_w , en cambio el comportamiento obtenido para la cristalización fue distinto. En este punto de almacenamiento pudieron determinarse T_{cr} inicial y T_{cr} , pero no pudo determinarse ΔH_{cr} porque el pico no se obtuvo completo al finalizar la rampa de calentamiento. Al igual que luego de 1 semana a 58 % HR, la muestra 60%-100 $^{\circ}\text{C}$ presentó la menor T_{cr} , pero a diferencia de lo ocurrido al almacenar a alta HR, no se detectaron diferencias significativas entre las T_{cr} del resto de las muestras (Tabla 5.5).

Tabla 5.4. Temperaturas de transición vítrea (Tg) inicial, media y final y diferencia de capacidad calorífica entre el inicio y el final de la transición vítrea (ΔC_p) de las fórmulas modelo, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 1 semana a 25 °C y 58 % HR y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético.

Semana	Tg inicial (°C)			Tg media (°C)			Tg final (°C)			ΔC_p (W/g lactosa)		
	0	1	12	0	1	12	0	1	12	0	1	12
50%-75°C	70,8 ± 1,9 ^a	19,1 ± 0,7 ^c	64,6 ± 1,1 ^b	75,0 ± 1,7 ^a	22,2 ± 1,6 ^b	69,3 ± 0,7 ^{bc}	80,8 ± 1,0 ^a	26,6 ± 1,3 ^c	74,6 ± 1,5 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
50%-100°C	69,4 ± 1,5 ^a	16,3 ± 0,7 ^b	64,8 ± 1,6 ^b	74,4 ± 2,0 ^a	19,8 ± 0,8 ^b	69,8 ± 2,2 ^c	79,4 ± 3,0 ^a	23,8 ± 0,9 ^b	75,0 ± 2,3 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^a
60%-75°C	71,4 ± 1,4 ^a	11,6 ± 0,9 ^a	60,9 ± 1,1 ^a	76,2 ± 2,2 ^a	14,2 ± 2,0 ^a	66,0 ± 1,0 ^a	81,2 ± 2,6 ^a	17,6 ± 2,3 ^a	72,1 ± 1,2 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a
60%-100°C	71,3 ± 1,8 ^a	10,5 ± 1,3 ^a	62,3 ± 1,0 ^a	76,3 ± 1,8 ^a	13,0 ± 1,4 ^a	67,0 ± 1,1 ^{ab}	80,0 ± 2,5 ^a	17,0 ± 1,4 ^a	72,8 ± 1,7 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^a

Promedio ± desviación estándar (n = 6). Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre muestras para un tiempo de almacenamiento dado. ¹Los valores de Tg inicial y media y ΔC_p luego de 1 semana a 58 % HR se obtuvieron de la primera rampa de calentamiento, mientras que los valores correspondientes al tiempo 0 y 12 semanas en envase hermético se obtuvieron de la segunda rampa de calentamiento.

Tabla 5.5. Temperaturas de cristalización (Tcr) inicial y media y entalpía de cristalización (ΔH) de las fórmulas modelo, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 1 semana a 25 °C y 58 % HR y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético.

Semana	Tcr inicial (°C)			Tcr (°C)			ΔH (J/g lactosa)		
	0	1 ²	12	0 ¹	1 ²	12	0 ¹	1 ²	12 ³
50%-75°C	135,1 ± 0,3 ^a	81,5 ± 0,8 ^d	134,7 ± 2,9 ^b	> 150	83,7 ± 0,9 ^d	146,6 ± 1,7 ^b	-	43,6 ± 0,9 ^d	-
50%-100°C	134,2 ± 1,6 ^a	75,7 ± 1,2 ^c	131,9 ± 4,6 ^{ab}	> 150	77,8 ± 1,3 ^c	142,3 ± 5,2 ^b	-	40,1 ± 1,2 ^c	-
60%-75°C	134,2 ± 0,7 ^a	69,1 ± 0,5 ^b	134,5 ± 2,4 ^b	> 150	71,2 ± 0,6 ^b	144,7 ± 1,0 ^b	-	36,7 ± 1,2 ^b	-
60%-100°C	133,8 ± 0,6 ^a	62,7 ± 2,3 ^a	128,5 ± 1,0 ^a	> 150	64,6 ± 2,4 ^a	136,2 ± 1,7 ^a	-	31,3 ± 2,1 ^a	-

Promedio ± desviación estándar (n = 6). Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre muestras para un tiempo de almacenamiento dado. ¹Al tiempo 0 no se pudo determinar Tcr y ΔH_{cr} porque la cristalización se completó a T > 160 °C (temperatura final de la rampa de calentamiento). ²Los valores correspondientes a las muestras almacenadas 1 semana a 58 % HR se obtuvieron de la primera rampa de calentamiento, mientras que los valores correspondientes al tiempo 0 y 12 semanas en envase hermético se obtuvieron de la segunda rampa de calentamiento. ³Al tiempo 12 semanas no se pudo determinar ΔH_{cr} porque la cristalización se completó a T > 160 °C (temperatura final de la rampa de calentamiento).

4.1.3. Cristalinidad por difracción de rayos X

La lactosa es un disacárido compuesto por una unidad de galactosa y una de glucosa unidas a través de un enlace glicosídico β 1-4. Presenta un grupo aldehído libre, lo que la hace un azúcar reductor, y puede existir en dos formas anoméricas: α y β -lactosa (Figura 5.12) (Fox et al., 2015).

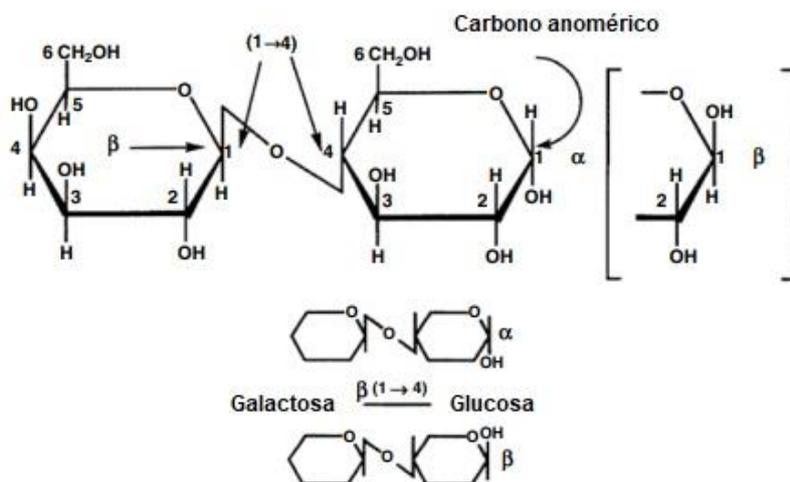


Figura 5.12. Estructura de la lactosa (adaptada de: Fox et al. (2015)).

La existencia de dos formas anoméricas hace que la cristalización de la lactosa sea un proceso complejo. Una solución acuosa de equilibrio a temperatura ambiente contiene aproximadamente 38 % del anómero α -lactosa y 62 % de β -lactosa, balanceada por mutarrotación. Sin embargo, en condiciones normales, es el anómero α -lactosa el que cristaliza, debido a su menor solubilidad (Drapier-Beche et al., 1997). Además, para sumar complejidad, la lactosa amorfa puede cristalizar en diversas formas cristalinas (polimorfismo), dependiendo de las condiciones de cristalización. Las formas cristalinas reportadas en bibliografía incluyen: α -lactosa monohidrato, α -lactosa anhidra estable e inestable, β -lactosa anhidra, mezclas de α - y β -lactosa anhidras en relación molar 5:3 o 4:1. Sin embargo, se ha mostrado que, en la leche en polvo, la lactosa amorfa cristaliza como α -lactosa monohidrato, mezcla anhidra de α - y β -lactosa en relación molar 5:3 o como β -lactosa anhidra (Biliaderis et al., 2002; Haque & Roos, 2005a).

Los difractogramas de las cuatro fórmulas al tiempo 0 y luego de 7, 14 y 28 días de almacenamiento a 25 °C y HR 58 % se presentan en la Figura 5.13. Las muestras al tiempo 0, 14 y 28 días se mezclaron con el patrón interno L-valina. Se puede observar que los picos correspondientes a la L-valina en el rango 5-35°, se ubican a ángulos de difracción 2θ de 7,4°, 14,7°, 22,1° y 29,7° (Sangeetha et al., 2015).

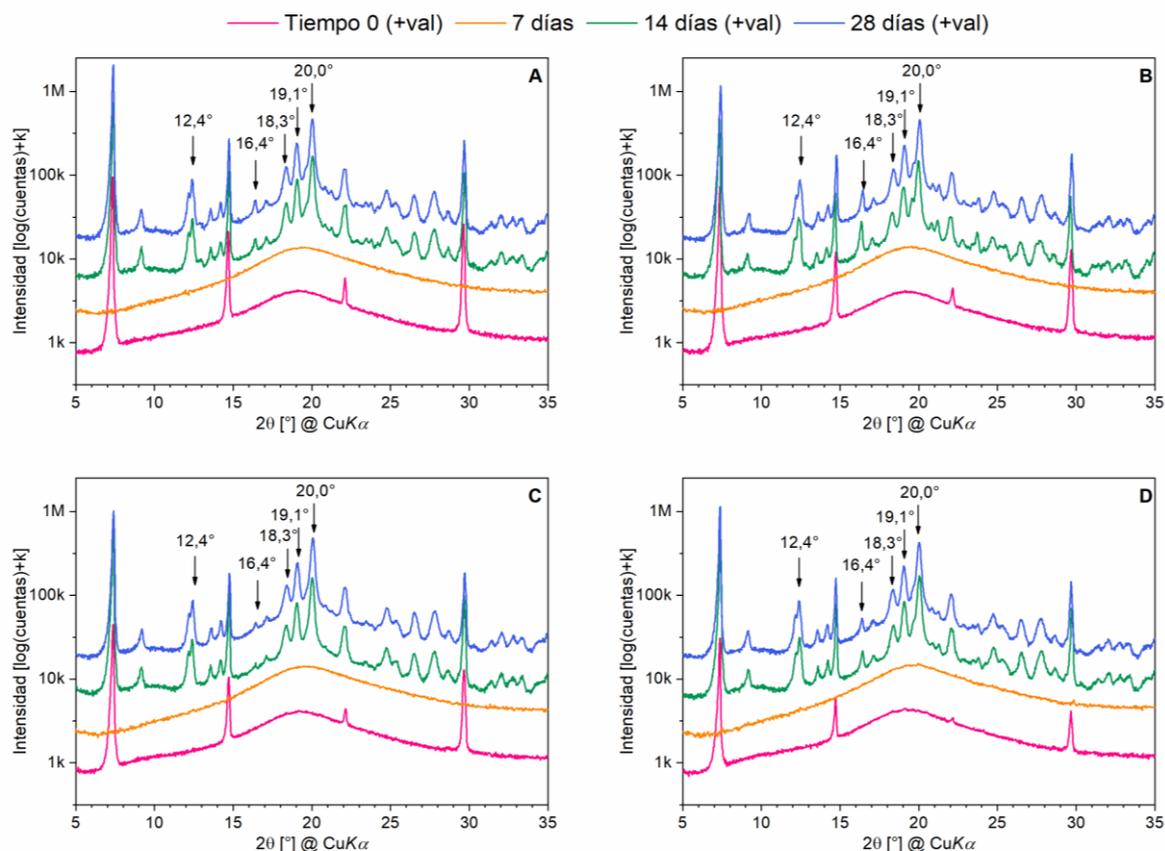


Figura 5.13. Diagramas obtenidos por difracción de rayos X de las fórmulas modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0) y luego de 7, 14 y 28 días de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C.

Las fórmulas a tiempo 0 y 14 y 28 días se mezclaron con L-valina (+val). Las flechas indican picos a ángulos de difracción (2θ) característicos.

Los diagramas indican que las cuatro muestras al tiempo 0 eran completamente amorfas (los únicos picos de difracción presentes son los correspondientes a la valina) y esto se mantuvo luego de 7 días de almacenamiento a alta HR (Figura 5.13). A los 14 días, las cuatro fórmulas modelo presentaron cristalización. Los resultados obtenidos por DSC (Tablas 5.4 y 5.5) habían mostrado que la cristalización ocurrió entre los días 7 y 14 a 58 % HR en las cuatro fórmulas modelo, resultado que se confirmó por DRX. Los difractogramas obtenidos a los 28 días no presentaron diferencias significativas, respecto al día 14, en la posición, intensidad o forma de picos de difracción, lo que permitió concluir que la cristalización no avanzó y, por lo tanto, las fórmulas ya estaban completamente cristalizadas a los 14 días. Este resultado también está en línea con los termogramas obtenidos por DSC, en los que no se obtuvo ninguna transición a partir de los 14 días, porque las muestras ya estaban cristalizadas (Figura 5.11).

En cuanto a las formas cristalinas detectadas a partir de los 14 días, la identificación se realizó de acuerdo con información bibliográfica. Se detectaron cristales de α -lactosa monohidrato, que

presenta picos a ángulos de difracción 2θ $12,4^\circ$, $16,4^\circ$ y 20° (Drapier-Beche et al., 1997; Haque & Roos, 2005b; Miao & Roos, 2005; Nijdam et al., 2007), en las cuatro fórmulas almacenadas durante 14 y 28 días (Figura 5.13). Aunque, el pico con máximo a $12,4^\circ$ corresponde en realidad a dos picos con ángulos de difracción a $12,1$ y $12,4^\circ$, en coincidencia con lo reportado por Nijdam et al. (2007). Sin embargo, dado que el pico a 20° también se atribuye a la mezcla anhidra de α - β -lactosa en relación molar 5:3 y a la α -lactosa anhidra inestable (Biliaderis et al., 2002; Simpson et al., 1982) y el pico a $12,4^\circ$ ha sido reportado también para otras formas cristalinas de la lactosa (Drapier-Beche et al., 1997; Nijdam et al., 2007), se utiliza el pico a $16,4^\circ$ para establecer la presencia de α -lactosa monohidrato. Para la mezcla α - β -lactosa en relación molar 5:3 se han reportado picos a ángulos de difracción de $19,1^\circ$ y $20,0^\circ$ (Biliaderis et al., 2002; Haque & Roos, 2005b; Miao & Roos, 2005; Simpson et al., 1982), que se detectaron en las cuatro fórmulas a partir de los 14 días a alta HR. A su vez, de acuerdo con Nijdam et al. (2007), el mejor pico para caracterizar la mezcla en relación molar $\alpha:\beta = 5:3$ se encuentra a un 2θ de aproximadamente $18,2^\circ$, que también fue detectado en la presente tesis ($\sim 18,3^\circ$). La β -lactosa anhidra presenta picos a $2\theta = 10,4$ - $10,5^\circ$ y $20,9$ - $21,0^\circ$ (Drapier-Beche et al., 1997; Haque & Roos, 2005b; Jouppila et al., 1997; Nijdam et al., 2007). No se obtuvieron picos a $10,4^\circ$ en ninguna de las fórmulas, sin embargo, todas ellas (tanto a los 14 como a los 28 días) presentaron un pico a $\sim 21,0^\circ$ de intensidad muy baja (Figura 5.13). La comparación de la β -lactosa con otras formas polimórficas ha arrojado que el pico a $\sim 10,4^\circ$ es el que mejor la caracteriza, por ser único para esta forma (Drapier-Beche et al., 1997; Kirk et al., 2007; Miao & Roos, 2005; Nijdam et al., 2007), por lo tanto, la ausencia de este pico permite concluir que las fórmulas modelo no presentaron cristales de β -lactosa anhidra. De igual forma, no se detectó la mezcla α - β -lactosa en relación molar 4:1, para la que se han reportado picos a $12,8^\circ$ (Jouppila et al., 1998) y $19,5^\circ$ (Haque & Roos, 2005b; Miao & Roos, 2005; Simpson et al., 1982).

La técnica de DRX permitió confirmar que la lactosa presente en las cuatro fórmulas cristalizó completamente entre las semanas 1 y 2 de almacenamiento a 58 % HR y 25°C . Teniendo en cuenta que la a_w de las muestras al día 7 varió entre 0,43 y 0,49, este resultado coincide con Haque & Roos (2005a), quienes observaron cristalización en mezclas de lactosa:proteína 5:1 (similar a la relación presente en las fórmulas modelo), en las muestras almacenadas a $\text{HR} \geq 44,1\%$. En la misma línea, Tham et al. (2016) reportaron que la cristalización de lactosa en fórmulas infantiles comerciales ocurrió a $a_w \geq 0,428$.

A su vez, se identificó la presencia de cristales de α -lactosa monohidrato y de mezcla anhidra de α - y β -lactosa en las cuatro fórmulas modelo, según información bibliográfica. Estudios previos realizados en condiciones similares a las de esta tesis también han reportado la presencia de α -lactosa monohidrato y mezcla anhidra de α - y β -lactosa en relación molar 5:3. Jouppila et al. (1998) investigaron los efectos del tiempo y HR de almacenamiento en las formas cristalinas producidas a partir de lactosa amorfa liofilizada. Los autores concluyeron que en las muestras

almacenadas a 53,8, 66,2 y 76,4 % HR predominaron las formas α -lactosa monohidrato y mezcla de α -/ β -lactosa en relación molar 5:3, y sólo detectaron cristales de β -lactosa anhidra en las muestras almacenadas a 44,4 % HR, que es inferior a la utilizada en la presente tesis. Los mismos autores en un trabajo anterior, estudiaron el efecto del tiempo y la HR durante el almacenamiento, en la cristalización de leche descremada en polvo y determinaron que a HR= 55 % la cristalización ocurrió principalmente como mezcla α -/ β -lactosa en relación molar 5:3, obteniendo otras formas cristalinas (α -lactosa anhidra estable, mezcla anhidra α -/ β -lactosa en relación molar 4:1, α -lactosa monohidrato) a HR mayores (76,4 y 85,5 %), pero no detectaron β -lactosa anhidra en ningún caso (Jouppila et al., 1997). Haque & Roos (2005a) determinaron que las mezclas de lactosa/WPI y lactosa/caseinato de sodio en relación 5:1 (similar a las presentes en las fórmulas modelo) obtenidas por secado spray y almacenadas a 54,5 % HR, cristalizaron mayoritariamente como α -lactosa monohidrato. Tham et al. (2016) obtuvieron un aumento significativo de la intensidad de los picos a 19,1° y 20,1° en fórmulas infantiles comerciales, al aumentar la a_w de 0,33 a 0,428, que coincide con los valores de a_w alcanzados entre las semanas 1 y 2 de almacenamiento en la presente tesis. Los autores reportaron que la intensidad del pico a 20,1° fue mayor que a 19,1° (al igual que lo observado en la Figura 5.13), aunque observaron un descenso de la intensidad a 20,1° a a_w = 0,529, que no parece haberse obtenido en este estudio.

De acuerdo con múltiples reportes bibliográficos, los cristales de α - β -lactosa obtenidos corresponderían a una forma reportada como cristales de lactosa con relación molar α : β = 5:3 (Biliaderis et al., 2002; Drapier-Beche et al., 1998; Fan & Roos, 2015; Haque & Roos, 2005a; Jouppila et al., 1997; Nijdam et al., 2007; Saffari & Langrish, 2014). Sin embargo, es necesario señalar que no existen reportes ni de difracción de polvo de una fase pura ni de la estructura cristalina de cristales con dicha relación molar en las bases de datos del International Centre for Diffraction Data (ICDD, 2013) ni en la Cambridge Structural Database (CSD, 2021) (Groom et al., 2016). Lo que sugiere que la forma de lactosa con relación α : β = 5:3 no existe realmente, siendo α - β -lactosa o una mezcla de esta fase con otras formas anhidras reportadas para la α -lactosa. De hecho, en la actualidad no existe consenso sobre la existencia de cristales compuestos de α - y β -lactosa anhidra (Hourigan et al., 2013).

Luego de 12 semanas de almacenamiento en envase hermético, las cuatro fórmulas fueron completamente amorfas, como se observa en los difractogramas correspondientes (Figura 5.14). Para cada muestra, los diagramas obtenidos al tiempo 0 presentaron únicamente los picos correspondientes al patrón interno L-valina, con el que se mezcló cada muestra antes de realizar el ensayo, mientras que los diagramas obtenidos a las 12 semanas no presentaron picos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por DSC (Tablas 5.4 y 5.5). Durante dicho período, la a_w de las fórmulas varió entre 0,1 y 0,3 (Figura 5.10A) y la temperatura se mantuvo en 25 °C. Este resultado coincide con los reportados por Tham et al. (2017), quienes almacenaron fórmulas

infantiles comerciales en su envase cerrado a 25, 45 y 60 °C durante 8 semanas y no detectaron cristalización de la lactosa.

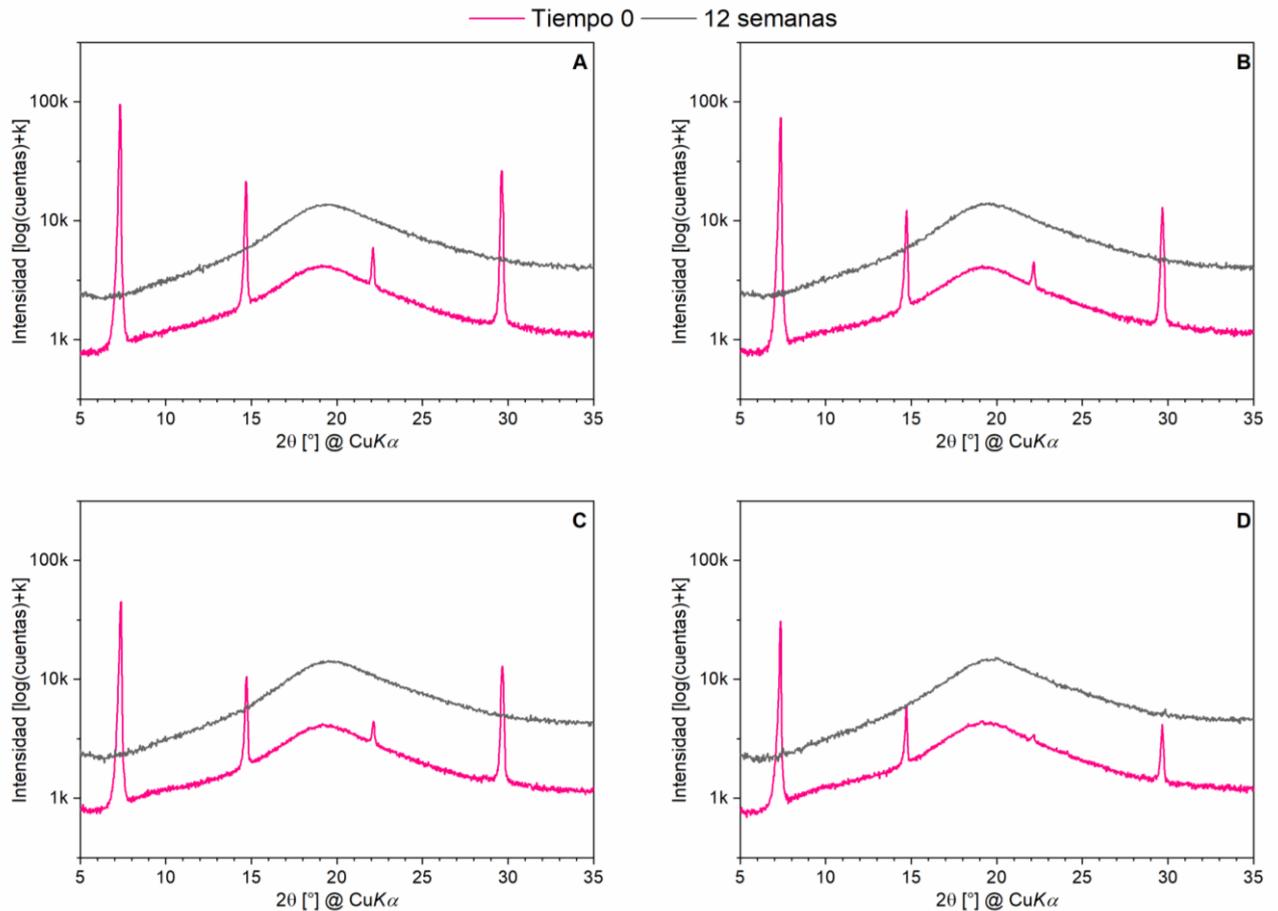


Figura 5.14. Diagramas obtenidos por difracción de rayos X de las fórmulas modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D) antes del almacenamiento (tiempo 0) mezcladas con L-valina y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.

4.1.4. Grasa libre superficial

Durante la producción de las fórmulas por mezclado en húmedo y secado spray, la emulsificación y encapsulación de los lípidos son claves para la obtención de polvos con propiedades físicas estables y mínima oxidación. En una situación ideal, se obtienen fórmulas con gotas de grasa pequeñas envueltas por la matriz encapsulante (compuesta por carbohidratos y proteínas), lo que reduce la reactividad de la fase grasa con el ambiente circundante (HR y temperatura) y retrasa la transferencia del material encapsulado a la superficie. Las propiedades de la emulsión (distribución del tamaño de la gota de aceite y viscosidad) y las condiciones de producción tienen efectos significativos sobre la eficiencia de la encapsulación, que puede estimarse a través de la medida de la GLS, que refiere a los componentes lipídicos que pueden encontrarse en la superficie del polvo cuando no fueron adecuadamente encapsulados. Cuando las fórmulas infantiles son

sometidas a condiciones de almacenamiento indeseadas, la GLS puede reducir la calidad del producto, favorecer el *caking* y aumentar la susceptibilidad a la oxidación, lo que lleva a la producción de rancidez y *off-flavours* (Tham et al., 2017).

Los resultados de GLS durante el almacenamiento se presentan en la Figura 5.15.

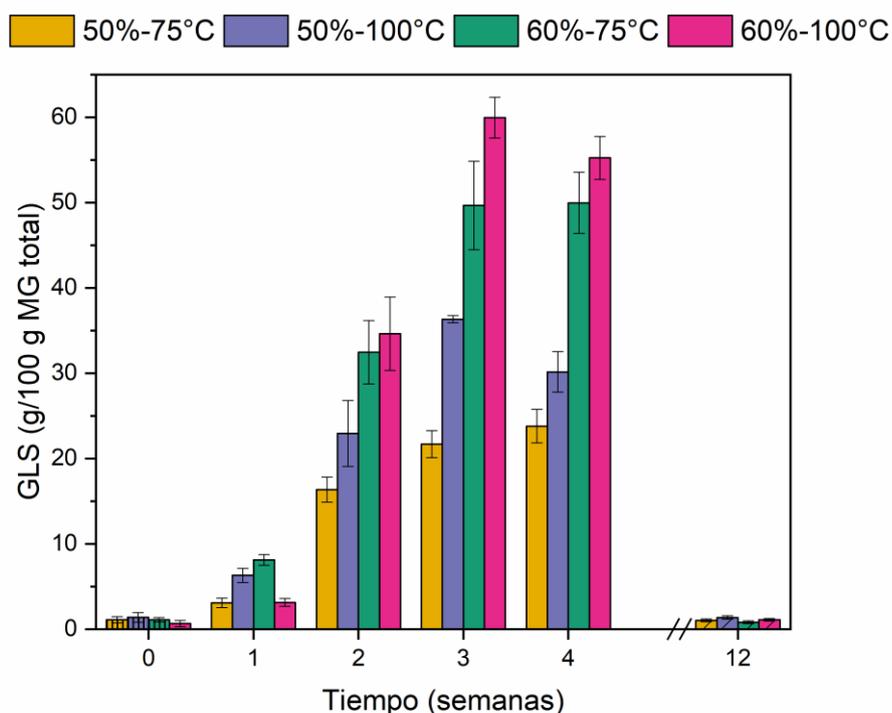


Figura 5.15. Grasa libre superficial de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).

Las barras representan la desviación estándar (n = 3).

Antes del almacenamiento (tiempo 0), el contenido de GLS varió entre 0,65 y 1,10 g/100 grasa total, no detectándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las fórmulas. Los resultados obtenidos son del mismo orden que los que habían sido obtenidos en los polvos frescos (recién producidos), para los que tampoco se habían detectado diferencias significativas entre muestras, y que se presentaron en el inciso 4.1.1 del Capítulo 4, a pesar de las variaciones en la metodología de análisis, y del proceso de congelado y descongelado que sufrieron las muestras entre ambos ensayos.

En todas las fórmulas analizadas, el contenido de GLS aumentó durante el almacenamiento a alta HR y en todas ellas se obtuvo un incremento significativo ($P < 0,05$) a la primera semana (Figura 5.15). Al cabo de 7 días de almacenamiento a 58 % HR, 60%-75°C presentó la mayor concentración de GLS ($8,1 \pm 0,6$ %), seguida por 50%-100°C ($6,3 \pm 0,8$ %). Las fórmulas 50%-75°C ($3,1 \pm 0,6$ %) y 60%-100°C ($3,1 \pm 0,5$ %) presentaron la menor GLS, no detectándose

diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas. Por lo tanto, durante esa primera semana de almacenamiento bajo condiciones adversas, pero en la que la lactosa aún se encontraba en estado amorfo, la velocidad de migración de la grasa parece haber estado dominada por las características de las emulsiones. De acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (4.6.3), 60%-75°C era la fórmula con menor estabilidad de emulsión debido a la floculación de sus gotas de aceite y 50%-100°C presentaba las gotas de mayor diámetro.

Sin embargo, el salto más pronunciado en el contenido de grasa libre se obtuvo entre las semanas 1 y 2 de almacenamiento a 58 % HR, dado que el valor de GLS pasó de 3-8 g/100 g grasa total al día 7, a 16-35 g/100 g grasa total, al día 14. Este salto en la GLS de las cuatro fórmulas coincide con el momento de cristalización de la lactosa (Figura 5.13). El aumento de la GLS como consecuencia de la cristalización de la lactosa en polvos lácteos ha sido demostrado previamente (Aguilar & Ziegler, 1994; Masum, Chandrapala, et al., 2020b; McCarthy et al., 2013; Vega et al., 2007). La formación de cristales de lactosa puede dañar las gotas de grasa favoreciendo su liberación y migración a la superficie de la partícula (Vignolles et al., 2007). En todos los puntos de análisis posteriores a la cristalización de la lactosa (14, 21 y 28 días), las muestras 60 % presentaron valores de GLS significativamente mayores ($P < 0,05$) que las muestras 50 %. Al cabo de los 28 días de almacenamiento a alta HR, las fórmulas 50 % presentaban 24-30 % de su grasa total libre, mientras que en las fórmulas obtenidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST, la GLS representaba 50-55 % de la materia grasa total (Figura 5.15). Los resultados de a_w y humedad (Figura 5.10) sugirieron que las muestras 60 % presentaron mayor velocidad de absorción de agua durante el almacenamiento, lo que probablemente aceleró la disminución de Tg y cristalización de lactosa. De hecho, Masum, Chandrapala et al. (2020a) estudiaron el almacenamiento de fórmulas infantiles bajo distintas condiciones de HR y temperatura y encontraron una correlación entre la Tg y la GLS: muestras con menor Tg presentaron mayor GLS y viceversa.

En el caso de las muestras almacenadas en envase cerrado, al cabo de las 12 semanas las fórmulas promediaron 0,8-1,4 g/100 grasa total y ninguna de las cuatro muestras sufrió un incremento significativo ($P > 0,05$). Tham et al. (2017) no observaron un incremento significativo de la GLS luego de almacenar fórmulas infantiles comerciales en su lata cerrada durante 6 semanas a 25 °C. Considerando que, en el presente estudio, las fórmulas a las 12 semanas de almacenamiento eran completamente amorfas, este resultado refuerza la teoría de que la principal causa del aumento de GLS en las fórmulas fue la cristalización de la lactosa. Saxena et al. (2020) investigaron la relación entre la cristalización de la lactosa y la GLS durante el almacenamiento de distintos tipos de fórmulas infantiles comerciales y encontraron que, para el caso de las fórmulas producidas con proteínas no hidrolizadas, similares a las investigadas en esta tesis, la GLS aumentó exponencialmente con el grado de cristalización de la lactosa.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de GLS obtenidos, se puede inferir que en condiciones de almacenamiento herméticas (envase cerrado) a temperatura ambiente, los polvos son lo suficientemente estables durante 3 meses como para no obtener migraciones significativas de grasa a la superficie. Por otro lado, bajo condiciones de almacenamiento adversas (alta HR), mientras la lactosa está en estado amorfo, la velocidad de migración de la grasa estaría controlada principalmente por las características de la emulsión, obteniéndose mayor velocidad de liberación de lípidos en aquellos polvos obtenidos a partir de emulsiones más inestables (por presentar floculación o gotas de mayor tamaño). En cambio, cuando se alcanzan valores de a_w lo suficientemente altos y ocurre la cristalización de la lactosa, las características de la emulsión dejan de ser el fenómeno determinante de la GLS, ocurriendo un aumento muy rápido de la GLS como consecuencia de la alteración de la matriz encapsulante durante la formación de cristales. En la Figura 5.16 se presentan las micrografías obtenidas por CLSM para las cuatro fórmulas modelo. En la Figura 5.16A se pueden observar las imágenes de las fórmulas antes de su almacenamiento. En las fórmulas que habían sido pasteurizadas a 100 °C se observan grandes agregados proteicos, en coincidencia con el alto grado de desnaturalización obtenido para dichas muestras en el Capítulo 3. Al finalizar el almacenamiento en condiciones de alta HR (Figura 5.16B), en las cuatro fórmulas se observó un importante aumento de la GLS, que se advierte como una mayor presencia de gotas de aceite liberadas de la matriz proteica. Esta observación coincide con los resultados obtenidos al cuantificar la GLS (Figura 5.15). A su vez, si bien no se realizó un análisis cuantitativo de las imágenes, en las fórmulas 60%-75°C y 60%-100°C parecería haber una mayor densidad de gotas de grasa libre que en las fórmulas 50 %, lo que también coincidiría con los resultados de cuantificación de la GLS. No se observó incremento en la GLS al cabo del almacenamiento en envase hermético, en ninguna de las cuatro fórmulas (Figura 5.15C).

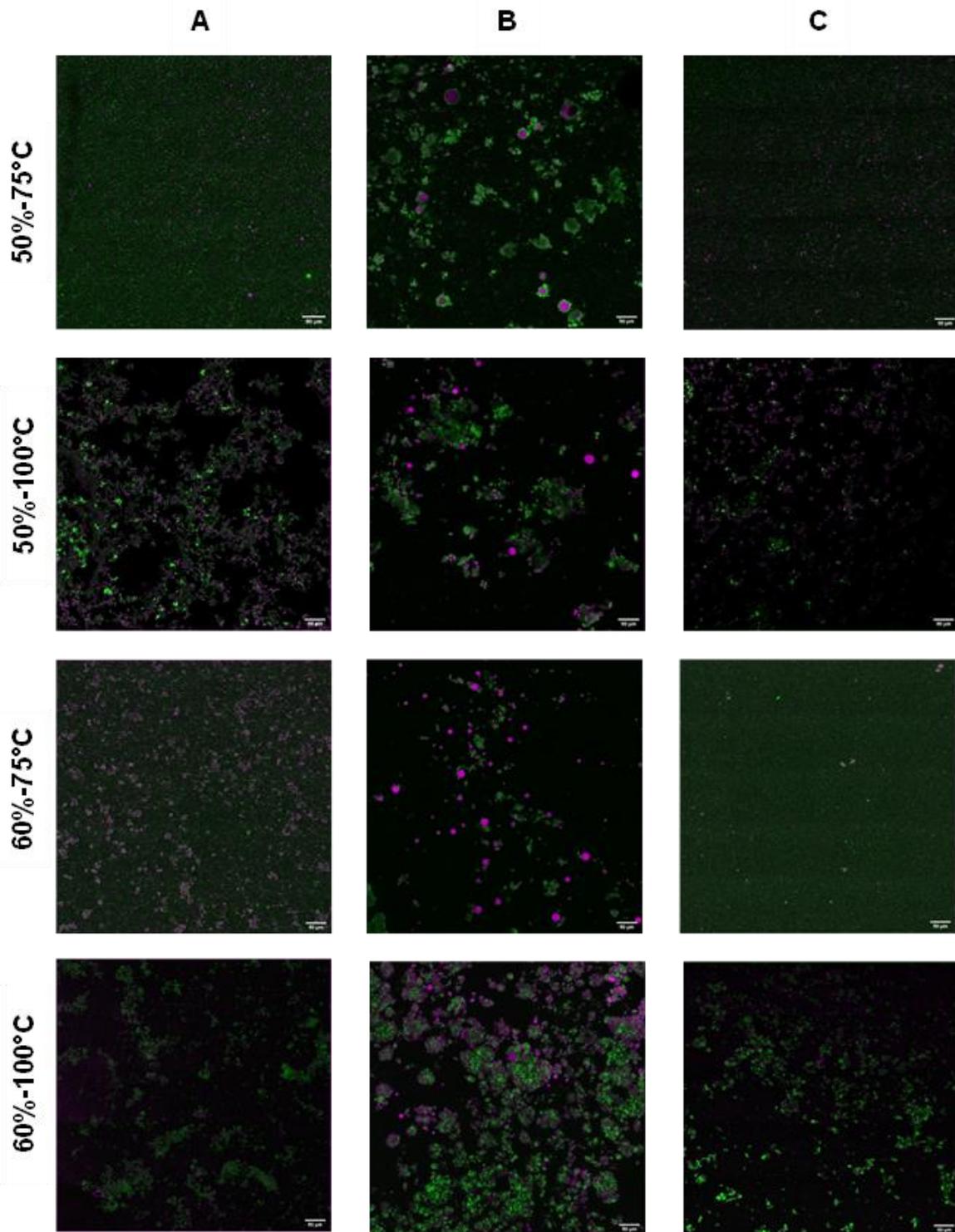


Figura 5.16. Micrografías obtenidas por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de las fórmulas modelo en polvo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, antes de su almacenamiento (A), luego de 28 días a 25 °C y 58 % HR (B) y luego de 12 semanas a 25 °C en envase hermético (C).

La grasa se marcó con Rojo Nilo y aparece en color magenta y las proteínas se marcaron con Fast Green y aparecen en verde. La barra indica 50 µm.

4.1.5. Color

En la Figura 5.17 se presentan los cambios de color de las distintas fórmulas durante el almacenamiento. Una disminución en L^* indica la pérdida de luminosidad u oscurecimiento de las muestras, un incremento del parámetro a^* indica un aumento del color rojo e incrementos en b^* e IP indican aumento del color amarillo o marrón, por lo que suelen utilizarse para evaluar el desarrollo de la reacción de Maillard en productos lácteos (Cheng et al., 2019; Chudy et al., 2015; Norwood, Le Floch-Fouéré, et al., 2016).

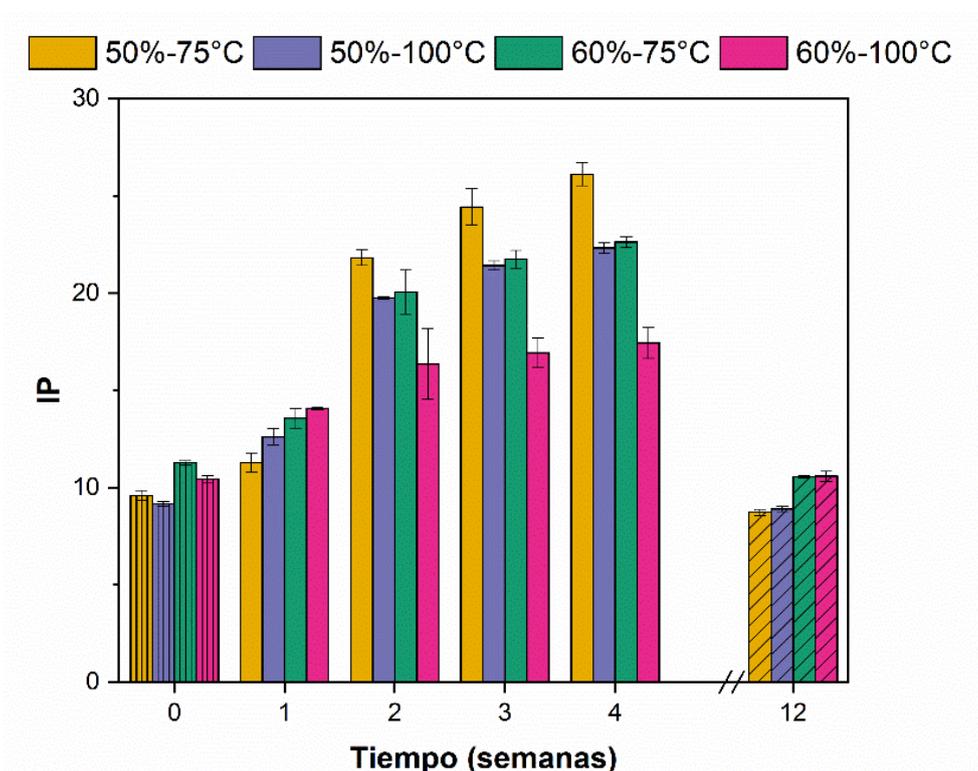


Figura 5.17. Índice de pardeamiento (IP) de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).

Las barras representan la desviación estándar (n = 12).

Los cambios en el IP suelen utilizarse como indicadores del desarrollo de pardeamiento no enzimático (Saxena et al., 2021a). Saxena et al. (2021b) encontraron una correlación lineal entre IP y la concentración de hidroximetil furfural (producto formado durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard) durante el almacenamiento de fórmulas infantiles. En líneas generales, como se observa en la Figura 5.17, durante el almacenamiento a alta HR las muestras tendieron a aumentar su IP. Esta tendencia coincide con estudios previos, en los que se observaron aumentos en IP durante el almacenamiento de polvos lácteos (Norwood, Chevallier, et al., 2016; Saxena et al., 2021a, 2021b). En el caso de la fórmula 50%-75°C, el IP aumentó significativamente ($P < 0,05$) semana a semana durante su almacenamiento a alta HR. En las fórmulas 50%-100°C y 60%-

75°C, IP aumentó a las semanas 1 y 2 y luego se estabilizó hasta el final del almacenamiento. Por último, en la fórmula 60%-100°C hubo un aumento significativo a la semana 1, no hubo diferencias significativas entre el IP de las semanas 1 y 2 y luego se mantuvo estable hasta el final del almacenamiento (Figura 5.17).

El salto más importante de IP se obtuvo entre los 7 y 14 días de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR, siendo este salto más y menos pronunciado en 50%-75°C y 60%-100°C, respectivamente (Figura 5.17). A ese tiempo ocurrió también la cristalización de la lactosa en todas las muestras (Figura 5.13, Tablas 5.4 y 5.5). Thomsen et al. (2005) explicaron la interrelación entre la cristalización de la lactosa y las reacciones de pardeamiento no enzimático en leche en polvo. En sistemas secos, tanto la reacción de Maillard como la cristalización de la lactosa se aceleran al aumentar la a_w . A su vez, la cristalización de la lactosa aumenta la a_w (Figura 5.10A), y durante las etapas tempranas de la reacción de Maillard se producen moléculas de agua. Por lo tanto, debido a los cambios en la a_w , tanto la cristalización de la lactosa como la reacción de Maillard probablemente se autocatalizan y se favorecen mutuamente. En coincidencia con los resultados obtenidos durante el presente estudio, Phosanam et al. (2020) reportaron mayor grado de pardeamiento no enzimático (dado por un incremento en b^*) al aumentar el grado de cristalización de la lactosa, tanto en leche en polvo entera como descremada. Por otro lado, entre los 7 y 14 días también se registró un salto importante en la GLS (Figura 5.15), y el cambio en la composición superficial de las partículas de polvo también podría afectar su color.

Tras el almacenamiento en condiciones herméticas, las fórmulas 60 % presentaron valores más altos ($P < 0,05$) de IP que las fórmulas 50 %, lo que podría explicarse por la diferencia de tamaño de partícula de los polvos (Capítulo 4, 4.1.2). Analizando los cambios del IP obtenidos en cada fórmula entre los tiempos 0 y 12 semanas, se observó que la diferencia dependió de la temperatura a la que se había pasteurizado la mezcla húmeda. Mientras que aquellas pasteurizadas a 100°C (50%-100°C y 60%-100°C) no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los valores de IP luego de 3 meses de almacenamiento hermético, las fórmulas que habían sido pasteurizadas a 75°C (50%-75°C y 60%-75°C) presentaron un aumento significativo ($P < 0,05$) del IP. Esta diferencia de comportamiento entre las muestras 75 °C y 100 °C, no se explica por diferencias en la GLS ni por la cristalización de la lactosa. Al analizar los polvos frescos, se había obtenido un contenido de lisina disponible significativamente más bajo en las muestras 100 °C (Capítulo 3, 4.7). Por lo tanto, un motivo para haber obtenido más cambios en el color de las fórmulas 75 °C podría ser que las fórmulas 100 °C ya habían presentado ese cambio de color durante el procesamiento, mientras que en 75°C se obtuvo en estas primeras semanas de almacenamiento.

Capítulo 5

4.1.6. Características físicas macroscópicas

En las Figuras 5.18 y 5.19 se presentan fotografías de las cuatro fórmulas a lo largo del almacenamiento a alta HR y en bolsa hermética, respectivamente.

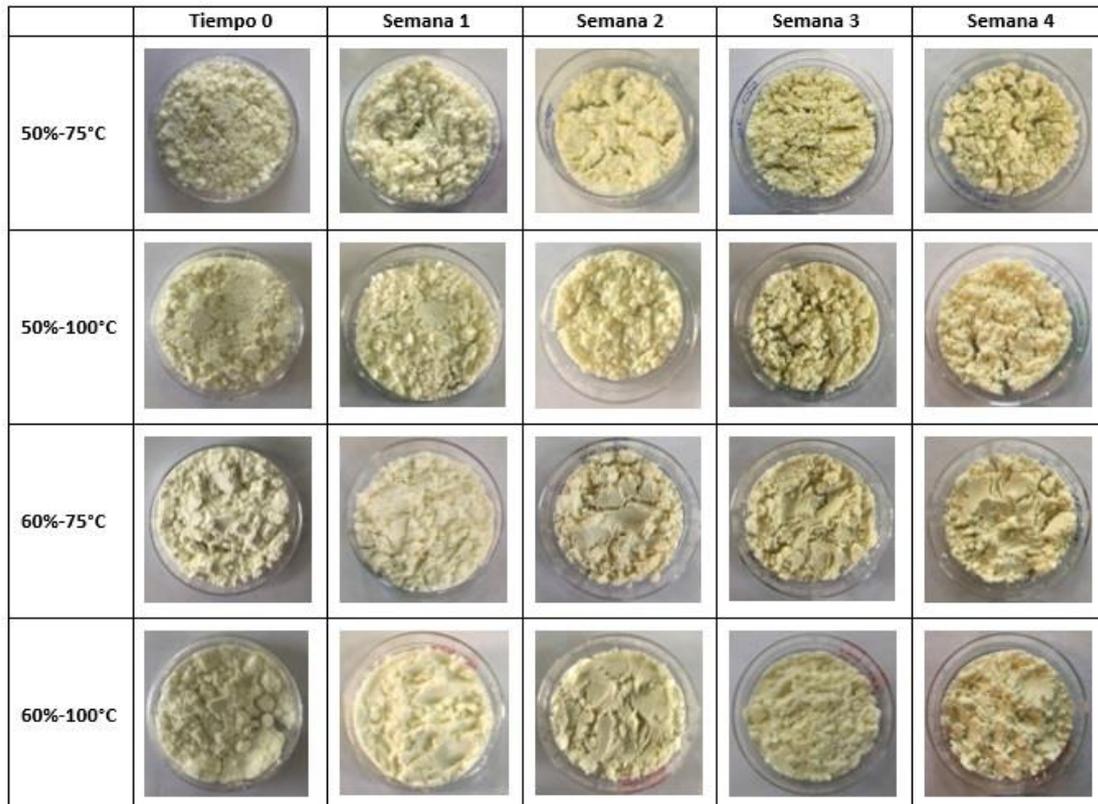


Figura 5.18. Fotografías de las fórmulas infantiles modelo durante su almacenamiento a 58 % HR y 25 °C.

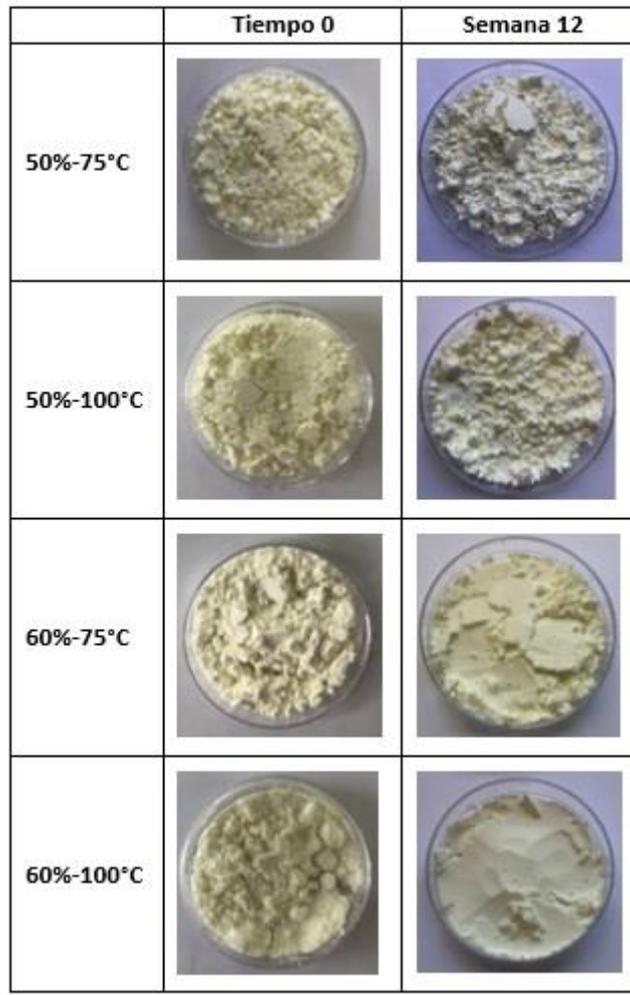


Figura 5.19. Fotografías de las fórmulas infantiles modelo durante su almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.

Inicialmente, las muestras se presentaron como polvos secos con formación de algunos aglomerados de partículas generados por la cohesividad de los polvos, que había sido determinada al evaluar sus propiedades de flujo (Capítulo 4, 4.3). Estos polvos podían fluir al mover la placa que los contenía y los aglomerados se separaban fácilmente al presionarlos con una espátula. Conforme transcurrieron las semanas de almacenamiento en atmósfera a 58 % HR, se observó un cambio en el color de las fórmulas (Figura 5.17). Sin embargo, el cambio más notorio estuvo dado por el aumento de humedad y apelmazamiento de los polvos, que formaron una única masa compacta desde la semana 1. A los 7 días de almacenamiento, ya se había perdido la individualidad de las partículas en las cuatro fórmulas formándose una masa unida con la forma del contenedor. Al presionarla, se advertía una textura gomosa y pegajosa. A partir de los 14 días, esta forma compacta pasó a ser un sólido no deformable (que podía quebrarse al aplicarle la suficiente fuerza), perdiendo la gomosidad y pegajosidad, ocurriendo lo que se conoce comúnmente como *caking*. Los cambios observados en las fórmulas entre los días 0, 7 y 14,

coinciden con el mecanismo esquematizado por Phosanam, Chandrapala, Zisu, et al. (2021) para explicar el *caking* (Figura 5.20).

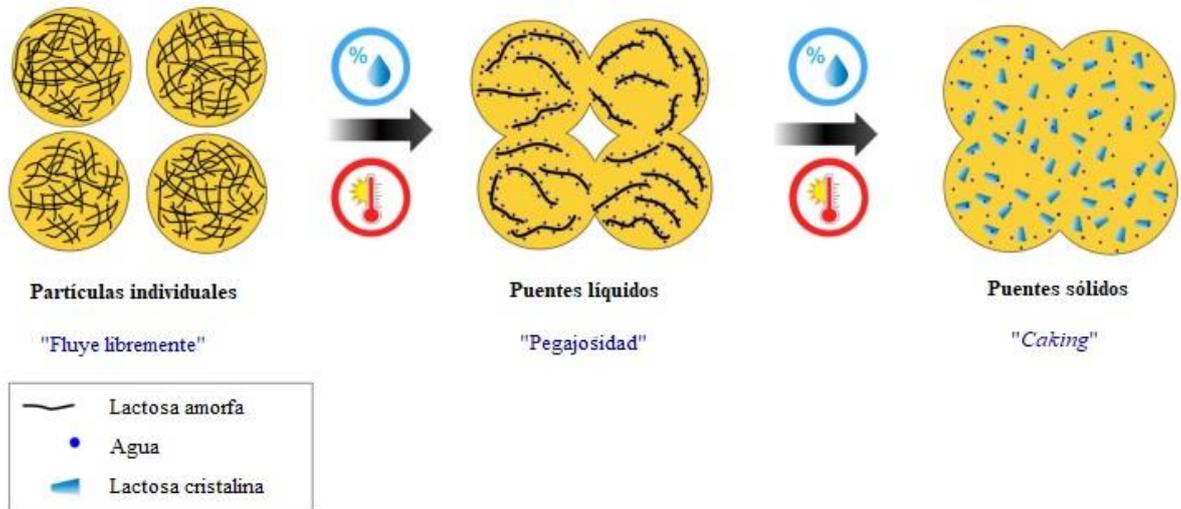


Figura 5.20. Representación esquemática de la pegajosidad y *caking* en polvos con alto contenido de azúcar (adaptada de: Phosanam, Chandrapala, Zisu, et al. (2021)).

El *caking* en la leche en polvo generalmente ocurre por un mecanismo que involucra tres etapas. En primer lugar, la lactosa absorbe agua, en segundo lugar, las partículas se aglomeran y, finalmente, ocurre la cristalización y solidificación de, al menos, parte de la lactosa (Phosanam, Chandrapala, Zisu, et al., 2021). En polvos con componentes amorfos, como la lactosa en las fórmulas, el aumento de la humedad genera una disminución de la Tg. Por encima de la Tg las partículas de polvo se vuelven “pegajosas”, lo que ocurre cuando el polvo alcanza el “*sticky point*”, que suele estar 10-20 °C por encima de la Tg. La pegajosidad se genera debido a la movilidad molecular de los componentes amorfos, que permiten que las superficies interactúen y se deformen, aumentando en gran medida la cohesividad del polvo. Este flujo que ocurre a temperaturas por encima de la Tg, permite que ocurra el proceso de sinterización en el que las moléculas se pueden mover hacia el espacio entre dos partículas adyacentes, formándose puentes líquidos entre las partículas (Fitzpatrick, 2013). Luego, al cristalizar los compuestos amorfos disueltos en los puentes líquidos, se forman los puentes sólidos (Carpin et al., 2016).

En cambio, durante el almacenamiento en bolsa hermética, ninguna de las cuatro fórmulas presentó diferencias advertibles a la vista o el tacto (Figura 5.17). En ese punto, las partículas mantenían su individualidad y podían fluir, lo que se explicaría por su baja a_w , el estado amorfo vítreo de la lactosa y el no incremento de la GLS, reportados previamente.

4.2. Microestructura

Con el objetivo de evaluar los cambios en la microestructura superficial de las fórmulas durante el almacenamiento, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido antes de su almacenamiento (tiempo 0), luego de 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento a alta HR y luego de 12 semanas de almacenamiento en condiciones herméticas. La Figura 5.21 es una recopilación de las micrografías obtenidas a lo largo del almacenamiento a 58 % HR, en dos niveles de magnificación.

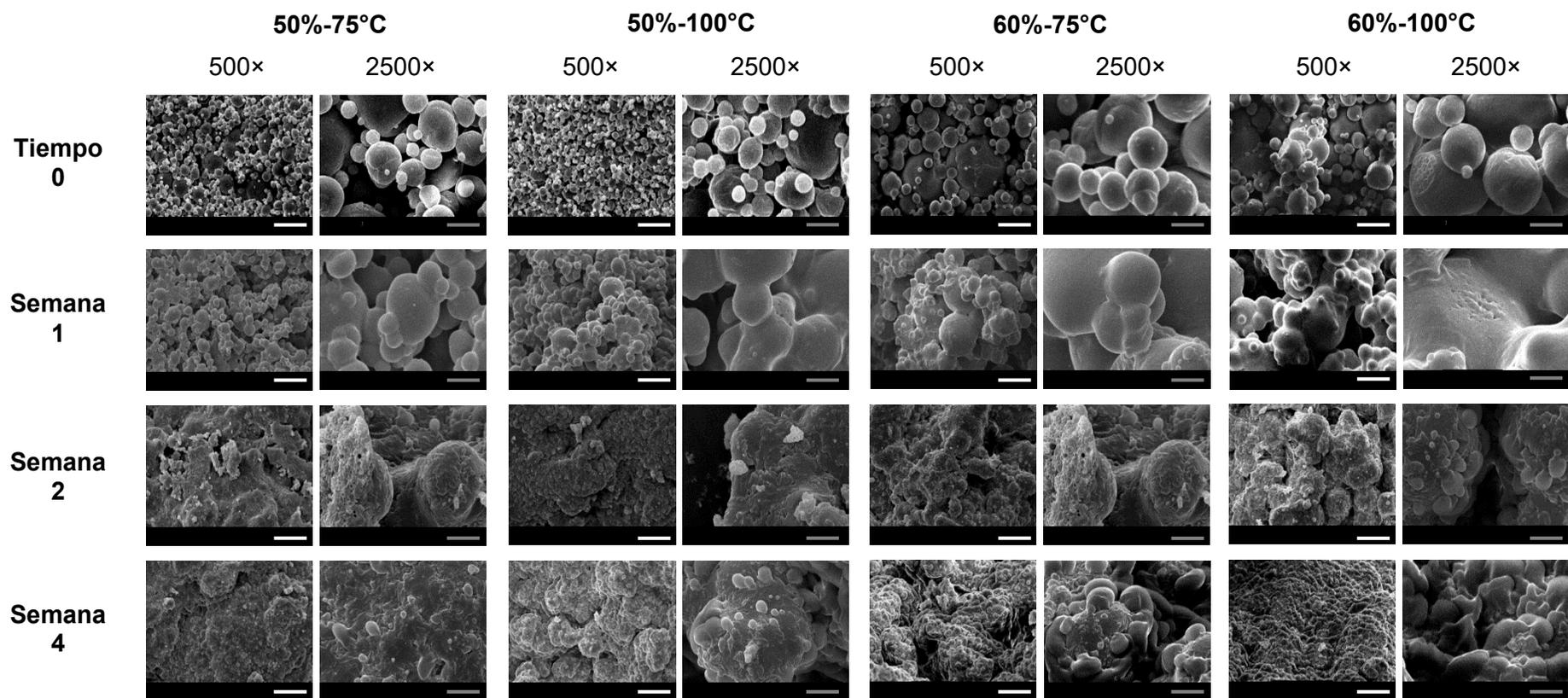


Figura 5.21. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, en dos niveles de magnificación, $\times 500$ y $\times 2500$, antes de su almacenamiento (tiempo 0) y luego de 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR.

Las barras blancas representan 50 μm y las barras grises representan 10 μm .

Inicialmente (tiempo 0), al igual que se había advertido en los polvos frescos (Capítulo 4, 4.1.4), las fórmulas presentaron partículas individuales de forma esférica. Cada muestra presentó diámetros de partícula variables, aunque se pudo observar un tamaño medio de partícula creciente en el siguiente orden: 50%-75°C < 50%-100°C < 60%-75°C < 60%-100°C. Además, en las micrografías tomadas a 500× de magnificación se observó un mayor grado de aglomeración en las fórmulas 60%-75°C y 60%-100°C, como se discutió en el Capítulo 4. Todas las fórmulas presentaron partículas con superficies predominantemente lisas, aunque en las muestras 60 % se detectaron regiones porosas, atribuidas a la presencia de partículas rotas que expusieron su interior poroso. Esta diferencia a nivel de la microestructura superficial inicial pudo haber explicado la mayor velocidad de adsorción de agua obtenida para 60%-75°C y 60%-100°C (Figura 5.10). Luego de una semana de almacenamiento en atmósfera de alta HR, se pudo observar claramente la presencia de puentes líquidos conectando las partículas. A esa altura, las partículas presentaban superficie lisa y todavía era posible distinguir su forma redondeada, pero estaban conectadas entre sí, habiéndose perdido su individualidad. Al cabo de dos semanas, en todas las fórmulas, la superficie pasó de lisa a rugosa y muy irregular, lo que se puede atribuir a la cristalización de la lactosa, y se perdió casi por completo la individualidad de las partículas. Murrieta-Pazos et al. (2011) publicaron micrografías obtenidas por SEM de leche entera en polvo almacenada a distintas HR y también obtuvieron un cambio de superficie lisa a rugosa al cristalizar la lactosa. Al igual que en la presente tesis, los autores no observaron cristales y lo atribuyeron a la presencia de grasa libre cubriendo la superficie, dado que sí detectaron gran presencia de cristales en forma de aguja (lactosa cristalizada) al almacenar leche descremada en polvo bajo las mismas condiciones.

Al cabo de las cuatro semanas de almacenamiento a alta HR, las fórmulas estaban completamente apelmazadas, no distinguiéndose la presencia de partículas individuales (Figura 5.21). Además, al observar las imágenes tomadas con magnificación 2500× se advierte la presencia de unas estructuras en forma de gotas, que también están presentes en la semana 2 pero en menor medida. La forma redondeada y la superficie lisa de esas prominencias sugiere que se trata de gotas de aceite.

Las imágenes de los polvos a las semanas 0 y 1 versus semanas 2 y 4, son muy similares a las reportadas en la bibliografía para fórmulas o leche en polvo entera amorfa o cristalizada (Murrieta-Pazos et al., 2011; Phosanam, Chandrapala, Zisu, et al., 2021; Saxena et al., 2019).

Las micrografías de las fórmulas almacenadas en condiciones herméticas se presentan en la Figura 5.22.

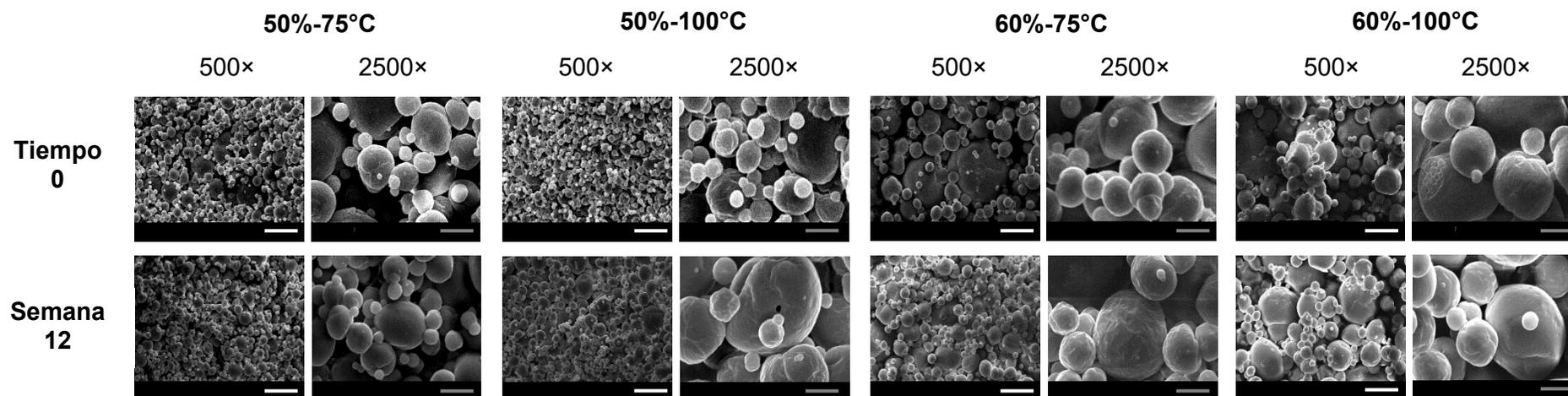


Figura 5.22. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas para las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C, en dos niveles de magnificación, $\times 500$ y $\times 2500$, antes de su almacenamiento (tiempo 0) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C.

Las barras blancas representan 50 μm y las barras grises representan 10 μm .

Luego de 12 semanas en bolsa hermética, las cuatro fórmulas seguían presentando partículas esféricas individuales de superficie relativamente lisa y no se observó la presencia de protuberancias detectadas a las 2 y 4 semanas de almacenamiento a alta HR. La microestructura observada coincide con los resultados presentados anteriormente, que demostraron que a las 12 semanas de almacenamiento hermético la lactosa presente en las fórmulas seguía en estado amorfo vítreo (Figura 5.14) con un nivel de a_w bajo (0,20-0,27) y sin haber aumentado significativamente el contenido de GLS respecto al tiempo 0. Por otro lado, comparando las imágenes obtenidas antes y después del almacenamiento en estas condiciones, se puede observar que a las 12 semanas la superficie de las partículas estaba más arrugada. Este cambio a nivel superficial parece haber sido más pronunciado en las muestras 60 %, que a su vez presentaron mayor a_w que las muestras 50 % a ese tiempo. Por lo tanto, ese arrugamiento podría explicarse por la adsorción de agua, que, aunque a bajos niveles, se había detectado al final del almacenamiento en bolsa hermética (Figura 5.10A).

Las imágenes obtenidas por SEM son consistentes con los resultados discutidos a lo largo del capítulo. Inicialmente los polvos tenían $a_w = 0,11-0,15$ (Figura 5.10A) y T_g inicial = 69-71 °C (Tabla 5.4), y se presentaban como partículas individuales conteniendo lactosa amorfa en estado vítreo. Al colocarlos en atmósfera a 25 °C y 58 % HR, luego de una semana, su a_w había aumentado a 0,43-0,49 (Figura 5.10A) y su T_g inicial había disminuido a 10-19 °C (Tabla 5.4). En ese momento la lactosa estaba en estado amorfo gomoso, generándose un importante descenso de la viscosidad y aumento de la movilidad molecular, formándose puentes líquidos entre las partículas de polvo y adquiriendo textura gomosa, tal como se observó macro y microscópicamente (Figuras 5.18 y 5.21). Considerando que la temperatura de almacenamiento era 25 °C, la diferencia entre la temperatura del polvo y la T_g inicial era 6-15 °C, dependiendo de la fórmula. Por lo tanto, o bien el *sticky point* se había alcanzado o se alcanzaría en los próximos días, cuando un sucesivo incremento de la a_w depreciara aún más la T_g . A las 2 semanas, la a_w había aumentado a 0,57-0,61 (Figura 5.10A) y la T_g no fue detectable (< 0 °C) (Tabla 5.4). En ese punto, la lactosa ya había cristalizado (Figura 5.13) y los puentes líquidos que unían las partículas se habían solidificado, ocurriendo el *caking*. En las fórmulas con al menos dos semanas de almacenamiento se observó por SEM la presencia de estructuras que parecen ser gotas de aceite, en coincidencia con el aumento de la GLS determinado a dicho tiempo (Figura 5.15), que pudo haber sido impulsado por la cristalización de la lactosa. A su vez, los resultados de a_w y humedad sugirieron una mayor velocidad de absorción de agua de las fórmulas 60 % durante el almacenamiento a HR = 58 %, que habría generado una mayor reducción de la T_g al cabo de 1 semana (Tabla 5.4), lo que podría haber redundado en una cristalización más rápida de dichas muestras. El análisis de la morfología superficial por SEM reveló que, al tiempo 0, las fórmulas

60 % presentaban mayor presencia de poros (dada por un mayor número de partículas partidas), lo que podría explicar la mayor velocidad de absorción de agua en dichas fórmulas.

En cambio, durante el almacenamiento en bolsa hermética, ninguna de las cuatro fórmulas presentó cambios advertibles a nivel macroscópico (Figura 5.17), lo que coincide con su baja a_w (Figura 5.10), el estado amorfo vítreo de la lactosa (Tabla 5.4 y Figura 5.13)) y el no incremento de la GLS (Figura 5.15), reportados previamente.

4.3. Solubilidad

La solubilidad de las fórmulas a lo largo del almacenamiento se presenta en la Figura 5.23.

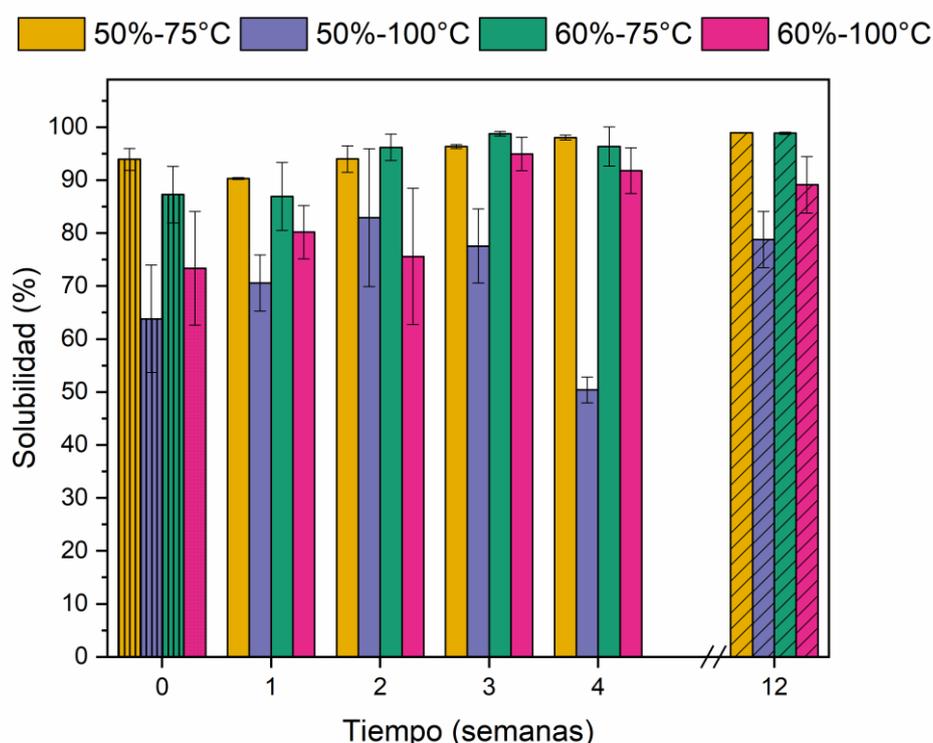


Figura 5.23. Solubilidad de las fórmulas infantiles modelo al tiempo 0 (barras con rayas verticales), luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 58 % HR y 25 °C (barras lisas) y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C (barras con rayas en diagonal).

Las barras representan la desviación estándar (n = 3).

Inicialmente, se observó una reducción aparente de la solubilidad en las fórmulas pasteurizadas a 100 °C. Sin embargo, en coincidencia con los resultados obtenidos para las fórmulas frescas (Capítulo 4), las diferencias entre muestras no fueron significativas ($P > 0,05$) al tiempo 0.

Analizando los resultados obtenidos durante el almacenamiento a alta HR, se observó que en general, la solubilidad de cada fórmula se mantuvo a lo largo de las 4 semanas de almacenamiento. Una excepción a este comportamiento se detectó para 50%-100°C, que mantuvo una solubilidad

relativamente constante durante las tres primeras semanas de almacenamiento a 58 % RH, y presentó una importante reducción en la cuarta semana (Figura 5.23). La solubilidad de 50%-100°C, que era $77,6 \pm 7,0$ % en la semana 3, se redujo significativamente ($P < 0,05$) a $50,4 \pm 2,4$ % en la semana 4. Así, comparando la solubilidad de las cuatro fórmulas a los 28 días de almacenamiento a alta HR, 50%-100°C presentó un valor significativamente menor que para las tres restantes, que presentaron solubilidades de entre 91 y 98 %.

Al cabo de las 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética, ninguna de las cuatro fórmulas presentó un cambio significativo ($P > 0,05$) en la solubilidad respecto al tiempo 0. Sin embargo, al comparar la solubilidad de las cuatro fórmulas con 12 semanas de almacenamiento se obtuvo un valor significativamente menor ($P < 0,05$) para 50%-100°C ($78,8 \pm 5,3$ %) que para las tres fórmulas restantes, cuya solubilidad varió entre 89 y 98 %.

La pérdida de solubilidad en polvos lácteos ha sido explicada por el entrecruzamiento de proteínas (Anema, Pinder, et al., 2006; Fan et al., 2018). El entrecruzamiento proteico refiere a la formación de enlaces covalentes entre cadenas polipeptídicas de una proteína (entrecruzamiento intramolecular) o entre proteínas (entrecruzamiento intermolecular) (Gerrard, 2002). Anema, Pinder et al. (2006) propusieron un mecanismo para explicar los cambios en la solubilidad del concentrado de proteínas de la leche en polvo (MPC85) durante el almacenamiento, según el cual, la formación de una red de proteínas entrecruzadas en la superficie de las partículas de polvo actúa como barrera impidiendo el ingreso de agua y la consecuente rehidratación. Los autores encontraron que la solubilidad se mantiene incambiada durante las primeras etapas de almacenamiento para luego reducirse rápidamente, lo que concuerda con la tendencia observada en 50%-100°C. De acuerdo con Anema, Pinder et al. (2006) el grado de entrecruzamiento de proteínas va aumentando durante el almacenamiento, pero la solubilidad sólo disminuye cuando el grado de entrecruzamiento es suficientemente alto y las superficies de las partículas se encuentran completamente entrecruzadas. Así, teniendo en cuenta que las partículas presentan distintos tamaños de partícula, no todas completarán el entrecruzamiento al mismo tiempo.

Considerando que las variaciones en la solubilidad de las fórmulas durante el almacenamiento no correlacionan con sus niveles de GLS ni con la cristalización de la lactosa, y que la tendencia observada en la solubilidad de 50%-100°C (estabilidad durante las primeras tres semanas de almacenamiento seguida por una disminución significativa en la semana 4) coincide con la reportada por Anema, Pinder et al. (2006), se infiere que la pérdida de solubilidad está causada principalmente por el avance de las reacciones de entrecruzamiento proteico durante el almacenamiento. A pesar de que los análisis realizados no permiten concluir sobre la o las causas responsables de la pérdida de solubilidad obtenida en 50%-100°C, el hecho de que la reducción haya sido evidente antes en dicha muestras que en el resto de las fórmulas podría deberse a una combinación de factores, incluyendo el tratamiento térmico al que fue sometida la muestra antes

de su secado spray y el tamaño de partícula tanto del polvo fresco como de los agregados de partículas formados durante el almacenamiento como consecuencia del *caking*.

4.4. Digestibilidad

Finalmente, se estudió si las condiciones de producción y almacenamiento afectaron la digestibilidad de las fórmulas modelo en polvo. Para eso, las cuatro fórmulas modelo en polvo (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C) antes de su almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas de almacenamiento a 25 °C y 58 % HR y luego de 12 semanas de almacenamiento en bolsa hermética a 25 °C, fueron sometidas a un proceso de digestión *in vitro*, simulando la digestión en lactantes, y se determinó el grado de proteólisis y lipólisis.

4.4.1. Grado de proteólisis

A continuación, se presentan los resultados del efecto de la digestión gástrica e intestinal sobre el grado de hidrólisis proteica de las fórmulas almacenadas bajo distintas condiciones (Figura 5.24).

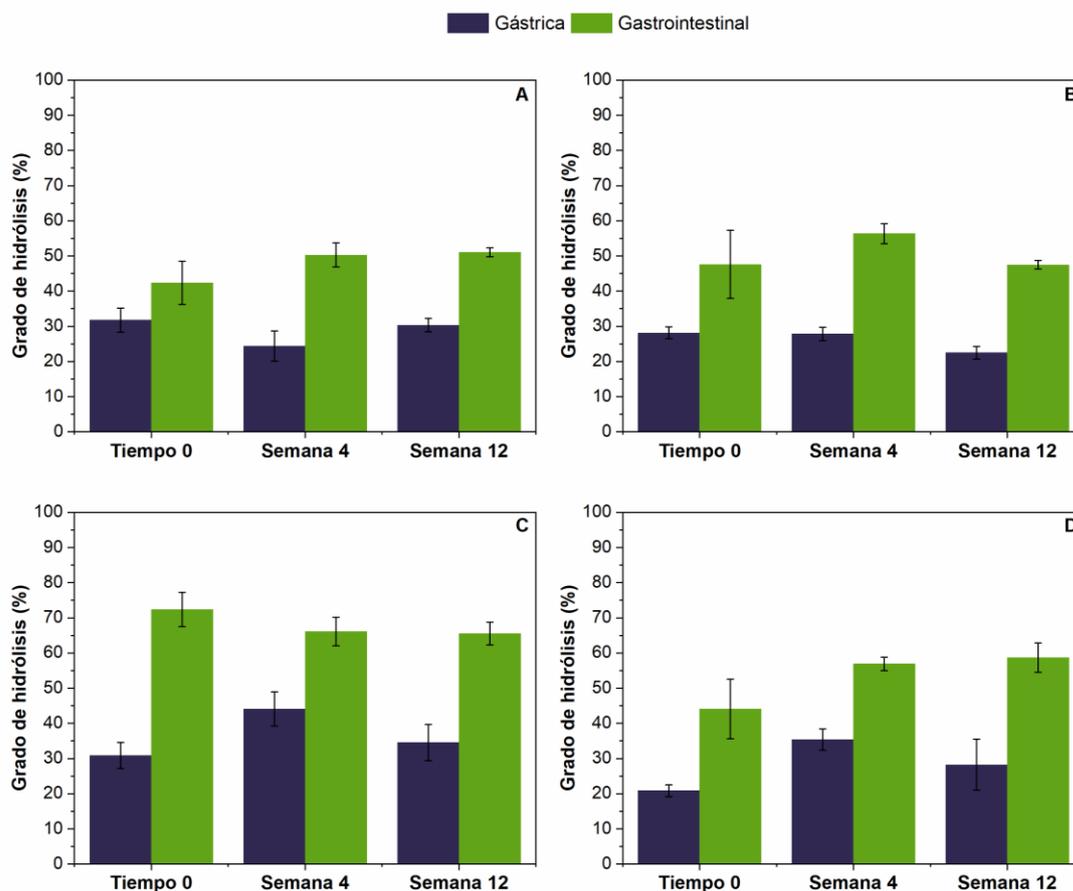


Figura 5.24. Grado de proteólisis (%) de las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 58 % HR y 25 °C y luego de 12 semanas en bolsa hermética a 25 °C, a los 60 min de digestión gástrica *in vitro* (gástrica) y luego de 60 min de digestión intestinal *in vitro* (gastrointestinal).

Las barras representan la desviación estándar (n = 6).

Las condiciones de digestión fueron seleccionadas de forma de simular el proceso que ocurre en recién nacidos a término, según Ménard et al. (2018). En la primera etapa (gástrica), la proteólisis ocurrió por acción de la enzima pepsina a 37 °C y pH= 5,3, durante 60 min. Al cabo de esta fase, las fórmulas presentaron 20-44 % de hidrólisis. Luego, durante la etapa intestinal llevada a cabo con pancreatina a 37 °C, pH= 6,6 y 60 min, la hidrólisis avanzó entre 10 y 42 % más. Así, al finalizar la digestión (60 min gástrica + 60 min intestinal) las fórmulas promediaron 42-72 % de hidrólisis proteica. Estos porcentajes de proteólisis coinciden con valores publicados previamente para fórmulas infantiles. Li et al. (2020) sometieron a leche fluida pasteurizada a un proceso de digestión gástrica dinámica *in vitro* y obtuvieron grados de proteólisis de ~15-30 % por OPA, luego de 60 min de digestión gástrica. Halabi et al. (2020) investigaron la digestibilidad *in vitro* estática de fórmulas infantiles con distinto perfil de WP sometidas a distintos tratamientos térmicos y obtuvieron valores de hidrólisis proteica cuantificadas por el método de OPA entre 30 y 60 % al cabo de 60 min de digestión intestinal.

Analizando individualmente las fórmulas, se observó que en ninguna de ellas el almacenamiento generó un impacto significativo sobre el grado de hidrólisis proteica durante la digestión. A su vez, en líneas generales, la fórmula 60%-75°C presentó mayor ($P < 0,05$) grado de hidrólisis proteica durante la digestión gastrointestinal en las tres condiciones de almacenamiento estudiadas. La mayor digestibilidad obtenida no se explica por el tratamiento térmico más suave aplicado durante la producción de dicha muestra, porque es el mismo al que se sometió a 50%-75°C.

4.4.2. Identificación de proteínas por SDS-PAGE

La cuantificación de los grupos amino libres da información sobre la cantidad de enlaces peptídicos que se hidrolizan durante la digestión, pero no brinda información sobre qué proteínas fueron hidrolizadas. Por lo tanto, las cuatro fórmulas modelo antes del almacenamiento (tiempo 0), a las 4 semanas de almacenamiento a 58 % y a las 12 semanas de almacenamiento en condiciones herméticas se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las fórmulas fueron analizadas antes de la digestión (G0), luego de la digestión gástrica (G60) y luego de la digestión intestinal (I60). El gel obtenido para la fórmula 50%-75°C antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas de almacenamiento a alta HR y luego de 12 semanas de almacenamiento hermético, en las distintas etapas de digestión, se presentan en la Figura 5.25. Cabe señalar que G0 corresponde a las fórmulas en el FGS (pH= 5,3) pero antes del agregado de las enzimas gástricas, como se señaló en la sección Materiales y Métodos del presente capítulo (3.6.1.3).

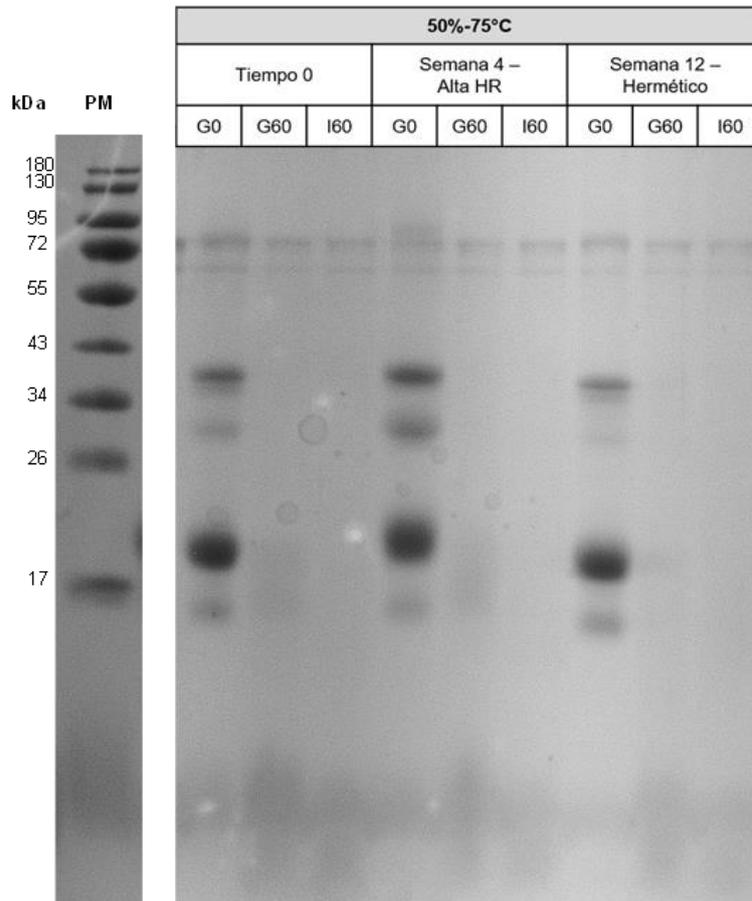


Figura 5.25. SDS-PAGE en condiciones reductoras de la fórmula infantil modelo 50%-75°C, antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 25 °C y 58 % HR (alta HR) y luego de 12 semanas en bolsa hermética y 25 °C (hermético), en distintos puntos de la digestión. G0: antes de la digestión, G60: luego de 60 min de digestión gástrica *in vitro*, I60: luego de 60 min de digestión gástrica + 60 min de digestión intestinal *in vitro*.

Las fórmulas contenían 60 % de WP, siendo las mayoritarias la β -Lg (~18 kDa), α -La (~14 kDa) y BSA (~66 kDa), y 40 % de caseínas. Estas proteínas ya habían sido identificadas por SDS-PAGE en las fórmulas reconstituidas no almacenadas en el Capítulo 3 (4.6.2), no detectándose diferencias entre fórmulas en el perfil electroforético obtenido bajo condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 5.25, donde se presentó el gel de la fórmula 50%-75°C como ejemplo, antes de la digestión (G0) se detectaron las bandas correspondientes a todas las proteínas de la leche mayoritarias (β -Lg, α -La, BSA, caseínas) en los tres puntos de almacenamiento. Se detectaron tres bandas correspondientes a caseínas, dos entre 34 y 43 kDa y una entre 26 y 34 kDa, que pueden atribuirse a α_s -, β - y κ -caseína, respectivamente (Figura 5.25).

En cuanto al efecto de la digestión en las distintas proteínas, al cabo de la digestión gástrica (G60) ya se observó una importante reducción de la intensidad de bandas en todas las fórmulas, junto con la aparición de bandas en la zona inferior del gel, correspondiente a péptidos de bajo peso

molecular. En todas las fórmulas, las bandas asociadas a caseínas antes de la digestión (G0), fueron imperceptibles luego de 60 min de digestión gástrica, lo que indica que fueron completamente digeridas por la pepsina. Las bandas correspondientes a β -Lg y α -La también desaparecieron en las fórmulas pasteurizadas a 100 °C al cabo de la digestión gástrica (G60) a los 3 tiempos de almacenamiento. Sin embargo, en las fórmulas tratadas a 75 °C se detectaron bandas tenues en la región correspondiente a β -Lg y α -La, indicando que las WP no habían sido digeridas por completo. Al finalizar la digestión (I60) no se detectaron bandas correspondientes a caseínas o WP en ninguna de las fórmulas a ninguno de los tiempos de almacenamiento (Figura 5.25).

Los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE al cabo de la digestión gástrica mostraron que las caseínas parecieran ser más susceptibles a la digestión que las proteínas del suero, en coincidencia con estudios previos sobre la digestión *in vitro* de fórmulas infantiles (Corrigan & Brodkorb, 2020; Phosanam, Chandrapala, Huppertz, et al., 2021). Se considera que la resistencia de las WP a la proteólisis gástrica está relacionada con su conformación, que se requiere para ejercer funciones fisiológicas específicas, mientras que las caseínas poseen una estructura abierta para ejercer funciones principalmente nutricionales, como proveer aminoácidos (van Lieshout et al., 2020).

En cuanto al efecto de las condiciones de producción y del almacenamiento sobre la digestibilidad, por un lado, se ha reportado que los tratamientos térmicos pueden aumentar la digestibilidad de las proteínas a través de su desnaturalización, y, por otro lado, algunas modificaciones inducidas por el calor o el almacenamiento, como las reacciones de entrecruzamiento, podrían reducir la digestibilidad (Wada & Lönnerdal, 2014). Los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron que el almacenamiento no afectó la digestibilidad. van Lieshout et al. (2020) realizaron una revisión sistemática para evaluar el efecto del procesamiento sobre la digestibilidad de las proteínas lácteas. Los autores reportaron que los estudios revisados coinciden en que la desnaturalización térmica de las proteínas del suero favorece su proteólisis gástrica, porque generan el desplegamiento de las proteínas globulares y consecuente exposición de los sitios de corte. Por otra parte, Wada & Lönnerdal (2014) sugirieron que el efecto beneficioso del tratamiento térmico sobre la digestibilidad podría verse contrarrestado por la formación de productos del entrecruzamiento proteico, como la LAL. Sin embargo, en su revisión, van Lieshout et al. (2020) encontraron resultados contradictorios, concluyendo que son necesarios más estudios para poder determinar si las reacciones de entrecruzamiento entre distintos aminoácidos reducen la digestibilidad proteica.

4.4.3. Grado de lipólisis

El grado de lipólisis obtenido en las fórmulas luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* se presenta en la Figura 5.26.

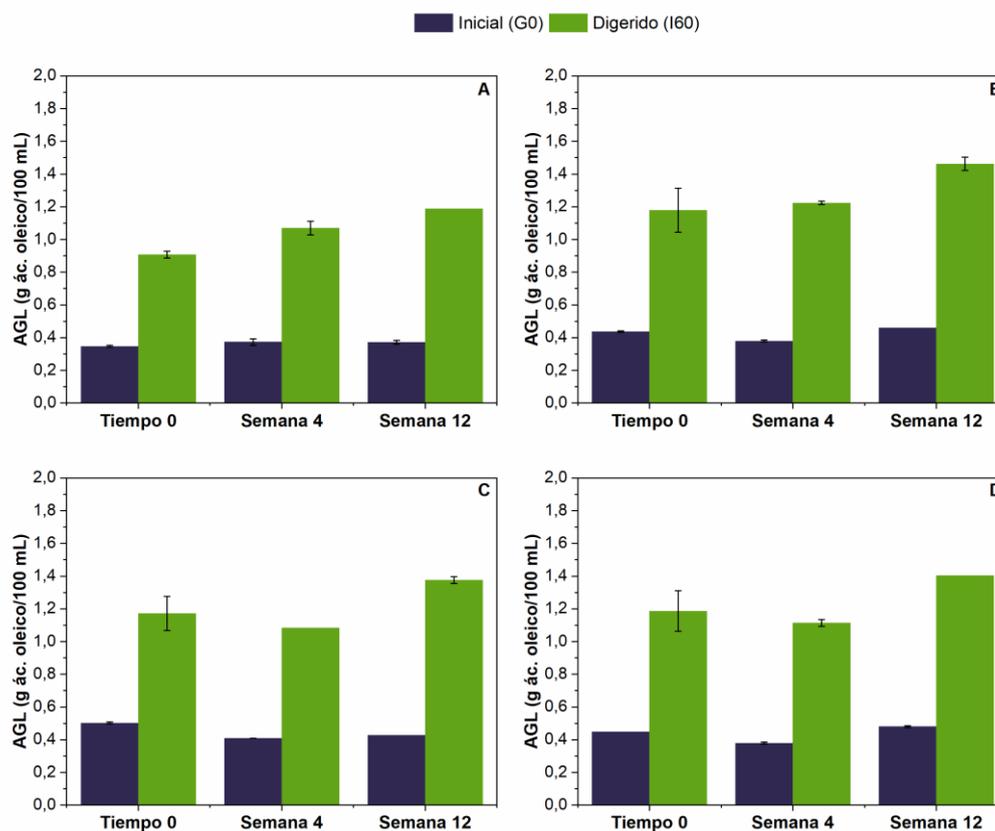


Figura 5.26. Ácidos grasos libres (g ácido oleico/100 mL fórmula reconstituida) en las fórmulas infantiles modelo 50%-75°C (A), 50%-100°C (B), 60%-75°C (C) y 60%-100°C (D), antes del almacenamiento (tiempo 0), luego de 4 semanas a 58 % HR y 25 °C y luego de 12 semanas en bolsa hermética a 25 °C, antes de la digestión (inicial, G0) y luego de 60 min de digestión gástrica + 60 min digestión intestinal *in vitro* (digerido, I60).

Las barras representan la desviación estándar (n = 2).

Todas las fórmulas presentaron un incremento de la concentración de AGL durante la digestión, como resultado de la acción de las lipasas.

En las muestras sin almacenar (tiempo 0) no se detectaron diferencias significativas entre fórmulas en la concentración de AGL al cabo de la digestión gastrointestinal, y la lipólisis aumentó 133-170 % durante el proceso digestivo.

Al cabo de las 4 semanas de almacenamiento, si bien el nivel de AGL en la fórmula 50%-100°C digerida fue significativamente más alto ($P < 0,05$) que en las restantes muestras, las concentraciones de las cuatro fórmulas fueron muy similares (1,1-1,2 g/100 mL, Figura 5.26).

Finalmente, comparando el nivel de AGL obtenido al finalizar la digestión de las fórmulas almacenadas en condiciones herméticas se obtuvo que 50%-75°C presentó un nivel significativamente menor ($P < 0,05$) a las restantes tres fórmulas. Sin embargo, dicha muestra

también había presentado la menor concentración de AGL antes de la digestión y, analizando el porcentaje de incremento de AGL durante la digestión no fue la del menor incremento, por lo tanto, no se puede concluir que sufrió menos actividad lipolítica.

En cuanto al efecto de las condiciones de almacenamiento, éstas no afectaron significativamente ($P > 0,05$) el grado de lipólisis alcanzado durante la digestión de las fórmulas pasteurizadas a 100 °C (50%-100°C y 60%-100°C). En las muestras tratadas a 75°C, se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de AGL al cabo de la digestión (I60) entre las muestras almacenadas herméticamente por 12 semanas y las muestras almacenadas a alta HR por cuatro semanas.

5. Conclusiones

- La estabilidad de las características fisicoquímicas de las fórmulas en polvo dependió tanto de las condiciones de producción como de almacenamiento.
- En general, se observaron cambios importantes en las características fisicoquímicas, microscópicas y macroscópicas de las fórmulas luego de 14 días de almacenamiento a 58 % HR, mientras que todas las fórmulas mantuvieron la estabilidad durante al menos 12 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente en envase hermético.
- Los ST de la mezcla húmeda generaron un mayor impacto en la estabilidad durante el almacenamiento que la temperatura de pasteurización, en los rangos y condiciones estudiadas.
- La lactosa cristalizó por completo en las cuatro fórmulas entre la primera y segunda semana de almacenamiento a alta HR, verificándose la presencia de cristales de α -lactosa monohidrato. Mientras que durante el almacenamiento en envase cerrado la lactosa se mantuvo en estado amorfo en todas las muestras.
- Las fórmulas obtenidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST (60%-75°C y 60%-100°C) presentaron una mayor velocidad de absorción de agua, probablemente debido a sus características morfológicas, lo que generó un descenso más rápido de sus temperaturas de transición vítrea y cristalización.
- Entre las semanas 1 y 2 de almacenamiento a alta HR se obtuvo también un importante incremento en la GLS y el IP de las fórmulas, y al cabo de 14 días las cuatro muestras presentaron *caking*.
- La solubilidad de las cuatro fórmulas se mantuvo estable a lo largo del almacenamiento, a excepción de 50%-100°C que presentó un descenso significativo a las cuatro semanas de almacenamiento a alta HR.
- Las condiciones de producción y almacenamiento de las fórmulas no generaron cambios relevantes en su digestibilidad.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Durante el desarrollo de la presente tesis se investigó, en primer lugar, el efecto que los macrocomponentes no grasos de las fórmulas infantiles, solos o combinados, ejercían antes y durante el tratamiento térmico, sobre los cambios conformacionales en las proteínas del suero (WP). El estudio realizado a escala laboratorio a través de la preparación de sistemas modelo, permitió demostrar que, la presencia de inulina, caseína y/o lactosa en las concentraciones habitualmente encontradas en fórmulas infantiles de inicio, impactan la desnaturalización, agregación y pérdida de solubilidad de las proteínas del suero.

La presencia de caseinato de calcio, solo o en presencia de inulina y/o lactosa, previno la formación de agregados proteicos de alto peso molecular, obtenidos al calentar a 75 °C por 30 min WP solas, y la consiguiente pérdida de solubilidad. Este efecto, conocido como actividad chaperona de las caseínas, había sido descrito previamente en la literatura para otras fuentes de caseína (caseinato de sodio, MPC, α_{s1} -, β - y κ -caseína). Sin embargo, no se habían encontrado reportes de dicha actividad para caseinato de calcio ni para la concentración relativa comúnmente encontrada en fórmulas infantiles (WP:caseínas = 60:40), que difiere significativamente de la relación existente en leche bovina (WP:caseínas = 20:80).

Las técnicas de DSC y FT-IR demostraron que la inulina indujo cambios conformacionales en las WP y, además, se determinó una reducción del 10 % de la solubilidad de WP sin tratar térmicamente. La inulina no inhibió la formación de agregados de alto peso molecular en los sistemas tratados a 75 °C por 30 min.

A futuro, podría investigarse el efecto de estos macrocomponentes a escala piloto buscando replicar en mejor medida los tipos e intensidad de tratamientos térmicos aplicados durante la producción industrial. Por otro lado, resultaría de interés tener en cuenta el efecto de la presencia de otros componentes, tales como sales minerales.

En segundo lugar, se produjeron fórmulas infantiles modelo a escala piloto por el método *wet-mix*, variando dos parámetros del proceso, el nivel de sólidos totales (ST) de la mezcla húmeda (50 o 60 %) y la temperatura de pasteurización (75 o 100 °C) a un tiempo de retención de 18 s. De esta forma, se obtuvieron cuatro fórmulas modelo (50%-75°C, 50%-100°C, 60%-75°C y 60%-100°C) de igual composición. Fue posible producir las fórmulas a partir de mezclas húmedas con $ST \geq 50$ %, lo que implica una reducción del gasto energético, respecto a fórmulas obtenidas a partir de mezclas con 25-30 % ST, que deben evaporarse previo al secado. A pesar de que este estudio no pretendió ser una optimización, pudo observarse que, entre las condiciones ensayadas, el proceso de producción con mezclas húmedas con 60 % ST pasteurizadas a 75 °C permitió obtener el mayor ahorro energético, con la menor desnaturalización proteica y pérdida de lisina disponible, lo que puede tener connotaciones positivas desde el punto de vista nutricional y fisicoquímico. Además, la viscosidad aparente obtenida a la entrada del secador spray estuvo por debajo del máximo recomendado en bibliografía (< 60 mPa.s), pero fue lo suficientemente alta como para obtener un tamaño de partícula no tan pequeño, lo que permitió mejorar la

Conclusiones

humectabilidad y fluidez del polvo. A su vez, la producción de las fórmulas con tecnologías de secado spray que permitan aumentar el tamaño de partícula, podrían mejorar aún más las propiedades de flujo y rehidratación. Finalmente, si bien la fórmula 60%-75°C presentó la menor estabilidad post-reconstitución, por estar floclada, cabe destacar que fue estable durante 2 horas a temperatura ambiente, tiempo entre la preparación y el consumo de la fórmula superior al que comúnmente se utiliza. Estudios futuros podrían llevarse a cabo con el objetivo de evitar la floclación de dicha fórmula. Entre los parámetros del proceso a optimizar para lograr este objetivo podrían encontrarse las condiciones de homogeneización (presión de primera y segunda etapa) o pasteurización (temperaturas intermedias entre 75 y 100 °C, otros tiempos de residencia o tipos de tratamientos térmicos alternativos, como la inyección directa de vapor).

Finalmente, se investigó el efecto que ejercían tanto las variables de producción estudiadas (ST y temperatura de pasteurización) como las condiciones de almacenamiento (envase cerrado y envase abierto) en la estabilidad y digestibilidad de las fórmulas. Mientras que durante el almacenamiento en “envase cerrado” (bolsa multicapa sellada herméticamente, T= 25 °C) las muestras fueron estables durante los tres meses de almacenamiento, presentando muy pocos cambios fisicoquímicos y ningún cambio aparente a nivel visual, las condiciones de almacenamiento de envase abierto (HR= 58 %, T= 25 °C) generaron importantes cambios fisicoquímicos en las cuatro fórmulas al cabo de 14 días. La absorción de agua redujo la temperatura de transición vítrea y cristalización de la lactosa en las fórmulas. Entre la primera y la segunda semana de almacenamiento la lactosa cristalizó completamente en todas las fórmulas, lo que a su vez impulsó el incremento de la grasa libre superficial en los polvos, el desarrollo de pardeamiento y cambios morfológicos a nivel microscópico y macroscópico (*caking*). Por lo tanto, luego de tan solo una semana de almacenamiento en condiciones de “envase abierto” los polvos presentaban apariencia y textura “gomosa” y al cabo de dos semanas eran totalmente inaceptables desde el punto de vista del consumidor. A pesar de los importantes cambios observados durante el almacenamiento en “envase abierto” y, al igual que en las condiciones de “envase cerrado”, el estudio de digestibilidad *in vitro* realizado simulando las condiciones de digestibilidad de bebés nacidos a término, no mostró cambios durante el almacenamiento. Es decir, la cristalización de la lactosa y otros cambios observados en las fórmulas durante el almacenamiento e HR= 58 %, no redujeron su digestibilidad.

En cuanto al efecto de las variables del proceso en la estabilidad durante el almacenamiento, éstas tuvieron menos efecto que las condiciones de “envase abierto”, pero igualmente pudo observarse que aquellas fórmulas producidas a partir de mezclas húmedas con 60 % ST presentaron mayor número de partículas partidas, lo que exponía su interior poroso y aumentaba su velocidad de absorción de agua. Por lo tanto, en estas fórmulas se generó un descenso más rápido de las temperaturas de transición vítrea y cristalización, haciendo que la lactosa cristalice antes que en

Conclusiones

las fórmulas 50 % (aunque tanto en las 50 como en las 60 % la cristalización ocurrió entre la primera y segunda semana de almacenamiento en condiciones de envase abierto).

Considerando las altas humedades relativas que se pueden alcanzar en ciertos momentos del año en países como Argentina y Uruguay, y que se suele recomendar consumir estos productos dentro de un plazo de hasta un mes luego de abiertos, los resultados obtenidos resaltan la importancia del adecuado empaque y conservación de las fórmulas una vez abiertas, para evitar la absorción de agua, que acelera el proceso de cristalización de la lactosa amorfa, presente en concentraciones mayores al 50 % y generando, por lo tanto, un alto impacto en la estabilidad fisicoquímica del producto.

La presente tesis se centró en la investigación de un producto lácteo de alto valor agregado, como las fórmulas infantiles. Si bien existían múltiples estudios publicados enfocados en los aspectos nutricionales y médicos, las publicaciones vinculadas a efectos de parámetros del proceso de producción sobre las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales, son aún limitados. Este estudio permitió generar conocimiento que aporta a la optimización de procesos de producción y a la producción de productos de alta calidad y estabilidad en el tiempo.

REFERENCIAS

Referencias

- Aalaei, K., Rayner, M., Tareke, E., & Sjöholm, I. (2016). Application of a dye-binding method for the determination of available lysine in skim milk powders. *Food Chemistry*, 196, 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.004>
- Aalaei, K., Sjöholm, I., Rayner, M., Teixeira, C., & Tareke, E. (2019). Early and advanced stages of Maillard reaction in infant formulas: Analysis of available lysine and carboxymethyl-lysine. *Plos One*, 14(7), e0220138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220138>
- Aguilar, C. A., & Ziegler, G. R. (1994). Physical and Microscopic Characterization of Dry Whole Milk with Altered Lactose Content. 2. Effect of Lactose Crystallization. *Journal of Dairy Science*, 77(5), 1198–1204. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77058-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77058-2)
- Ahijado Guzmán, R. (2013). *Análisis biofísico y reconstitución en microesferas funcionalizadas de FtsZ, proteína esencial en la división*. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Ahmad, S., & Guo, M. (2014). Infant formula quality control. En: M. Guo (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology* (pp. 246–272). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857099150.3.246>
- Ahmed, J., Al-Jassar, S., & Thomas, L. (2015). A comparison in rheological, thermal, and structural properties between Indian Basmati and Egyptian Giza rice flour dispersions as influenced by particle size. *Food Hydrocolloids*, 48, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.012>
- Akkerman, M., Rauh, V. M., Christensen, M., Johansen, L. B., Hammershøj, M., & Larsen, L. B. (2016). Effect of heating strategies on whey protein denaturation-Revisited by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 152–166. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9924>
- Allen, J., & Hector, D. (2005). Benefits of breastfeeding. En: *New South Wales public health bulletin* (Vol. 16, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1071/nb05011>
- Allied Market Research. (2018). *Baby Infant Formula Market Overview*. <https://www.alliedmarketresearch.com/baby-infant-formula-market>
- Alliet, P., Scholtens, P., Raes, M., Hensen, K., Jongen, H., Rummens, J. L., Boehm, G., & Vandenplas, Y. (2007). Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition*, 23(10), 719–723. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.06.011>
- Aly, E., Ros, G., & Frontela, C. (2013). Structure and Functions of Lactoferrin as Ingredient in Infant Formulas. *Journal of Food Research*, 2(4), 25. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n4p25>
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. G. F. (2008). Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 41(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.004>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Le-Doare, K. M. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Anema, S. G. (2000). Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4168–4175. <https://doi.org/10.1021/jf991173e>
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1640–1646. <https://doi.org/10.1021/jf025673a>
- Anema, S. G., Lowe, E. K., Lee, S. K., & Klostermeyer, H. (2014). Effect of the pH of skim milk at heating on milk concentrate viscosity. *International Dairy Journal*, 39(2), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.010>

Referencias

- Anema, S. G., Lowe, E. K., & Li, Y. (2004). Effect of pH on the viscosity of heated reconstituted skim milk. *International Dairy Journal*, 14(6), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.007>
- Anema, S. G., Pinder, D. N., Hunter, R. J., & Hemar, Y. (2006). Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). *Food Hydrocolloids*, 20(2-3 SPEC. ISS.), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.015>
- Anema, S. G., Siew, K. L., & Klostermeyer, H. (2006). Effect of protein, nonprotein-soluble components, and lactose concentrations on the irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7339–7348. <https://doi.org/10.1021/jf061508+>
- AOAC International. (2016). Official Method 947.05. Acidity of Milk. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th ed.).
- AOAC International. (2019). Official Method 982.14. Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Preswe. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st ed.).
- ASTM International. (2016). *ASTM D6128-16, Standard Test Method for Shear Testing of Bulk Solids Using the Jenike Shear Tester*.
- Bahl, R., Frost, C., Kirkwood, B. R., Edmond, K., Martinez, J., Bhandari, N., & Arthur, P. (2005). Infant feeding patterns and risks of death and hospitalization in the first half of infancy: Multicentre cohort study. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(6), 418–426. <https://doi.org/S0042-96862005000600009>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Biliaderis, C. G., Lazaridou, A., Mavropoulos, A., & Barbayiannis, N. (2002). Water plasticization effects on crystallization behavior of lactose in a co-lyophilized amorphous polysaccharide matrix and its relevance to the glass transition. *International Journal of Food Properties*, 5(2), 463–482. <https://doi.org/10.1081/JFP-120005798>
- Birchal, V. S., Passos, M. L., Wildhagen, G. R. S., & Mujumdar, A. S. (2005). Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality. *Drying Technology*, 23(3), 611–636. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054153>
- Blanchard, E., Zhu, P., & Schuck, P. (2013). Infant formula powders. *Handbook of Food Powders: Processes and Properties*, 465–483. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.3.465>
- Bloomfield, V. A., & Morr, C. V. (1973). Structure of casein micelles: physical methods. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27, 103–120.
- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*, 91(11), 619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
- Boehm, G. (2013). Soluble and insoluble fibre in infant nutrition. En: J. A. Delcour & K. Poutanen (Eds.), *Fibre-Rich and Wholegrain Foods: Improving Quality* (pp. 421–449). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857095787.4.421>
- Bogahawaththa, D., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2019). Thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin in different protein mixtures in relation to antigenicity. *International Dairy Journal*, 91, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.004>
- Boiarkina, I., & Young, B. (2019). The structure and rehydration properties of dairy powders. En: L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (Vol. 3, pp. 55–60). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21693-4>
- Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M. N., Robert,

Referencias

- B., Deglaire, A., Pezennec, S., Bouhallab, S., Carrière, F., & Dupont, D. (2015). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, 182, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.001>
- Boye, J. I., & Alli, I. (2000). Thermal denaturation of mixtures of α -lactalbumin and β -lactoglobulin: A differential scanning calorimetric study. *Food Research International*, 33(8), 673–682. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00112-5)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brahm, P., & Valdés, V. (2017). Beneficios de la lactancia materna y riesgos de no amamantar. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(1), 15–21. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062017000100001>
- Britten, M., & Giroux, H. J. (1991). Emulsifying Properties of Whey Protein and Casein Composite Blends. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3318–3325. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78519-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78519-6)
- Buggy, A. K., McManus, J. J., Brodtkorb, A., Carthy, N. M., & Fenelon, M. A. (2017). Stabilising effect of α -lactalbumin on concentrated infant milk formula emulsions heat treated pre- or post-homogenisation. *Dairy Science and Technology*, 96(6), 845–859. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0306-1>
- Burnett, D. J., Thielmann, F., & Booth, J. (2004). Determining the critical relative humidity for moisture-induced phase transitions. *International Journal of Pharmaceutics*, 287(1–2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.009>
- Butler, J. E. (1969). Bovine Immunoglobulins: A Review. *Journal of Dairy Science*, 52(12), 1895–1909. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86871-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86871-2)
- Carbonaro, M., Bonomi, F., Iametti, S., Cappelloni, M., Carnovale, E., Carbonaro, M., Cappelloni, M., Istituto, E. C., Ardeatina, V., Bonomi, F., Dipartimento, S. I., Agroalimentari, M., & Celoria, V. (1998). Aggregation of Proteins in Whey from Raw and Heat-Processed Milk: Formation of Soluble Macroaggregates and Nutritional Consequences. *LWT - Food Science and Technology*, 31(6), 522–529.
- Carpin, M., Bertelsen, H., Bech, J. K., Jeantet, R., Risbo, J., & Schuck, P. (2016). Caking of lactose: A critical review. *Trends in Food Science and Technology*, 53(2016), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.002>
- Carr, H. Y., & Purcell, E. M. (1954). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *American Physical Society*, 94, 630–638.
- Carrero, A., Ceriani, F., De León, C., & Girona, A. (2020). *Encuesta Nacional de Lactancia, Prácticas de Alimentación y Anemia en menores de 24 meses usuarios del Sistema Nacional Integrado de Salud 2020*.
- Casanova, H., & Dickinson, E. (1998). Rheology and flocculation of oil-in-water emulsions made with mixtures of α (s1)-casein + β -casein. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207(1), 82–89. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5744>
- Centro Científico Tecnológico Rosario. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). (s.f.). *Microscopio Confocal de Barrido Láser*. Recuperado el 27/09/2021, de <https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/centrodecomputosdealtorendimiento-2>
- Chakravarty, S. (2019). *World's Top 10 Infant Formula Manufacturers*. Market Research Reports. <https://www.marketresearchreports.com/blog/2019/04/09/world's-top-10-infant-formula-manufacturers>

Referencias

- Chanamai, R., & McClements, D. J. (2000). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1–3), 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00551-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00551-3)
- Chávez-Servín, J. L., De La Torre Carbot, K., García-Gasca, T., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2015). Content and evolution of potential furfural compounds in commercial milk-based infant formula powder after opening the packet. *Food Chemistry*, 166, 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.050>
- Chen, Y. (2018). *Global infant formula products market: estimations and forecasts for production and consumption*. China Dairy. https://www.girafood.com/wp-content/uploads/2018/09/GIRA_ChinaDairy_GlobalInfantFormulaProductsMarketEN_Jun2018.pdf
- Cheng, H., Erichsen, H., Soerensen, J., Petersen, M. A., & Skibsted, L. H. (2019). Optimising water activity for storage of high lipid and high protein infant formula milk powder using multivariate analysis. *International Dairy Journal*, 93, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.02.008>
- Cheng, H., Zhu, R. G., Erichsen, H., Soerensen, J., Petersen, M. A., & Skibsted, L. H. (2017). High temperature storage of infant formula milk powder for prediction of storage stability at ambient conditions. *International Dairy Journal*, 73, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.007>
- Chever, S., Méjean, S., Dolivet, A., Mei, F., Den Boer, C. M., Le Barzic, G., Jeantet, R., & Schuck, P. (2017). Agglomeration during spray drying: Physical and rehydration properties of whole milk/sugar mixture powders. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.002>
- Choi, Y., & Okos, M. R. (1986). Effects of temperature and composition on the thermal properties of food. En: M. Le Maguer & P. Jelen (Eds.), *Food Engineering and Process Applications, Vol. 1. "Transport Phenomena"* (pp. 92–101). Elsevier Applied Science Publishers.
- Chudy, S., Pikul, J., & Rudzińska, M. (2015). Effects of storage on lipid oxidation in milk and egg mixed powder. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(1), 31–40.
- Cilla, A., Lacomba, R., García-Llatas, G., & Alegría, A. (2012). Prebióticos y nucleótidos en alimentación infantil; revisión de la evidencia. *Nutricion Hospitalaria*, 27(4), 1037–1048. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5811>
- Codex Alimentarius. (1987). *Norma para preparados complementarios. CXS 156-1987. Adoptada en 1987. Enmendada en 1989, 2011 y 2017.*
- Codex Alimentarius. (2007). *Norma para preparados para lactantes y preparados para usos medicinales especiales destinados a los lactantes. CXS 72-1981. Enmendada en 1983, 1985, 1987, 2011, 2015, 2016, 2020. Revisada en 2007.*
- Código Alimentario Argentino (2018). Capítulo XVII. Artículo 1353 bis (Resolución Conjunta RESFC-2018-12-APN-SRYGS#MSYDS N°12/2018).
- Comisión Europea. (2016). Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015. En: *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Contreras-Calderón, J., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2009). Utility of some indicators related to the Maillard browning reaction during processing of infant formulas. *Food Chemistry*, 114(4), 1265–1270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.004>
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., & Gabrielli, O. (2006). Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*, 38(SUPPL. 2), 291–294. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60013-9](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60013-9)
- Corrigan, B., & Brodkorb, A. (2020). The effect of pre-treatment of protein ingredients for infant

Referencias

- formula on their in vitro gastro-intestinal behaviour. *International Dairy Journal*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104810>
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 99–118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Crowley, S. V., Dowling, A. P., Caldeo, V., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2016). Impact of α -lactalbumin: β -lactoglobulin ratio on the heat stability of model infant milk formula protein systems. *Food Chemistry*, 194, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.077>
- Crowley, S. V., Gazi, I., Kelly, A. L., Huppertz, T., & O'Mahony, J. A. (2014). Influence of protein concentration on the physical characteristics and flow properties of milk protein concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 135, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.005>
- Dalglish, D. G., Goff, H. D., & Luan, B. (2002). Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion systems - Behavior of individual proteins. *Food Hydrocolloids*, 16(4), 295–302. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00102-3)
- Danone. (s.f.). *Nutrición Temprana*. Recuperado el 26/08/2021, de <https://corporate.danone.com.ar/ar/descubri/nuestros-negocios/nutricion-especializada/nutricion-temprana/>
- Dapueto, N., Troncoso, E., Mella, C., & Zúñiga, R. N. (2019). The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 263, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.005>
- Davis, A. M., Harris, B. J., Lien, E. L., Pramuk, K., & Trabulsi, J. (2008). α -Lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: Plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(11), 1294–1301. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602848>
- de Figueiredo Furtado, G., da Silva Carvalho, A. G., & Hubinger, M. D. (2021). Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and oil composition on emulsion and powder properties. *Journal of Food Engineering*, 292(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110256>
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62(2), 342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x>
- Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.033>
- Dissanayake, M., Kasapis, S., George, P., Adhikari, B., Palmer, M., & Meurer, B. (2013a). Hydrostatic pressure effects on the structural properties of condensed whey protein/lactose systems. *Food Hydrocolloids*, 30, 632–640. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.010>
- Dissanayake, M., Ramchandran, L., Donkor, O. N., & Vasiljevic, T. (2013). Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. *International Dairy Journal*, 31(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.002>
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387–1397. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1791>
- Drapala, K. P. (2017). *Processing and Stability of Infant Formula-Based Emulsions as Affected*

- by *Emulsifier*. University College Cork.
- Drapala, K. P., Auty, M. A. E., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2017). Influence of emulsifier type on the spray-drying properties of model infant formula emulsions. *Food Hydrocolloids*, *69*, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.024>
- Drapier-Beche, N., Fanni, J., & Parmentier, M. (1998). Kinetics of the Synthesis of Lactose Molecular Compounds. *Journal of Dairy Science*, *81*(11), 2826–2832. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75841-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75841-2)
- Drapier-Beche, N., Fanni, J., Parmentier, M., & Vilasi, M. (1997). Evaluation of Lactose Crystalline Forms by Nondestructive Analysis. *Journal of Dairy Science*, *80*(3), 457–463. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75957-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75957-5)
- Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z., & Uversky, V. N. (2008). The unfoldomics decade: An update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*, *9*(SUPPL. 2), 1–26. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-S2-S1>
- Dupont, D., Croguennec, T., Brodkorb, A., & Kouaouci, R. (2013). Quantitation of Proteins in Milk and Milk Products. En: P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 A. Proteins: Basic Aspects*. (4th ed., pp. 87–134). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_3
- Efstathiou, T., Feuarent, C., Méjean, S., & Schuck, P. (2002). The use of carbonyl analysis to follow the main reactions involved in the process of deterioration of dehydrated dairy products: prediction of most favourable degree of dehydration. *Lait*, *82*, 423–439. <https://doi.org/10.1051/lait>
- Enferad, S., Petit, J., Gaiani, C., Falk, V., Burgain, J., Kiesgen De Richter, S., & Jenny, M. (2020). Effect of particle size and formulation on powder rheology. *Particulate Science and Technology*, *0*(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/02726351.2020.1738605>
- Euston, S. R., Finnigan, S. R., & Hirst, R. L. (2001). Heat-induced destabilization of oil-in-water emulsions formed from hydrolyzed whey protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5576–5583. <https://doi.org/10.1021/jf0102620>
- Euston, S. R., Finnigan, S. R., & Hirst, R. L. (2000). Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, *14*, 155–161. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00061-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00061-2)
- Fabian, H., & Mäntele, W. (2006). Infrared Spectroscopy of Proteins. En: J. M. Chalmers & P. R. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0470027320.s8201>
- Fan, F., & Roos, Y. H. (2015). X-ray diffraction analysis of lactose crystallization in freeze-dried lactose-whey protein systems. *Food Research International*, *67*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.023>
- Fan, F., Liu, M., Shi, P., Xu, X., Lu, W., Wang, Z., & Du, M. (2018). Protein cross-linking and the Maillard reaction decrease the solubility of milk protein concentrates. *Food Science and Nutrition*, *6*(5), 1196–1203. <https://doi.org/10.1002/fsn3.657>
- Farrell Jr, H. M., Brown, E. M., & Malin, E. L. (2013). High Order Structures of the Caseins: A Paradox? En: P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (4th ed., Vol. 1A, pp. 161–184). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- FDA. (2017). *Grade “A” pasteurized milk ordinance*.
- FDA. (2016). *Infant Formula, 21 C.F.R. § 107*. https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=62c7d11b3d4fdff146e06516c27f349d&mc=true&node=pt21.2.107&rpn=div5#se21.2.107_1321.2.101&r=PART#se21.2.101_11

- Fenelon, M. A., Hickey, R. M., Buggy, A., McCarthy, N., & Murphy, E. G. (2018). Whey Proteins in Infant Formula. En: H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 439–494). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812124-5.00013-8>
- Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., & Romero, F. (2000). Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(5), 1817–1822. <https://doi.org/10.1021/jf9911971>
- Fitzpatrick, J. J. (2013). Powder properties in food production systems. En: B. Bhandari, N. Bansal, M. Zhang, & P. Schuck (Eds.), *Handbook of Food Powders: Processes and Properties* (pp. 285–308). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.2.285>
- Fitzpatrick, J. J., Barringer, S. A., & Iqbal, T. (2004). Flow property measurement of food powders and sensitivity of Jenike's hopper design methodology to the measured values. *Journal of Food Engineering*, *61*(3), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00147-X)
- Fitzpatrick, J. J., Hodnett, M., Twomey, M., Cerqueira, P. S. M., O'Flynn, J., & Roos, Y. H. (2007). Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. *Powder Technology*, *178*(2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.04.017>
- Fitzpatrick, J. J., van Lauwe, A., Coursol, M., O'Brien, A., Fitzpatrick, K. L., Ji, J., & Miao, S. (2016). Investigation of the rehydration behaviour of food powders by comparing the behaviour of twelve powders with different properties. *Powder Technology*, *297*, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.04.036>
- Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *21*(4), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.007>
- Floury, J., Desrumaux, A., & Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *1*(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00012-6)
- Foerster, M., Liu, C., Gengenbach, T., Wai, M., & Selomulya, C. (2017). Reduction of surface fat formation on spray-dried milk powders through emulsion stabilization with 1 - carrageenan. *Food Hydrocolloids*, *70*, 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.005>
- Forny, L., Marabi, A., & Palzer, S. (2011). Wetting, disintegration and dissolution of agglomerated water soluble powders. *Powder Technology*, *206*(1–2), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.07.022>
- Fournaise, T., Burgain, J., Perroud, C., Scher, J., Gaiani, C., & Petit, J. (2020). Impact of formulation on reconstitution and flowability of spray-dried milk powders. *Powder Technology*, *372*, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.05.085>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry* (2nd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Friedlander, M. (2019). *Crecieron 38,2% las exportaciones de lácteos en 2018, según Agroindustria*. Infocampo. <https://www.infocampo.com.ar/crecieron-382-las-exportaciones-de-lacteos-en-2018-segun-agroindustria/>
- Gaiani, C., Boyanova, P., Hussain, R., Murrieta Pazos, I., Karam, M. C., Burgain, J., & Scher, J. (2011). Morphological descriptors and colour as a tool to better understand rehydration properties of dairy powders. *International Dairy Journal*, *21*(7), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.009>

Referencias

- Gaiani, C., Morand, M., Sanchez, C., Tehrany, E. A., Jacquot, M., Schuck, P., Jeantet, R., & Scher, J. (2010). How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.016>
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>
- Gao, F., Zhang, X., Wang, H., Sun, X., Wang, J., & Wang, C. (2019). Comparison of dry- and wet-heat induced changes in physicochemical properties of whey protein in absence or presence of inulin. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1367–1374. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00577-w>
- García Álvarez, A. (2019). *Aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear al estudio de miosistemas*. Universidad Complutense de Madrid.
- Gaspard, S. J., Auty, M. A. E., Kelly, A. L., & Mahony, J. A. O. (2017). Isolation and characterisation of k-casein / whey protein particles from heated milk protein concentrate and role of k-casein in whey protein aggregation. *International Dairy Journal*, 73, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.012>
- GEA. (s.f.). *GEA Batch Formula(R) PRO High Shear Mixer*. Recuperado el 23/07/2021, de <https://www.gea.com/en/products/mixers-blenders/high-shear-mixers/gea-batch-formula-pro-high-shear-mixer.jsp>
- GEA Niro. (2005a). *GEA Niro Method No. A10a. Surface Free Fat of Powder*. https://www.gea.com/es/binaries/A_10_a_Surface Free Fat of Powder_tcm25-30918.pdf
- GEA Niro. (2005b). *GEA Niro Method No. A5 a Wettability*. http://www.gea.com/es/es/binaries/A_5_a - Wettability_tcm25-30909.pdf. Revisado 5 Mayo 2016
- GEA Niro. (2005c). *GEA Niro Method No. A6a. Powder Dispersibility IDF Method*. https://www.gea.com/es/binaries/A_6_a - Powder Dispersibility IDF Method_tcm25-30911.pdf
- GEA Niro. (2006a). *GEA Niro Method No. A1a. Powder Moisture Accurate Standard Method*. https://www.gea.com/es/binaries/A_1_a - Powder Moisture Accurate Standard Method_tcm25-30900.pdf
- GEA Niro. (2006b). *GEA Niro Method No. A11a. Particle Density, Occluded Air and Interstitial Air by Air Pycnometer*. https://www.gea.com/es/binaries/A_11_a - Particle Density%2COccluded Air and Interstitial Air by Air Pycnometer_tcm25-30919.pdf
- GEA Niro. (2006c). *GEA Niro Method No. A2a. Powder Bulk Density*. https://www.gea.com/en/binaries/A_2_a - Powder Bulk Density_tcm11-30905.pdf
- GEA Niro. (2006d). *GEA Niro Method No. A3a. Insolubility Index*. https://www.gea.com/es/binaries/A_3_a - Insolubility Index_tcm25-30907.pdf
- Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12), 391–399. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00257-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00257-1)
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., & Vasiljevic, T. (2017).

- Predicting sediment formation in ultra high temperature-treated whole and skim milk using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 74, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.004>
- Grewal, M. K., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2018). FTIR fingerprinting of structural changes of milk proteins induced by heat treatment, deamidation and dephosphorylation. *Food Hydrocolloids*, 80, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.010>
- Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. (2016). The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallographica Section B*, B72, 171–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>
- Guo, Mingruo, Wang, H., & Wang, C. (2018). Interactions between whey protein and inulin in a model system. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 4051–4058. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3331-7>
- Gurr, M. I. (1981). Human and artificial milks for infant feeding. *Journal of Dairy Research*, 48(3), 519–554. <https://doi.org/10.1017/s0022029900022020>
- Guyomarc'h, F., Nono, M., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1103–1110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.001>
- Guyomarc'h, F., Warin, F., Donald Muir, D., & Leaver, J. (2000). Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders. *International Dairy Journal*, 10(12), 863–872. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00020-6)
- Halabi, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., Dupont, D., & Deglaire, A. (2020). Modification of protein structures by altering the whey protein profile and heat treatment affects: In vitro static digestion of model infant milk formulas. *Food and Function*, 11(8), 6933–6945. <https://doi.org/10.1039/d0fo01362e>
- Han, N. S., Kim, T. J., Park, Y. C., Kim, J., & Seo, J. H. (2012). Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.003>
- Hanley, K. J., Cronin, K., O'Sullivan, C., Fenelon, M. A., O'Mahony, J. A., & Byrne, E. P. (2011). Effect of composition on the mechanical response of agglomerates of infant formulae. *Journal of Food Engineering*, 107(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.042>
- Haque, M. A., Chen, J., Aldred, P., & Adhikari, B. (2015). Denaturation and Physical Characteristics of Spray-Dried Whey Protein Isolate Powders Produced in the Presence and Absence of Lactose, Trehalose, and Polysorbate-80. *Drying Technology*, 33(10), 1243–1254. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1023311>
- Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2005a). Crystallization and X-ray Diffraction of Crystals Formed in Water-Plasticized Amorphous Spray-dried and Freeze-dried Lactose/Protein Mixtures. *Journal of Food Science*, 70(5), 359–366.
- Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2005b). Crystallization and X-ray diffraction of spray-dried and freeze-dried amorphous lactose. *Carbohydrate Research*, 340(2), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.11.026>
- Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2004). Water Plasticization and Crystallization of Lactose in Spray-dried Lactose/Protein Mixtures. *Journal of Food Science*, 69(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17863.x>
- Hazlett, R., Schmidmeier, C., & Mahony, J. A. (2021a). Approaches for improving the flowability of high-protein dairy powders post spray drying – A review. *Powder Technology*, 388, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.03.021>
- Hazlett, R., Schmidmeier, C., & O'Mahony, J. A. (2021b). Influence of mechanical integrity

- during pneumatic conveying on the bulk handling and rehydration properties of agglomerated dairy powders. *Journal of Food Engineering*, 288(January 2020), 110103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110103>
- Ho, Q. T., Murphy, K. M., Drapala, K. P., Fenelon, M. A., O'Mahony, J. A., Tobin, J. T., & McCarthy, N. A. (2019). Modelling the changes in viscosity during thermal treatment of milk protein concentrate using kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 246(September 2018), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.026>
- Ho, T. M., Truong, T., & Bhandari, B. (2017). Spray-Drying and Non-Equilibrium States/Glass Transition. En: B. Bhandari & Y. H. Roos (Eds.), *Non-equilibrium states and glass transitions in foods* (pp. 111–136). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100309-1.00008-0>
- Hodge, J. E. (1953). Browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928–943. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf60015a004>
- Hogan, S. A., Famelart, M. H., O'Callaghan, D. J., & Schuck, P. (2010). A novel technique for determining glass-rubber transition in dairy powders. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.040>
- Hourigan, J. A., Lifran, E. V, Vu, L. T. T., Listiohadi, Y., & Sleight, R. W. (2013). Lactose : Chemistry , Processing , and Utilization. En: G. W. Smithers & M. A. Augustin (Eds.), *Advances in Dairy Ingredients* (1st ed., pp. 31–69). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118448205>
- Huck-Iriart, C., Montes-de-Oca-Ávalos, J., Herrera, M. L., Candal, R. J., Pinto-de-Oliveira, C. L., & Linares-Torriani, I. (2016). New insights about flocculation process in sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 89, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.026>
- Huck-Iriart, C., Rincón Cardona, J. A., Montes de Oca Ávalos, J., & Candal, R. J. (2014). Gelificación De Emulsiones De Caseinato De Sodio Como Alternativa A Las Grasas Trans. *Ciencia e Investigación*, 64(2), 14.
- Huppertz, T. (2013). Chemistry of the Caseins. En: P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 A. Proteins: Basic Aspects*. (4th ed., pp. 135–160). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- Huppertz, T. (2016). Heat stability of milk. En: P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (Eds.), *Advanced dairy chemistry. Vol. 1B: proteins: applied aspects* (4ta ed., pp. 179–196). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2>
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6842–6851. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10033>
- Hurrell, R. F., Lerman, P., & Carpenter, K. J. (1979). Reactive lysini in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *Journal of Food Science*, 44, 1221–1231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb03485.x>
- Hussain, R., Gaiani, C., Jeandel, C., Ghanbaja, J., & Scher, J. (2012). Combined effect of heat treatment and ionic strength on the functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6260–6273. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5416>
- ICDD. (2013). *PDF-2 2013. International Centre for Diffraction Data*.
- Igoa Saldaña, F. (2021). *Materiales microporosos basados en tierras raras con potencial aplicación en dispositivos electrónicos*. Universidad de la República.
- Infante, D., & Tormo, R. (2017). Novedad en alimentación infantil: Fórmulas a base de leche de cabra. *Acta Pediatrica Espanola*, 75(1–2), 13–17.

Referencias

- ISO. (2001). *Milk. Determination of nitrogen content. ISO Standard 8968-2, IDF Standard 20-2*. International Organization for Standardization.
- ISO. (2008). *Dried milk and dried milk products. Determination of fat content. Gravimetric method (reference method). ISO Standard 1736. IDF Standard 9*. International Organization for Standardization.
- ISO. (2010). *Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). ISO Standard 6731, IDF Standard 21*. International Organization for Standardization.
- Jenike, A. W. (1964). *Storage and flow of solids. Bulletin No. 123* (Vol. 53, Issue 26). Utah Engineering Experiment Station, University of Utah.
- Jenness, R., & Koops, J. (1962). Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 16, 153–164.
- Journink, T. J., & De Kruif, K. G. (1993). Changes in Milk on Heating: Viscosity Measurements. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 139–150. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027461>
- Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Maguire, P., Zhang, H., & Miao, S. (2016). Rehydration behaviours of high protein dairy powders: The influence of agglomeration on wettability, dispersibility and solubility. *Food Hydrocolloids*, 58, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.030>
- Jiang, Y. J. (2014). Processing technology for infant formula. En: Mingruo Guo (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology* (pp. 211–229). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857099150.2.211>
- Jouppila, K., Kansikas, J., & Roos, Y. H. (1997). Glass Transition, Water Plasticization, and Lactose Crystallization in Skim Milk Powder. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3152–3160. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76286-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76286-6)
- Jouppila, K., Kansikas, J., & Roos, Y. H. (1998). Crystallization and X-ray Diffraction of Crystals Formed in Water-Plasticized Amorphous Lactose. *Biotechnology Progress*, 14(2), 347–350.
- Kehoe, J. J., & Foegeding, E. A. (2011). Interaction between β -casein and whey proteins as a function of pH and salt concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 349–355. <https://doi.org/10.1021/jf103371g>
- Kelly, G. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., Huppertz, T., Kennedy, D., & O'Callaghan, D. J. (2015). Influence of protein concentration on surface composition and physico-chemical properties of spray-dried milk protein concentrate powders. *International Dairy Journal*, 51, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.07.001>
- Kelly, G. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., & O'Callaghan, D. J. (2016). Effect of hydrolyzed whey protein on surface morphology, water sorption, and glass transition temperature of a model infant formula. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 6961–6972. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10447>
- Keowmaneechai, E., & McClements, D. J. (2002). Effect of CaCl₂ and KCl on physicochemical properties of model nutritional beverages based on whey protein stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science*, 67(2), 665–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10657.x>
- Kim, E. H. J., Chen, X. D., & Pearce, D. (2002). Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 197–212. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00334-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00334-4)
- Kim, E. H. J., Chen, X. D., & Pearce, D. (2009a). Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. *Journal of Food Engineering*, 94(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.021>

Referencias

- Kim, E. H. J., Chen, X. D., & Pearce, D. (2009b). Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 3. Changes in the surface composition during long-term storage. *Journal of Food Engineering*, *94*(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.001>
- Kim, E. H. J., Xiao, D. C., & Pearce, D. (2005). Effect of surface composition on the flowability of industrial spray-dried dairy powders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *46*(3), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.005>
- Kirk, J. H., Dann, S. E., & Blatchford, C. G. (2007). Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, *334*(1–2), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.026>
- Krause, R., Knoll, K., & Henle, T. (2003). Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *European Food Research and Technology*, *216*(4), 277–283. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0649-0>
- Kroll, C. (2013). *Roemmers lanza nutraceutica*. <https://www.pharmabiz.net/roemmers-lanza-nutraceutica/>
- Kruger, N. J. (2002). The Bradford method for protein quantitation. En: J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (2nd ed., pp. 15–21). Humana Press Inc.
- Kulinich, A., & Liu, L. (2016). Human milk oligosaccharides: The role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydrate Research*, *432*, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.07.009>
- Kunz, C., & Rudloff, S. (2008). Potential Anti-Inflammatory and Anti-Infectious Effects of Human Milk Oligosaccharides. En: S. Bösze (Ed.), *Bioactive Components of Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 455–466). Springer. https://doi.org/https://doi-org.proxy.timbo.org/10.1007/978-0-387-74087-4_18
- La Sibila. (s.f.). *Leches Infantiles*. Recuperado el 26/08/2021, de <https://www.lasibila.com.ar/mobile/home.html>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lazzaro, F., Saint-Jalmes, A., Violleau, F., Lopez, C., Gaucher-Delmas, M., Madec, M. N., Beaucher, E., & Gaucheron, F. (2017). Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids*, *63*, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.037>
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (1999). Structural and interaction properties of β -lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, *34*(5–6), 419–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00311.x>
- León-Cava, N., Lutter, C., Ross, J., & Martin, L. (2002). *Quantifying the benefits of breastfeeding: a summary of the evidence*.
- Li, R., Lin, D., Roos, Y. H., & Miao, S. (2019). Glass transition, structural relaxation and stability of spray-dried amorphous food solids: A review. *Drying Technology*, *37*(3), 287–300. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1459680>
- Li, X., Gu, Y., He, S., Dudu, O. E., Li, Q., Liu, H., & Ma, Y. (2020). Influence of pasteurization and storage on dynamic in vitro gastric digestion of milk proteins: Quantitative insights based on peptidomics. *Foods*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/foods9080998>
- Li, Y., Ma, X., & Liu, X. (2019). Physicochemical and rheological properties of cross-linked inulin with different degree of polymerization. *Food Hydrocolloids*, *95*(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.026>
- Liang, Y., Matia-merino, L., Gillies, G., Patel, H., Ye, A., & Golding, M. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science The heat stability of milk protein-stabilized oil-in-water

- emulsions: A review. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 63–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.007>
- Liang, Y., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., & Golding, M. (2013). Structure and stability of heat-treated concentrated dairy-protein-stabilised oil-in-water emulsions: A stability map characterisation approach. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.012>
- Liyanaarachchi, W. S., Ramchandran, L., & Vasiljevic, T. (2015). Controlling heat induced aggregation of whey proteins by casein inclusion in concentrated protein dispersions. *International Dairy Journal*, 44, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.010>
- Liyanaarachchi, W. S., & Vasiljevic, T. (2018). Caseins and their interactions that modify heat aggregation of whey proteins in commercial dairy mixtures. *International Dairy Journal*, 83, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.006>
- Lönnerdal, B., & Suzuki, Y. A. (2013). Lactoferrin. En: Paul L.H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (4th ed., Vol. 1A, pp. 295–315). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- Luo, M., Qi, X., Ren, T., Huang, Y., Keller, A. A., Wang, H., Wu, B., Jin, H., & Li, F. (2017). Heteroaggregation of CeO₂ and TiO₂ engineered nanoparticles in the aqueous phase: Application of turbiscan stability index and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectra. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 533, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.014>
- Macías, S., Rodríguez, S., & Ronayne de Ferrer, P. (2006). Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Archivos Argentinos De Pediatría*, 104(5), 423–430.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4), 387–396.
- Maher, P. G., Roos, Y. H., & Fenelon, M. A. (2014). Physicochemical properties of spray dried nanoemulsions with varying final water and sugar contents. *Journal of Food Engineering*, 126, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.001>
- Mallol Gasch, J. G. (2005). *Densificación y flujo de lechos de cuarzo*. Universitat Jaume I de Castelló.
- Malvern Panalytical. (s.f.). *Difracción láser*. Recuperado el 22/03/2021, de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/laser-diffraction#:~:text=Principios,una muestra de partículas dispersas.&text=El tamaño de partícula se,de esfera equivalente al volumen>.
- Markoska, T., Daniloski, D., Vasiljevic, T., & Huppertz, T. (2021). Structural Changes of β -Casein Induced by Temperature and pH Analysed by Nuclear Magnetic Resonance, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, and Chemometrics. *Molecules*, 26(24), 7650. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26247650>
- Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K., & Vasiljevic, T. (2019). Structural changes of milk proteins during heating of concentrated skim milk determined using FTIR. *International Dairy Journal*, 89, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.010>
- Martín Martínez, B. (2018). Fórmulas extensivamente hidrolizadas. Importancia del grado de hidrólisis. *Acta Pediatr Esp*, 76 (9-10), 115–122. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/
- Marx, M., & Kulozik, U. (2018). Thermal denaturation kinetics of whey proteins in reverse osmosis and nanofiltration sweet whey concentrates. *International Dairy Journal*, 85, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.009>
- Maskan, M. (2001). Drying, shrinkage and rehydration characteristics of kiwifruits during hot air

Referencias

- and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48(2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00155-2)
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Adhikari, B., Huppertz, T., & Zisu, B. (2019). Effect of lactose-to-maltodextrin ratio on emulsion stability and physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders. *Journal of Food Engineering*, 254(October 2018), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.023>
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020a). Effect of storage conditions on the physicochemical properties of infant milk formula powders containing different lactose-to-maltodextrin ratios. *Food Chemistry*, 319(March). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126591>
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020b). Influence of drying temperatures and storage parameters on the physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders. *International Dairy Journal*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104696>
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020c). Production and characterization of infant milk formula powders: A review. *Drying Technology*, 0(0), 1–40. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1767645>
- Masum, A. K. M., Huppertz, T., Chandrapala, J., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020). Physicochemical properties of spray-dried model infant milk formula powders: Influence of whey protein-to-casein ratio. *International Dairy Journal*, 100, 104565. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104565>
- Matsudomi, N., Kanda, Y., & Moriwaki, H. (2004). Ability of α -Casein to Suppress the Heat Aggregation of Ovotransferrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4882–4886. <https://doi.org/10.1021/jf030802o>
- McCarthy, N. A., Gee, V. L., Hickey, D. K., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., & Fenelon, M. A. (2013). Effect of protein content on the physical stability and microstructure of a model infant formula. *International Dairy Journal*, 29(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.004>
- McCarthy, N. A., Gee, V. L., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., & Fenelon, M. A. (2015). Optimising emulsion stability during processing of model infant formulae using factorial statistical design. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 334–341. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12240>
- McCarthy, N. A., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., Hickey, D. K., Chaurin, V., & Fenelon, M. A. (2012). Effect of protein content on emulsion stability of a model infant formula. *International Dairy Journal*, 25(2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.03.003>
- McClements, D. J. (2016). *Food Emulsions. Principles, practices and techniques*. (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b18868>
- McSweeney, D. J., Maidannyk, V., Montgomery, S., O'Mahony, J. A., & McCarthy, N. A. (2020). The influence of composition and manufacturing approach on the physical and rehydration properties of milk protein concentrate powders. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020236>
- McSweeney, S. L. (2008). Emulsifiers in infant nutritional products. *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, 233–261. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75284-6_8
- Medina Hernández, M. J., & García Álvarez-Coque, M. C. (1992). Available Lysine in Protein, Assay Using o-Phthalaldehyde/ N-Acetyl-L-cysteine Spectrophotometric Method. *Journal of Food Science*, 57(2), 503–505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05526.x>
- Mediwaththe, A., Bogahawaththa, D., Grewal, M. K., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2018). Structural changes of native milk proteins subjected to controlled shearing and heating.

Referencias

- Food Research International*, 114(May), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.001>
- Meiboom, S., & Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments*, 29(8), 688–691. <https://doi.org/10.1063/1.1716296>
- Ménard, O., Bourlieu, C., De Oliveira, S. C., Dellarosa, N., Laghi, L., Carrière, F., Capozzi, F., Dupont, D., & Deglaire, A. (2018). A first step towards a consensus static in vitro model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry*, 240(July 2017), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.145>
- Meng, F., Uniacke-Lowe, T., Ryan, C. A., & Kelly, A. L. (2021). The composition and physico-chemical properties of human milk: A review. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040>
- Miao, S., & Roos, Y. H. (2005). Crystallization kinetics and X-ray diffraction of crystals formed in amorphous lactose, trehalose, and lactose/trehalose mixtures. *Journal of Food Science*, 70(5), 350–358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09976.x>
- Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., & Bergenståhl, B. (2001). Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1–3), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00183-7)
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Ministerio de Salud de la Nación. Dirección Nacional de Maternidad, I. y A. (2018). *Situación de la Lactancia Materna en la Argentina - Informe 2018*.
- Mollà García, J. (2019). *El mercado de la alimentación infantil en China* (ICEX España Exportación e Inversiones (ed.)). Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Cantón.
- Mondragón Cortez, P. (2020). *Principios y aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas* (1era ed.). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).
- Montagne, D.-H., Van Dael, P., Skanderby, M., & Hugelshofer, W. (2009). Infant Formulae - Powders and Liquids. En: A. Y. Tamime (Ed.), *Dairy Powders and Concentrated Products* (pp. 294–331). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444322729.ch9>
- Moreno Villares, J. M. (2008). Prebióticos en las fórmulas para lactantes. ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *Anales de Pediatría*, 68(3), 286–294. <https://doi.org/10.1157/13116712>
- Morgan, P. E., Treweek, T. M., Lindner, R. A., Price, W. E., & Carver, J. A. (2005). Casein proteins as molecular chaperones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2670–2683. <https://doi.org/10.1021/jf048329h>
- Moronta, J. (2015). Actividad biológica de proteínas y péptidos de amaranto. Efectos inmunomodulatorios. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Morr, C. V. (1967). Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 50, 1744–1751.
- Mounsey, J. S., & O’Kennedy, B. T. (2009). Stability of β -lactoglobulin/micellar casein mixtures on heating in simulated milk ultrafiltrate at pH 6.0. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 493–499. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00522.x>
- Mulcahy, E. M., Fargier-Lagrange, M., Mulvihill, D. M., & O’Mahony, J. A. (2017).

- Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. *Food Chemistry*, 229(February), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.155>
- Murphy, E. G. (2015). *Infant Milk Formula Manufacture: Process and Compositional Interactions in High Dry Matter Wet-Mixes*. University College Cork.
- Murphy, E. G., Fenelon, M. A., Roos, Y. H., & Hogan, S. A. (2014). Decoupling macronutrient interactions during heating of model infant milk formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(43), 10585–10593. <https://doi.org/10.1021/jf503620r>
- Murphy, E. G., Regost, N. E., Roos, Y. H., & Fenelon, M. A. (2020). Powder and reconstituted properties of commercial infant and follow-on formulas. *Foods*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9010084>
- Murphy, E. G., Roos, Y. H., Hogan, S. A., Maher, P. G., Flynn, C. G., & Fenelon, M. A. (2015). Physical stability of infant milk formula made with selectively hydrolysed whey proteins. *International Dairy Journal*, 40, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.012>
- Murphy, E. G., Tobin, J. T., Roos, Y. H., & Fenelon, M. A. (2013). A high-solids steam injection process for the manufacture of powdered infant milk formula. *Dairy Science and Technology*, 93(4–5), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0116-7>
- Murphy, R. M. (1997). Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: What can we learn? *Current Opinion in Biotechnology*, 8(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80153-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80153-X)
- Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Cuq, B., Desobry, S., & Scher, J. (2011). Comparative study of particle structure evolution during water sorption: Skim and whole milk powders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.001>
- Nasirpour, A., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Baby foods: Formulations and interactions (a review). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 665–681. <https://doi.org/10.1080/10408390500511896>
- Naumann, D. (2000). Infrared Spectroscopy in Microbiology. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 102–131). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117.pub2>
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646.
- Nijdam, J., Ibach, A., Eichhorn, K., & Kind, M. (2007). An X-ray diffraction analysis of crystallised whey and whey-permeate powders. *Carbohydrate Research*, 342(16), 2354–2364. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.08.001>
- Norwood, E. A., Chevallier, M., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., Jeantet, R., & Croguennec, T. (2016). Heat-Induced Aggregation Properties of Whey Proteins as Affected by Storage Conditions of Whey Protein Isolate Powders. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 993–1001. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1686-1>
- Norwood, E. A., Le Floch-Fouéré, C., Briard-Bion, V., Schuck, P., Croguennec, T., & Jeantet, R. (2016). Structural markers of the evolution of whey protein isolate powder during aging and effects on foaming properties. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5265–5272. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10788>
- O'Brien, J. (2009). Non-Enzymatic Degradation Pathways of Lactose and Their Significance in Dairy Products. En: P.L.H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Volume 3: Lactose, water, salt and minor constituents* (3rd ed., Vol. 3, pp. 231–295). Springer Science&Business Media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_7

Referencias

- O'Callaghan, D. M., O'Mahony, J. A., Ramanujam, K. S., & Burgher, A. M. (2011). Dehydrated Dairy Products [Infant Formulae]. En: J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 135–145). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00124-2>
- O'Donoghue, L. T., Haque, M. K., Kennedy, D., Laffir, F. R., Hogan, S. A., O'Mahony, J. A., & Murphy, E. G. (2019). Influence of particle size on the physicochemical properties and stickiness of dairy powders. *International Dairy Journal*, *98*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.07.002>
- O'Kennedy, B. T., & Mounsey, J. S. (2006). Control of heat-induced aggregation of whey proteins using casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5637–5642. <https://doi.org/10.1021/jf0607866>
- O'Mahony, J. A., Drapala, K. P., Mulcahy, E. M., & Mulvihill, D. M. (2019). Chapter 7 - Whey Protein-Carbohydrate Conjugates. En: H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 249–280). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00008-4>
- O'Mahony, J. A., & Fox, P. F. (2013). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. En: P.L.H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. (4th ed., pp. 43–85). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- O'Mahony, J. A., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2013). Indigenous Enzymes of Milk. En: P.L.H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 A. Proteins: Basic Aspects*. (4th ed., pp. 337–385). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- O'Regan, J. O., Ennis, M. P., & Mulvihill, D. M. (2009). Milk Proteins. En: G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (2nd ed., pp. 298–358). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.X0001-3>
- Observatorio de Salud, M. y S.-C. F. A. (2020). *Fórmulas infantiles y lactancia materna*. <http://observatorio.cofa.org.ar/index.php/2020/08/07/formulas-infantiles-y-lactancia-materna/>
- Oldfield, D. J., Taylor, M. W., & Singh, H. (2005). Effect of preheating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture. *International Dairy Journal*, *15*(5), 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.004>
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., & Pearce, K. N. (2001). with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, *10*(2000), 509–518.
- OMS. (2011). *La lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses es lo mejor para todos los niños*. https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding_20110115/es/#:~:text=La OMS recomienda a todas,complementada con otros alimentos nutritivos.
- Palzer, S. (2010). The relation between material properties and supra-molecular structure of water-soluble food solids. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(1), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.08.005>
- Particulate Systems. (2012). *User's Manual Nano Plus zeta/nano particle analyzer*. https://www.micromeritics.com/Repository/Files/NanoPlus_Operators_Manual_10-01-2012.pdf
- Paulsson, M., & Dejmek, P. (1990). Thermal Denaturation of Whey Proteins in Mixtures with Caseins Studied by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Dairy Science*, *73*(3), 590–600. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78707-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78707-3)
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J. A., & de Noni, I. (2013). Nutritional

- Quality of Milk Proteins. En: P.L.H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 A. Proteins: Basic Aspects*. (4th ed., pp. 515–538). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>
- Petit, J., Six, T., Moreau, A., Ronse, G., & Delaplace, G. (2013). β -lactoglobulin denaturation, aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: Pilot-scale experiments and dimensional analysis. *Chemical Engineering Science*, *101*, 432–450.
- Phosanam, A., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020). Effect of storage conditions on physicochemical and microstructural properties of skim and whole milk powders. *Powder Technology*, *372*, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.06.020>
- Phosanam, A., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2021). In vitro digestion of infant formula model systems: Influence of casein to whey protein ratio. *International Dairy Journal*, *117*, 105008. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105008>
- Phosanam, A., Chandrapala, J., Zisu, B., & Adhikari, B. (2021). Storage stability of powdered dairy ingredients: a review. *Drying Technology*, *39*(11), 1529–1553. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1910955>
- Písecký, J. (2012). *Handbook of Milk Powder Manufacture* (2da ed.). GEA Process Engineering A/S. www.niro.com
- Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., De Lamballerie, M., Añón, M. C., & Anton, M. (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*, *19*(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.07.001>
- Radford, S. J., & Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: What is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *238*(1–3), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.02.020>
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2015). Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-Effects on antigenicity. *Journal of Dairy Science*, *98*(7), 4255–4265. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9010>
- Raikos, V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, *24*(4), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.014>
- Rao, A. M. (2014). *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods* (G. V. Barbosa-Cánovas (ed.); 3rd ed.). Springer. <https://doi.org/https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/978-1-4614-9230-6>
- Reglamento Bromatológico Nacional. (1994). *Capítulo 29. Alimentos Modificados. Sección 2. Disposiciones generales para alimentos para lactantes y niños de corta edad*.
- Rockland, L. B. (1960). Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40° C. *Analytical Chemistry*, *32*(10), 1375–1376. <https://doi.org/10.1021/ac60166a055>
- Roos, Y. H. (2002). Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Lait*, *82*, 475–484. <https://doi.org/0.1051/lait:2002025>
- Ruan, D., Wang, H., & Cheng, F. (2018). The Maillard Reaction. In S. Parisi (Ed.), *The Maillard Reaction in Food Chemistry. Current Technology and Applications* (pp. 1–21). Springer. <https://doi.org/https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/978-3-030-04777-1>
- Sabater, C., Prodanov, M., Olano, A., Corzo, N., & Montilla, A. (2016). Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. *Food Chemistry*, *194*, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.127>
- SAC. (2010). *National Food Safety Standard. Infant Formula. GB 10765*. Standarization

- Administration of the People's Republic of China (SAC).
- Saffari, M., & Langrish, T. (2014). Effect of lactic acid in-process crystallization of lactose/protein powders during spray drying. *Journal of Food Engineering*, *137*, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.002>
- Sainz Jiménez, C. L., & Salto Hurtado, A. (2016). *Fórmulas de inicio y fórmulas de continuación para lactantes*. Universidad Complutense de Madrid.
- Sampedro, A., de los Toyos, J. R., & Martínez-Nistal, A. (1995). *Técnicas de Fluorescencia en Microscopía y Citometría* (Universidad de Oviedo (ed.)). Servicio de Publicaciones Universidad de Oviedo.
- Sangeetha, M. K., Mariappan, M., Madhurambal, G., & Mojumdar, S. C. (2015). TG-DTA, XRD, SEM, EDX, UV, and FT-IR spectroscopic studies of l-valine thiourea mixed crystal. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *119*(2), 907–913. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4123-6>
- Satriano, R., Lopez, C., Tanzi, M. N., Jasinski, C., & Rebori, A. (2012). Recomendaciones de uso de fórmulas y fórmulas especiales. *Archivos de Pediatría Del Uruguay*, *83*(2), 128–135.
- Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Huppertz, T., & Chandrapala, J. (2020). Inter-relationship between lactose crystallization and surface free fat during storage of infant formula. *Food Chemistry*, *322*(February), 126636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126636>
- Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Huppertz, T., Chandrapala, J., & Zisu, B. (2019). Physicochemical properties and surface composition of infant formula powders. *Food Chemistry*, *297*(May). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124967>
- Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Huppertz, T., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2021a). Influence of lactose pre-crystallization on the storage stability of infant formula powder containing lactose and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, *111*(September 2020), 106385. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106385>
- Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Huppertz, T., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2021b). Effect of compositional variation on physico-chemical and structural changes in infant formula during storage. *International Dairy Journal*, *116*(104957), 104957. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104957>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, D. G., & Payens, T. A. J. (1976). Micellar aspects of casein. En: E. Matijevic (Ed.), *Surface and Colloid Science* (pp. 165–229). Wiley-Interscience.
- Schmitz-Schug, I., Foerst, P., & Kulozik, U. (2013). Impact of the spray drying conditions and residence time distribution on lysine loss in spray dried infant formula. *Dairy Science and Technology*, *93*(4–5), 443–462. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0115-8>
- Schuck, P. (2017). Implications of Non-Equilibrium States and Glass Transition in Dairy Powders. En: B. Bhandari & Y. H. Roos (Eds.), *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods: Processing Effects and Product-Specific Implications* (pp. 303–324). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100309-1.00016-X>
- Schuck, P., Blanchard, E., Dolivet, A., Méjean, S., Onillon, E., & Jeantet, R. (2005). Water activity and glass transition in dairy ingredients. *Lait*, *85*, 295–304. <https://doi.org/10.1051/lait:2005020>
- Schuck, P., Dolivet, A., & Jeantet, R. (2012). Analytical Methods for Food and Dairy Powders. En: *Analytical Methods for Food and Dairy Powders*. John Wiley & Sons, Ltd.

Referencias

- <https://doi.org/10.1002/9781118307397>
- Schuck, P., Jeantet, R., Bhandari, B., Chen, X. D., Perrone, Í. T., de Carvalho, A. F., Fenelon, M., & Kelly, P. (2016). Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. *Drying Technology*, 34(15), 1773–1790. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1233114>
- Schuck, P., Méjean, S., Dolivet, A., Beaucher, E., & Famelart, M. F. (2005). Pump amperage: a new method for monitoring viscosity of dairy concentrates before spray drying. *Lait*, 85(4–5), 361–367. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1051/lait:2005014>
- Schulze, D. (2008). *Powders and Bulk Solids*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73768-1>
- Severova, V. (1997). *Clima del Uruguay*. https://www.rau.edu.uy/uruguay/geografia/Uy_c-info.htm
- Simpson, T. D., Parrish, F. W., & Nelson, M. L. (1982). Crystalline Forms of Lactose Produced in Acidic Alcoholic Media. *Journal of Food Science*, 47(6), 1948–1951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12920.x>
- Singh, A. M., & Dalgleish, D. G. (1998). The Emulsifying Properties of Hydrolyzates of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 918–924. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75651-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75651-6)
- Singh, J., Prakash, S., Bhandari, B., & Bansal, N. (2019). Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. *Food Research International*, 116(December 2018), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.049>
- Singh, P. R., & Heldman, D. R. (2014). *Introduction to Food Engineering* (5th ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2011-0-06101-X>
- Siročić, A. P., Krehula, L. K., Katančić, Z., & Hrnjak-Murgić, Z. (2016). Characterization of casein fractions - Comparison of commercial casein and casein extracted from cow's milk. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 30(4), 501–509. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2311>
- Slattery, C. W. (1976). Review: casein micelle structure; an examination of models. *Journal of Dairy Science*, 59, 1547–1556.
- Slettengren, K., Xanthakis, E., Ahrné, L., & Windhab, E. J. (2016). Flow Properties of Spices Measured with Powder Flow Tester and Ring Shear Tester-XS. *International Journal of Food Properties*, 19(7), 1475–1482. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1083576>
- Sourdet, S., Relkin, P., Fosseux, P.-Y., & Aubry, V. (2002). Composition of fat protein layer in complex food emulsions at various weight ratios of casein-to-whey proteins. *Lait*, 82(<https://doi.org/10.1051/lait:2002033>), 567–578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/lait:2002033>
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Srinivasan, M., Singh, H., & Munro, P. A. (2003). Influence of retorting (121°C for 15 min), before or after emulsification, on the properties of calcium caseinate oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 80(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00238-8)
- StrategyR. (2021). *Baby Foods and Infant Formula. Global Market Trajectory & Analytics*. <https://www.strategyr.com/market-report-baby-foods-and-infant-formula-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>

Referencias

- Subramanian, A., Prabhakar, V., & Rodriguez-Saona, L. (2011). Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis. En: J.W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da ed., pp. 115–124). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818766-1.00035-0>
- Subramanian, A., & Rodriguez-Saona, L. (2009). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. En: D.-W. Sun (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Part I: Fundamentals and Instruments*. (1st ed., pp. 145–178). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9>
- Télam. (2012). *SanCor vendió su línea infantil a una firma especializada de EE.UU.* El Litoral. <https://www.ellitoral.com/index.php/diarios/2012/02/25/economia1/ECON-03.html>
- Tetra Pak. (1995). Dairy Processing Handbook. En: *Tetra Pak Processing Systems*. Systems, Tetra Pak Processing Systems AB. <http://www.ales2.ualberta.ca/afns/courses/nufs403/PDFs/chapter15.pdf>
- Tham, T. W. Y., Wang, C., Yeoh, A. T. H., & Zhou, W. (2016). Moisture sorption isotherm and caking properties of infant formulas. *Journal of Food Engineering*, *175*, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.014>
- Tham, T. W. Y., Xu, X., Yeoh, A. T. H., & Zhou, W. (2017). Investigation of caking by fat bridging in aged infant formula. *Food Chemistry*, *218*, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.043>
- Thompkinson, D. K., & Kharb, S. (2007). Aspects of Infant Food Formulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *6*, 79–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00020.x>
- Thomsen, M. K., Lauridsen, L., Skibsted, L. H., & Risbo, J. (2005). Two types of radicals in whole milk powder. Effect of lactose crystallization, lipid oxidation, and browning reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1805–1811. <https://doi.org/10.1021/jf0485483>
- Tobin, J. T., Fitzsimons, S. M., Kelly, A. L., Kelly, P. M., Auty, M. A. E., & Fenelon, M. A. (2010). Microparticulation of mixtures of whey protein and inulin. *International Journal of Dairy Technology*, *63*(1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00550.x>
- Tomas, A., Paquet, D., Courthaudon, J. L., & Lorient, D. (1994). Effect of Fat and Protein Contents on Droplet Size and Surface Protein Coverage in Dairy Emulsions. *Journal of Dairy Science*, *77*(2), 413–417. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76967-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76967-8)
- Triani, R., & Foegeding, E. A. (2019). Heat stability of whey protein ingredients based on state diagrams. *International Dairy Journal*, *91*, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.12.006>
- Unruh, D. K., & Forbes, T. Z. (2019). X-ray diffraction techniques. En: J. P. L. Kenney, H. Veeramani, & D. S. Alessi (Eds.), *Analytical Geomicrobiology: A Handbook of Instrumental Techniques*. (pp. 215–237). Cambridge University Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/9781107707399.009>
- van Lieshout, G. A. A., Lambers, T. T., Bragt, M. C. E., & Hettinga, K. A. (2020). How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(14), 2422–2445. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1646703>
- VanLandingham, M., Trussell, J., & Grummer-Strawn, L. (1991). Contraceptive and health benefits of breastfeeding: A review of the recent evidence. *International Family Planning Perspectives*, *17*(4), 131–136. <https://doi.org/10.2307/2133228>
- Vega, C., Douglas Goff, H., & Roos, Y. H. (2007). Casein molecular assembly affects the properties of milk fat emulsions encapsulated in lactose or trehalose matrices. *International*

Referencias

- Dairy Journal*, 17(6), 683–695. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.004>
- Vignolles, M. L., Jeantet, R., Lopez, C., & Schuck, P. (2007). Free fat, surface fat and dairy powders: Interactions between process and product. A review. *Lait*, 87(3), 187–236. <https://doi.org/10.1051/lait:2007010>
- Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4175–4185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf501617s>
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: Do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)
- Wang, C., Wang, H., Sun, X., Sun, Y., & Guo, M. (2019). Heat-Induced Interactions between Whey Protein and Inulin and Changes in Physicochemical and Antioxidative Properties of the Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4089. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms20174089>
- Westergaard, V. (2011). *Milk Powder Technology Evaporation and Spray Drying GEA Process Engineering engineering for a better world Preface to Fifth Edition*. 1–338. https://www.gea.com/en/binaries/Milk Powder Technology - Evaporation and Spray Drying_tcm11-33784.pdf
- Wijayanti, H. B., Brodkorb, A., Hogan, S. A., & Murphy, E. G. (2019). Thermal Denaturation, Aggregation, and Methods of Prevention. En: H. C. Deeth & N. Bansal (Eds.), *Whey Proteins* (pp. 185–247). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812124-5.00006-0>
- Xanthakis, E., Ruud van Ommen, J., & Ahrné, L. (2015). Flowability characterization of nanopowders. *Powder Technology*, 286, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.015>
- Ye, A., Anema, S. G., & Singh, H. (2007). Behaviour of homogenized fat globules during the spray drying of whole milk. *International Dairy Journal*, 17(4), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.04.007>
- Yong, Y. H., & Foegeding, E. A. (2010). Caseins: Utilizing molecular chaperone properties to control protein aggregation in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 685–693. <https://doi.org/10.1021/jf903072g>
- Zhou, P., & Labuza, T. P. (2011). Differential scanning calorimetry. En: John W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da ed., Vol. 1, pp. 256–263). Academic Press. <https://doi.org/10.3139/9781569906446.007>
- Zhou, Z., & Langrish, T. (2021). A review of Maillard reactions in spray dryers. *Journal of Food Engineering*, 305(March), 110615. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110615>
- Zhu, R., Cheng, H., Li, L., Erichsen, H. R., Petersen, M. A., Soerensen, J., & Skibsted, L. H. (2018). Temperature effect on formation of advanced glycation end products in infant formula milk powder. *International Dairy Journal*, 77, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.005>