



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Dichano, María Celeste

Estrategias para incrementar la solubilidad y actividad emulsionante del aislado de proteínas de arroz



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

by Atribución No Comercial Sin Obra Derivada (by-nc-nd)

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Dichano, M. C. (2024) *Estrategias para incrementar la solubilidad y actividad emulsionante del aislado de proteínas de arroz*. Universidad Nacional de Quilmes. Departamento de Ciencia y Tecnología. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4619>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>



Universidad
Nacional
de Quilmes



Laboratorio de Investigación
en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos

Departamento de Ciencia y Tecnología

Estrategias para incrementar la solubilidad y actividad emulsionante del aislado de proteínas de arroz

Trabajo final de grado

Ingeniería en Alimentos

María Celeste Dichano

Directora: Daniela Edith Igartúa

Co-director: Dario Marcelino Cabezas

Bernal, 2024

El presente trabajo final, para optar por el título de Ingeniera en Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes, fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección de la Dra. Daniela Edith Igartúa y el Dr. Dario Marcelino Cabezas.

Agradecimientos

Me permito este espacio para reflexionar en el camino recorrido y en todas las personas que lograron hacer de éste una experiencia hermosa.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Quilmes por permitirme acceder a una educación pública de calidad. Gracias por el conocimiento impartido, por brindarme todos los recursos para hacer de este proceso lo más simple posible. Gracias por hacerme sentir a gusto en estos años de carrera, por hacer de este lugar una segunda casa. Gracias por permitirme estudiar y trabajar y por darme mi primera experiencia laboral. Gracias a todos los profesionales que conocí en este recorrido, de cada uno de ellos me llevé algo útil para implementar tanto en mi carrera estudiantil como profesional.

Así mismo, extendo mi agradecimiento al Departamento de Ciencia y Tecnología y, en especial, al Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), el lugar que me abrió las puertas para llevar a cabo el presente trabajo de investigación. Gracias por la confianza y por brindarme un cálido ambiente en el cual trabajar. Gracias a todos los que conforman este espacio, en especial al Dr. Gonzalo G. Palazolo y al Dr. Dario M. Cabezas, por acompañarme en todo el trayecto, por el tiempo y la dedicación. Gracias por responder a cada pregunta con paciencia y compromiso, por proponer ideas y discutir resultados. Y por ser de los mejores docentes que me permitió conocer esta carrera.

El mayor agradecimiento se lo lleva mi directora, la Dra. Daniela Igartúa, quien creyó en mí desde el primer instante y se aseguró de transmitirme confianza y seguridad durante todo el proceso. Gracias por todo el tiempo dedicado, por cada enseñanza, por la paciencia, por el entendimiento, por la empatía. Gracias por musicalizar las mañanas y tardes de trabajo, por dejarme instalar todo el día en el laboratorio si tenía que cursar más tarde, por sellarme los eppendorfs con parafilm para ahorrar tiempo. Gracias por hacer de ese laboratorio y de este equipo un lugar donde uno desea quedarse para siempre. Gracias por cada palabra de aliento tanto para con la carrera como para con la vida. Gracias por las risas y los consejos. Gracias por ser una excelente persona.

En lo que respecta al desarrollo de esta tesis, quisiera agradecer a Sofia Güerrissi de Grupo Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina) por donarnos el aislado de proteínas de arroz, materia prima de este trabajo. Gracias al Dr. Diego S. Vazquez del Laboratorio de

Expresión y Plegado de Proteínas de la UNQ por permitirnos el uso del espectrofluorómetro. Además, gracias a las Dras. Estefania Achilli y Constanza Flores por facilitarnos el protocolo detallado para realizar los SDS-PAGE.

Considero que el proceso es mucho más importante que el resultado en sí. Gracias a mis compañeros, hoy amigos, por caminar este camino conmigo.

Y, por supuesto, gracias a mi familia. Gracias a mis papás, Silvia y Daniel, por apoyarme en todo lo que me propuse. Por transmitirme la confianza y la tranquilidad en los momentos necesarios. Por facilitarme el desempeño de esta carrera, sin su acompañamiento no hubiese sido posible. Gracias por llevarme a la universidad los días de lluvia o irme a buscar a la estación si se hacía tarde, gracias por bajar el volumen de la tele cada vez que se los pedía, gracias por cada apunte impreso. Gracias por enorgullecerse con cada logro, sin importar si fuese pequeño o grande. Gracias por ayudarme a hacer realidad mis sueños y mis proyectos.

Gracias a mis abuelos y a mis tíos, en especial a mi iaia, por prenderme una velita en cada examen de la carrera. Gracias por entender las ausencias de algunos (varios) domingos. Gracias por siempre querer saber cómo me fue y recordarme “lo inteligente que soy” si la respuesta era “bien”.

Gracias a mi hermana, Maru, por ser mí guía desde que tengo memoria. Por incentivarme a nunca bajar los brazos, por enseñarme que nada es tan malo. Gracias por ser en parte responsable de quién soy hoy.

A todos los que conocí en estos seis años de carrera, a todos los que me crucé en un aula, pasillo, laboratorio, comedor, con todos los que compartí un mate, una birra, una risa, un llanto.

A todos, ¡gracias!

Publicaciones y actividades

Los resultados de este trabajo de investigación permitieron generar las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas científicas

- Igartúa DE, **Dichano MC**, Ferrari SB, Palazolo GG & Cabezas DM. (2023). Combination of pH-shifting, ultrasound, and heat treatments to enhance solubility and emulsifying stability of rice protein isolate. Food Chemistry, 137319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137319>

Publicaciones en reuniones científicas

- *Evaluación del efecto del pH, el tratamiento térmico y el tratamiento ultrasónico sobre proteínas aisladas de arroz.* **Dichano MC**, Palazolo GG, Cabezas DM, Igartúa DE. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022). 4 al 6 de octubre de 2022. Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- *Combinación de tratamientos térmicos, ultrasónicos y de pH para incrementar la solubilidad y actividad emulsionante de proteínas aisladas de arroz.* **Dichano MC**, Ferrari S, Palazolo GG, Cabezas DM, Igartúa DE. XVIII Congreso Argentino De Ciencia Y Tecnología De Alimentos (CYTAL). 4 al 6 de octubre de 2023. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Otras actividades

Además, durante la pasantía de investigación en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de los Alimentos, se ha colaborado en la obtención y caracterización de complejos coacervados entre el aislado de proteínas de arroz modificado y la goma arábiga. Parte de dichos resultados se han presentado en la siguiente reunión científica:

- *Efecto del pH y la relación proteínas-polisacáridos en las interacciones y propiedades emulsionantes de proteínas aisladas de arroz y goma arábiga.* **Dichano MC**, Morales Huanca MN, Palazolo GG, Cabezas DM, Igartúa DE. 11^{er}

Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA). 27 al 29 de septiembre de 2023. Montevideo, Uruguay.

El artículo científico relacionado con dichos experimentos se encuentra en proceso de revisión en una revista internacional del área de alimentos:

- *Rice proteins – gum arabic coacervates: Effect of pH and polysaccharide concentration in oil-in-water emulsion stability.* Igartúa DE, **Dichano MC**, Morales Huanca MN, Palazolo GG, Cabezas DM.

Adicionalmente, durante su trabajo de tesis, la postulante se desempeñó como auxiliar académica alumna del área Ciencias Básicas de los Alimentos.

Índice

Agradecimientos	3
Publicaciones y actividades	5
<i>Publicaciones en revistas científicas</i>	5
<i>Publicaciones en reuniones científicas</i>	5
<i>Otras actividades</i>	5
Índice	7
Resumen	11
Abreviaturas	15
1. Introducción	17
1.1. Proteínas aisladas de arroz	17
1.1.1. Fuente de obtención: Arroz	17
1.1.2. Fracciones proteicas del arroz	19
1.1.2.1. <i>Albúminas</i>	20
1.1.2.2. <i>Prolaminas</i>	21
1.1.2.3. <i>Globulinas</i>	22
1.1.2.4. <i>Glutelinas</i>	23
1.1.3. Métodos de extracción de las proteínas del arroz	23
1.1.3.1. <i>Extracción enzimática</i>	24
1.1.3.2. <i>Extracción química</i>	25
1.1.3.3. <i>Extracción física</i>	25
1.1.3.4. <i>Aislados de proteínas de arroz comerciales</i>	26
1.1.4. Métodos de modificación de proteínas	26
1.1.5. Propiedades funcionales	28
1.1.5.1. <i>Solubilidad</i>	28
1.1.5.2. <i>Propiedades espumantes y emulsionantes</i>	29
1.1.5.3. <i>Propiedades nutricionales</i>	30
1.2. Emulsiones	32
1.2.1. Definición y clasificación	32
1.2.2. Preparación de emulsiones	33
1.2.3. Estabilidad de las emulsiones	38
1.2.3.1. <i>Separación gravitacional (cremado)</i>	39
1.2.3.2. <i>Floculación</i>	39
1.2.3.3. <i>Coalescencia</i>	39

1.2.3.4. Coalescencia parcial.....	40
1.2.3.5. Desproporción o maduración de Ostwald	40
1.2.3.6. Inversión de fases.....	41
1.2.4. Proteínas como emulsionantes.....	41
2. Objetivos.....	45
3. Materiales y métodos.....	47
3.1. Materiales.....	47
3.2. Modificación del RPI	47
3.3. Caracterización de muestras de RPI modificado.....	49
3.3.1. Solubilidad.....	49
3.3.1.1. Fundamentos teóricos	49
3.3.1.2. Condiciones experimentales.....	50
3.3.2. Potencial Z.....	51
3.3.2.1. Fundamentos teóricos	51
3.3.2.2. Condiciones experimentales.....	54
3.3.3. Hidrofobicidad superficial.....	54
3.3.3.1. Fundamentos teóricos	54
3.3.3.2. Preparación y almacenamiento del stock de sonda PRODAN	55
3.3.3.3. Condiciones experimentales.....	56
3.3.4. Espectroscopia de fluorescencia.....	56
3.3.4.1. Fundamentos teóricos	56
3.3.4.2. Condiciones experimentales.....	59
3.3.5. SDS- PAGE.....	59
3.3.5.1. Fundamentos teóricos	59
3.3.5.2. Condiciones experimentales.....	61
3.3.6. Distribución de tamaño de partícula	62
3.3.6.1. Fundamentos teóricos	62
3.3.6.2. Condiciones experimentales.....	65
3.3.7. Microscopía de fluorescencia convencional y microscopía confocal láser	65
3.3.7.1. Fundamentos teóricos	66
3.3.7.2. Condiciones experimentales.....	68
3.4. Actividad emulsionante de muestras de RPI modificado	68
3.4.1. Preparación de emulsiones O/W.....	68
3.4.2. Distribución de tamaño de partícula.....	69
3.4.2.1. Fundamentos teóricos	69

3.4.2.2. Condiciones experimentales.....	70
3.4.3. Microscopía	70
3.4.4. Estabilidad física.....	71
3.4.4.1. Fundamentos teóricos	71
3.4.4.2. Condiciones experimentales.....	73
3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	73
4. Resultados y discusión	75
4.1. Impacto de diferentes tratamientos en las características del RPI	75
4.1.1. Solubilidad.....	75
4.1.2. Potencial Z, hidrofobicidad superficial y espectroscopia de fluorescencia	78
4.1.3. Tamaño de partícula y microscopia de fluorescencia convencional y confocal láser de barrido.....	83
4.1.4. SDS-PAGE.....	90
4.2. Impacto de diferentes tratamientos en las propiedades emulsionantes del RPI	92
4.2.1. Distribución de tamaño de partícula y microscopía óptica	93
4.2.2. Estabilidad física y registro fotográfico	100
5. Conclusiones y perspectivas.....	107
6. Referencias bibliográficas	111

Resumen

En los últimos años se ha dirigido la atención a las proteínas de origen vegetal debido a las considerables ventajas que suponen desde el punto de vista de salud, costos, funcionalidad, entre otras. Las mismas pueden ser pensadas como una alternativa renovable y sostenible respecto a las proteínas de origen animal y su utilización responde a una demanda de consumo que está manifestando una parte de la sociedad en constante crecimiento. Entre las proteínas vegetales, las proteínas de arroz han despertado un interés creciente en la industria alimentaria ya que son hipoalergénicas, hipocolesterolémicas, poseen propiedades antioxidantes y actividades anticancerígenas, son ricas en aminoácidos esenciales y, según se informa, tienen mayor digestibilidad y valor nutritivo que las proteínas derivadas de otros cereales importantes, como el trigo, el maíz y la cebada. Así, en la actualidad, el desarrollo de aislados de proteínas de arroz (RPI, por *rice proteins isolate*) y su uso como ingredientes alimentarios se han convertido en una tendencia importante. Sin embargo, los RPI poseen un elevado contenido de glutelina, por lo que presentan baja solubilidad acuosa y pobres propiedades funcionales. Asimismo, la obtención de RPI por secado por aspersión a nivel industrial, genera agregación masiva de las proteínas, limitando aún más su solubilidad y aplicación directa en alimentos.

Por otra parte, las proteínas se utilizan comúnmente como emulsionantes alimentarios debido a su capacidad para absorberse en la interfase aceite-agua y formar películas interfaciales que permiten tanto la obtención como la estabilización de emulsiones aceite en agua (O/W). Específicamente, las propiedades emulsionantes de las proteínas se ven afectadas por la tasa de adsorción de la proteína en la interfase, la cantidad de proteína adsorbida, el reordenamiento conformacional en la interfase, el grado de reducción de la tensión interfacial y la formación de una película cohesiva. Los factores cruciales que afectan las propiedades emulsionantes de las proteínas son, principalmente, la solubilidad y la hidrofobicidad superficial.

Considerando lo expuesto, el presente trabajo se propuso evaluar el impacto de combinar diferentes tratamientos para modificar la solubilidad y propiedades emulsionantes de un RPI comercial.

En primer lugar, se estudiaron diferentes combinaciones de tratamientos de cambios de pH (PS), ultrasónicos (US) y térmicos (HT), que dieron lugar a diez muestras: sin tratar

(RPI), tratadas con US (RPI-US), tratadas con HT (RPI-HT), tratamientos combinados de US y HT (RPI-US+HT y RPI-HT+US), tratada con PS (RPI-PS), y combinación de PS con tratamientos US y/o HT (RPI-PS+US, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US). El objetivo de este diseño experimental fue seleccionar las condiciones óptimas que aseguren un aumento significativo de solubilidad respecto al control de RPI y puedan, de esta forma, ser empleadas para estabilizar emulsiones O/W. Como resultado, se obtuvo que los tratamientos realizados a pH neutro (RPI, RPI-US, RPI-HT y RPI-US+HT y RPI-HT+US) no modificaron la solubilidad y las demás características superficiales, debido a la elevada agregación y baja dispersabilidad que presenta el RPI en dichas condiciones de pH, mientras que el tratamiento con PS solo permitió obtener una mejora pequeña pero no significativa en la solubilidad de las proteínas. De esta forma, los resultados obtenidos apuntaron a seguir trabajando con las muestras tratadas con PS combinado con US y/o HT. Estos tratamientos combinados aumentaron significativamente la solubilidad, induciendo cambios en la estructura superficial de las proteínas y generando agregados de proteínas menos compactos y más dispersos. Respecto al control de RPI sin tratar, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US presentaron los valores más prometedores con una solubilidad del $79,1 \pm 9,5 \%$ y $91,8 \pm 6,4 \%$ y una hidrofobicidad superficial del 262 y 283 %, respectivamente. Asimismo, produjeron una mayor intensidad de emisión de fluorescencia, al mismo tiempo que dieron lugar a distribuciones de tamaño de partícula más amplias con una mayor proporción de partículas de menores tamaños, además de un estado completamente disperso según las microscopías.

En segundo lugar, se prepararon emulsiones O/W estabilizadas con las muestras de RPI modificado seleccionadas (RPI-PS+US, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US). De esta forma, se observó que las emulsiones preparadas con RPI-PS+US no mostraron un proceso de coalescencia pero, al igual que en el control RPI, sí presentaron floculación. Además, presentaron la formación de una capa de crema homogénea y fueron las únicas en las que se observó clarificación. Resultados similares fueron observados para las emulsiones obtenidas con RPI-PS+HT, aunque las mismas presentaron tamaños reducidos tanto para gotas individuales como para flóculos con respecto a los encontrados para las emulsiones preparadas con RPI y RPI-PS+US. Finalmente, las combinaciones de los tres tratamientos (RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US) permitieron obtener emulsiones con los tamaños de gotas más pequeños y, por ende, una desestabilización a menor velocidad, demostrando una marcada mejora respecto del control de RPI y de las demás muestras.

En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que el enfoque combinado propuesto en este trabajo tiene un efecto sinérgico en la modificación de las estructuras de las proteínas para mejorar tanto la solubilidad del RPI como las propiedades de las emulsiones estabilizadas con el mismo. Por lo tanto, las muestras del RPI modificado pueden ampliar la aplicación de los subproductos del arroz en el área alimentaria.

Abreviaturas

BS: *Backscattering* (retrodispersión)

CLSM: *Confocal laser scanning microscopy* (microscopía confocal láser de barrido)

DLS: *Dynamic light scattering* (dispersión de luz dinámica)

DTP: Distribución de tamaño de partícula

H₀: Hidrofobicidad aromática superficial

HT: *Heat treatment* (tratamiento térmico)

MPM: Marcador de peso molecular

PB-I: *Protein body I* (cuerpo proteico I)

PB-II: *Protein body II* (cuerpo proteico II)

PDI: *Polidispersity index* (índice de polidispersidad)

pI: Punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

PS: *pH-shifting* (cambio de pH)

PRODAN: N,N-Dimetil-6-propionil-2-naftilamina

RFU: *Relative fluorescence unit* (unidad de fluorescencia relativa)

RPI: *Rice protein isolate* (proteínas aisladas de arroz).

T: Transmitancia

TSI: *Turbiscan stability index* (índice de estabilidad de Turbiscan)

US: Tratamiento ultrasónico

1. Introducción

1.1. Proteínas aisladas de arroz

1.1.1. Fuente de obtención: Arroz

El arroz (*Oryza sativa L.*) representa uno de los cultivos alimenticios líderes en el mundo, con una producción anual global estimada de alrededor de 520 millones de toneladas métricas (basado en arroz elaborado) (USDA, 2023), con un 7 % del comercio mundial de granos, luego de la soja (31 %), del trigo (18 %) y del maíz (12 %). Se cultiva hoy en día en más de 100 países, en todos los continentes excepto en la Antártida. Es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial, principalmente en los países asiáticos, donde aporta una proporción considerable de la ingesta proteica de millones de personas (Muthayya et al., 2014).

Los principales productores son China con 206 millones de toneladas (30 % del total mundial), seguida por India con 153 millones de toneladas (20 % del total mundial). Por su parte, Brasil es el principal productor de América del Sur y aporta el 1,5 % a la producción mundial de arroz. Argentina produce 1,6 millones de toneladas anuales. En los últimos 10 años la producción se incrementó un 121 %, acompañada por un alza del 16 % en los rendimientos. Actualmente, Argentina exporta alrededor de 640 mil toneladas de arroz (SISA, 2023).

El grano de arroz en bruto se compone de la capa más externa, es decir, la cáscara (del 16 al 28 % de la masa seca) y la cariósida encerrada dentro de la cáscara. La cariósida contiene el endospermo blanco almidonado (89 a 94 %), el embrión (2 a 3 %), el pericarpio (1 a 2 %) y la capa de aleurona, cubierta de la semilla y núcleo, que juntos contribuyen del 4 al 6 % de la masa de la cariósida (Ghanghas et al., 2022) (Figura 1).

La composición química del arroz se detalla en la Tabla 1.

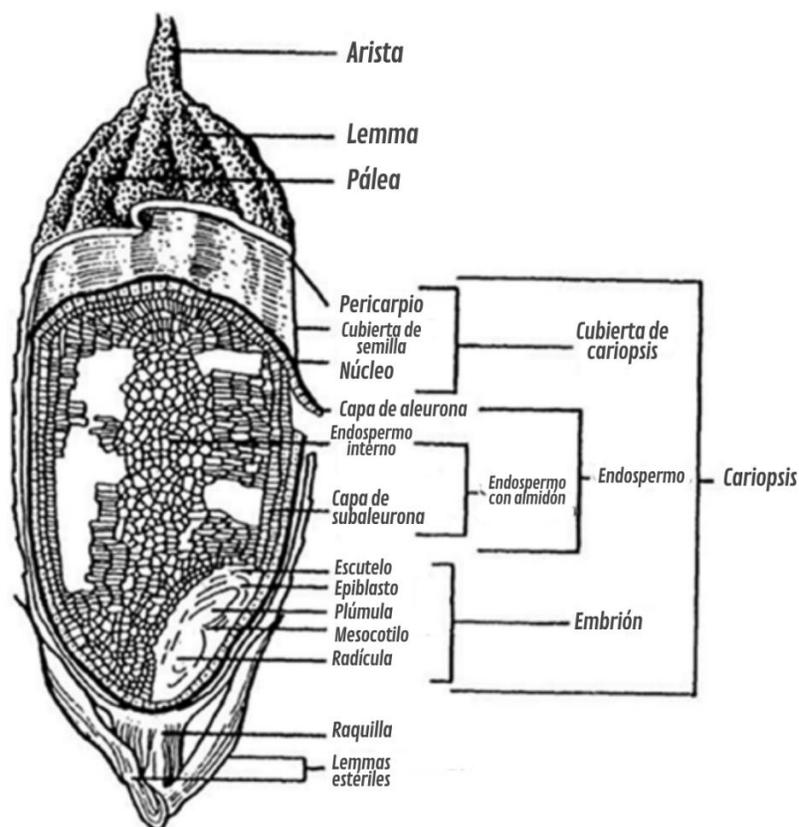


Figura 1. Estructura del grano de arroz. Adaptada de Amagliani et al. (2017a).

Tabla de composición química del arroz blanco crudo	
Agua	12,5 g
Proteínas	6,9 g
Lípidos totales	0,2 g
Colesterol	0 mg
Ácidos grasos saturados	0,05 g
Ácidos grasos monoinsaturados	0,06 g
Ácidos grasos poliinsaturados	0,05 g
Ácidos grasos trans	0 g
Carbohidratos totales	79,2 g
Carbohidratos disponibles	77,5 g
Azúcares totales	0,3 g
Fibra alimentaria	1,7 g
Cenizas	1,2 g

Tabla 1. Composición química del arroz blanco cada 100 gramos de porción comestible y en crudo. (Ministerio de Salud de la Nación, 2022).

Las fracciones de molienda del grano de arroz difieren en términos de contenido de proteína, siendo mayor el del arroz integral, es decir, la cariósida del arroz, en comparación con el arroz molido o blanco (compuesto completamente de endospermo), debido a la eliminación del salvado rico en proteínas durante la molienda. Además, el contenido de proteína del arroz está influenciado por factores como el manejo y las prácticas culturales, el clima y el genotipo (Amagliani et al., 2017a; Champagne et al., 2004).

Las proteínas influyen significativamente en las propiedades estructurales, funcionales y nutricionales del arroz, y su caracterización ha sido objeto de extensas investigaciones. Se ha informado que la digestibilidad de las proteínas y el valor biológico del arroz son más altos que los de otros cereales importantes como el trigo, el maíz y la cebada (Amagliani et al., 2017b; Han et al., 2015). Además, las proteínas de arroz y algunos de sus derivados se consideran hipoalergénicos (Helm y Burks, 1996) e hipocolesterolémicos (Chrastil, 1992) y se han asociado con propiedades antioxidantes (Kawase et al., 1998; Singh et al., 2021) y anticancerígenas (Xia et al., 2012; Pantoa et al., 2020). Por tanto, el arroz representa una interesante fuente de proteínas para la formulación y fabricación de productos nutricionales (Amagliani et al., 2017a).

1.1.2. Fracciones proteicas del arroz

Las proteínas de arroz se pueden clasificar en base a escala de solubilidad desarrollada por Osborne (1924), lo que da lugar a cuatro fracciones proteicas: albúminas (solubles en agua), prolaminas (solubles en alcohol), globulinas (soluble en soluciones salinas diluidas) y glutelinas (solubles en álcali/ácido) (Hoogenkamp et al., 2017). De todas formas, los datos informados en la literatura sobre las proporciones de dichas fracciones de proteínas del arroz varían ampliamente, según la variedad de arroz y los procedimientos de extracción.

Las proteínas se organizan en el grano de arroz principalmente en forma de orgánulos de almacenamiento llamados cuerpos proteicos (PB, por *protein bodies*). Se han identificado dos tipos de PB morfológicamente distintos en el endospermo de arroz, a saber, el tipo I (PB-I) y el tipo II (PB-II). El PB-I tiene una estructura laminar, es de forma esférica y es rico en prolaminas, mientras que el PB-II tiene una estructura cristalina, presenta una

forma irregular y contiene glutelinas predominantemente (Bechtel y Juliano, 1980; Ogawa et al., 1987) (Figura 2). Según Ogawa et al. (1987), las proteínas de almacenamiento del endospermo comprenden 60-65 % de PB-II, 20-25 % de PB-I y 10-15 % de albúminas y globulinas en el citoplasma. Las fracciones de molienda del grano de arroz difieren en términos de composición proteica (Amagliani et al., 2017a).

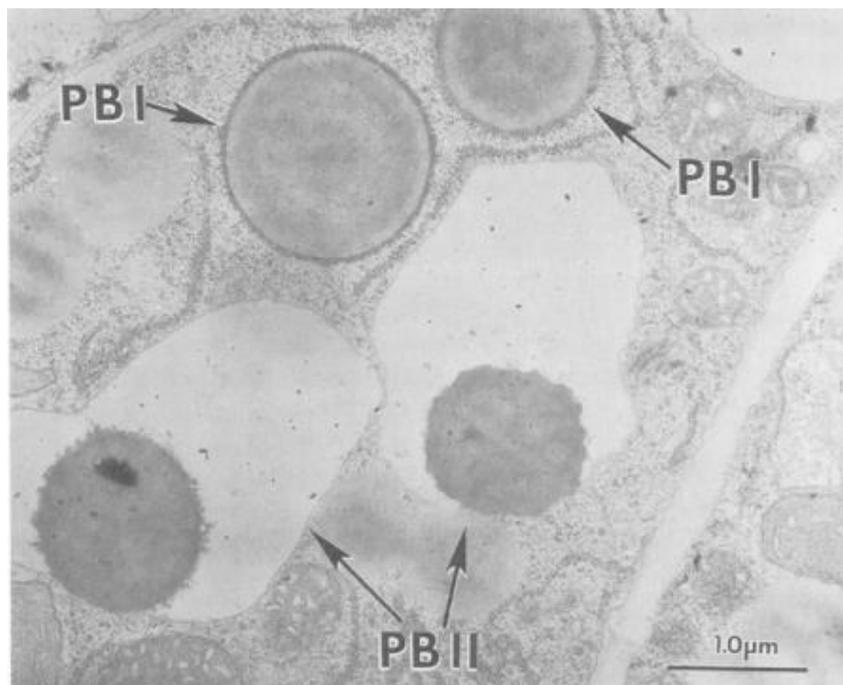


Figura 2. Micrografía electrónica que muestra dos tipos de cuerpos proteicos en el endospermo en desarrollo de la variedad de arroz Kinmaze (Takaiwa et al., 2019).

1.1.2.1. *Albúminas*

La fracción de albúminas constituye del 4 al 6 % de las proteínas de la semilla en el arroz, alrededor del 35 % del salvado de arroz (Adebiyi et al., 2009) o del 4 al 8 % del endospermo (Cagampang et al., 1966). Es una fracción de proteínas minoritaria al igual que las prolaminas (Ghanghas et al., 2022).

La fracción de albúminas contiene proteínas solubles en agua con mínimos enlaces disulfuros y suficiente carga neta superficial para presentar una superficie hidrofílica (Hamada, 1997; Romero, 2014; Shewry y Casey, 1999). Sin embargo, las albúminas coagulan por calentamiento ya que este tratamiento induce la exposición de residuos de

aminoácidos hidrofóbicos, promoviendo así sus interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Ghanghas et al., 2022). Las temperaturas de desnaturalización de la albúmina fueron reportadas en 75,7 °C y 73 °C por Ju et al. (2001) y Adebisi et al. (2009), respectivamente.

Las albúminas de arroz son fácilmente digeribles y absorbibles. La fracción de albúminas contiene proteínas con pesos moleculares en el rango de 10-200 kDa (Figura 3), predominando la proteína de 16 kDa y la glicoproteína de 60 kDa (Hoogenkamp et al., 2017).

Según distintos autores, el punto isoeléctrico (pI) de esta fracción es pH 4,1 o 6,4 (Ju et al., 2001; Padhye y Salunkhe, 1979).

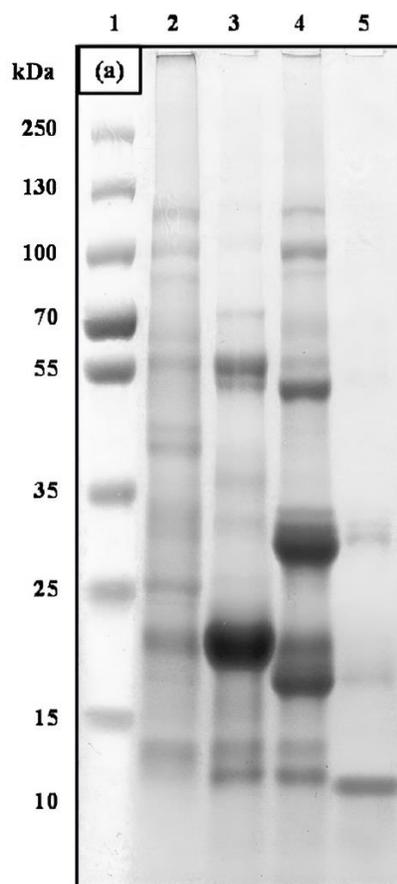


Figura 3. Patrones representativos de SDS-PAGE de fracciones de proteína de arroz enriquecidas (1: marcador de peso molecular; 2: albúminas; 3: globulinas; 4: glutelinas; 5: prolaminas) (Amagliani et al., 2017b).

1.1.2.2. Prolaminas

Las prolaminas comprenden del 2,6 al 3,3 % (Cagampang et al., 1966) y alrededor del 4 % (Fabian y Ju, 2011) en el endospermo y en el salvado de arroz, respectivamente. Es la fracción proteica hidrófoba localizada en los cuerpos proteicos I (PB-I) (Ghanghas et al., 2022). Las prolaminas contienen altos niveles de ácido glutámico o glutamato, alanina, glicina y arginina pero bajos en lisina (Romero, 2014).

Las prolaminas son proteínas solubles en alcohol que presentan baja solubilidad en agua debido a su alto contenido de aminoácidos ácidos y bajo contenido de aminoácidos polares; están presentes en los aislados de proteínas de arroz (RPI, por *rice protein isolate*) como monómeros y pequeños agregados (Hoogenkamp et al., 2017).

El peso molecular (PM) de estas proteínas oscila en el rango de 12 y 17 kDa (Figura 3) (Padhye y Salunkhe, 1979). En este sentido, se identificaron tres subunidades polipeptídicas con PM aparentes de 10, 13 y 16 kDa, siendo predominante la prolamina de 13 kDa (Ogawa et al., 1987). La prolamina de 13 kDa es rica en leucina y glutamina, pero carece de lisina (Hibino et al., 1989). Por otro lado, las prolaminas de 16 kDa y 10 kDa poseen aminoácidos ricos en azufre, como la cisteína y la metionina (Hibino et al., 1989).

Según se ha reportado, el pI de la fracción de prolaminas es pH 6,0-6,5 (Ju et al., 2001; Padhye y Salunkhe, 1979).

1.1.2.3. Globulinas

Las globulinas están presentes en el endospermo de arroz en un 9,6-10,8 % (Cagampang et al., 1966) y alrededor de un 15-26 % en el salvado de arroz (Krishnan et al., 1992).

Se considera que las globulinas presentan cadenas polipeptídicas de distinto tamaño unidas entre sí por puente disulfuro. Sin embargo, estas estructuras cuaternarias presentan baja o nula agregación (Hamada, 1997).

Esta fracción puede clasificarse en γ -globulina de 16 kDa y α -globulina de 21 kDa (Figura 3), y su agregación puede promoverse mediante tratamientos térmicos que inducen interacciones hidrofóbicas y reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Ghanghas et al., 2022; Krishnan et al., 1992).

Son solubles en soluciones salinas debido a la presencia de carga eléctrica neta (Hamada, 1997; Romero, 2014). Estas proteínas son ricas en aminoácidos que contienen azufre, cisteína y metionina, pero bajas en lisina (Romero, 2014; Hoogenkamp et al., 2017).

Las globulinas poseen buenas propiedades antigénicas (Landers et al., 1994) y tienen un pI de 4,3. También parece tener una temperatura de desnaturalización relativamente baja de 60 °C (Ghanghas et al., 2022).

1.1.2.4. *Glutelinas*

La mayoría de las proteínas del grano de arroz se encuentran en la fracción de glutelinas. El endospermo contiene del 66 al 78 % (Cagampang et al., 1966), mientras que el salvado tiene alrededor del 11 al 27 % (Romero, 2014).

Se encuentra principalmente en los cuerpos proteicos PB-II y contiene una buena cantidad de lisina, aunque en menor cantidad que la albúmina de arroz (Ghanghas et al., 2022).

Las glutelinas son extremadamente insolubles en agua, pero son fácilmente solubles en condiciones ácidas (pH < 3,0) o alcalinas (pH > 10,0) (Shih, 2004).

Las glutelinas presentan proteínas de alto peso molecular, oscilando entre 45 y 150 kDa (Figura 3). Esta fracción se puede dividir en dos subunidades; las subunidades ácidas (α) contienen casi el doble de ácido glutámico/glutamina y más serina y glicina que las subunidades básicas (β), que contienen más alanina, lisina, ácido aspártico/asparagina e isoleucina, con PM aparentes de 30 a 39 y 19 a 25 kDa, respectivamente (Juliano, 2007). La composición en aminoácidos de las glutelinas es similar a la composición en aminoácidos de las proteínas totales del arroz, porque es la fracción proteica más abundante (Hoogenkamp et al., 2017).

Según diferentes autores, el pI de la glutelina se reporta como pH 4.8, 5.7-6.8 o 8.0-8.7 (Ju y Rath, 2001; Padhye y Salunkhe, 1979; Shyur, et al., 1988).

En RPI, las glutelinas se presentan como proteínas glicosiladas, unidas por disulfuro y ampliamente agregadas con alta hidrofobicidad superficial (Takaiwa et al., 1999).

1.1.3. Métodos de extracción de las proteínas del arroz

En el pasado, hubo poco interés en el procesamiento de proteínas de arroz, principalmente debido al contenido proteico relativamente bajo, su baja solubilidad en agua y, por ende, las oportunidades comerciales limitadas.

Sin embargo, las propiedades nutricionales y para la salud de las proteínas vegetales en general, y las proteínas de arroz en particular, son ampliamente reconocidas hoy en día, lo cual ha permitido un aumento de su disponibilidad comercial en los últimos años. El creciente interés de la industria y las comunidades académicas de investigación en estos ingredientes permitieron el desarrollo de procesos para la extracción, enriquecimiento, purificación y funcionalización de proteínas de arroz, incluyendo la producción de RPI (Figura 4).

En los últimos años, se han estudiado diversos tratamientos químicos, físicos y enzimáticos como potencial en la extracción de proteínas, y algunos se han aplicado industrialmente (Amagliani et al., 2017a).



Figura 4. Diagrama de extracción de proteínas de arroz.

1.1.3.1. Extracción enzimática

El componente principal de la harina de arroz es el almidón. Para la separación de proteínas, la hidrólisis y la solubilización del almidón se realizan utilizando la enzima α -amilasa (Ghanghas et al., 2022). Según diversos autores, el uso de enzimas hidrolizantes

de carbohidratos como la celulosa o una combinación de celulosa y hemicelulosa, además de la α -amilasa, enriquecería la proteína en el residuo y así mejoraría la capacidad de extracción liberando proteínas de las estructuras basadas en polisacáridos (Fabian y Ju, 2011; Shih et al., 1999).

1.1.3.2. *Extracción química*

La extracción química de proteínas implica el uso de diferentes disolventes. Esta técnica es útil para aislar proteínas con mínima pérdida y máximo rendimiento. La extracción con disolventes comprende principalmente tres pasos: desgrasado, extracción y precipitación de proteínas de una muestra cruda (Jayaprakash et al., 2022). Además de las proteínas, en el precipitado también se encuentran presentes una gran cantidad de compuestos/impurezas no proteicos. Por lo tanto, se estandarizan diferentes métodos químicos para el aislamiento de proteínas sobre la base de una recuperación máxima y una pérdida mínima. La eficacia del método de aislamiento de proteínas depende principalmente de la naturaleza de la muestra proteica (Kumar et al., 2021).

El método de extracción alcalina es el método más utilizado para la extracción de proteínas. Éstas macromoléculas se exponen a una solución alcalina para aumentar su solubilidad en la fase acuosa, permitiendo la preparación de aislados y concentrados proteicos (De Groot y Slump, 1969). Esto se debe a la ionización de los aminoácidos ácidos que se produce en el pH básico. Los estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que las proteínas de arroz preparadas por extracción alcalina tienen una mayor digestibilidad y biodisponibilidad en comparación con las preparadas por degradación del almidón por α -amilasas como resultado de los cambios estructurales en el PB-I poco digerible causado por la extracción alcalina (Kubota et al., 2010). Sin embargo, la extracción alcalina presenta algunos inconvenientes ya que la condición de pH extremo durante el proceso de extracción alcalina cambia la estructura nativa de las proteínas y también afecta su valor nutricional. La lisina es el aminoácido limitante en las proteínas del arroz, por lo tanto, el método de extracción alcalina debe usarse en condiciones óptimas para evitar la pérdida del valor nutritivo (Ghanghas et al., 2022).

1.1.3.3. *Extracción física*

Los métodos físicos suelen preferirse a los métodos químicos o enzimáticos en el procesamiento de alimentos, ya que inducen menos modificaciones (Shih, 2003), además

de ser, en general, más económicos y más fáciles de adaptar y utilizar en la industria. La congelación y descongelación, la mezcla de alta velocidad, la sonicación, la cocción hidrotermal, la microfluidización y el uso de agua subcrítica se encuentran entre los enfoques físicos probados para extraer proteínas del arroz (Amagliani et al., 2017a).

Entre los tratamientos físicos probados, la sonicación dio el mayor rendimiento de extracción de proteínas, aunque solo fue del 15 %. Sin embargo, la extractabilidad de proteínas aumentó significativamente cuando estos tratamientos físicos se combinaron con la acción de enzimas como la α -amilasa y la proteasa P (Amagliani et al., 2017a).

1.1.3.4. *Aislados de proteínas de arroz comerciales*

Como se ha explicado, varios de los tratamientos de extracción tienen el potencial de inducir la desnaturalización y/o agregación de las proteínas, lo que reduce su solubilidad, haciendo que el empleo de las proteínas del arroz sea aún más desafiante (Amagliani et al., 2017a). Además, como el comportamiento global de los aislados proteicos está determinado en gran medida por el comportamiento de su fracción proteica mayoritaria, los RPI son altamente insolubles en agua y muestran baja actividad superficial en condiciones de pH neutro (Amagliani et al., 2017a; Dai et al., 2022; Zhao et al., 2020). Esto limita su aplicación directa en la industria alimentaria. Sumado a ello, la mayoría de los aislados proteicos comerciales se suele obtener por la técnica de secado por aspersión que induce aún más la agregación proteica (Figura 4). Por lo tanto, mejorar la solubilidad de los RPI en condiciones neutras es un desafío crucial para aprovechar al máximo estas proteínas vegetales de alta calidad.

Particularmente, en el presente trabajo se utilizó un aislado proteico comercial producido y comercializado por Saporiti S.A. Según la hoja de seguridad, el mismo fue obtenido por secado por aspersión.

1.1.4. **Métodos de modificación de proteínas**

Para mejorar la solubilidad de las proteínas vegetales, existen numerosas investigaciones que han explorado tratamientos químicos, físicos y biológicos (Nasrabadi, Doost y Mezzenga, 2021).

Entre ellos, el tratamiento de cambio de pH (PS, por *pH-shifting*) es una técnica de modificación química simple y efectiva para modificar las características de las proteínas,

dato que un pH extremo (ácido o básico) puede inducir la separación de subunidades y el desplegamiento proteico, para luego ajustar el pH a neutralidad. Varios estudios han demostrado que el PS puede mejorar la solubilidad, la actividad emulsionante y la estabilidad de diferentes proteínas vegetales (Dai et al., 2022; Jiang et al., 2009; Shen et al., 2023).

Por otro lado, el tratamiento ultrasónico (US), como tecnología de procesamiento físico, puede cambiar la conformación de las proteínas al destruir las interacciones intermoleculares, como el puente de hidrógeno y las fuerzas electrostáticas, a través del efecto de la cavitación y la acción mecánica (Li et al., 2020). Además, el ultrasonido se reconoce como una técnica de procesamiento prometedora porque es amigable con el medio ambiente y presenta bajo consumo de energía con alta eficiencia. Yang et al. (2017) demostraron que el tratamiento con ultrasonido en condiciones neutras cambió la estructura secundaria de las proteínas de arroz, mientras que Wang et al. (2021) demostraron que el tratamiento con ultrasonido aumentó la solubilidad del RPI y la capacidad de formar complejos con ácido clorogénico.

Finalmente, el tratamiento térmico (HT, por *heat treatment*) es un método comúnmente utilizado para inducir la desnaturalización proteica. El calentamiento puede producir modificaciones estructurales mediante el despliegue de la estructura de las proteínas, la exposición de grupos hidrofóbicos y sulfhidrilo y/o la disociación de subunidades de proteínas según la concentración proteica, la temperatura de calentamiento, el pH y la fuerza iónica (Alavi et al., 2021a). Liu et al. (2021) estudiaron el efecto de diversos tratamientos térmicos en fracciones de proteína de arroz y demostraron que el calentamiento a 80 °C durante 20 min fue suficiente para desnaturalizar las proteínas de arroz, especialmente la fracción de albúmina, y que tanto los enlaces disulfuro como las interacciones no covalentes (interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno) tienen funciones predominantes en la estructura de los agregados de proteína de arroz.

Existen registros del uso de tratamientos combinados para modificar las proteínas vegetales. Sin embargo, la mayoría se basa en combinar PS con HT (Alavi et al., 2021a; Zhao et al., 2020; Li et al., 2022) o combinar PS con US (Fang et al., 2021; Li et al., 2020; Zhang et al., 2018). Los enfoques combinados de los tres tratamientos fueron menos estudiados en proteínas de origen vegetal, existiendo solo estudios en proteína aislada de arvejas (Zhi et al., 2022) y proteínas de papa (Mao et al., 2020). Es decir que,

actualmente, se desconocen los efectos de combinar PS, US y HT en proteínas aisladas de arroz.

1.1.5. Propiedades funcionales

La utilización de proteínas como ingredientes alimentarios depende de sus propiedades funcionales. Estas propiedades, que determinan el comportamiento y desempeño de las proteínas en los sistemas alimentarios (es decir, la funcionalidad) durante la preparación, el procesamiento, el almacenamiento y el consumo, están influenciadas por la naturaleza y el alcance de las interacciones de las proteínas consigo mismas, con otros componentes y con el agua en el sistema alimentario (Amagliani et al., 2017a). Las propiedades funcionales dependen de varios factores, como el método de extracción utilizado, el método de secado, el tratamiento empleado para su utilización, el pH de los alimentos, la concentración de sal y azúcar en los alimentos y también de los otros componentes presentes en los alimentos, como los carbohidratos y los lípidos (Ghanghas et al., 2022).

1.1.5.1. Solubilidad

La solubilidad de las proteínas es, bajo un conjunto dado de condiciones, la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente, y está directamente relacionada con la naturaleza fisicoquímica de la superficie de la proteína (Damodaran, 1994). Esta propiedad representa un requisito previo importante para las proteínas que deben actuar como ingredientes funcionales en los sistemas alimentarios. Factores como la temperatura, el pH, la concentración de sal y la constante dieléctrica del solvente alteran la solubilidad de las proteínas, ya que variaciones en estas condiciones conducen a cambios en las conformaciones estructurales de las proteínas, lo que a su vez afecta su funcionalidad (Amagliani et al., 2017a).

Se ha reportado que las proteínas de arroz muestran una solubilidad mínima en agua en el rango de pH 4-5, mientras que la solubilidad aumenta con el aumento de la alcalinidad o la acidez (Cao et al., 2009; Shih et al., 1999; Xia et al., 2012). La solubilidad acuosa está influenciada principalmente por las propiedades de las glutelinas, ya que representa la fracción de proteína dominante en el arroz. La alta insolubilidad de las glutelinas de arroz en agua se debe principalmente a su gran agregación y unión a través de enlaces

disulfuro (Hamada, 1997). Las condiciones ácidas y alcalinas extremas promueven la disociación de los agregados de glutelinas y, por lo tanto, aumentan su solubilidad.

Por otro lado, se ha reportado que el RPI tiene una solubilidad muy baja en el rango de pH de 3 a 9, mostrando un ligero aumento por encima de esos valores (Shih, 2011). Como se mencionó anteriormente, esta característica también se debe al proceso de secado por aspersión, por el cual se obtienen la mayoría de los aislados proteicos comerciales, que induce aún más la agregación proteica.

1.1.5.2. *Propiedades espumantes y emulsionantes*

Las propiedades espumantes de las proteínas son cruciales en la producción de diferentes tipos de alimentos. Las espumas son sistemas de dos fases que tienen celdas de aire separadas por una capa continua de líquido. Para su aplicación en una variedad de alimentos, las proteínas deben formar espumas estables con eficacia y rapidez en el rango de pH del alimento y también a baja concentración (Ghanghas et al., 2022).

Las propiedades espumantes dependen de la capacidad de las proteínas para (1) adsorberse rápidamente en la interfase aire-agua, (2) experimentar un rápido cambio conformacional y reorganización en la interfase, y (3) formar una película viscoelástica cohesiva en la interfase a través de interacciones intermoleculares (Damodaran, 1994).

Por otra parte, las propiedades emulsionantes de las proteínas se ven afectadas por factores similares a los que afectan sus propiedades espumantes, incluida la tasa de adsorción de la proteína en la interfase aceite-agua, la cantidad de proteína adsorbida, el reordenamiento conformacional en la interfase, el grado de reducción de la tensión interfacial y formación de una película cohesiva (Damodaran, 1994).

La capacidad de migrar y adsorberse en la interfase depende de la solubilidad de las proteínas. De esta forma, al incrementarse la solubilidad, aumenta la probabilidad de que las mismas migren a la interface y se puedan desplegar. La interacción entre proteínas y lípidos aumenta con la exposición de más grupos hidrofóbicos (Ghanghas et al., 2022).

Las propiedades emulsionantes de las proteínas se pueden evaluar midiendo la distribución del tamaño de las gotas de las emulsiones obtenidas después de la homogeneización y durante el almacenamiento, utilizando enfoques de dispersión de luz dinámica o estática (Piorkowski y McClements, 2014).

Las proteínas de arroz han mostrado diferentes propiedades funcionales a diferentes pH, concentración de sal y azúcar, etc., que se deben a la modificación estructural y conformacional de las mismas por factores externos. Por ende, la estructura y la naturaleza de las proteínas juegan un papel crucial en su funcionalidad.

1.1.5.3. *Propiedades nutricionales*

El interés en el arroz como fuente potencial de proteínas económicas de alta calidad ha aumentado recientemente. Las proteínas de arroz tienen propiedades nutricionales únicas, como un perfil de aminoácidos bien equilibrado e hipoalergenicidad, en comparación con otras proteínas de cereales y legumbres; por lo tanto, los concentrados y aislados de proteínas de arroz pueden servir como ingredientes valiosos en muchas aplicaciones alimentarias (Romero, 2014).

Las proteínas de arroz tienen un sólido perfil de aminoácidos que comprende aminoácidos esenciales como la treonina, la leucina y la fenilalanina junto con aminoácidos ricos en azufre como la metionina y la cisteína, que son cruciales para el cuerpo humano. Si bien el contenido de aminoácidos esenciales de los aislados de proteínas de arroz puede variar dependiendo del cultivo de origen y de las metodologías utilizadas para su procesamiento (Ghanghas et al., 2022), se ha reconocido que presentan un perfil de composición muy parecido al de modelo de proteína ideal recomendado por la Organización Mundial de la Salud y la Organización de Alimentos y Agricultura de los Estados Unidos (WHO/FAO, por *World Health Organization and Food and Agriculture Organization*, respectivamente) (Zheng et al., 2023). Además, el contenido de aminoácidos esenciales como la metionina y la fenilalanina en el RPI es mayor en comparación con la caseína y también contiene una mayor cantidad de leucina, metionina y treonina que los aislados de proteínas de soja (Ghanghas et al., 2022).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se utilizó un aislado comercial provisto por Grupo Saporiti S.A., que presenta la composición de aminoácidos detallada en la Tabla 2. Se puede observar que este aislado posee buenas proporciones de los aminoácidos esenciales triptófano, histidina, treonina, valina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

Contenido de aminoácidos (g/100 g de proteína)	
Ácido aspártico	8,05
Ácido glutámico	18,39
Alanina	5,75
Arginina	8,36
Cistina	5,12
Fenilalanina	5,22
Glicina	4,70
Histidina	2,19
Isoleucina	3,87
Leucina	8,78
Lisina	3,87
Metionina	3,34
Prolina	4,18
Serina	3,66
Tirosina	3,45
Treonina	2,30
Triptófano	1,88
Valina	6,90

Tabla 2. Composición de aminoácidos del aislado de proteínas de arroz comercial utilizado en este trabajo.

Las propiedades nutricionales e hipoalergénicas únicas de las proteínas de arroz las convierten en un ingrediente adecuado para formulaciones de alimentos infantiles (Helm y Burks, 1996) y alimentos para bebés (Hansen et al. 1981).

Los concentrados de proteínas de arroz se han incorporado en la preparación de bebidas, pastas y dulces, así como en sopas, salsas, productos cárnicos y otras aplicaciones saladas (Romero, 2014). Al igual que los hidrolizados de otras fuentes de proteínas, los hidrolizados de proteínas de arroz también se pueden usar como suplementos nutricionales, ingredientes funcionales y potenciadores del sabor en alimentos, blanqueadores de café, confitería y en la fortificación de refrescos y jugos (Fabian y Ju, 2011).

La generalmente baja solubilidad acuosa de las proteínas de arroz limita sus posibles aplicaciones a productos que no requieren una alta solubilidad de estos ingredientes, por ejemplo, análogos de carne, productos horneados, cereales para el desayuno, barras de proteína y alimentos para mascotas.

El principal obstáculo en la incorporación de proteína de arroz en diversas formulaciones basadas en alimentos radica en la extracción eficiente de las fracciones de proteína con un deterioro mínimo. Con la proteína extraída, el siguiente obstáculo refiere a lograr un nivel apreciable de solubilidad en los sistemas alimentarios deseados.

1.2. Emulsiones

1.2.1. Definición y clasificación

Una emulsión consiste en una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles, en la que uno de ellos forma gotas esféricas de pequeño tamaño (0,1 a 100 μm) en el seno del otro. La sustancia que forma las gotas en una emulsión se denomina fase dispersa, discontinua o interna, mientras que la sustancia que forma el líquido circundante se denomina fase continua o externa. La fase dispersa se obtiene al romper uno de los líquidos por medios mecánicos (McClements, 2004).

Las emulsiones alimentarias usualmente están formadas por una fase lipídica (generalmente aceite) y una fase acuosa. Dependiendo de cómo se distribuye la fase acuosa y la fase lipídica las emulsiones se pueden clasificar en aceite en agua (O/W, por *oil/water*) y agua en aceite (W/O, por *water/oil*). Las emulsiones O/W consisten en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa (Figura 5). Por el contrario, en las emulsiones W/O las gotas de fase acuosa están dispersas en aceite (Fennema, 1996). La leche, las cremas, los quesos, los yogures, los helados y la mayonesa son ejemplos cotidianos de emulsiones O/W; la manteca y la margarina son los ejemplos más comunes de emulsiones W/O.

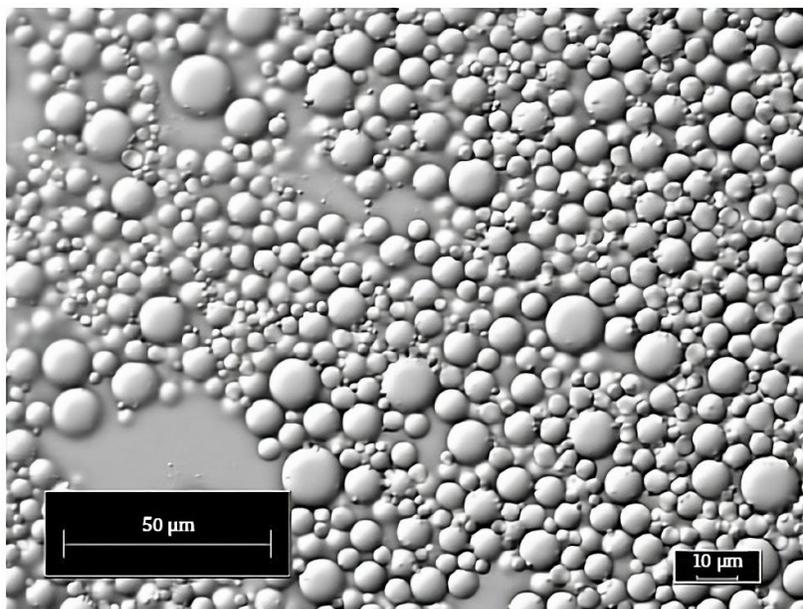


Figura 5. Ejemplo de emulsión alimentaria O/W (aderezo para ensaladas) evaluada mediante microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) (McClements, 2004).

El conocimiento del comportamiento de una emulsión es muy importante ya que la concentración de gotas y la distribución de tamaño de partícula de las mismas influye en el aspecto, textura, sabor, estabilidad y costo de los productos alimenticios a base de este tipo de sistema. La concentración de la fase dispersa se suele expresar en términos de la fracción másica (ϕ_m), tal como se expresa en la Ecuación 1 (McClements, 2004).

$$\phi_m = \frac{m_D}{m_E} \quad (1)$$

Siendo m_D la masa de la fase dispersa (gotas) y m_E la masa total de la emulsión.

1.2.2. Preparación de emulsiones

Para formar una emulsión es necesario que todos los ingredientes se dispersen de forma adecuada. En primer lugar, antes de realizar la emulsión, se deben dispersar los ingredientes en la fase en la que son solubles. De esta forma, en la fase acuosa se dispersan ingredientes tales como polisacáridos, azúcares, minerales, proteínas; y en la fase lipídica vitaminas, colorantes y antioxidantes, entre otros. En algunas situaciones, para evitar la formación de grumos y facilitar la dispersión en los pasos siguientes, es más conveniente incorporar los ingredientes en polvo a la mezcla inicial de aceite y agua, sin importar en qué fase sean más solubles. A su vez, algunos ingredientes requieren la

aplicación de calor para facilitar la dispersión de los mismos. Por lo tanto, la formación de una emulsión puede involucrar uno o más pasos consecutivos dependiendo de los materiales iniciales y del método utilizado para su formación (McClements, 2004).

La formación de gotas y su dispersión es un proceso que requiere un aporte de energía que será suministrado por un homogeneizador. La homogeneización es el proceso por el cual dos fases inmiscibles se transforman en un sistema emulsionado. En este sentido, es posible formar una emulsión por homogeneización primaria o simple de las fases lipídicas y acuosas, sin embargo, las dos fases se separarían rápidamente hacia un sistema que consta de una capa de fase oleosa (menor densidad) en la parte superior de una capa de fase acuosa (mayor densidad). Esto se debe a que las gotas tienden a fusionarse con sus vecinas cuando chocan con ellas, lo que finalmente conduce a la completa separación de fases, debido a que el contacto entre las moléculas de aceite y el agua es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992). La energía superficial del sistema aumentará debido al consecuente aumento del área interfacial tras la formación de la emulsión, lo cual explica la inestabilidad termodinámica del sistema. Generalmente, las gotas dispersas tenderán a ser esféricas para minimizar esta carga energética (Palazolo, 2006).

Durante la preparación de una emulsión se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 2004).

En un comienzo, durante el homogeneizado, se produce una deformación interfacial que da como resultado la formación de gotas de gran tamaño. Para producir un aumento en la estabilidad del sistema, estas gotas deben seguir deformándose y así dar origen a pares de menor tamaño. A fin de disminuir la tensión interfacial, será necesaria la adsorción de un agente emulsionante. Para que este proceso sea eficiente se debe buscar que la velocidad de adsorción sea similar a la velocidad de homogeneización, de lo contrario se producirá una coalescencia inmediata de las gotas recién formadas. En la interfase agua-aceite, el agente emulsificante actuará mediante dos mecanismos que otorgaran estabilidad termodinámica y cinética al sistema; por un lado, causará la disminución de la tensión interfacial y, por otro, aportarán rigidez al film que rodea a las gotas (McClements, 2004).

Como se mencionó, el dispositivo mecánico diseñado para llevar a cabo el proceso de homogeneización se denomina homogeneizador (Tabla 3).

Tipo de homogeneizador	Densidad de energía	Modo de operación	Mecanismo de ruptura	Tamaño de gota promedio (μm)	Viscosidad de la muestra
Baja velocidad (cuchilla)	Baja	Discontinuo	Flujo laminar y Flujo turbulento	5	Baja - Media
Alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator)	Baja	Discontinuo	Flujo laminar y Flujo turbulento	2	Baja - Media
Molino coloidal	Media	Continuo	Flujo laminar y Flujo turbulento	1	Media – Alta
Válvula de alta presión	Alta	Continuo	Flujo turbulento y cavitación	0,1	Baja – Media
Ultrasónico	Alta	Discontinuo	Flujo turbulento y cavitación	0,1	Baja – Media
Membrana	Alta	Continuo	Flujo turbulento	0,1	Baja – Media

Tabla 3. Principales dispositivos de homogeneización y sus características (Palazolo, 2006).

Este proceso se puede dividir este proceso en dos etapas. Por un lado, la homogeneización primaria consiste en la formación de una emulsión a partir de dos líquidos separados en un mezclador de alta velocidad. Por otra parte, la homogeneización secundaria se trata de la reducción del tamaño de las gotas en una emulsión y se lleva a cabo en una válvula homogeneizadora de alta presión, homogeneizadores ultrasónicos o microfluidificadores (Tabla 3). La formación de un tipo específico de emulsión puede involucrar cualquiera de las etapas por separado o la combinación de las mismas. Sin embargo, en general es más eficiente utilizar los dos pasos de forma consecutiva (McClements, 2004) (Figura 6).

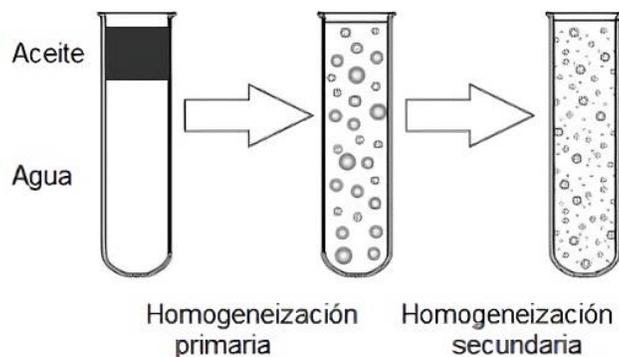


Figura 6. Etapas de formación de una emulsión (McClements, 2004).

Para la preparación de emulsiones en instancias preliminares o en procesos donde no se requiere alcanzar un tamaño de gota muy pequeño, los homogeneizadores de media a baja velocidad serán particularmente útiles (Figura 7); los mismos combinan un gradiente de velocidades en varias direcciones (longitudinal, rotacional y radial) que genera la irrupción de la interfaz agua-aceite (Palazolo, 2006). Si bien el tamaño de partícula que se logre alcanzar dependerá del tiempo de homogeneización y de la naturaleza y concentración de los compuestos tratados, el límite dependerá exclusivamente de las características mecánicas del homogeneizador.

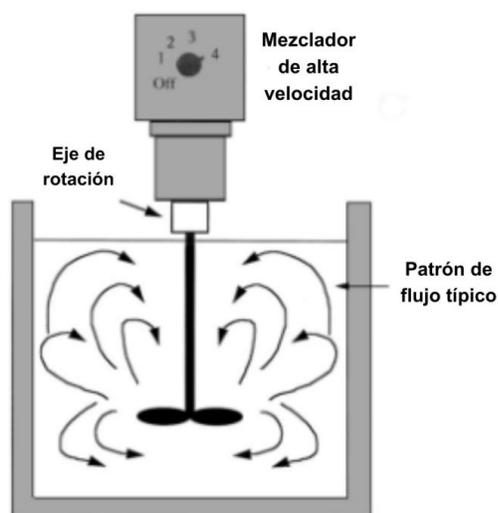


Figura 7. Mezclador a alta velocidad (McClements, 2004)

Por otro lado, los equipos que utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad generan una disminución considerable en el tamaño de gota formada, debido al principio de cavitación (Figura 8). Cuando se expone el sistema a este fenómeno, las ondas sonoras ultrasónicas se propagan a través del fluido causando ciclos de alta y baja presión (aproximadamente 20000 ciclos/s) (Porfiri et al., 2017). Los principales factores que determinan la eficiencia de homogeneizadores ultrasónicos son la intensidad, duración y frecuencia de las ondas ultrasónicas (McClements, 2004). Normalmente es necesario irradiar una muestra durante cortos períodos de tiempo y controlar las condiciones de temperatura (por ejemplo, mediante un baño de hielo), ya que esta aplicación causa un calentamiento apreciable.

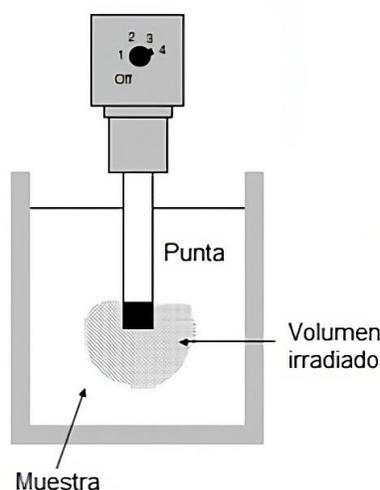


Figura 8. Homogeneizador ultrasónico (McClements, 2004).

1.2.3. Estabilidad de las emulsiones

En líneas generales, la estabilidad de una emulsión puede definirse como la capacidad que tiene el sistema emulsionado para resistir los cambios en sus propiedades fisicoquímicas a lo largo del tiempo (McClements, 2004). En este sentido, es importante identificar cuáles serán los principales mecanismos de desestabilización, para luego determinar la estrategia más efectiva que imparta estabilidad al sistema. Este hecho, a su vez, dependerá de la composición, de la microestructura y de las condiciones ambientales propicias para la conservación del sistema.

Las emulsiones O/W son las que se emplean en una amplia cantidad de procesos industriales y son la base de muchos productos alimenticios. Las mismas presentan numerosos mecanismos que pueden llevarlas a la desestabilización física, entre ellos: la

separación gravitacional (cremado), floculación, coalescencia, coalescencia parcial, desproporción de Ostwald e inversión de fases (Figura 9).

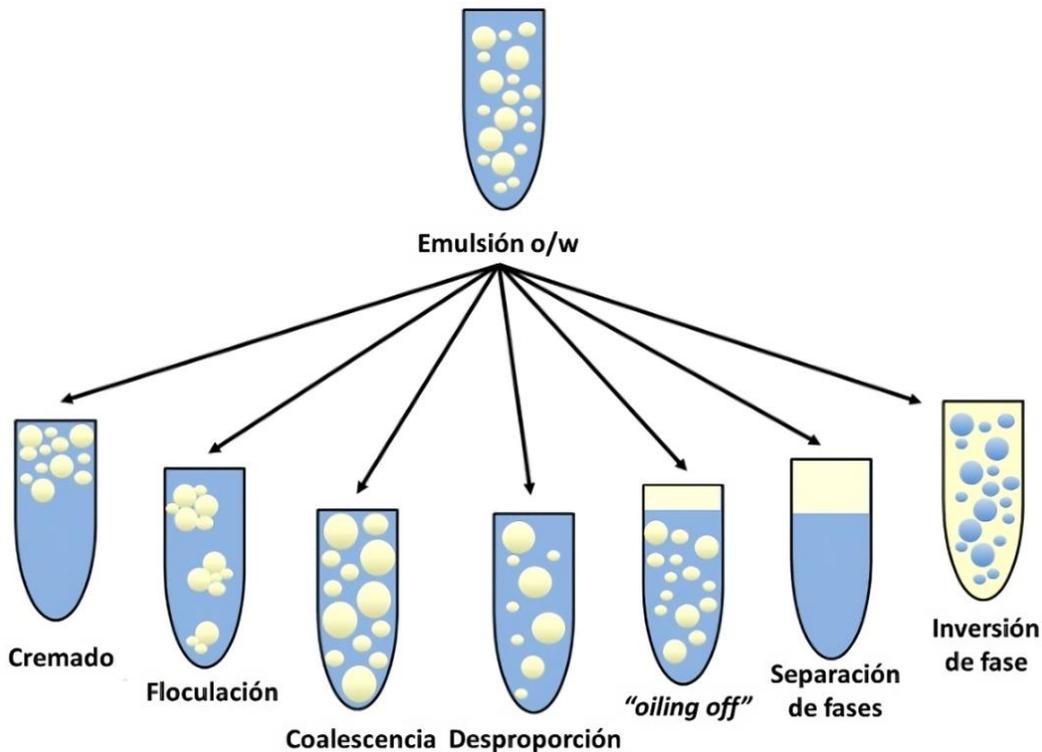


Figura 9. Mecanismos de desestabilización de emulsiones O/W.

1.2.3.1. Separación gravitacional (cremado)

Se define como un gradiente vertical de la concentración de gotas, sin variar la distribución de tamaño de partículas. El cremado consiste en la migración de las partículas hacia la superficie de la dispersión dependiendo de la densidad de las gotas y del líquido dispersante.

De acuerdo a la ley de Stokes (Ecuación 2), la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidades entre las fases dispersa y continua, e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua (McClements, 2004).

$$v = \frac{2 \times R^2 \times \Delta \delta \times g}{9 \times \mu} \quad (2)$$

Donde R es el radio de la gota o burbuja, $\Delta \delta$ es la diferencia de densidad entre las fases, g es la gravedad y μ la viscosidad de la fase continua.

1.2.3.2. *Floculación*

Las gotas en las emulsiones están en movimiento continuo por efecto de la energía térmica, la gravedad y las fuerzas mecánicas aplicadas, lo que favorece la colisión entre las gotas, las cuales pueden apartarse o quedar agregadas, dependiendo de la magnitud relativa de las fuerzas repulsivas y atractivas entre ellas. La floculación es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado (flóculo) en el cual cada gota retiene su identidad, sin fusionarse, pero llevando a una disminución en el número efectivo de partículas presentes en la emulsión.

El grado de floculación alcanzado depende de dos factores: la frecuencia y la eficiencia de las colisiones (McClements, 2004).

Dependiendo del tipo de emulsionante y de la concentración de aceite, se pueden formar flóculos compactos o abiertos. Cuando los flóculos son compactos, aumenta la velocidad de cremado debido a que aumenta el tamaño efectivo de las partículas. Por el contrario, los flóculos abiertos pueden formar una red tridimensional que reduce la movilidad de las gotas, aumentando la estabilidad de la emulsión (Sceni y Wagner, 2007).

1.2.3.3. *Coalescencia*

Es el proceso mediante el cual dos o más gotas líquidas se fusionan para formar una sola gota más grande, por lo que es un proceso irreversible. Así, la emulsión se mueve hacia su estado termodinámicamente más estable ya que implica una disminución del área de contacto entre la fase oleosa y acuosa (reducción del área interfacial).

Se produce por aproximación, choque, deformación y/o ruptura de la película interfacial; donde las gotas individuales se unen perdiendo su identidad y formando gotas más grandes. Este proceso depende de la frecuencia, energía y eficiencia de colisión entre gotas así como también de la resistencia y viscoelasticidad de la película que rodea a las gotas (McClements, 2004).

1.2.3.4. *Coalescencia parcial*

Este fenómeno se produce cuando dos o más gotas de aceite parcialmente cristalinas entran en contacto y forman un agregado de forma irregular. El agregado conserva en parte la forma de las gotas que lo conforman debido a que la red cristalina de grasa dentro de las gotas impide que se fusionen completamente (Márquez, 2009).

1.2.3.5. *Desproporción o maduración de Ostwald*

La maduración de Ostwald es el proceso mediante el cual las gotas grandes crecen a expensas de las más pequeñas en una emulsión polidispersa debido al transporte masivo de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia (McClements, 2004). Este fenómeno ocurre porque la solubilidad del soluto dentro de una partícula esférica aumenta a medida que disminuye el tamaño de la partícula. Por lo tanto, las moléculas de soluto se mueven de las gotas más pequeñas a las más grandes debido a este gradiente de concentración. Este proceso hace que las gotas más pequeñas se reduzcan y las gotas más grandes crezcan, lo que lleva a un aumento neto general en el tamaño medio de las gotas con el tiempo. Este proceso es insignificante en la mayoría de los alimentos emulsionados, debido a que la solubilidad de los triglicéridos en agua es tan baja que el transporte de masa es despreciable (Schramm, 2014).

A menudo, varios de estos mecanismos de desestabilización pueden estar interrelacionados. Por ejemplo, un incremento en el tamaño de partícula ya sea por coalescencia, floculación o maduración de Ostwald, conducirá a una marcada separación gravitacional. A la inversa, si las gotas se encuentran muy cerca debido a la separación gravitacional o por floculación, las mismas estarán expuestas a una mayor tendencia a fusionarse y, por tanto, el principal mecanismo de desestabilización será la coalescencia. Por consiguiente, el fenómeno responsable de la manifestación visible de la inestabilidad no necesariamente es la razón por la cual la emulsión se volvió inestable en primer lugar (McClements, 2004).

1.2.3.6. *Inversión de fases*

La inversión de fase es el proceso por el cual un sistema cambia de una emulsión O/W a una emulsión W/O o viceversa (McClements, 2004). Sin embargo, este no es un cambio que pueda ocurrir espontáneamente ya que necesita de una modificación externa para desarrollarse (por ejemplo, aplicación de trabajo mecánico, cambio de pH o de la concentración salina).

1.2.4. **Proteínas como emulsionantes**

Los emulsionantes son sustancias tensioactivas que se adsorben en la interfase aceite – agua disminuyendo la tensión interfacial. De esta manera, disminuye la energía libre de

Gibbs y el sistema es más estable termodinámicamente. Los agentes emulsionantes pueden ser de origen proteico, lipídico o glucídico.

Las proteínas son de particular interés en términos de sus propiedades emulsionantes, debido a su naturaleza anfifílica (es decir, que tienen grupos hidrofóbicos e hidrofílicos) y su capacidad de formar películas (Lam y Nickerson, 2013). Las mismas se clasifican según su modo de adsorción a la interfase (Muñoz et al., 2007; Sceni y Wagner, 2007). Las proteínas flexibles pueden ser proteínas globulares, fibrilares o con estructura desordenada en suspensión, pero al llegar a la interfase, se despliegan y desnaturalizan. Esto ocurre generalmente porque durante la homogeneización se despliega la estructura proteica a la vez que se generan las gotas de aceite. La proteína desplegada, orienta sus grupos hidrofóbicos hacia la fase lipídica y los grupos polares hacia la fase acuosa, y de esta manera reduce la tensión interfacial (Figura 10). Por otro lado, las proteínas globulares rígidas no se desnaturalizan en la interfase, sino que acomodan las zonas hidrofílicas de su superficie a la fase polar y las zonas hidrofóbicas de su superficie a la fase lipídica, también disminuyendo la tensión interfacial.

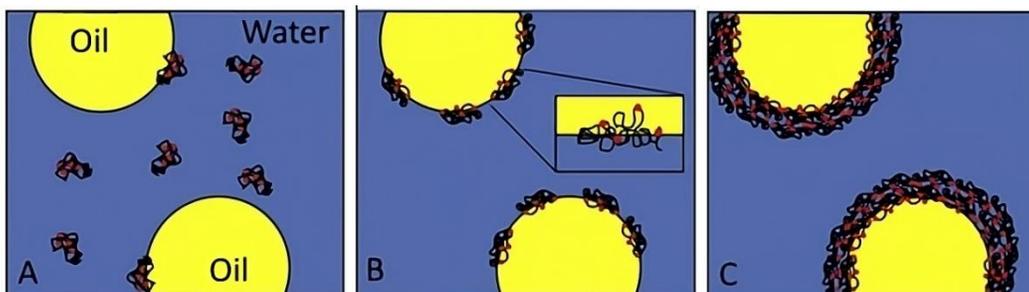


Figura 10. Representación del proceso para una proteína globular flexible que **(A)** migra a la interfase agua-aceite, **(B)** se adsorbe en la interfase y se despliega exponiendo los residuos de aminoácidos hidrofóbicos hacia la fase oleosa y los residuos de aminoácidos hidrofílicos hacia la fase acuosa y **(C)** se asocia con las proteínas vecinas formando films viscoelásticos que resisten los esfuerzos mecánicos y le otorgan estabilidad al sistema (Lam y Nickerson, 2013).

Las películas viscoelásticas, formadas por la interacción de proteínas en la interfase, resisten tensiones mecánicas y proporcionan estabilización electrostática (dependiendo de las condiciones del solvente) y estérica (dependiendo de la proteína) (Figura 11) (Lam y Nickerson, 2013). En el mecanismo electrostático, las partículas se mantienen estables en suspensión gracias a la repulsión por solapamiento de las nubes de cargas que se forman en la superficie de la partícula. Para que este mecanismo pueda establecerse,

el pH de la emulsión debe estar por encima o por debajo del pI de la proteína, para que la misma presente carga neta positiva o negativa, respectivamente. Por otro lado, el mecanismo estérico depende del tamaño de la proteína y de su flexibilidad, dado que cuantos más bucles o colas puedan irradiar desde la interfase, mayor será su capacidad para evitar que las gotas se acerquen, por simples impedimentos estéricos. La magnitud relativa de ambos mecanismos depende del espesor, el empaquetamiento, las características químicas y la carga de la proteína en la interfase.

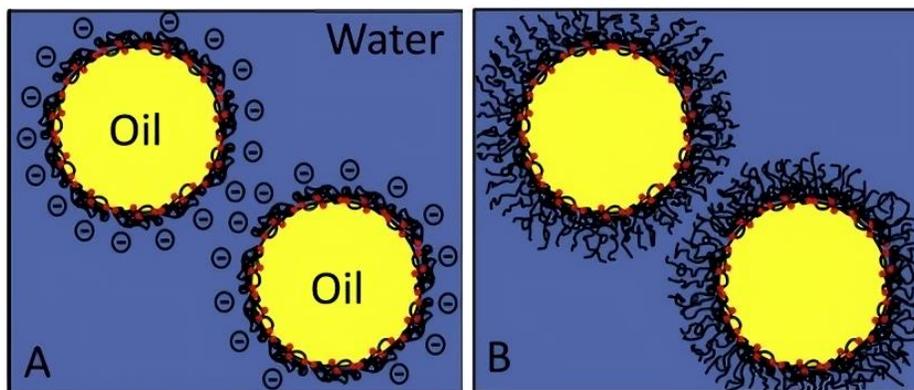


Figura 11. Mecanismos de estabilización mediados por film viscoelásticos de proteínas mediante **(A)** repulsión electrostática y **(B)** estabilización estérica (Lam y Nickerson, 2013).

Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas juegan un papel importante en la determinación de su capacidad emulsionante. Por ejemplo, la hidrofobicidad superficial influye en la capacidad de la proteína para adsorberse en la fase oleosa de la interfaz, donde una mayor integración generalmente conduce a una mayor capacidad emulsionante. Por el contrario, la carga superficial de la proteína influye en la solubilidad de las proteínas dentro de la fase acuosa, donde se desea una alta solubilidad para tener mayores velocidades de difusión hacia la interfase (Lam y Nickerson, 2013). Una vez que se forma la película viscoelástica, las gotas pueden asumir una carga negativa o positiva dependiendo de si el pH de la emulsión está por encima o por debajo del pI de la proteína (y baja fuerza iónica), respectivamente. La alta repulsión electrostática entre las gotas de aceite tiende a conducir a una mayor estabilidad de la emulsión, mientras que en condiciones de pH cercanas al pI de la proteína (o alta fuerza iónica) domina la floculación/agregación de las gotas, lo que conduce a la coalescencia y la inestabilidad (McClements, 2004). Dependiendo del tamaño, la estructura y la libertad conformacional de la proteína, los bucles o colas de segmentos de proteínas pueden irradiar desde la

interfase compuesta principalmente de aminoácidos hidrófilos, para crear una estabilización estérica, restringiendo físicamente la unión de las gotas. La presencia de proteína dentro de la fase continua también consigue aumentar la viscosidad de la emulsión, reduciendo la movilidad y difusión de las gotas de aceite dentro de la misma (Lam y Nickerson, 2013).

Como las proteínas son muy sensibles a las características del medio (pH, temperatura y concentración de sales, de azúcares, de lípidos polares o de lípidos no polares), estos factores pueden afectar también a la formación y estabilidad de las emulsiones. Debido a la diversidad de la composición de aminoácidos y estructuras nativas que tienen las proteínas, no se puede generalizar el efecto que tienen estos factores en dichos sistemas

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la combinación de diferentes tratamientos para incrementar la solubilidad y actividad emulsionante de proteínas aisladas de arroz (RPI), para su empleo en la industria de alimentos.

Para cumplir dicho objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtener muestras de RPI modificado por combinación de tratamientos de cambio de pH, ultrasónicos y/o térmicos.
- Caracterizar las muestras de RPI modificado y comparar sus propiedades de solubilidad con una muestra de RPI sin modificar.
- Evaluar la capacidad de formar y estabilizar emulsiones aceite en agua de RPI modificado en comparación con una muestra de RPI sin modificar.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

El aislado de proteínas de arroz (RPI) fue donado por Grupo Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina). Según el proveedor, el RPI se aisló de *Oryza sativa* y se obtuvo mediante secado por aspersion. De acuerdo con la hoja de datos del proveedor, la composición de RPI es de 83,6 % en peso de proteína cruda (N x 6,25), 6,1 % en peso de grasa, 6,3 % en peso de carbohidratos, 1,5 % en peso de ceniza y 2,3 % en peso de humedad. La concentración de proteína cruda se confirmó mediante el método de Kjeldahl, utilizando el mismo factor de conversión de nitrógeno a proteína (6,25). El polvo de RPI se usó sin purificación adicional. La sal disódica del ácido 2,2'-biquinolina-4,4'-dicarboxílico (ácido bicinconínico, BCA), la albúmina de suero bovino (BSA) y la azida de sodio se adquirieron en Sigma Aldrich (Missouri, EE. UU.). La sonda fluorescente N,N-dimetil-6-propionil-2-naftilamina (PRODAN) fue de Santa Cruz Biotechnology (Texas, EE. UU.). El aceite de girasol refinado utilizado fue de marca Molino Cañuelas (Buenos Aires, Argentina) y se compró en un supermercado local. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y se compraron a distribuidores locales (Buenos Aires, Argentina).

3.2. Modificación del RPI

Se aplicaron tres tipos de tratamientos al RPI: cambio de pH (PS), ultrasonido (US) y/o tratamiento térmico (HT). Las combinaciones múltiples dieron lugar a diez muestras: sin tratar (RPI), tratadas con US (RPI-US), tratadas con HT (RPI-HT), tratamientos combinados de US y HT (RPI-US+HT y RPI-HT+US), tratada con PS (RPI-PS), y combinación de PS con tratamientos US y/o HT (RPI-PS+US, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US) (Tabla 4).

Muestra	Ajuste de pH	Agitación 1 hora	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Ajuste de pH	Agitación ON
RPI	7,0	✓	-	-	-	✓
RPI-US	7,0	✓	US	-	-	✓
RPI-HT	7,0	✓	HT	-	-	✓
RPI-US+HT	7,0	✓	US	HT	-	✓
RPI-HT+US	7,0	✓	HT	US	-	✓
RPI-PS	12,0	✓	-	-	7,0	✓
RPI-PS+US	12,0	✓	US	-	7,0	✓
RPI-PS+HT	12,0	✓	HT	-	7,0	✓
RPI-PS+US+HT	12,0	✓	US	HT	7,0	✓
RPI-PS+HT+US	12,0	✓	HT	US	7,0	✓

Tabla 4. Combinación de tratamientos de RPI.

Para la muestra control (sin tratamiento) de RPI, se pesaron 2,50 g de polvo sólido de RPI. Luego se añadió agua desionizada para obtener 95,00 g de dispersión. El pH se ajustó a 7,0 añadiendo NaOH 1 M y la dispersión se mezcló durante 1 hora a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Finalmente, se añadió la cantidad necesaria de agua desionizada para obtener 100,00 g de dispersión (dispersión RPI sin tratar al 2,50 % en peso), seguido de reposo durante la noche para una hidratación completa. Las determinaciones de peso se realizaron utilizando una balanza analítica Ohaus® Pioneer® PA214 calibrada (resolución $\pm 0,0001$ g) y el pH se midió utilizando un medidor de pH/mV Consort C861 con un electrodo Sartorius PY-P10-25 (resolución $\pm 0,01$), calibrado diariamente antes de usar.

Para muestras de RPI modificado, se pesaron 2,50 g de polvo sólido de RPI y se añadió agua desionizada para obtener 95,00 g de dispersión. Según la Tabla 4, el pH se ajustó a 7,0 o 12,0 añadiendo NaOH 1 M y la dispersión se mezcló durante 1 hora a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Luego, se realizaron US y/o HT siguiendo el orden presentado en la Tabla 4.

Para el tratamiento US, las dispersiones (95,00 g en un vaso de vidrio con 6,5 cm de diámetro) se sonicaron durante 5 minutos con un ciclo de encendido/apagado de 30/30

segundos y 100 % de amplitud utilizando un homogeneizador de ultrasonido Sonics Vibra Cell VCX750 (Sonics & Materials, Inc.; EE. UU.) con la punta de 28 mm de diámetro sumergida 1/3 en el vaso de precipitados. El aumento de temperatura durante la sonicación se evitó colocando el vaso en un baño de agua helada.

Para el tratamiento HT, las dispersiones (95,00 g en un vaso de vidrio de 6,5 cm de diámetro) se colocaron en un baño de agua caliente hasta alcanzar los 90 °C durante 30 minutos, seguido de colocar la muestra en un baño de agua con hielo para enfriarla.

La masa perdida durante US y/o HT se restableció añadiendo agua desionizada antes del siguiente paso. Para muestras con combinaciones de PS y otros tratamientos, los pasos de US y/o HT se realizaron a pH 12,0 siguiendo el orden presentado en la Tabla 4. Después de eso, el pH de la dispersión se ajustó a 7,0 añadiendo HCl 1 M.

Finalmente, se aplicó la cantidad necesaria de agua desionizada para obtener 100,00 g de dispersiones (dispersiones RPI tratadas al 2,50 % en peso), seguido de reposo durante la noche para una hidratación completa.

Para el almacenamiento, se añadió azida sódica a todas las muestras a una concentración final de 0,02 % en peso.

3.3. Caracterización de muestras de RPI modificado

3.3.1. Solubilidad

3.3.1.1. Fundamentos teóricos

La solubilidad representa un requisito para que las proteínas puedan actuar como ingredientes funcionales en los sistemas alimentarios (Nielsen, 1997). Las variaciones de la temperatura o el pH alteran esta propiedad conduciendo a cambios en la conformación estructural de las proteínas afectando a su vez su funcionalidad (Adebiyi et al., 2007).

La cuantificación de proteínas solubles se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Este método se fundamenta en que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{+2} a Cu^{+} (reacción de Biuret). Smith et al. (1985) postularon que el Cu^{+} se produce mediante dos reacciones separadas. La primera es independiente de la temperatura y surge de la oxidación de residuos de cisteína,

tirosina y triptófano. Se ha reportado que la estructura macromolecular, el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de dar inicio a la reacción (Wiechelmann et al., 1988). Se supone que la segunda fuente de Cu^+ es una reacción dependiente de la temperatura de enlaces peptídicos con Cu^{+2} . Se informa que este proceso es más frecuente a medida que aumenta la temperatura de incubación. Independientemente del proceso de formación, los iones Cu^+ se unen a dos moléculas del BCA, una sal sódica, y al hacerlo, cambia la estructura electrónica de tal manera que el compuesto absorbe luz a 562 nm y se torna de color púrpura (Figura 12). En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteínas totales presente en la muestra (Bolbarán Gómez, 2014). La estabilidad del reactivo y el cromóforo generan un método para la cuantificación de proteínas que es muy sensible, rápido y sencillo (Grefa Andi, 2017).

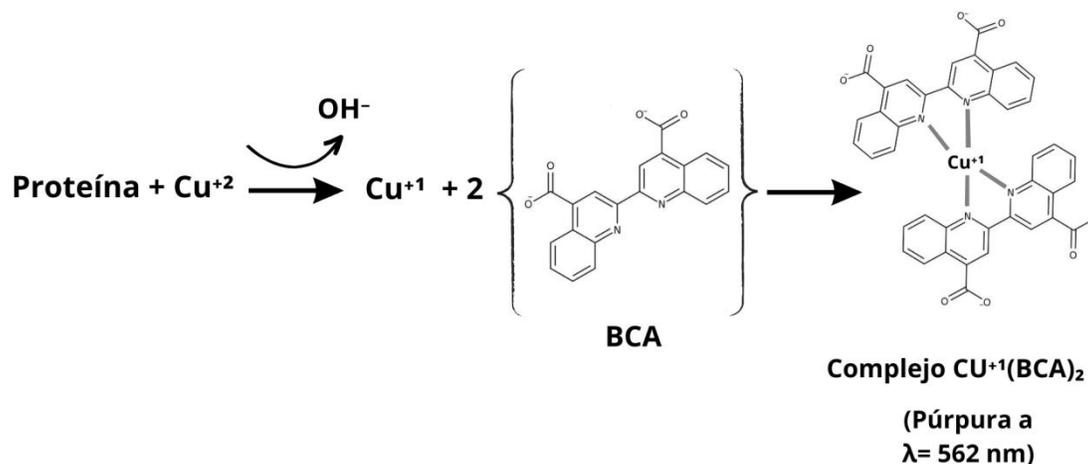


Figura 12. Formación del complejo hidrosoluble con absorción de luz a 562 nm.

La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia de concentración conocida (ej. albúmina de suero bovino). A partir de esta curva se determina la concentración de la muestra de proteína incógnita.

3.3.1.2. Condiciones experimentales

Las muestras de RPI se centrifugaron durante 10 minutos a 7200 g y 20 °C utilizando una centrífuga Hermle Z 200 A (LaborTechnik, Alemania) y se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteína en los sobrenadantes se determinó utilizando el método del BCA descrito por primera vez por Smith et al. (1985) con pequeñas modificaciones para

permitir la cuantificación en volúmenes pequeños. El método se basa en mezclar 50 partes de agente A (BCA 11 %, Na_2CO_3 2 %, NaOH 0,4 %, tartrato de sodio 0,16 % y NaHCO_3 0,95 %, pH 11,25) con 1 parte de agente B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 %), para obtener el agente C. Luego, se mezclaron 25 μL de cada sobrenadante con 200 μL de agente C en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se determinó la absorbancia a 562 nm utilizando el lector de microplacas Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., EE. UU.). La concentración de proteína se determinó por comparación con una curva de calibración estándar realizada con albúmina de suero bovino (BSA) en agua desionizada. La solubilidad de la proteína se calculó como la relación entre la concentración de proteína en el sobrenadante después de la centrifugación con respecto a la concentración de proteína inicial en las muestras antes de la centrifugación. La concentración inicial de proteína se calculó teóricamente considerando que las muestras contenían 2,50 % en peso de RPI y RPI tenía 83,6 % en peso de proteínas.

3.3.2. Potencial ζ

3.3.2.1. Fundamentos teóricos

El potencial ζ , que se relaciona con la carga superficial de las partículas, fue determinado utilizando el equipo Nano Zetasizer ZEN 5600 (Malvern Instrument, UK). La presencia de una carga neta en la superficie de la partícula afecta la distribución de los iones en la región interfacial que la rodea, resultando en una concentración creciente de iones de carga opuesta a la partícula, cerca de su superficie. La capa líquida que rodea la zona interfacial se divide en dos: una región interna, en donde los iones se encuentran fuertemente unidos entre sí, y una externa y difusa, donde la unión entre iones es de menor intensidad. De este modo, se halla una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. Dentro de esta última capa, existe un límite teórico dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se encuentra en movimiento, los iones en su proximidad se mueven con ella. Sin embargo, los iones más allá del límite teórico no lo hacen. Este límite se denomina superficie de corte hidrodinámico y, el potencial que existe en este se denomina potencial ζ (Figura 13).

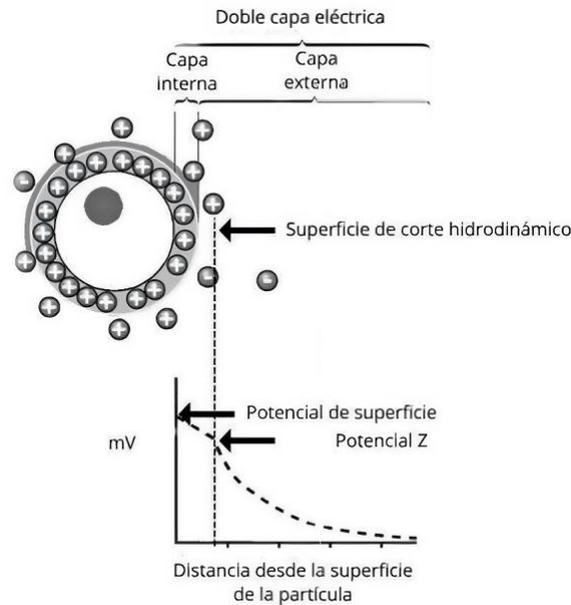


Figura 13. Definición gráfica del potencial ζ (Malvern Instruments, 2013a).

La magnitud del potencial ζ da una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial ζ altamente negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí y no habrá tendencia a flocular. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial ζ cercanos a cero, entonces no hay fuerza que impida que las partículas se junten y se agreguen/floculen. Por lo tanto, el factor más importante que afecta el potencial ζ es el pH. El valor de pH en el cual el potencial ζ es cero se puede considerar como el punto isoeléctrico (pI) y normalmente es el punto donde el sistema coloidal es menos estable.

El potencial ζ puede ser determinado por la medición de la movilidad electroforética. Dicha movilidad electroforética es obtenida a través de la realización de una electroforesis a la muestra y la medición de la velocidad de las partículas, utilizando *Laser Doppler Velocimetry* (LDV).

La electroforesis consiste en el movimiento de una partícula cargada en un líquido bajo la influencia de un campo eléctrico. Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. Las fuerzas viscosas actúan en oposición a este movimiento, por lo que, al llegar al equilibrio entre estas fuerzas, las partículas se mueven a velocidad constante, denominada movilidad electroforética.

En la Figura 14 se puede observar la celda utilizada para medir la movilidad electroforética, la misma cuenta con electrodos en cada extremo a los que se aplica un potencial. Las partículas de la muestra se mueven en dirección al electrodo con carga opuesta y su velocidad se mide mediante la técnica de LDV. Esta técnica consiste en medir la fluctuación en la intensidad de la señal de la luz dispersada, la cual es proporcional a la velocidad de las partículas. En la Figura 15 se muestra la incidencia del láser en la muestra y la luz dispersada por las partículas.

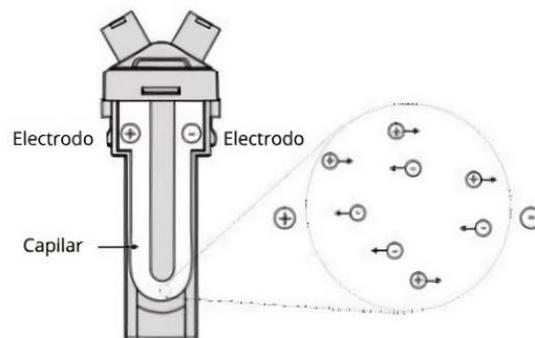


Figura 14. Celda para medir la movilidad electroforética (Malvern Instruments, 2013a).

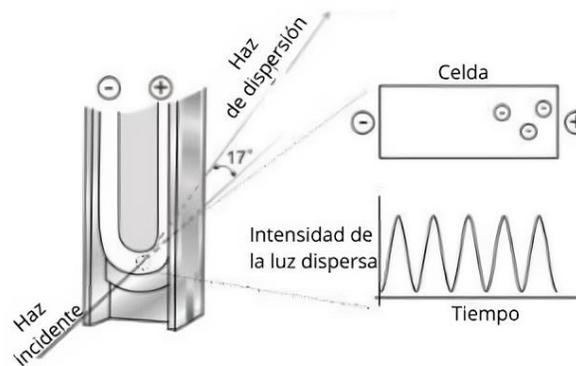


Figura 15. Incidencia del láser y detección de la luz dispersada (Malvern Instruments, 2013a).

La velocidad de las partículas depende de la fuerza del campo eléctrico, de la constante dieléctrica y viscosidad del medio y del potencial ζ . De esta forma, conociendo la movilidad electroforética se puede obtener el potencial ζ aplicando la ecuación de Henry (Ecuación 3):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3\eta} \quad (3)$$

donde ζ es Potencial ζ , U_E es movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, η es la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry.

En la Figura 16 se pueden observar los componentes del sistema de medición del potencial ζ .

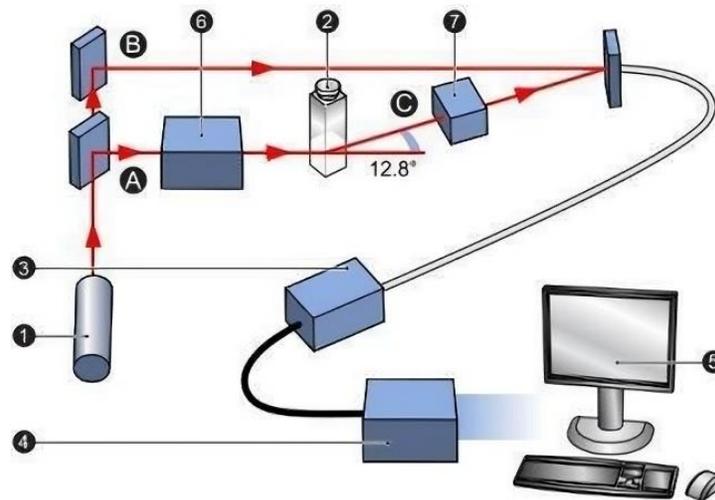


Figura 16. Componentes del sistema de medición del potencial ζ . 1. Láser. 2. Celda. 3. Detector. 4. Procesador digital de señal. 5. Computadora. 6. Atenuador. 7. Ópticas de compensación (Malvern Instruments, 2013a).

3.3.2.2. Condiciones experimentales

El potencial ζ de las muestras RPI se determinó después de la dilución (1:10 v/v) con agua desionizada utilizando un analizador Zetasizer Nano ZSP ZEN 5600 (Malvern Instrument, Reino Unido) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Los valores del índice de refracción se establecieron en 1,54 y 1,33 para los agregados proteicos y el dispersante, respectivamente.

3.3.3. Hidrofobicidad superficial

3.3.3.1. Fundamentos teóricos

En la mayoría de los trabajos publicados, para la determinación de la hidrofobicidad aromática superficial en proteínas o partículas proteicas, se utiliza la sonda 1-anilinoftaleno-8-sulfonato (ANS); ésta es capaz de modificar su intensidad de emisión de fluorescencia dependiendo si se encuentra o no unida a parches hidrofóbicos en la superficie de dichas proteínas o partículas proteicas. Sin embargo, ANS es una molécula ionizable que puede presentar carga negativa a pH ácido cuando su grupo sulfonato se

encuentra desprotonado. La presencia de carga negativa en la molécula sonda interfiere con los ensayos de hidrofobicidad que se realizan a distintos pH, dado que puede existir interacción iónica entre la sonda y las proteínas cargadas positivamente, además de las posibles interacciones hidrofóbicas. Por ello, en nuestro laboratorio se puso a punto el estudio de hidrofobicidad superficial utilizando la sonda no ionizable (no cargada) N,N-dimetil- 6-propionil-2-naftilamina (PRODAN) (Figura 17). Si bien en este trabajo se realizaron todas las determinaciones a pH neutro, se utilizó esta sonda para posibles comparaciones a futuro.

PRODAN es una molécula no ionizable muy sensible a la polaridad del medio en el que se encuentra. La ausencia de carga en la molécula elimina la posibilidad de que haya interacción electrostática en la medición de la hidrofobicidad de las proteínas, haciendo que la medida sea dependiente solo de la hidrofobicidad de la superficie de las proteínas e independiente de la carga neta de la misma y del valor de pH del medio (Alizadeh-Pasdar et al., 2000). La sensibilidad a la polaridad del medio en el que se encuentra se puede determinar a partir de su espectro de emisión de fluorescencia, dado que presenta intensidad de fluorescencia diferencial según se encuentre en suspensión o unida a parches hidrofóbicos en la superficie de las proteínas. Es decir que, a través de la determinación de los cambios en la intensidad de fluorescencia, se puede comparar la hidrofobicidad en diversas muestras. A diferencia del ANS y debido a su insolubilidad en agua, la solución PRODAN debe ser solubilizada inicialmente en metanol.

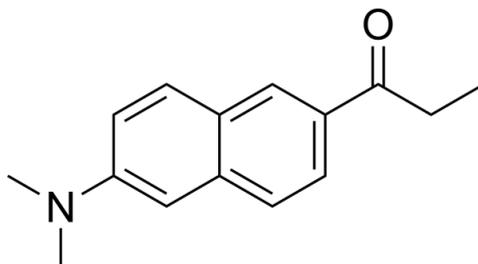


Figura 17. Estructura química de la molécula de PRODAN.

3.3.3.2. *Preparación y almacenamiento del stock de sonda PRODAN*

Para la preparación de la solución se llevó a cabo el método propuesto por Alizadeh-Pasdar y Li-Chan (2001), con ligeras modificaciones. La solución stock de PRODAN se preparó en metanol grado HPLC con una concentración de 1,41 mM. Las condiciones de almacenamiento de la misma fueron en freezer a -20 °C, con una vida útil de hasta 6

meses. Al momento de realizar la determinación, se realizó una dilución 1/20 v/v del stock en metanol (50 µL del stock y 950 µL de metanol grado HPLC). Este procedimiento se llevó a cabo cada día en que se realizó la determinación de hidrofobicidad, manteniendo la solución diluida en baño de hielo hasta su uso.

3.3.3.3. *Condiciones experimentales*

La hidrofobicidad superficial de las muestras de RPI se determinó utilizando la sonda PRODAN según un método descrito previamente (Igartúa et al., 2022). Para ello, las muestras de RPI se diluyeron en serie en agua desionizada para obtener concentraciones de proteína que oscilaban entre 0,2 y 0,00625 % en peso. Alícuotas de 200 µL de cada dilución fueron depositadas en cada pocillo de una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-one, EE. UU.). Luego, se determinó la emisión de fluorescencia en cada pocillo utilizando el lector de placas Cytation 5 (BioTek Instruments, EE. UU.). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 365 ± 9 nm y 465 ± 20 nm, respectivamente. Posteriormente, se agregaron 20 µl de la solución de PRODAN diluida en cada pocillo y la placa se agitó por 10 minutos en oscuridad. Seguidamente, se determinó la emisión de fluorescencia. La diferencia entre la emisión de fluorescencia después y antes de la adición de PRODAN se graficó en función de la concentración de la proteína en cada muestra. La pendiente de cada recta se obtuvo por regresión lineal, representando la hidrofobicidad superficial en cada muestra. Para facilitar la comparación, en este trabajo, la hidrofobicidad se expresó como valor relativo respecto al valor obtenido para la muestra sin tratar (RPI) que se fijó como referencia (100 %).

3.3.4. *Espectroscopia de fluorescencia*

3.3.4.1. *Fundamentos teóricos*

La fluorescencia es un proceso en el que los átomos y moléculas (analitos) se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. La absorción puede causar la excitación del analito a estados energéticos de mayor energía, y después la especie excitada se relaja al estado fundamental, emitiendo su exceso de energía como fotones (fluorescencia o fosforescencia) o por procesos no radiantes. Esta conversión de radiación absorbida en energía que se emite nuevamente es un proceso rápido. La fluorescencia es uno de los posibles procesos por los cuales se emite el exceso de energía en forma de fotones. Dichos fotones se emiten siempre a menores frecuencias (mayores longitudes de onda)

que las de la radiación absorbida, debido a que la transición emisora tiene lugar luego de que parte de la energía vibracional ha sido disipada hacia el entorno.

La mayoría de las proteínas presentan fluorescencia intrínseca, debido a que presentan residuos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) que son fluorescentes. La emisión de proteínas está dominada por el triptófano, que absorbe en la longitud de onda más alta y muestra el mayor coeficiente de extinción. Además, debido a su elevada longitud de onda, la energía absorbida por los residuos de fenilalanina y tirosina a menudo se transfiere a los residuos de triptófano en la misma proteína (Lakowicz, 1999). Los espectros de absorción y emisión de estos aminoácidos se muestran en la Figura 18. En ésta última se puede observar que la fenilalanina muestra las longitudes de onda de emisión menores con un máximo cercano a los 282 nm, mientras que la emisión de tirosina en agua ocurre a 303 nm y es relativamente insensible a la polaridad del solvente y la emisión máxima de triptófano en el agua se produce cerca de los 350 nm y depende en gran medida de la polaridad y/o del entorno local.

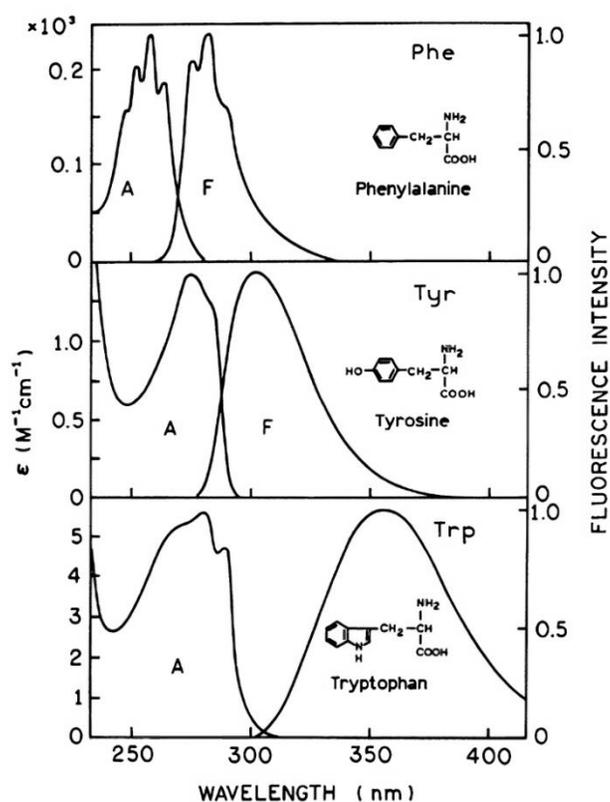


Figura 18. Espectros de absorción y emisión de de los aminoácidos aromáticos en solución acuosa a pH 7 (Lakowicz, 1999).

La alteración de la estructura molecular de las proteínas puede provocar cambios en la intensidad de la fluorescencia de las proteínas y cambios en la longitud de onda de emisión máxima. Una característica valiosa de la fluorescencia intrínseca de las proteínas es la alta sensibilidad del triptófano a su entorno local. Con frecuencia se pueden observar cambios en los espectros de emisión del triptófano en respuesta a transiciones conformacionales de proteínas, asociación de subunidades, unión de sustrato o desnaturalización, todo lo cual puede afectar el entorno local que rodea el anillo de indol (Lakowicz, 1999). La intensidad de fluorescencia emitida por estos aminoácidos aromáticos depende de su grado de exposición al medio. En las proteínas en estado nativo, los aminoácidos hidrofóbicos tienden a interactuar entre ellos y ubicarse en el interior de la estructura proteica globular, limitando su capacidad de absorber energía (y por lo tanto de emitir fluorescencia). Durante el proceso de desnaturalización, cambios conformacionales y estructurales relacionados con el despliegue parcial de la proteína nativa conduce a la exposición de algunos residuos de aminoácidos hidrofóbicos al medio, lo que induce un aumento en la intensidad de fluorescencia. Si la desnaturalización induce una posterior agregación de las moléculas desplegadas mediante la formación de nuevos enlaces intermoleculares entre los residuos expuestos de aminoácidos en diferentes cadenas peptídicas, la emisión de fluorescencia podría modificarse nuevamente (Elshereef et al., 2006).

Dado que la fluorescencia de las proteínas generalmente se determina luego de excitar al máximo de absorción o en longitudes de onda principalmente atribuible al triptófano, en este trabajo los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

3.3.4.2. *Condiciones experimentales*

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de las muestras de RPI se determinaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) utilizando un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Corea). Para las mediciones, las muestras se diluyeron 1/200 v/v en agua desionizada para obtener una concentración de RPI final de 0,01 % p/v, reduciendo el efecto de dispersión de la luz. Las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo de 1 cm x 1 cm con λ excitación a 280 nm (ancho de rendija = 5 nm) y λ emisión de 300 a 500 nm (ancho de rendija = 5 nm) con una resolución de 0,5 nm y una velocidad de escaneo de 60 mm/minuto.

3.3.5. SDS-PAGE

3.3.5.1. Fundamentos teóricos

La electroforesis es una técnica empleada para la separación de proteínas basada en el desplazamiento de las mismas en un campo eléctrico. Se utiliza principalmente como método analítico. Su ventaja es que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite hacer una estimación rápida del número de proteínas en una mezcla o del grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada (Nelson y Cox, 2022).

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida. El gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando la migración de las proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su cociente carga/masa. La migración también puede estar afectada por la forma de la proteína. En la electroforesis, la fuerza que mueve la macromolécula es el potencial eléctrico, E . La movilidad electroforética, μ , de la molécula es el cociente entre la velocidad de la partícula, V , y el potencial eléctrico. La movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula, Z , dividida por el coeficiente friccional, f , que refleja en parte la forma de la proteína (Ecuación 4).

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f} \quad (4)$$

El desplazamiento de una proteína en un gel durante una electroforesis es por tanto función de su tamaño y de su forma.

Un método electroforético comúnmente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular emplea el detergente dodecil sulfato sódico (SDS) ("dodecil" se refiere a una cadena de 12 átomos de carbono) (Figura 19). El SDS se une a la mayoría de proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos aminoácidos.

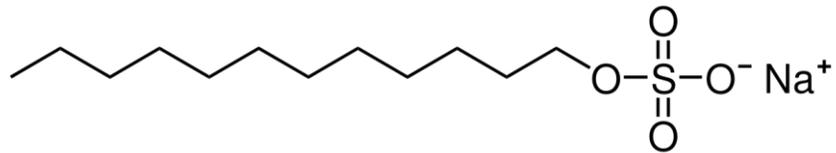


Figura 19. Estructura química del dodecil sulfato sódico.

El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa similar. Además, la conformación nativa de la proteína se altera cuando se fija el SDS y la mayoría de las proteínas adoptan una forma similar. La electroforesis en presencia de SDS separa, por tanto, las proteínas casi exclusivamente en función de la masa (peso molecular), de forma que los polipéptidos pequeños se desplazan más rápidamente. Después de la electroforesis las proteínas se visualizan añadiendo un colorante tal como el azul Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel. Cuando se compara con las posiciones a las que se desplazan en el gel proteínas de masa molecular conocida, la posición de una proteína desconocida puede proporcionar una medida excelente de su masa molecular. Si la proteína tiene dos o más subunidades diferentes, las subunidades se separarán generalmente a consecuencia del tratamiento con SDS y aparecerá una banda individual para cada una.

3.3.5.2. *Condiciones experimentales*

La composición de las muestras de RPI se estudió mediante SDS-PAGE realizado con geles de poliacrilamida de apilamiento al 4 % y de separación al 12 %, como se describió anteriormente (Zhi et al., 2022).

En primer lugar, se realizó el ensamblaje del casete de vidrio en el marco y el soporte de polimerización del gel. Se colocó el peine en el casete de vidrio para marcar una línea horizontal a 1 cm por debajo de los dientes (Figura 20), hasta donde se vertería el gel de resolución. Además, se prepararon los geles de poliacrilamida a la concentración y volumen necesarios.

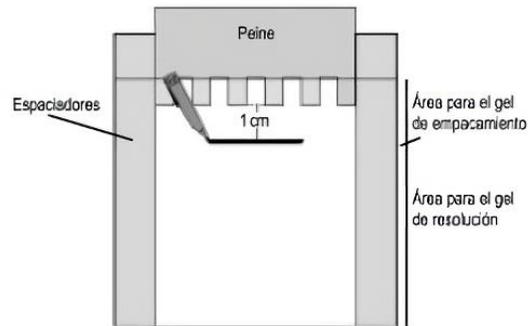


Figura 20. Marcado del casete de vidrio.

De esta forma, se agregó el gel de resolución entre las placas de vidrio hasta la línea trazada, de forma suave para evitar la formación de burbujas. Además, se añadió una capa de agua (aproximadamente 100 μL) sobre la solución de poliacrilamida para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente. Una vez formado el gel, se lavó la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada.

Seguidamente, se agregó el gel de apilamiento entre los vidrios y sobre el gel de resolución ya polimerizado. Inmediatamente después, se colocó nuevamente el peine entre ambos vidrios. La poliacrilamida se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el tubo.

Una vez formado el gel, se retiró el peine cuidadosamente y se lavaron todos los pocillos ya formados con agua destilada.

A continuación, se ensambló el casete de gel en el marco de sujeción y se llevó dentro de la cuba de electroforesis. Se colocó el buffer de resolución dentro de los marcos hasta rebalsarlos y dentro de la cuba de electroforesis hasta la marca indicada en la misma (700 mL para 2 geles; 1000 mL para 4 geles).

Las muestras de RPI se disolvieron en solución buffer Tris-Glycine SDS que contenía el agente reductor de β -mercaptoetanol y se calentaron en agua hirviendo durante 5 minutos, seguido de centrifugación a 12000 rpm durante 10 segundos. Posteriormente, los sobrenadantes (15 μL) y el marcador de peso molecular de proteínas (10 μL) se

agregaron a los geles prefabricados para electroforesis. Se cubrió el módulo con la tapa y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. La condición experimental se fijó en 200 V durante 40 minutos.

Finalizada la electroforesis se procedió al desmontaje del equipo. Para desprender el gel del vidrio, el mismo se remojó con agua destilada y se utilizó una espátula como ayuda.

Se tomó el gel cuidadosamente y se lo sumergió en la solución de tinción que contenía azul brillante de Coomassie al 0,1 % (R-250). Se dejó incubar con un suave movimiento rotatorio por 2 horas. Culminado ese tiempo, se cubrió el gel teñido con solución de decoloración rápida y se dejó incubar por 30 minutos. Luego, se retiró la solución decolorante rápida y se añadió un segundo volumen de la misma solución hasta apreciar las primeras bandas. Inmediatamente, se retiró la solución de decoloración rápida y se añadió la solución decolorante lenta. Se realizó una incubación *overnight* a movimiento constante, hasta que las bandas de las proteínas pudieron ser apreciadas claramente.

Se fotografió el gel sobre una superficie blanca y con adecuada iluminación para la posterior interpretación de resultados.

3.3.6. Distribución de tamaño de partícula

3.3.6.1. Fundamentos teóricos

Para medir la distribución de tamaño de partícula (DTP) se utilizó el equipo Mastersizer 2000E (Malvern Instrument, UK). Este equipo determina la DTP basándose en el método de dispersión estática de la luz (SLS, por *Static Light Scattering*), también conocida como técnica de difracción láser.

El Mastersizer se compone de la unidad óptica principal, una o más unidades de dispersión y una celda de medición. Normalmente, un dispersante como agua desionizada también se conecta directamente a la unidad de dispersión. La unidad óptica principal, a veces denominada banco óptico o simplemente instrumento, es el núcleo del sistema Mastersizer (Figura 21). Su propósito es transmitir luz láser roja y luz azul a través de una muestra y luego usar sus detectores para generar datos sobre el patrón de dispersión de la luz causado por las partículas en la muestra. Luego, el software de aplicación Mastersizer interpreta los datos para proporcionar información precisa sobre el tamaño de las partículas (Malvern Instruments, 2013b).

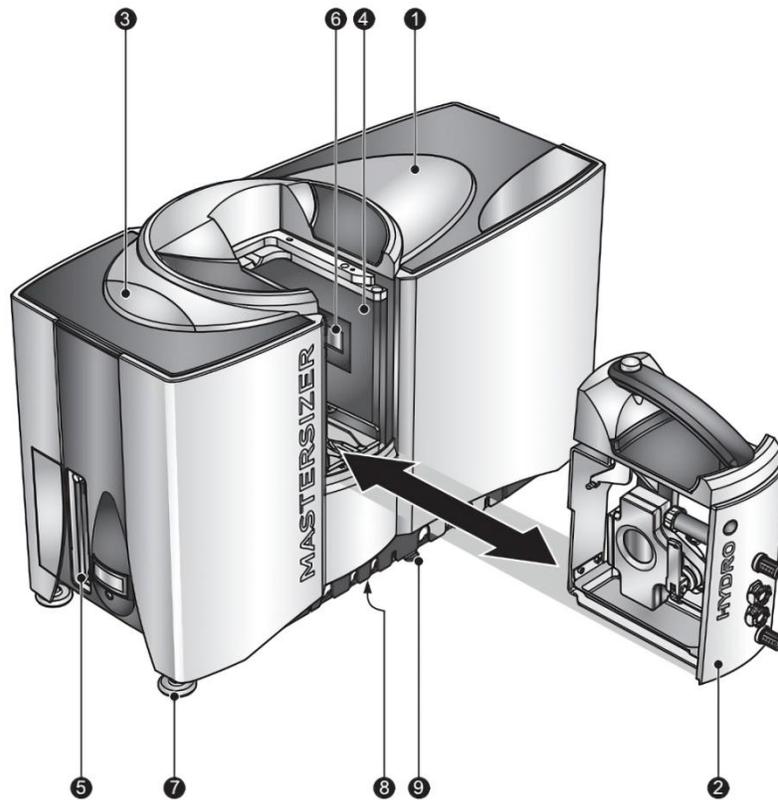


Figura 21. Componentes de la unidad óptica. 1. Unidad óptica. 2. Celda. 3. Estado del instrumento LED. 4. Bahía de celdas. 5. Panel final. 6. Ventana de protección. 7. Pies ajustables. 8. Drenaje. 9. Guía de colocación de tubos/cables. (Malvern Instruments, 2013b).

Hay dos tipos de unidades de dispersión: seca y húmeda. La función de la unidad seca es garantizar que una muestra seca se disperse y se alimente uniformemente a la celda de medición dentro de una corriente continua de aire (Malvern Instruments, 2013b). La unidad húmeda controla la dispersión de una muestra suspendida dentro de un dispersante líquido y asegura la llegada a la misma a la celda de medición, para que el láser pueda pasar a través de ella para realizar una medición (Malvern Instruments, 2013b).

La técnica empleada mide la DTP a partir de la variación angular de la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra con partículas dispersas (Figura 22). En general, el ángulo de dispersión se relaciona inversamente con el tamaño de la partícula. Por lo tanto, en esta técnica se mide la intensidad promedio de la luz dispersada. La intensidad de la luz dispersada por un periodo dado de tiempo es acumulada para un número dado de concentraciones de la muestra. Este promedio de

tiempo remueve las fluctuaciones inherentes en la señal, de ahí el término de dispersión estática de la luz (Alzate Calderón, 2018).

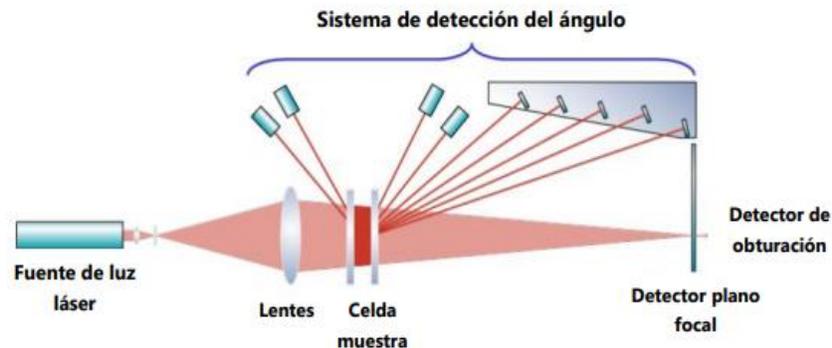


Figura 22. Esquema del fundamento de la técnica de SLS (Alzate Calderón, 2018).

La luz dispersada en distintos ángulos por las partículas de diferentes tamaños pasa por un sistema óptico complejo e incide posteriormente sobre los detectores, obteniéndose un patrón angular de luz dispersada. El *software* incorporado al equipo permite traducir este patrón con la correspondiente DTP (Copadoa et al., 2020). Este cálculo requiere el conocimiento del índice de refracción tanto de las partículas como del líquido circundante a la longitud de onda del láser utilizado.

Los datos son ajustados matemáticamente siguiendo la teoría del modelo óptico de Mie, el cual usa los datos de los índices de refracción y de absorción (de la muestra) y del índice de refracción (del medio líquido), para obtener el tamaño de partícula promedio en un rango entre 0,01 – 10000 μm (Alzate Calderón, 2018).

La concentración de partículas usualmente es presentada como porcentaje de volumen, superficie o número (Palazolo, 2006). La importancia de la elección en cómo presentar los resultados, dependerá del modo en el cual se visualicen mejor los fenómenos que ocurren en nuestro sistema.

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse los distintos diámetros promedio, mediante la utilización del diámetro promedio de Sauter ($D[3,2]$) y del diámetro promedio de De Broukere ($D[4,3]$), estas determinaciones no requieren el conocimiento del número total de partículas ya que los valores de $D[3,2]$ y $D[4,3]$ se relacionan con las distribuciones en superficie y volumen, respectivamente. Estos diámetros se conocen

como “*moment diameters*” (Walstra, 1983) y se definen de acuerdo a las Ecuaciones 5 y 6 como:

$$D_{3,2} = \frac{\sum S_i d_i}{\sum S_i} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (5)$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (6)$$

Donde n_i es el número, S_i la superficie y V_i el volumen correspondiente a todas las partículas con diámetro d_i (Márquez, 2009).

3.3.6.2. *Condiciones experimentales*

La DTP de cada muestras de RPI se determinó mediante SLS utilizando un equipo Mastersizer 2000E asociado con una unidad de dispersión húmeda Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Los valores del índice de refracción para los agregados proteicos y el dispersante se establecieron en 1,54 y 1,33, respectivamente. Además de las DTP, se analizaron los diámetros promedio ponderados por volumen (D[4,3]) y superficie (D[3,2]), ya que el primero es más sensible a la presencia de partículas grandes mientras que el segundo es más sensible a la presencia de partículas pequeñas (McClements, 2004) .

3.3.7. *Microscopía de fluorescencia convencional y microscopía confocal láser*

3.3.7.1. *Fundamentos teóricos*

La microscopía de fluorescencia es una técnica de imágenes que utiliza fluoróforos (sondas, tintes o proteínas fluorescentes) para marcar muestras y generar una imagen. La imagen se basa en la excitación específica de las moléculas fluorescentes, donde la luz es absorbida por un fluoróforo y emitida en una longitud de onda más alta. Autores como Aguilera y Standley (1999) han informado del uso de sondas fluorescentes en el campo de la ciencia de los alimentos. Algunos componentes de los alimentos presentan autofluorescencia o tienen una capacidad de fluorescencia inherente, pero en su mayoría, la fluorescencia de los compuestos de los alimentos debe ser inducida mediante tratamiento químico. Esta última, también llamada fluorescencia secundaria, se puede lograr de dos maneras: (i) tratando la muestra con colorantes específicos (sondas fluorescentes) o produciendo productos de reacción fluorescentes específicos en la muestra; o (ii) aplicando moléculas biológicas marcadas con fluorescencia, como

anticuerpos, con afinidad de unión por constituyentes específicos (Ferrando y Spiess, 2000). Para la tinción de proteínas en matrices alimentarias es común utilizar la sonda Rodamina B (Figura 23) que tiene la capacidad de unirse selectivamente a estas biomoléculas.

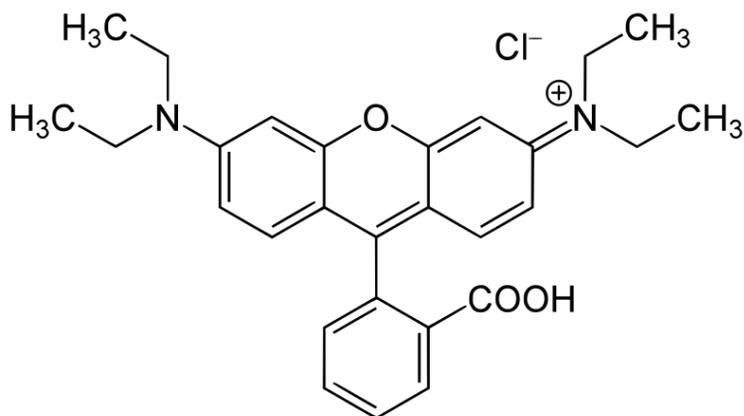


Figura 23. Estructura química de la molécula de Rodamina B.

En un microscopio convencional de campo amplio (Figura 24A), la fluorescencia emitida por la muestra marcada se enfoca en el detector mediante el mismo objetivo que se utiliza para la luz de excitación. El espejo dicróico actúa como un filtro de longitud de onda específica que transmite fluorescencia al ocular o a un detector. Por otra parte, en un microscopio confocal láser (CLSM, Figura 24B), la luz de excitación es emitida por un láser. Una longitud de onda de luz específica pasa a través de un orificio y es reflejada por el espejo dicróico hacia la muestra. El orificio permite que sólo la luz del plano de enfoque llegue al detector (Ferrando y Spiess, 2000). Esto reduce la adquisición de luz desenfocada, mejorando así la calidad de la imagen. El fluoróforo excitado emite fluorescencia secundaria que pasa a través del espejo dicróico y se enfoca como un punto confocal en el orificio del detector fotomultiplicador (PTM).

Las principales ventajas de un microscopio convencional de campo amplio es que se obtienen imágenes rápidamente y pueden observarse directamente en el ocular. El costo de mantenimiento es bajo en comparación con el microscopio confocal. Sin embargo, la técnica está sujeta a una seria limitación que surge de la dificultad para obtener imágenes claramente delineadas a lo largo del ángulo de visualización (eje z), o profundidad, de la muestra (Ferrando y Spiess, 2000).

Por otra parte, utilizando un microscopio confocal se puede obtener una calidad de imagen superior y mejorar la relación señal-ruido por el rechazo de la luz que no proviene del plano focal. Debido a la dispersión de la luz, la imagen borrosa se puede eliminar fácilmente. Sin embargo, utilizar un microscopio confocal puede llevar mucho tiempo (dependiendo de la velocidad de escaneo) y tiene un procedimiento de adquisición de imágenes más complicado en comparación con un microscopio convencional. Adicionalmente, es más elevado el costo de mantenimiento del equipo.

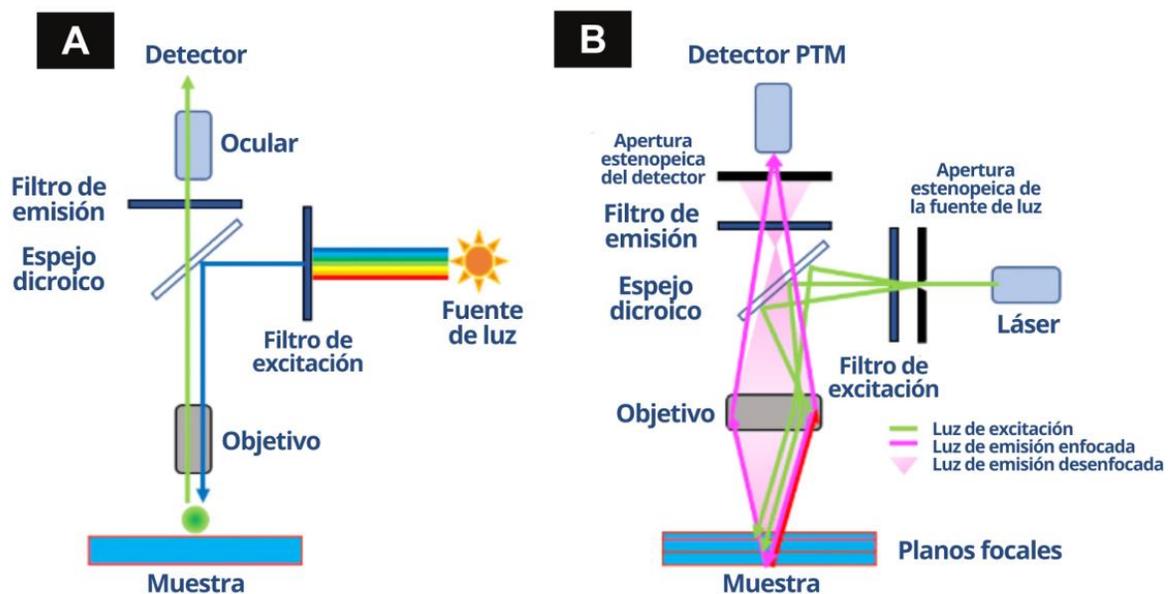


Figura 24. Generación de imágenes en microscopios de **(A)** fluorescencia de campo amplio y **(B)** confocales. Adaptado de Proteintech Group (2023).

En resumen, se puede destacar que las técnicas de microscopía son complementarias. CLSM se centra en una pequeña lámina del eje z que permite la observación de estructuras más pequeñas pero impide el estudio de agregados tridimensionales, mientras que la microscopía convencional permite la observación de agregados tridimensionales con una menor sensibilidad.

3.3.7.2. Condiciones experimentales

Las muestras de RPI se observaron mediante microscopía de fluorescencia convencional y microscopía láser confocal después de la tinción con rodamina B. Para la tinción, se agregaron 10 μ l de solución etanólica de rodamina B (0,05 % en peso) a 1 ml de cada muestra de RPI. Luego, las dispersiones teñidas se colocaron en un portaobjetos de vidrio

y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación en el microscopio de fluorescencia convencional Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., EE. UU.) o en el microscopio confocal Leica SP8 (Leica Instruments, Alemania). Las longitudes de excitación y emisión fueron de 514 y 561 nm para el microscopio confocal y de 531 y 596 nm para el microscopio convencional.

3.4. Actividad emulsionante de muestras de RPI modificado

3.4.1. Preparación de emulsiones O/W

Se usó un proceso de homogeneización de dos pasos para preparar las emulsiones O/W. En primer lugar, las muestras de RPI modificado se diluyeron en agua desionizada para obtener 90,0 g de dispersiones al 1,5 % en peso, seguido de la mezcla con 10,0 g de aceite de girasol refinado a 20000 rpm durante 2 minutos utilizando un homogeneizador Ultraturrax T25 con una herramienta de dispersión S25N-8G (IKA Labortechnik, Alemania). De esta manera se obtuvieron emulsiones con una relación másica fase dispersa/emulsión (ϕ) de 0,1. En segundo lugar, las preemulsiones obtenidas se sonicaron durante 2 minutos (ciclo de encendido/apagado de 20/20 segundos) al 70 % de amplitud utilizando un homogeneizador de ultrasonidos Sonics Vibra Cell VCX750 (Sonics & Materials, Inc.; EE. UU.), con una punta de diámetro de 28 mm sumergida 1/3 en un vaso de precipitados (Figura 25). Una vez más, se evitó el aumento de temperatura durante la sonicación colocando el vaso de precipitados en un baño de agua con hielo.

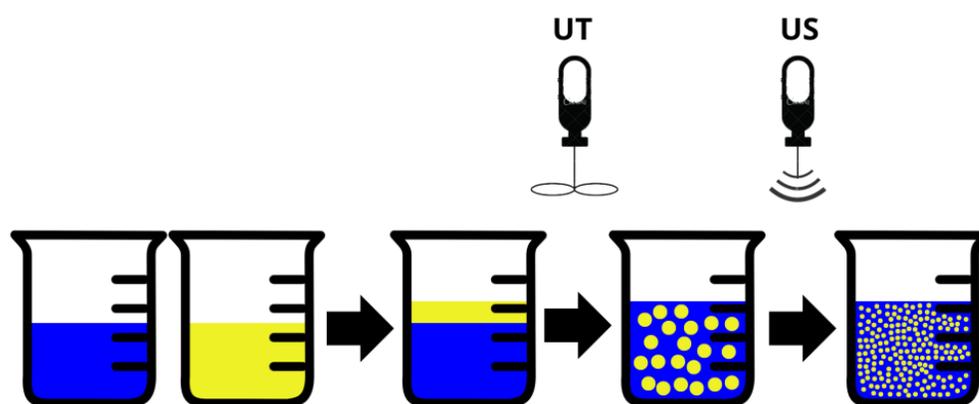


Figura 25. Preparación de emulsiones O/W. UT: Agitación por Ultraturrax, US: Sonicación.

3.4.2. Distribución de tamaño de partícula

3.4.2.1. Fundamentos teóricos

Para medir la DTP de las emulsiones preparadas se utilizó el equipo Mastersizer 2000E (Malvern Instrument, UK). Como se mencionó anteriormente, este equipo determina la DTP basándose en el método de SLS.

El tamaño de gotas en una emulsión tiene un fuerte impacto en la estabilidad, propiedades ópticas, reológicas y atributos sensoriales. Cuando todas las gotas en una emulsión tienen el mismo tamaño, la emulsión es denominada “monodispersa”. En la práctica, las emulsiones alimentarias contienen rangos definidos de diferentes tamaños de partículas, por lo cual se hace referencia a ellas como emulsiones “polidispersas” (Figura 26). En este sentido, es conveniente referirse en términos de una DTP para el análisis de las mismas. A su vez, las emulsiones polidispersas pueden ser caracterizadas como “monomodales”, “bimodales” o “multimodales”, dependiendo si se pueden definir uno, dos o más rangos de DTP.

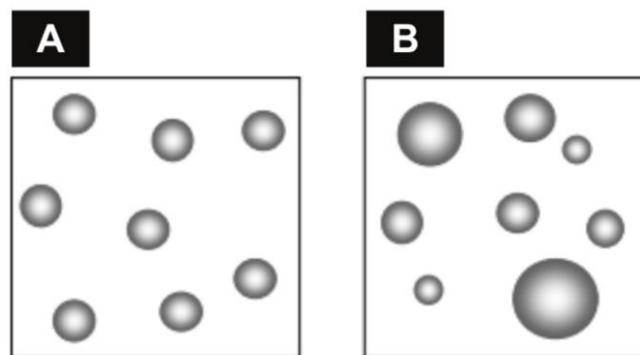


Figura 26. Representación esquemática de emulsiones **(A)** monodispersas y **(B)** polidispersas (McClements, 2004).

La determinación de tamaño de partícula debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi < 0,05$) y con agitación, con el objetivo de que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Así, en un volumen pequeño de la emulsión un haz de radiación láser incide sobre una celda interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. Como se explicó anteriormente, la luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores

obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El *software* incorporado en el equipo permite traducir este patrón en la correspondiente DTP.

Como este equipo no es capaz de discernir por sí solo entre gotas libres o gotas floculadas, es posible utilizar un agente defloculante para analizar la existencia de floculación en las muestras. La utilización de un tensioactivo aniónico como el SDS permite desplazar a las proteínas de la interfase, otorgando a las gotas carga negativa que, por fuerzas repulsivas, favorece la defloculación.

3.4.2.2. *Condiciones experimentales*

Las emulsiones estabilizadas con RPI recién preparadas se diluyeron (1:4 v/v) con agua desionizada o solución de SDS al 1,0 % en peso. A continuación, se determinaron las DTP con y sin SDS utilizando un equipo Mastersizer 2000E asociado a una unidad de dispersión húmeda Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd., UK). En este caso, los valores del índice de refracción para las gotas de aceite y el dispersante se establecieron en 1,47 y 1,33, respectivamente. Los resultados del tamaño de partícula también se expresaron como diámetros promedio ponderados por volumen de las gotas (D[4,3]). Para la estabilidad durante el almacenamiento, las emulsiones estabilizadas con RPI se colocaron en tubos sellados y se almacenaron a temperatura ambiente durante 21 días. Las DTP con y sin SDS también se determinaron en los días 1 (24 horas) y 21.

3.4.3. *Microscopía*

Las emulsiones estabilizadas con RPI se observaron mediante microscopía óptica convencional a los días 1 y 21. Para ello, las emulsiones se diluyeron (1:4 v/v) con agua desionizada o solución de SDS al 1,0 % en peso, y se colocaron 10 µL de cada dilución en un portaobjetos de vidrio y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación en el microscopio óptico convencional Cytation 5.

3.4.4. *Estabilidad física*

3.4.4.1. *Fundamentos teóricos*

Para analizar la estabilidad física de las emulsiones se utilizó el analizador vertical de barrido Turbiscan LAB (Formulaction, Francia). Este equipo permite analizar la estabilidad física de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento, basándose en la

tecnología de dispersión múltiple de la luz. Este permite monitorizar y cuantificar fenómenos de inestabilidad antes de ser detectable a simple vista.

Turbiscan LAB tiene un cabezal de detección que se mueve hacia arriba y hacia abajo a lo largo de una celda cilíndrica de vidrio de fondo plano (Figura 27). El cabezal de detección se compone de una fuente de luz del infrarrojo cercano ($\lambda = 880 \text{ nm}$) y dos detectores síncronos. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra (180° del haz incidente), mientras que el detector de retrodispersión recibe la luz dispersada por la muestra (45° del haz incidente).

El Turbiscan LAB funciona en modo de escaneo: el cabezal de lectura óptica escanea la longitud de la muestra (hasta 55 mm), adquiriendo datos de transmisión y retrodispersión cada $40 \mu\text{m}$. Este es el modo de análisis más completo que permite detectar los fenómenos migratorios.

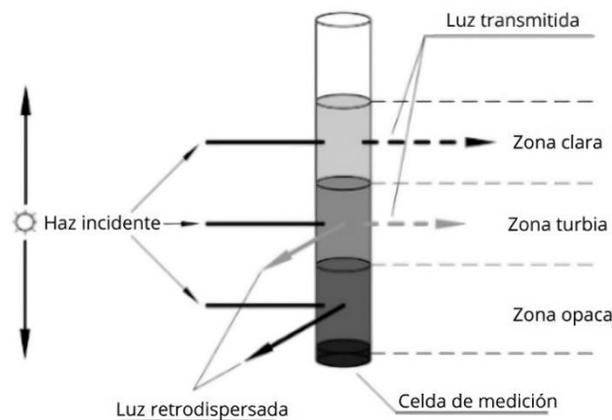


Figura 27. Principios de operación del Turbiscan LAB. Adaptada de Bru et al., (2004).

Los perfiles de luz transmitida (%T) y luz retrodispersada (%BS, por *backscattering*) en función de la altura del tubo y el índice de estabilidad (TSI, por *Turbiscan Stability Index*) se determinan en función del tiempo de almacenamiento y se utilizan para analizar y comparar la estabilidad de las muestras. Estos perfiles constituyen una huella macroscópica de la muestra en un momento dado. La transmisión se utiliza para analizar dispersiones claras a turbias y la retrodispersión se utiliza para analizar dispersiones opacas y concentradas (Formulation, 2017).

A través del análisis de los perfiles de %T y %BS, es posible determinar el tipo de desestabilización que cada muestra está sufriendo. La formación de crema es un

fenómeno común de inestabilidad de las emulsiones, cuando la fase dispersa tiene una densidad menor que la fase continua. Puede acoplarse con coalescencia o floculación y finalmente conducirá a una separación de fases. En el caso del cremado de emulsiones O/W, este fenómeno se detecta fácilmente ya que puede observarse que el %BS disminuye en el fondo de la muestra debido a una disminución de la concentración de las partículas en esta parte (capa clarificada, fase suero) y aumenta en la parte superior de la muestra, debido a un aumento de la concentración de la fase dispersa (capa de crema) (Figura 28B) (Formulation, 2017). El descenso en la señal de %BS en la zona superior del tubo indica que disminuye el número de gotas debido a la coalescencia de las mismas. Por otro lado, si la muestra se mantuviera estable en suspensión, no se observarían fluctuaciones en los %BS y %T a lo largo del tiempo de almacenamiento. Además, los valores de %BS son directamente proporcionales a la concentración de fase dispersa e inversamente proporcionales al diámetro de las partículas. El análisis de esta señal, seleccionando zonas adecuadas del tubo, permite estudiar procesos de desestabilización en sistemas opacos, como cremado y coalescencia en emulsiones. Por otro lado, la señal de %T indica si el sistema es translúcido (Figura 28A).

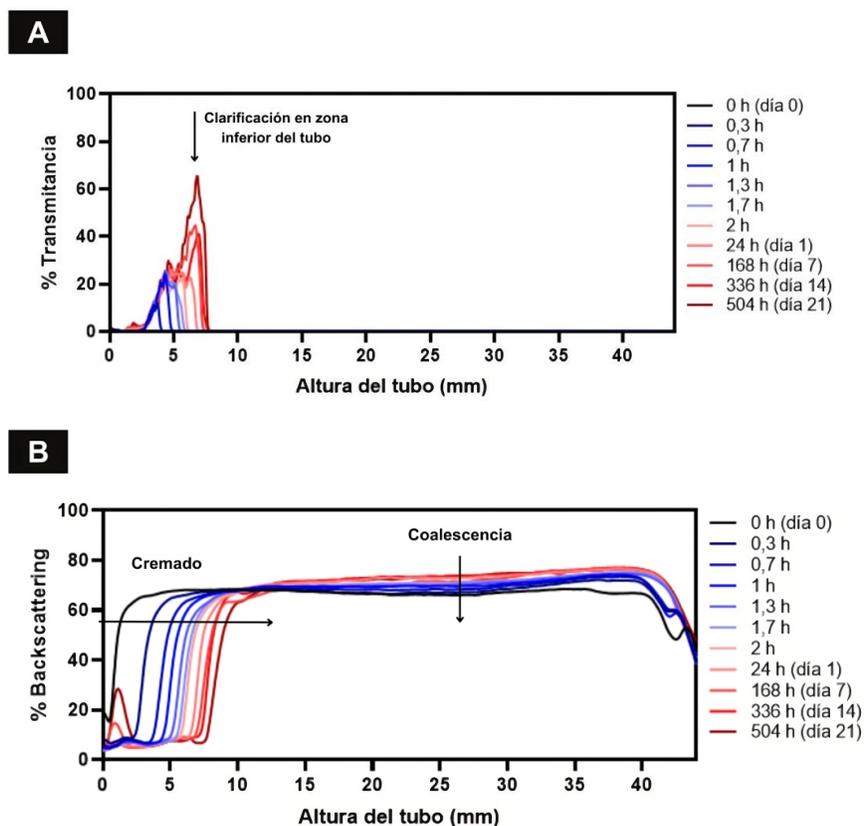


Figura 28. Perfiles de (A) %T y (B) %BS para ejemplificar cremado, coalescencia y clarificación.

3.4.4.2. *Condiciones experimentales*

La estabilidad física de las emulsiones estabilizadas con RPI se controló utilizando un analizador Turbiscan Lab® (Formulacion, Francia). Para ello, las emulsiones se colocaron en tubos cilíndricos de vidrio y se determinaron los perfiles de transmisión (%T) y retrodispersión (%BS) a lo largo de la muestra hasta el día 21 de almacenamiento. Las muestras se almacenaron estáticamente a temperatura ambiente y se protegieron de la luz durante este período.

3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todas las preparaciones y ensayos de caracterización se realizaron al menos por duplicado.

Los datos adquiridos se analizaron estadísticamente usando el software Graph Pad Prism v8.0. En los gráficos, los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Además, se utilizaron diferentes letras para representar las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de acuerdo con el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) o de dos vías (Two-way ANOVA) seguido por el correspondiente análisis de múltiples comparaciones de Tukey.

4. Resultados y discusión

4.1. Impacto de diferentes tratamientos en las características del RPI

Los aislados de proteína de arroz (RPI) están ganando interés en la industria alimentaria, pero su incorporación como ingredientes alimentarios está limitada por la presencia de grandes agregados proteicos y su baja solubilidad. En el presente trabajo, se prepararon diez muestras (Tabla 4) para evaluar el impacto de realizar tratamientos solos o en combinación de cambio de pH (PS), ultrasonido (US) y calor (HT) en un RPI comercial. Las muestras proteicas obtenidas fueron caracterizadas por su solubilidad, el potencial ζ , la hidrofobicidad superficial y la emisión de fluorescencia intrínseca. Además, para estudiar el estado de agregación de las proteínas, se determinaron las distribuciones de tamaño de partícula y se realizaron análisis de microscopía de fluorescencia convencional y CLSM.

4.1.1. Solubilidad

La solubilidad (%) de las dispersiones de RPI luego de centrifugar se presenta en la Figura 29, en la cual se demuestra que la aplicación de los diferentes tratamientos y su combinación condujo a una mayor solubilidad.

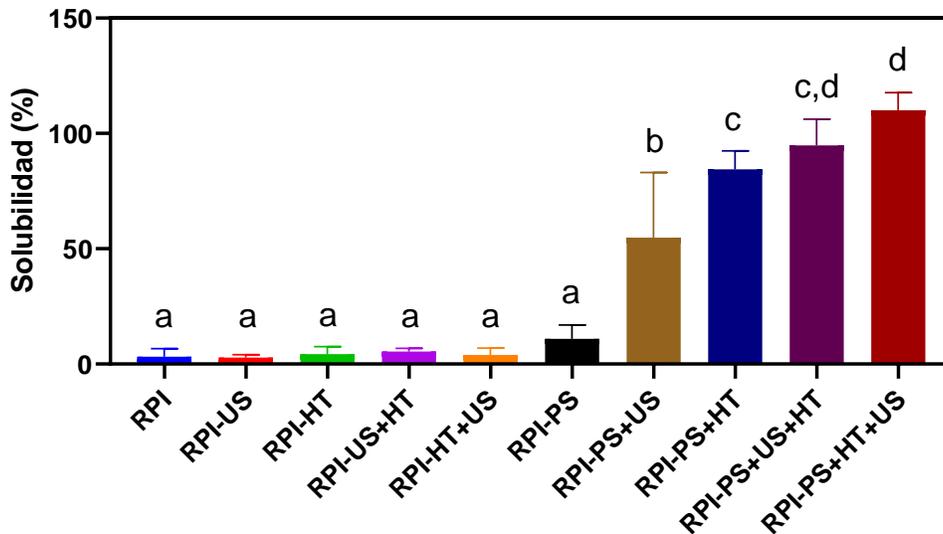


Figura 29. Solubilidad (%) de las muestras modificadas y no tratadas de RPI.

El control de RPI mostró una solubilidad muy baja ($2,7 \pm 1,0$ %). Estos resultados eran esperados ya que otros investigadores informaron previamente que el RPI presenta elevada agregación y baja dispersabilidad en condiciones de pH neutro (Dai et al., 2022). La glutelina es la principal fracción proteica del aislado, la cual es extremadamente insoluble en agua en estas condiciones.

La realización de tratamientos US y/o HT en condiciones de pH neutro (RPI-US, RPI-HT, RPI-US+HT y RPI-HT+US) no mejoró la solubilidad de las proteínas del arroz. Estos resultados sugirieron que la agregación de proteínas a pH 7,0 es tan intensa que ni el calentamiento, ni la sonicación, ni los tratamientos combinados logran un efecto significativo sobre la solubilidad de las muestras.

Según nuestros resultados, el tratamiento con PS permitió obtener una mejora pequeña pero no significativa en la solubilidad de las proteínas ($9,1 \pm 4,9$ %). Este resultado demostró diferencias respecto a resultados publicados por otros estudios (Jiang, et al., 2010; Dai et al., 2022), donde la aplicación de únicamente un tratamiento alcalino aumentaba considerablemente la solubilidad proteica. Esto se explicaría dado que las proteínas de arroz muestran una solubilidad mínima en agua en el rango de pH 4-5, mientras que condiciones ácidas y alcalinas extremas promueven la disociación de los agregados de glutelinas y la hidrólisis parcial y, por lo tanto, aumentan su solubilidad (Amagliani et al., 2017a). Además, debido a la alta carga neta que porta la proteína bajo el tratamiento de PS, una repulsión electrostática aumentada entre las moléculas de RPI podría resultar en la desagregación de los agregados de proteínas, lo que conduciría a un aumento de la solubilidad (Dai et al., 2022). Dai et al. (2022) demostraron que el tratamiento con PS aumentaba la solubilidad de RPI mediante la disociación de subunidades de glutelinas, la desagregación de agregados de proteínas y los reordenamientos de las estructuras secundarias de las proteínas. Sin embargo, estos autores trabajaron con un RPI obtenido por liofilización en lugar de uno obtenido por secado por aspersion como el utilizado en este trabajo. La técnica de secado modifica no sólo las características de los polvos sino también el estado de agregación de las proteínas dificultando la redispersión en medios acuosos. Li et al. (2022) demostraron que el polvo de glutelinas de arroz obtenido por secado por aspersion presentaba menos solubilidad, más agregación y más inestabilidad durante la redisolución que los polvos obtenidos por liofilización. Estas diferentes condiciones iniciales de trabajo permiten justificar la disparidad en los resultados de las muestras tratadas con PS y la necesidad

de realizar tratamientos más intensos para mejorar la solubilidad de los aislados obtenidos por secado por aspersión. En este sentido, cabe mencionar que la mayoría de los aislados de proteínas vegetales disponibles actualmente en el mercado se obtienen mediante dicho método de secado.

La combinación de los tratamientos PS y US (RPI-PS+US) aumentó significativamente la solubilidad de las proteínas ($45,8 \pm 23,5$ %). De manera similar, anteriormente se informaron incrementos en la solubilidad después de tratamientos con ultrasonido realizados a pH 12,0 en proteínas de arroz (Zhang et al., 2018), soja (Fang et al., 2021), colza (Li et al., 2020) y arvejas (Jiang et al., 2017). El efecto sinérgico de la combinación PS+US en RPI podría atribuirse a la condición de pH extremadamente alcalino que desdobló las estructuras proteicas haciéndolas más susceptibles al tratamiento de agitación violenta y cavitaciones acústicas causadas por US, conduciendo a la formación de agregados solubles que retienen el agua en el interior y se hinchan, mejorando indirectamente la solubilidad de las proteínas (Gao et al., 2022; Zhang et al., 2018). Específicamente, la cavitación acústica inducida por US puede romper las interacciones intra o intermoleculares, lo que conduce a cambios conformacionales en las proteínas que separan los agregados de proteínas en subunidades de glutelinas individuales o incluso generan nuevos agregados solubles (Zhi et al., 2022). Yildiz et al. (2017) informaron que el aislado de proteínas de soja desplegado por un pH alto (pH 12) se volvió más susceptible a los cambios estructurales por las fuerzas físicas producidas por la cavitación acústica. Otros estudios, como el de Jiang et al. (2017), demostraron que la solubilidad de las proteínas de arvejas aumentaba a pH 12 en combinación con el tratamiento ultrasónico, lo que sugirió que las moléculas de proteínas se volvieron más flexibles y se desdoblaron parcialmente luego del PS, lo que permitió que las fuerzas físicas producidas por la cavitación acústica alteraran sus microestructuras dando como resultado una mejora de la solubilidad.

La combinación de los tratamientos PS y HT (RPI-PS+HT) aumentó significativamente la solubilidad ($70,4 \pm 6,8$ %) con respecto a RPI, RPI-HT y RPI-PS+US, lo que sugiere que la combinación PS+HT es más eficaz que la combinación PS+US. Una posible explicación para el aumento de la solubilidad está relacionada con el hecho de que el calentamiento podría debilitar las interacciones por puente de hidrógeno entre los polipéptidos para disminuir el peso molecular de los agregados de RPI y fortalecer la repulsión electrostática entre las subunidades de proteínas que fueron previamente modificadas por

el tratamiento con PS (Wang et al., 2018; Zhi et al., 2022). Esto conduciría a la separación de las subunidades proteicas e incluso a la formación de nuevos agregados proteicos solubles.

La combinación de PS con tratamientos US y HT condujo a los valores de solubilidad más altos. Cuando se realizó HT después de US (RPI-PS+US+HT), se alcanzó una solubilidad de $79,1 \pm 9,5$ %, mejorando los resultados obtenidos para RPI-PS+US y demostrando que la adición de un paso de HT es un enfoque efectivo para mejorar las propiedades del RPI. De la misma manera, cuando se realizó US luego de HT (RPI-PS+HT+US), se logró una solubilidad de $91,8 \pm 6,4$ %, superando el valor obtenido para RPI-PS+HT y reportando los beneficios de incluir un paso de US en la modificación del RPI. Estadísticamente, no se observaron diferencias en la solubilidad cuando se compararon RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US, lo que sugiere que el orden de los tratamientos no modificó significativamente los resultados de solubilidad. De manera similar, Zhi et al. (2022) observaron que la combinación de PS, US y HT aumentaba la solubilidad y la hidrofobicidad superficial al mismo tiempo que reducía el tamaño de las partículas del aislado de proteínas de arveja.

En resumen, estos resultados permitieron vislumbrar que la solubilidad proteica aumentó en todas las muestras tratadas con PS en combinación con otro tratamiento, alcanzando su máximo para las muestras que presentaron los tres tipos de tratamientos (RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US).

4.1.2. Potencial ζ , hidrofobicidad superficial y espectroscopia de fluorescencia

El potencial ζ es una medida de la carga superficial de las proteínas o agregados proteicos y depende de la cantidad de grupos ionizables expuestos en la superficie de las mismas y del pH del medio. Se considera que, cuanto mayor es el módulo de potencial ζ , mayor será la estabilidad de las partículas por la elevada repulsión electrostática entre ellas. Por otro lado, la hidrofobicidad superficial puede usarse como un indicador para evaluar cambios en la estructura terciaria de las proteínas. Generalmente, las fuerzas hidrofóbicas mantienen esta estructura; la cantidad de grupos hidrofóbicos en la superficie de la proteína en contacto con el ambiente de agua polar determina la hidrofobicidad superficial de la misma (Zhang et al., 2022). Finalmente, la espectroscopia de fluorescencia permite evaluar el microentorno de los residuos de triptófano y tirosina de las proteínas, lo que permite evaluar indirectamente la desnaturalización de las mismas.

De esta forma, se analizaron estos indicadores para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos, solos y combinados, de las dispersiones de RPI. Las Figuras 30, 31 y 32 muestran los resultados obtenidos.

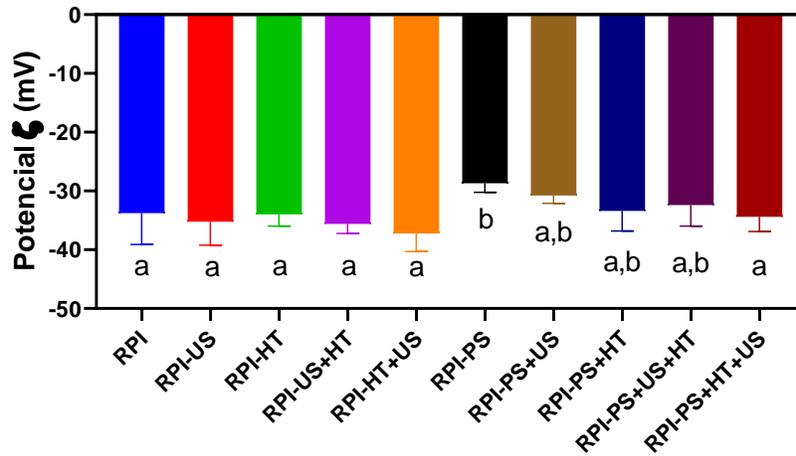


Figura 30. Potencial ζ de las muestras modificadas y no tratadas de RPI.

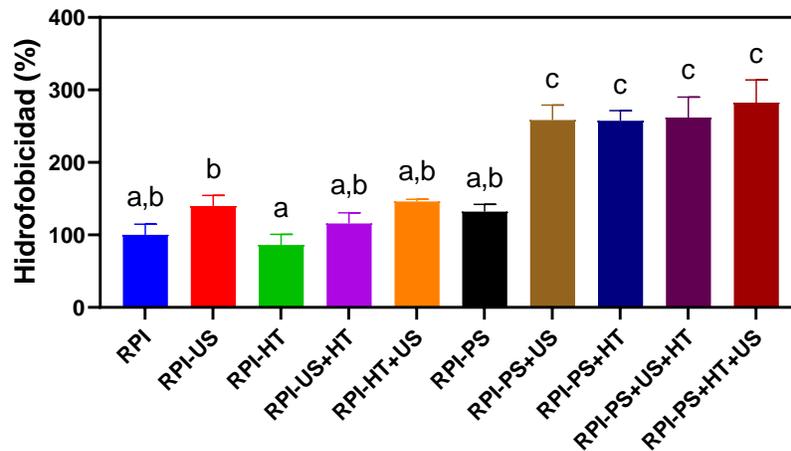


Figura 31. Hidrofobicidad superficial de las muestras modificadas y no tratadas de RPI.

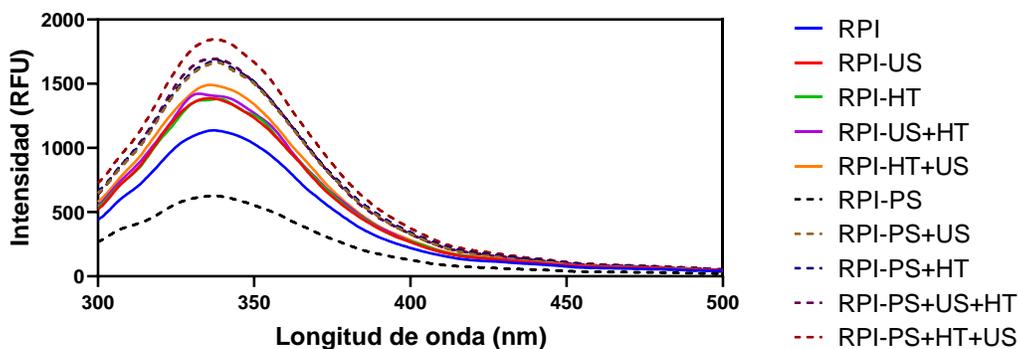


Figura 32. Espectros de emisión de fluorescencia de proteínas intrínsecas de las muestras modificadas y no tratadas de RPI. RFU: *Relative Fluorescence Unit*.

El RPI en condiciones neutras presentó un potencial ζ negativo ($-33,8 \pm 5,3$ mV, Figura 30). A pesar de presentar este potencial ζ que permitiría estabilizar las proteínas por repulsiones electrostáticas, la solubilidad proteica (Figura 29) fue muy baja, lo cual podría deberse a la elevada agregación de las proteínas. Además, el control de RPI presentó una emisión de fluorescencia máxima a 336,9 nm (Figura 32) cuando se excitó a 280 nm debido a la presencia de residuos de triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Dai et al. (2022) informaron previamente resultados similares para la emisión de fluorescencia de RPI. Por otra parte, RPI presentó un valor de hidrofobicidad superficial que fue considerado como el 100%, relativizando los resultados de las demás muestras respecto a este control para realizar la comparación (Figura 31).

La realización de tratamientos US y/o HT en condiciones neutras (RPI-US, RPI-HT, RPI-US+HT y RPI-HT+US) no generó cambios significativos en potencial ζ (Figura 30) ni en la hidrofobicidad superficial (Figura 31). Estos resultados sugieren que estas características superficiales de los agregados proteicos no pueden modificarse con los tratamientos US y HT en condiciones de pH neutro. Sin embargo, estas muestras de RPI modificado presentaron un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia y desplazamiento del pico máximo de emisión con respecto al RPI no tratado (Figura 32). Esto indica que la estructura del RPI cambió en cierta medida debido a los diferentes tratamientos. La muestra RPI-US presentó una mayor intensidad de emisión que RPI con un ligero desplazamiento hacia el azul a 335,4 nm, mientras que la muestra RPI-HT presentó una mayor intensidad de emisión que RPI con un ligero desplazamiento hacia el rojo a 338,9 nm. Estos resultados indicaron el despliegue de estructuras proteicas con la exposición de aminoácidos aromáticos originalmente ubicados en el interior de los agregados proteicos

(Wang et al., 2021). Según estos resultados, los Trp estuvieron expuestos a un microambiente más hidrofóbico en RPI-US y a un microambiente más hidrofílico en RPI-HT. Resultados similares se obtuvieron para las glutelinas de arroz después del tratamiento térmico (Zhao et al., 2020). Por su parte, las muestras RPI-US+HT y RPI-HT+US presentaron mayor intensidad de emisión que RPI, RPI-US y RPI-HT, lo que sugirió que la combinación de dos tratamientos aumenta el proceso de despliegue de las estructuras proteicas.

La realización de un tratamiento con PS (RPI-PS) generó cambios significativos en potencial ζ (Figura 30) presentando un valor de $-28,7 \pm 1,5$ mV y redujo significativamente la intensidad de la emisión de fluorescencia con respecto al RPI sin generar corrimientos del máximo de emisión (Figura 32). Este resultado puede explicarse por el despliegue de las estructuras proteicas que expone los grupos hidrofóbicos a la superficie de las moléculas de proteína y permite la formación de agregados proteicos mediante interacción hidrofóbica (Wang et al., 2021). En la formación de nuevos agregados proteicos, los aminoácidos aromáticos expuestos vuelven a ubicarse al interior de los agregados, lo que resultó en una disminución de la intensidad de la fluorescencia. Entonces, el tratamiento con PS genera un acoplamiento/agregación de los residuos de Trp debido a la interacción proteína-proteína, sin cambios significativos en el microambiente de este residuo de aminoácido (Zhang et al., 2022). En este sentido, Dai et al. (2022) informaron anteriormente que el RPI sufre un proceso de despliegue y reordenamiento hacia una estructura más ordenada bajo el tratamiento con PS, según experimentos de dicroísmo circular. Muchos estudios han demostrado que en condiciones ácido-base extremas, la estructura secundaria y terciaria de la proteína cambia y se rompen los enlaces disulfuro, lo que debilita la interacción entre las cadenas laterales y aumenta la hidrofobicidad y flexibilidad de las moléculas de proteínas (Goto et al., 1990; Hettiarachchy et al 1995; Jiang et al, 2011). Dai et al. (2022) demostraron que el tratamiento con PS aumentaba la solubilidad y la hidrofobicidad superficial de RPI mediante la disociación de subunidades de glutelinas, la despolimerización de agregados de proteínas y los reordenamientos de la estructura secundaria de las proteínas. Sin embargo, según los resultados del presente trabajo, el tratamiento con PS no generó cambios en la hidrofobicidad superficial (Figura 31). La contradicción entre resultados puede nuevamente explicarse por el hecho de que los mencionados autores trabajaron con un RPI obtenido por liofilización en lugar de uno obtenido por secado por aspersión como el utilizado en este trabajo.

La combinación de los tratamientos PS y US (RPI-PS+US) no generó cambios significativos en el potencial ζ (Figura 30) pero sí aumentó significativamente la hidrofobicidad superficial (~258 %, Figura 31). Los resultados demostraron que la combinación de estos dos tratamientos fue superior en cuanto a los cambios en la estructura superficial de las moléculas de proteínas, para exponer más grupos hidrofóbicos, respecto al control, a las muestras sin PS y a RPI-PS. Un aumento del pH (a pH 12,0) puede hacer que las moléculas de proteína adquieran un estado de desnaturalización con más residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie. En esas condiciones de pH, el efecto de cavitación del ultrasonido estimula la desnaturalización molecular y destruye la fuerza de interacción hidrofóbica, lo que llevaba a una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos al entorno circundante (Li et al., 2020). Una alta hidrofobicidad y solubilidad podrían estar relacionadas con la reducción de las interacciones intermoleculares y el tamaño de las partículas de RPI después del tratamiento US. Además, RPI-PS+US presentó una mayor intensidad de emisión de fluorescencia que RPI, RPI-PS y RPI-US, con un desplazamiento al rojo a 339,4 nm (Figura 32). Estos cambios se atribuyeron a una mayor efectividad de combinar PS+US en lugar de realizar PS o US solos para inducir la pérdida de la estructura originalmente compacta en RPI y la exposición de los residuos de Trp a un microambiente más polar. Zhang et al. (2022) obtuvieron resultados similares para proteínas de arveja en tratamientos combinados de PS+US.

La combinación de los tratamientos PS y HT (RPI-PS+HT) tampoco generó cambios significativos en potencial ζ (Figura 30) pero sí originó una mayor hidrofobicidad (~257%, Figura 31) que RPI. Este aumento puede explicarse tanto por la separación y exposición de las subunidades hidrofóbicas de glutelinas (Takaiwa et al., 1999) como por el despliegue de otras fracciones de proteínas que, luego de un tratamiento térmico, exponen los grupos hidrofóbicos hacia su superficie (Zhao et al., 2020). De manera similar, Mäkinen et al. (2016) encontraron que la hidrofobicidad de las proteínas de soja aumentó en un 50% después de un tratamiento térmico de 5 minutos a 100 °C y pH 10,5. Además, RPI-PS+HT presentó una mayor intensidad de emisión de fluorescencia que RPI, RPI-PS y RPI-HT (Figura 32). El aumento en la emisión se correlacionó con el aumento significativo en la hidrofobicidad superficial y mostró nuevamente la efectividad de combinar PS+HT para inducir cambios estructurales de proteínas. El efecto sinérgico de la combinación PS+HT también se informó en la proteína de haba (Alavi et al., 2021a),

la proteína de semilla de cáñamo (Wang et al., 2018), la globulina de quinoa (Mäkinen et al., 2016) y la glutelina de arroz (Zhao et al., 2020).

La combinación de PS con tratamientos US y HT (RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US) no causaron cambios en el potencial ζ con respecto a RPI (Figura 30). Como observaron Dai et al. (2022), los valores del potencial ζ no mostraron una correlación directa con la solubilidad y el tamaño de las partículas, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas no son la fuerza principal responsable de las variaciones del tamaño de las partículas proteicas. Por otro lado, ambas muestras presentaron mayor hidrofobicidad superficial que RPI y RPI-PS y, al igual que con la solubilidad, no se observaron diferencias significativas entre ellas (Figura 31), lo que vuelve a sugerir que el orden de los tratamientos no modificó significativamente los resultados. Sin embargo, RPI-PS+HT+US presentó la mayor intensidad de emisión de fluorescencia (superior a RPI-PS+US+HT, Figura 32). En conjunto, estos resultados confirmaron que el desempeño del US después del HT es el enfoque combinado más eficiente para inducir cambios en la estructura de la proteína que permitieron aumentar la solubilidad del RPI y la hidrofobicidad superficial. En estos enfoques combinados, el PS puede inducir el despliegue y la separación de agregados de proteínas, mejorando la repulsión electrostática y produciendo un estado similar a un glóbulo fundido que también se modifica mediante la ruptura de las interacciones por puente de hidrógeno y la exposición de subunidades hidrofóbicas por HT, y los efectos mecánicos, químicos y de cavitación causada por US.

4.1.3. Tamaño de partícula y microscopía de fluorescencia convencional y confocal láser de barrido

La determinación de la distribución de tamaño de partículas (DTP) de una proteína o mezcla de proteínas se utilizan a menudo para caracterizar el grado de agregación, lo que tiene una influencia en su solubilidad y capacidad emulsionante (Li et al, 2020). Se investigaron los efectos de los diferentes tratamientos, solos y combinados, en la DTP de las dispersiones de RPI (Figura 33) y en los tamaños promedios D[4,3] y D[3,2] (Figura 34). La morfología y el cambio de tamaño de los agregados de RPI modificado también se confirmaron a partir de la observación con microscopía de fluorescencia tradicional y microscopía de fluorescencia confocal láser de barrido (CLSM, Figura 35).

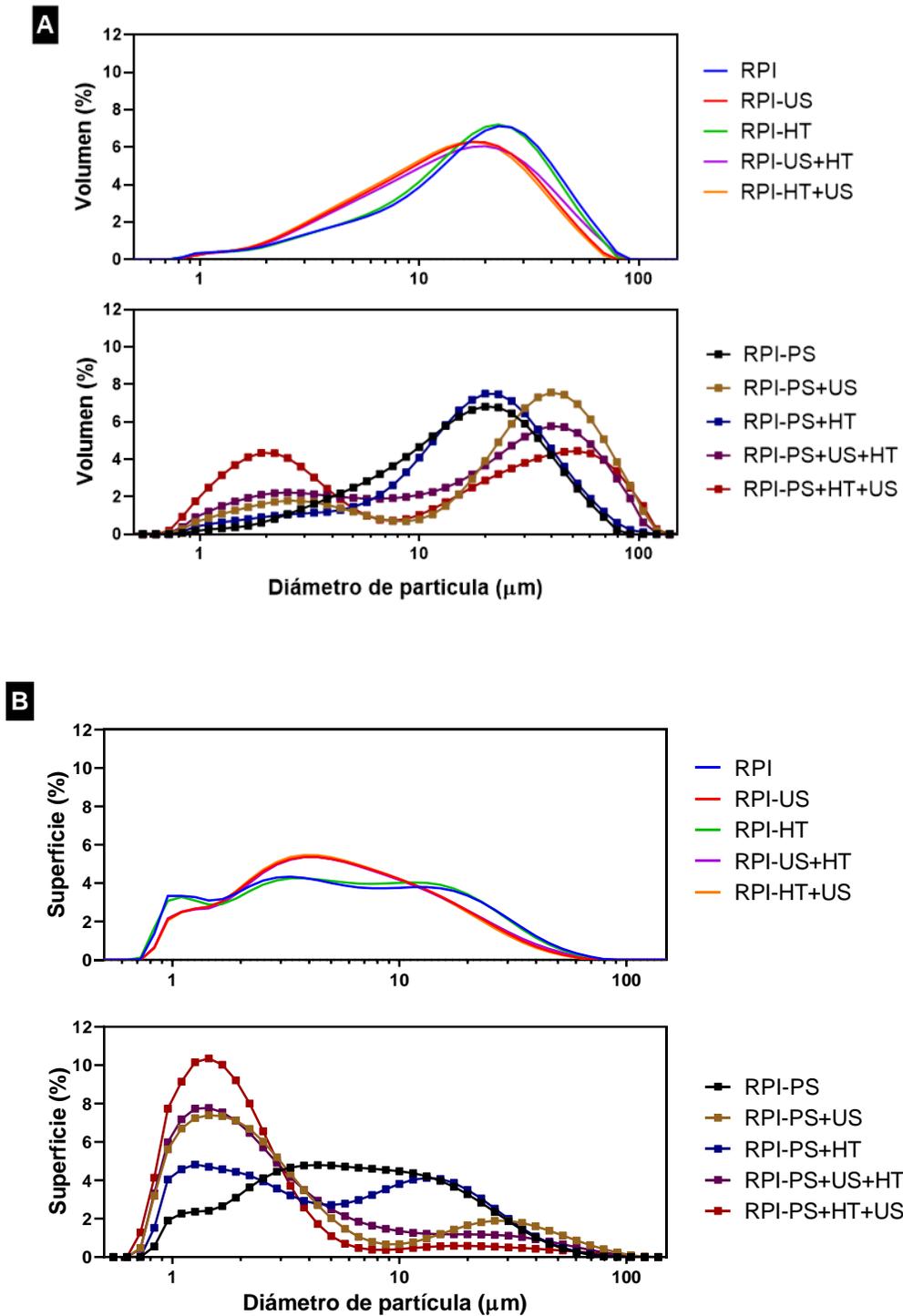


Figura 33. Tamaño de partícula de muestras de RPI modificado y no tratado. Distribuciones de tamaño de partículas en **(A)** volumen (%) y **(B)** superficie (%).

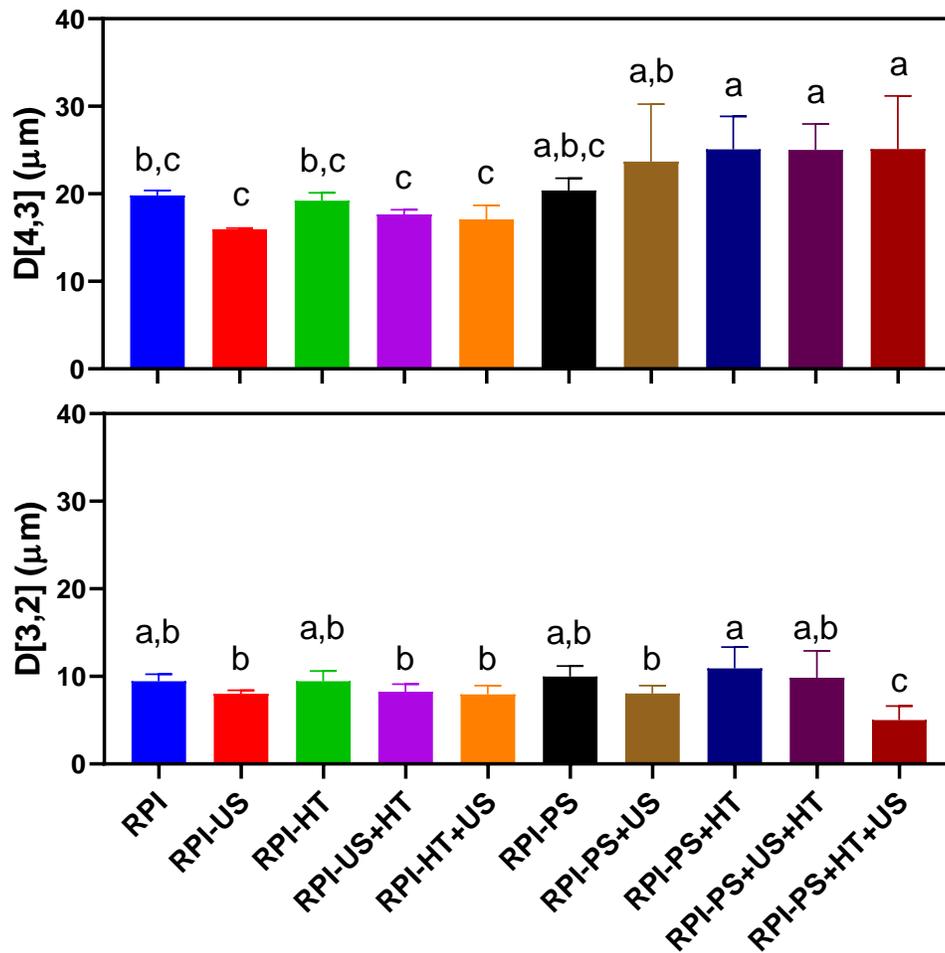


Figura 34. Tamaño de partícula de muestras de RPI modificado y no tratado. Diámetros medios de partículas ponderados en volumen ($D[4,3]$) y superficie ($D[3,2]$).

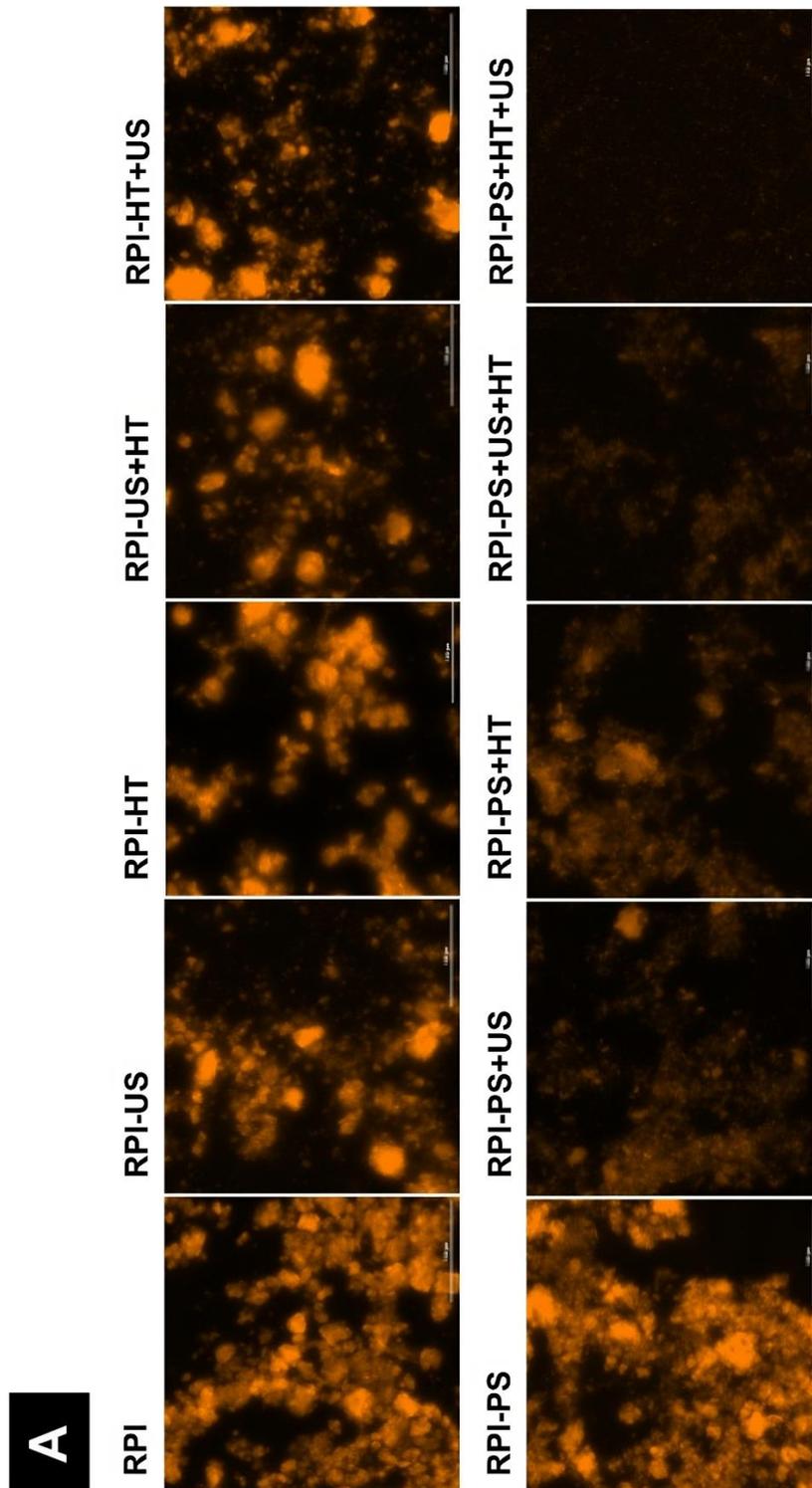


Figura 35. Estado de agregación de las muestras modificadas y no tratadas de RPI luego de la tinción con rodamina B. **(A)** Microscopía de fluorescencia convencional (Barra de escala: 100 μm), **(B)** Microscopía de barrido láser confocal (Barra de escala: 50 μm).

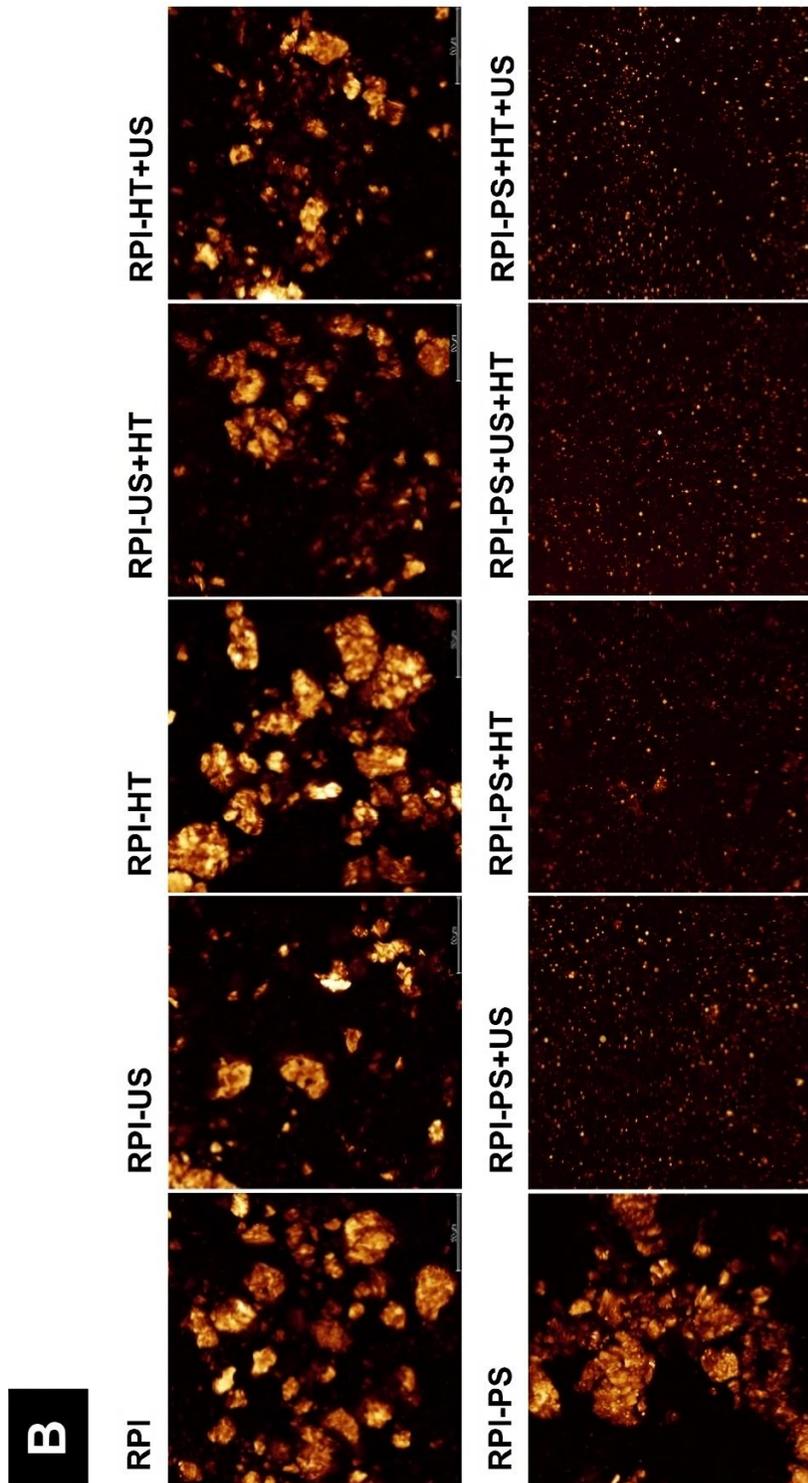


Figura 35 (continuación). Estado de agregación de las muestras modificadas y no tratadas de RPI luego de la tinción con rodamina B. **(A)** Microscopía de fluorescencia convencional (Barra de escala: 100 µm), **(B)** Microscopía de barrido láser confocal (Barra de escala: 50 µm).

Aunque las proteínas de arroz en condiciones neutras presentaron potencial ζ negativo que permite repulsiones electrostáticas, se observó la presencia de grandes agregados en las DTP (D[4,3]: $19,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$, Figura 34), lo cual pudo dilucidarse también en las micrografías (Figura 35). Otros investigadores informaron previamente que el RPI presenta alta agregación y baja dispersabilidad en condiciones de pH neutro (Dai et al., 2022). Además, estos resultados eran esperados porque la glutelina es la principal fracción proteica del aislado.

La realización de tratamientos US y/o HT en condiciones de pH neutro (RPI-US, RPI-HT, RPI-US+HT y RPI-HT+US) no generaron cambios significativos en las DTP (Figura 33) mientras que las micrografías demostraron la presencia de agregados de proteínas grandes y compactos (Figura 35). Así como se observó que no se mejoró la solubilidad del RPI ni se generaron cambios significativos en potencial ζ e hidrofobicidad superficial, estos resultados sugieren que la agregación de proteínas en condiciones de pH neutro es tan intensa que no puede romperse con los tratamientos US y HT. En conjunto, estos resultados permiten deducir que, aunque la US y la HT tienen efectos combinados sobre las estructuras de las proteínas, no son suficientes para inducir cambios en la solubilidad, la hidrofobicidad superficial y la DTP.

La realización de un tratamiento con PS no presentó cambios en la DTP ni evidenció una diferencia en la agregación y tamaño de las partículas (Figuras 33 y 35). Nuevamente, estos resultados están en contradicción con los informados previamente por Dai et al. (2022) pero, como se explicó en el apartado de solubilidad, este equipo de autores trabajó con un RPI obtenido por liofilización que modificó no sólo las características de los polvos sino también el estado de agregación de las proteínas dificultando la redispersión en medios acuosos.

Con la combinación de los tratamientos PS y US (RPI-PS+US) se observó una DTP más amplia que para RPI y RPI-PS, aunque no se observaron cambios significativos en los tamaños promedios D[4,3] y D[3,2] (Figura 34). Aun así, se observaron agregados proteicos menos compactos y más dispersos en las microscopías con respecto a los obtenidos para RPI, RPI-US, RPI-HT y RPI-PS (Figura 35). A partir de la observación de esta muestra, se puede distinguir la complementariedad entre las diferentes técnicas de microscopía ya que CLSM, que permite la observación de estructuras más pequeñas pero impide el estudio de agregados tridimensionales, vislumbró agregados dispersos de

tamaño reducido, mientras que la microscopía convencional, que posibilita la observación de agregados tridimensionales con una menor sensibilidad, demostró estructuras de mayor tamaño. La formación de agregados más pequeños y uniformes se informó previamente en aislados de proteína de arveja (Zhang et al., 2022). De manera similar, Gao et al. (2022) informaron sobre la observación de DTP más amplias después del tratamiento con US en aislados de proteína de arveja. Estos autores explicaron que los agregados más grandes después de la aplicación de ultrasonido podían provenir de moléculas más pequeñas que eran inestables al deformarse y se reasociaban para formar nuevos agregados más grandes, pero solubles y estables en dispersión. Entonces, el efecto sinérgico de la combinación PS+US en RPI podría atribuirse a la condición de pH extremadamente alcalino en PS que desdobló la estructura proteica y permitió el daño por agitación violenta y cavitación acústica causada por US, conduciendo a la formación de agregados solubles que retienen el agua en el interior y se hinchan, mejorando indirectamente la solubilidad de las proteínas (Gao et al., 2022; Zhang et al., 2018). Específicamente, la cavitación acústica inducida por US puede romper las interacciones intra o intermoleculares, lo que conduce a cambios conformacionales en las proteínas que separan los agregados de proteínas en subunidades de glutelina individuales o incluso generan nuevos agregados solubles (Zhi et al., 2022).

La combinación de los tratamientos PS y HT (RPI-PS+HT) presentó agregados de proteínas menos compactos y más dispersos (Figura 35) que RPI, pero mantuvo el ancho de la DTP (Figura 33). El efecto sinérgico de la combinación PS+HT también se informó para otras proteínas (Alavi et al., 2021a; Mäkinen et al., 2016; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2020). Nuevamente, el tratamiento de PS puede inducir la desagregación de las estructuras proteicas, dando lugar a estructuras de glóbulo fundido susceptibles a la acción del HT. El calentamiento podría favorecer la disociación de las subunidades proteicas, al desfavorecer las interacciones electrostáticas (por sus características exotérmicas) y favorecer las interacciones hidrofóbicas (por sus características endotérmicas) (Wang et al., 2018; Zhi et al., 2022).

La combinación de PS con tratamientos US y HT produjeron DTP más amplias, posiblemente por la formación de nuevos agregados solubles y la separación en subunidades proteicas individuales, como se discutió anteriormente para RPI-PS-US. Sin embargo, solo RPI-PS+HT+US presentó una $D[3,2]$ significativamente menor (Figura 34) que el resto de las muestras y una mayor proporción de partículas con menores tamaños

en la DTP (Figura 33), además de un estado completamente disperso en ambas microscopías (Figura 35), lo que demuestra que el calentamiento y el ultrasonido realizados en ese orden reducen significativamente el tamaño de partículas de las proteínas. De manera similar, Zhi et al. (2022) observaron que la combinación de PS, US y HT aumentaba la solubilidad y la hidrofobicidad superficial al mismo tiempo que reducía el tamaño de las partículas del aislado de proteína de arveja.

Un tamaño más pequeño de agregados de proteínas fue beneficioso para la disolución en agua. Este resultado también estuvo de acuerdo con los datos de solubilidad de RPI, donde los mayores porcentajes lo presentaron RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US. En general, los agregados de proteínas con tamaños más pequeños son más solubles debido a una mayor área de interacción entre las proteínas y las moléculas de agua. La formación de nuevos agregados proteicos de mayor tamaño, pero con mayor incorporación de agua, también son más solubles que los agregados grandes y compactos. Es importante mencionar que el tamaño reducido de las proteínas y agregados proteicos podría aumentar la tasa de adsorción de la proteína en la interfase aceite-agua, mejorando así su capacidad emulsionante (Jiang et al., 2017).

En resumen, se observó que las muestras sin PS presentaron agregados proteicos de gran tamaño. Tras la combinación de PS con algún tratamiento (US o HT) se demostró una disminución en el tamaño de los agregados y que los mismos quedaron más dispersos. Se puede concluir que el grado de agregación de RPI disminuyó significativamente y la dispersabilidad fue la mejor luego de realizar los tres tratamientos combinados.

4.1.4. SDS-PAGE

Para analizar en profundidad los cambios en las muestras de RPI modificado, se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 36) y se identificaron las bandas en función de trabajos anteriores (Amagliani et al., 2017b; Liu et al., 2021, Figura 3). La glutenina de arroz presentó una subunidad ácida y otra básica de 30-35 kDa y 19-23 kDa, respectivamente. El precursor de glutenina que debería aparecer entre 51 y 57 kDa no se observó en este estudio, presumiblemente debido a su baja concentración. Las globulinas de arroz presentaron dos subunidades polipeptídicas principales de 19-25 y 13 kDa. En este caso, la subunidad a 53-56 kDa no se observó, lo cual también podría deberse a su baja concentración. La prolamina de arroz presentó subunidades de 10, 13 y 16 kDa,

siendo predominante la banda de 13 kDa. De esta forma, estas bandas se superpusieron con las de globulinas. Según los trabajos previos, el perfil de albúmina de arroz era heterogéneo con resolución en una amplia gama de bandas entre 13 y 110 kDa. En este estudio no se detectó ninguna banda específica de albúminas, también posiblemente debido a su baja concentración.

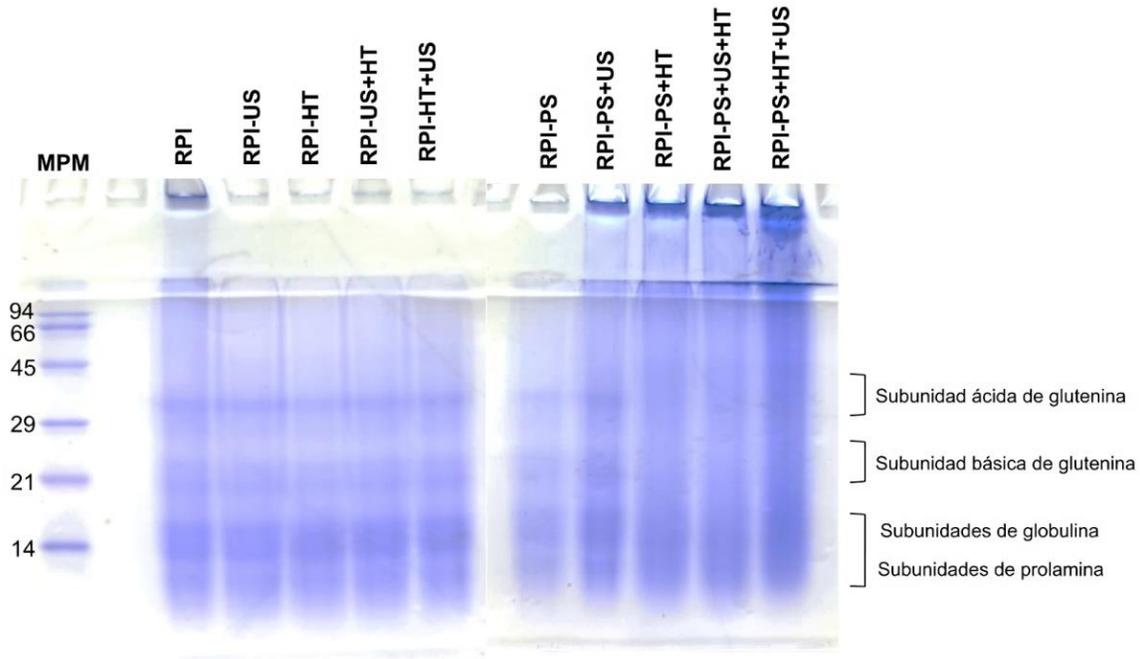


Figura 36. SDS-PAGE en condiciones reductoras de RPI control y modificados. MPM: Marcador de peso molecular.

Con respecto a las muestras de RPI modificado, se observó el mismo perfil de bandas en RPI-US, RPI-HT, RPI-US+HT, RPI-HT+US, RPI-PS y RPI-PS+US que en el control de RPI. Esto era esperado para las muestras que no modificaron la solubilidad respecto de RPI, pero no para RPI-PS+US que sí presentó solubilidad aumentada y cambios en otras características; por lo tanto, los cambios en la solubilidad y el estado de agregación de RPI-PS+US con respecto al control no tratado de RPI podrían explicarse por la formación de nuevos agregados solubles en lugar de a un cambio en el PM de las subunidades proteicas (ocasionado por hidrólisis de las mismas). Por el contrario, la concentración de cada banda disminuyó en RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US. Este resultado podría explicarse de dos maneras. Por un lado, los tratamientos combinados podrían causar la formación de grandes agregados que se acumulan en la parte superior del gel de apilamiento, lo que sugiere que además de los enlaces disulfuro, otros tipos de

entrecruzamiento estabilizaron los agregados, como pueden ser enlaces por base de Schiff o los enlaces ditirosina (Wang et al., 2018). Es de destacar que estos grandes agregados serían altamente solubles y estables en dispersión, como se discutió en resultados anteriores (Figuras 29 y 35). Por otro lado, los tratamientos combinados podrían provocar la hidrólisis de las proteínas, lo que llevaría a la formación de polipéptidos de menor PM que los originales, los que pueden visualizarse en una tinción más pareja a lo largo de cada calle del gel. En el estudio de Zhang et al. (2018), el SDS-PAGE de proteínas de arroz presentó la misma distribución de bandas que nuestro trabajo después de la combinación PS+US, mostrando la presencia de polipéptidos de varios tamaños y una coloración azul en todo el rango de PM. Por su parte, Wang et al. (2018) demostraron que la combinación PS+HT provocó escisiones de enlaces peptídicos en aislados de proteínas de semillas de cáñamo, mientras que Zhao et al. (2020) demostraron que los tratamientos con PS+HT alteraron la estructura primaria de la glutelina del arroz. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por estos autores, la coloración observada en todo el rango de PM para nuestras muestras de RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US (Figura 36) podría deberse a la hidrólisis de las proteínas causada por la acción de HT en condiciones alcalinas. En resumen, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US presentaron alta solubilidad e hidrofobicidad probablemente debido tanto a la formación de nuevos agregados solubles como a la hidrólisis de proteínas. Aun así, para confirmar la hidrólisis de proteínas, se deberían realizar otros estudios.

4.2. Impacto de diferentes tratamientos en las propiedades emulsionantes del RPI

Las proteínas se usan comúnmente como emulsionantes alimentarios debido a su capacidad para absorberse en la interfaz aceite-agua y formar películas interfaciales que permiten la estabilización de emulsiones O/W (McClements, 2004). Específicamente, las propiedades emulsionantes de las proteínas se ven afectadas por la tasa de adsorción de proteínas en la interfaz agua-aceite, la cantidad de proteína adsorbida, el reordenamiento conformacional en la interfaz, el grado de reducción de la tensión interfacial y la formación de una película cohesiva (McClements, 2004). Como los factores cruciales que afectan las propiedades emulsionantes de las proteínas son la solubilidad y la hidrofobicidad

superficial, se seleccionaron las muestras RPI-PS+US, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US para evaluar su capacidad emulsionante; estas muestras presentaron características de solubilidad e hidrofobicidad incrementadas respecto al control de RPI no tratado. Utilizando estas muestras seleccionadas, se prepararon emulsiones O/W y se estudió la DTP con y sin la adición de SDS y los perfiles de transmisión y retrodispersión durante 21 días, acompañado con un registro fotográfico. Además, se realizaron observaciones de microscopía óptica en los días 1 y 21.

4.2.1. Distribución de tamaño de partícula y microscopía óptica

En primer lugar, se estudió la DTP de las emulsiones con o sin adición de SDS como agente defloculante durante 21 días (Figuras 37 y 38). El tamaño de gotas en una emulsión tiene un fuerte impacto en la estabilidad, propiedades ópticas, reológicas y atributos sensoriales. Como los procesos de cremado y coalescencia están gobernados por la presencia de gotas de mayor tamaño, aunque estén presentes en pequeño porcentaje con respecto al número total, la DTP en volumen es más adecuada para identificar a estas poblaciones. Por otro lado, la distribución en superficie se relaciona con el área total expuesta y es más sensible a las partículas pequeñas ya que para un mismo volumen total, poseen mayor área superficial total que las partículas más grandes (Sceni, 2021). Adicionalmente, la morfología de las emulsiones fue analizada para obtener información complementaria a la DTP. Dicho análisis se realizó a través de un microscopio óptico convencional (Cytation 5) en los días 1 y 21 (Figura 39).

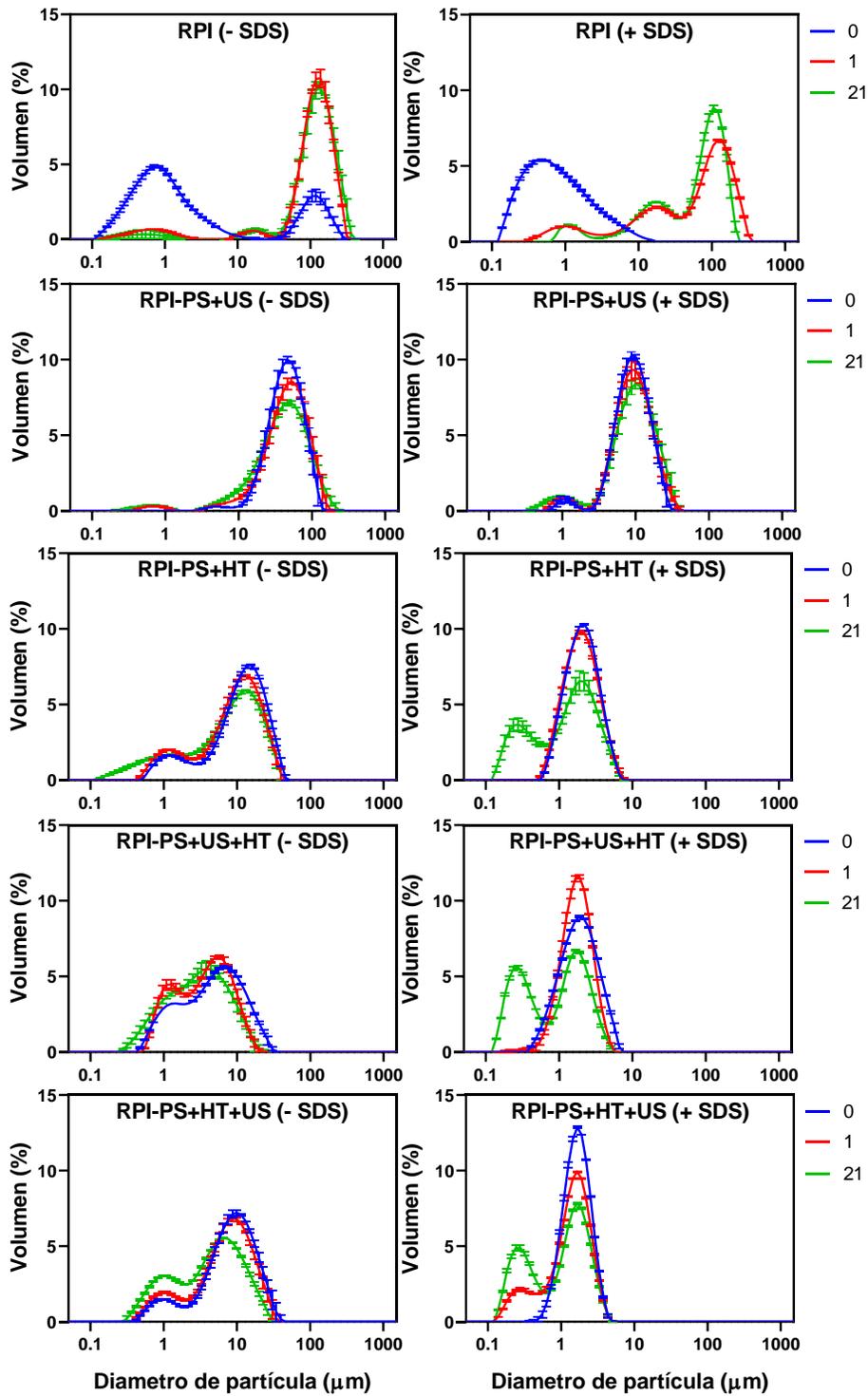


Figura 37. Tamaño de partícula de emulsiones estabilizadas por RPI. Distribuciones de tamaño de partícula en volumen (%) de emulsiones con y sin SDS en los días 0, 1 y 21.

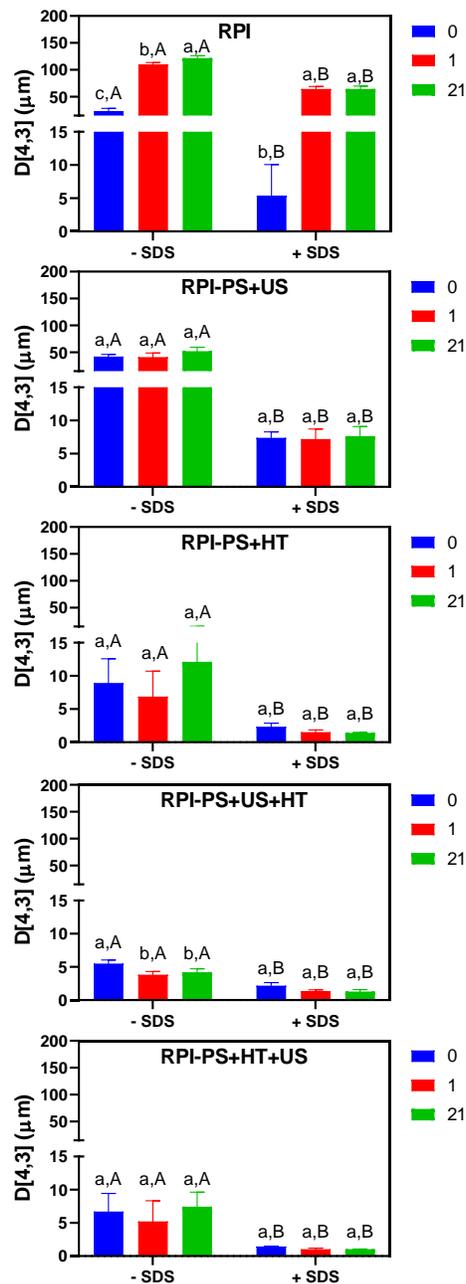


Figura 38. Tamaño de partícula de emulsiones estabilizadas por RPI. Diámetro medio ponderado por volumen (D[4,3]) de emulsiones con y sin SDS en los días 0, 1 y 21. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento dentro de la misma condición (con o sin SDS), mientras que las diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas en muestras con y sin SDS dentro del mismo tiempo de almacenamiento (día 0, 1 o 21) según Two-way ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

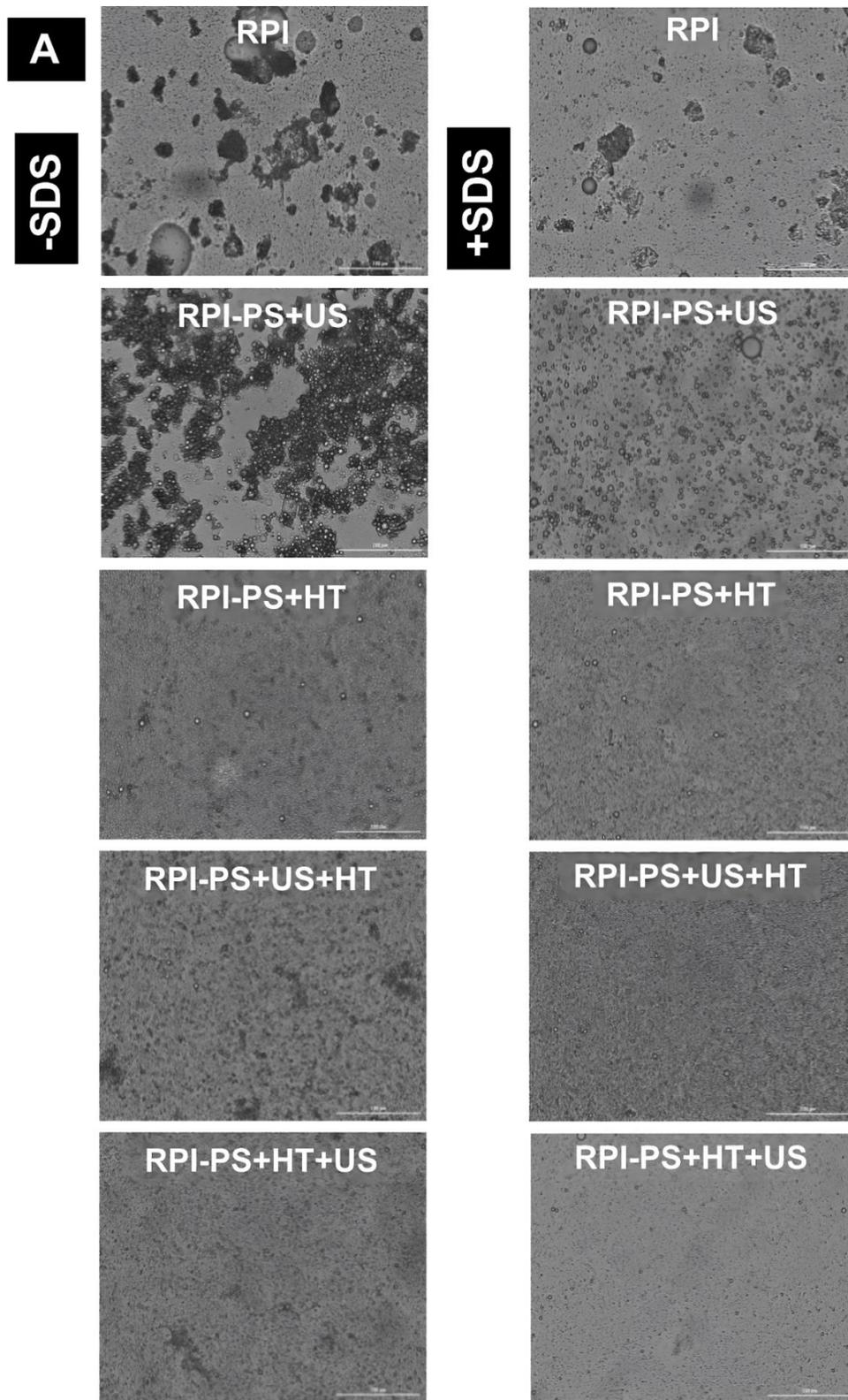


Figura 39. Caracterización de emulsiones estabilizadas por RPI. Micrografía de emulsión del día (A) 1 y (B) 21 sin y con SDS. Barra de escala: 100 μm .

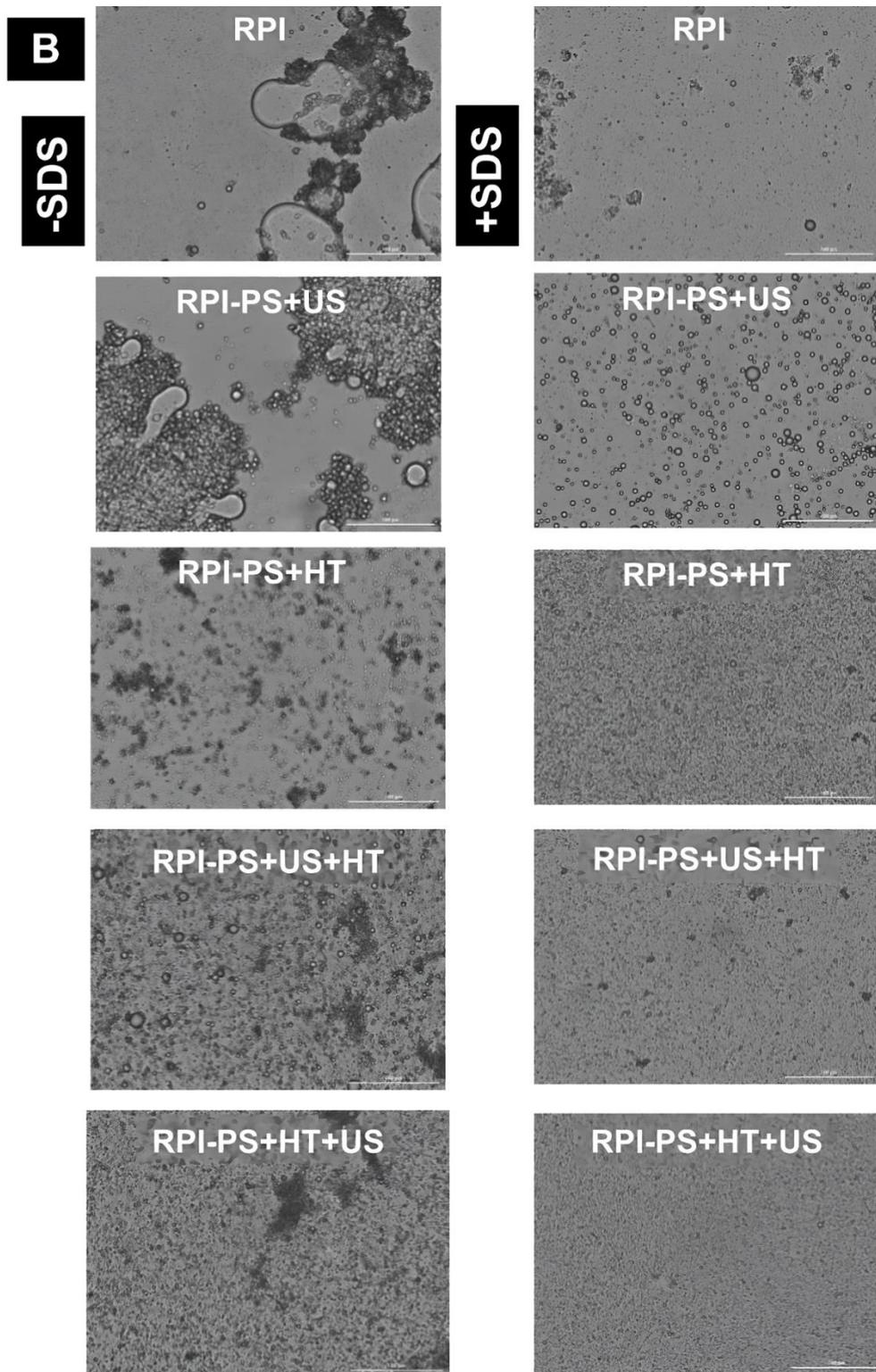


Figura 39 (continuación). Caracterización de emulsiones estabilizadas por RPI. Micrografía de emulsión del día (A) 1 y (B) 21 sin y con SDS. Barra de escala: 100 μm .

Si bien fue posible obtener emulsiones O/W utilizando el control de RPI sin tratamiento, las emulsiones obtenidas fueron inestables, presentando tanto coalescencia como floculación. La coalescencia puede deducirse por el incremento significativo de $D[4,3]$ durante el almacenamiento (comparando los días 0 y 1, Figura 38), mientras que la floculación se deduce por las diferencias significativas observadas en el $D[4,3]$ con y sin SDS dentro del mismo día de almacenamiento (Figura 38). La floculación también quedó evidenciada en las microscopías obtenidas en presencia y ausencia del SDS, donde queda claro el efecto defloculante de este agente. Se pudo observar también que el SDS no logró alterar los grandes agregados de proteínas, que se pueden observar en la microscopía (Figura 39).

Las emulsiones obtenidas con RPI-PS+US no mostraron un proceso de coalescencia ya que su $D[4,3]$ permaneció estable durante el almacenamiento (Figura 38). Esto podría deberse a que estas proteínas generaron un blindaje físico a través de una mayor adsorción y distribución interfacial, lo que podría impartir un mecanismo estérico para proteger las gotas de emulsión contra la coalescencia durante el almacenamiento (Dickinson, 2010; Jiang et al., 2014; Sha et al., 2021). De esta forma, las propiedades emulsionantes mejoradas de RPI-PS+US en comparación con RPI están relacionadas con la mayor solubilidad e hidrofobicidad que presentó esta muestra. En particular, la presencia de agregados de proteínas de mayor solubilidad y menor tamaño podría acelerar la absorción de proteínas en la interfaz aceite-agua, desempeñando un papel clave en la resistencia de la película interfacial a la ruptura y, por lo tanto, promoviendo la estabilidad de la emulsión a la coalescencia. En este sentido, Zhang et al. (2022) observaron que la combinación PS+US en aislado de proteína de arveja conduce a la formación de emulsiones más estables mediante la aceleración de la adsorción de proteínas en la interfaz aceite-agua y el aumento de la compacidad de la película interfacial. Como explican Alavi et al. (2021b), las proteínas con alta solubilidad y un tamaño de partícula pequeño migran más fácilmente y rápidamente desde la fase acuosa a la superficie de las gotas de aceite durante la homogeneización, inhibiendo efectivamente la tendencia a la coalescencia entre las gotas. Además, el ambiente extremadamente alcalino y la fuerza de corte mecánica generada por la cavitación ultrasónica hacen que la conformación de la proteína sea más flexible (Zhang et al., 2022). Este resultado puede brindar una oportunidad para cubrir eficientemente las gotas de emulsión durante el proceso de reordenamiento de proteínas en la interfaz O/W. Además, la exposición de grupos hidrofóbicos promueve la interacción proteína-aceite y

acelera el proceso de cambio instantáneo de reorientación de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que lleva a la rápida formación de un sistema de emulsión con un tamaño de gota pequeño y una distribución relativamente uniforme. Sin embargo, al igual que en el control RPI, estas emulsiones presentaron floculación. La floculación se reflejó tanto en microscopías como en las diferencias significativas entre $D[4,3]$ con y sin SDS (Figuras 38 y 39). Este fenómeno podría ocurrir debido a la floculación por puenteo causada por la baja concentración de proteína, donde una misma cadena polipeptídica estabiliza la interfase de dos gotas separadas (Qamar et al., 2019).

Las emulsiones obtenidas con RPI-PS+HT tampoco evidenciaron coalescencia y presentaron tamaños reducidos tanto para gotas individuales como para flóculos con respecto a los encontrados para las emulsiones preparadas con RPI y RPI-PS+US (Figuras 37, 38 y 39). Como explican Wang et al., (2018), una mayor exposición de los grupos de cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos, debido al despliegue estructural parcial en las muestras tratadas, permitiría una mayor adsorción en la interfase y, por lo tanto, una mayor actividad superficial. Además, debido a su tamaño reducido, estas proteínas modificadas tienen mayor velocidad de absorción a la interfase, lo que permite formar gotas más pequeñas durante la homogeneización de la emulsión. Si bien estas gotas se agregaron, formando flóculos, éstos fueron más pequeños.

Finalmente, las emulsiones obtenidas con RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US no evidenciaron coalescencia y presentaron los tamaños de partícula más pequeños tanto para gotas individuales como para flóculos (Figuras 37, 38 y 39). Este resultado sugiere que la solubilidad incrementada y el tamaño reducido de los agregados de proteínas tuvieron una influencia positiva y significativa en la distribución del tamaño de las gotas. Esto podría deberse a que la mayor hidrofobicidad superficial de las proteínas y agregados proteicos permitió que las mismas tuvieran una mayor actividad interfacial (Zhi et al., 2022). Además, la mayor solubilidad permitió la rápida migración a la interfase, estabilizando gotas individuales de menor tamaño. La alteración de la estructura terciaria de la proteína aumenta la flexibilidad de la misma, lo que puede mejorar su capacidad para estabilizar la interfaz aceite-agua, tal como demuestran diversos estudios (Damodaran, 2005; Ghribi et al., 2015; Zhu et al., 2020; Yan et al., 2021). Además, una proteína con una estructura flexible tiende a formar una película de interfaz viscoelástica, creando un obstáculo estérico entre las gotas de aceite para disminuir o inhibir la floculación de las gotas durante el almacenamiento. Un aumento moderado en la

hidrofobicidad de la superficie promueve la interacción proteína-proteína en la interfaz O/W, mejorando la rigidez de la película viscoelástica formada en la interfaz (Zhang et al., 2022). De esta forma, los parches hidrofóbicos expuestos por los tratamientos combinados podrían promover las interacciones entre las proteínas adsorbidas para asegurar una cobertura adecuada en la interfaz O/W, generando un efecto positivo en la compacidad de la membrana de la interfaz, dando así como resultado una emulsión más estable.

En resumen, ninguna de las emulsiones obtenidas con muestras tratadas presentó coalescencia, demostrando una marcada mejora respecto del control de RPI. Sin embargo, todas ellas sufrieron un proceso de floculación, posiblemente debido a la baja concentración de proteínas. Una posible perspectiva sería evaluar el efecto de incrementar la concentración de proteínas. RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US fueron las que obtuvieron los tamaños de partícula más pequeños y una mayor estabilidad frente a la floculación.

4.2.2. Estabilidad física y registro fotográfico

Para estudiar la estabilidad global de las emulsiones se determinaron los perfiles de %BS (Figura 40) y %T (Figura 41) durante 21 días utilizando el analizador vertical de barrido Turbiscan LAB. Además, se realizó un registro fotográfico de las muestras (Figura 42).

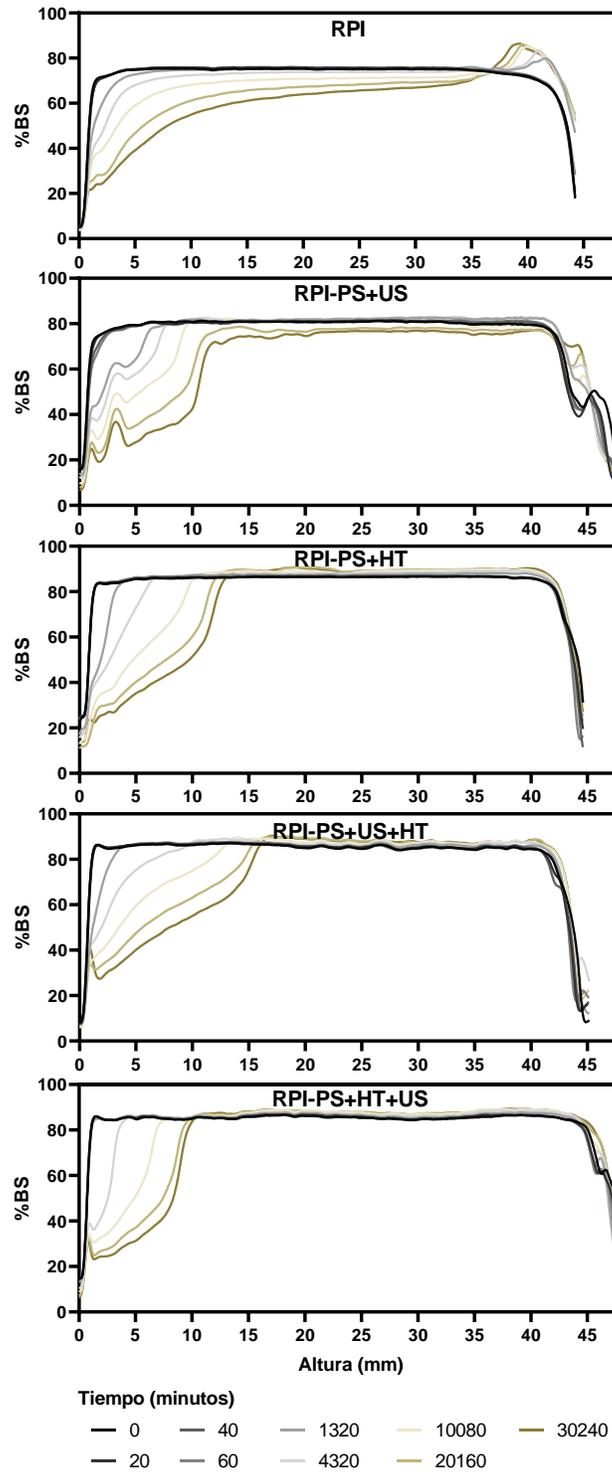


Figura 40. Estabilidad física de emulsiones estabilizadas por RPI. Perfiles de retrodispersión (%BS) de emulsiones en el almacenamiento en reposo durante 21 días (30240 minutos).

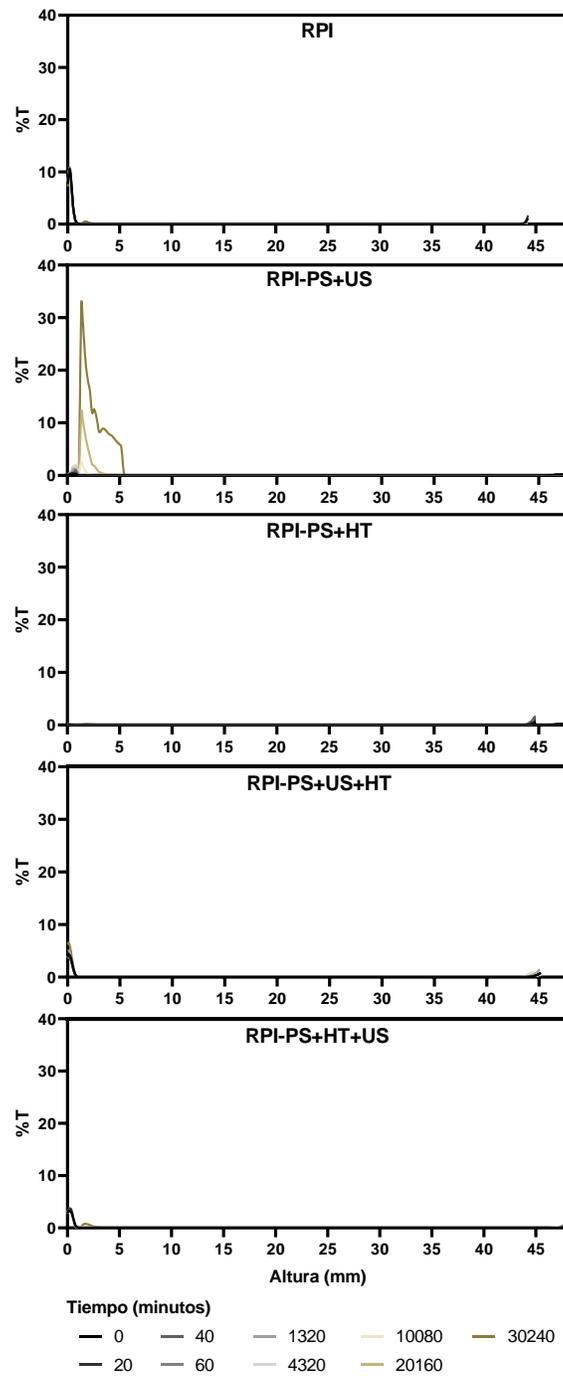


Figura 41. Caracterización de emulsiones estabilizadas por RPI. Perfiles de transmisión (%T) de emulsiones estabilizadas con RPI durante el almacenamiento durante 21 días (30240 minutos).

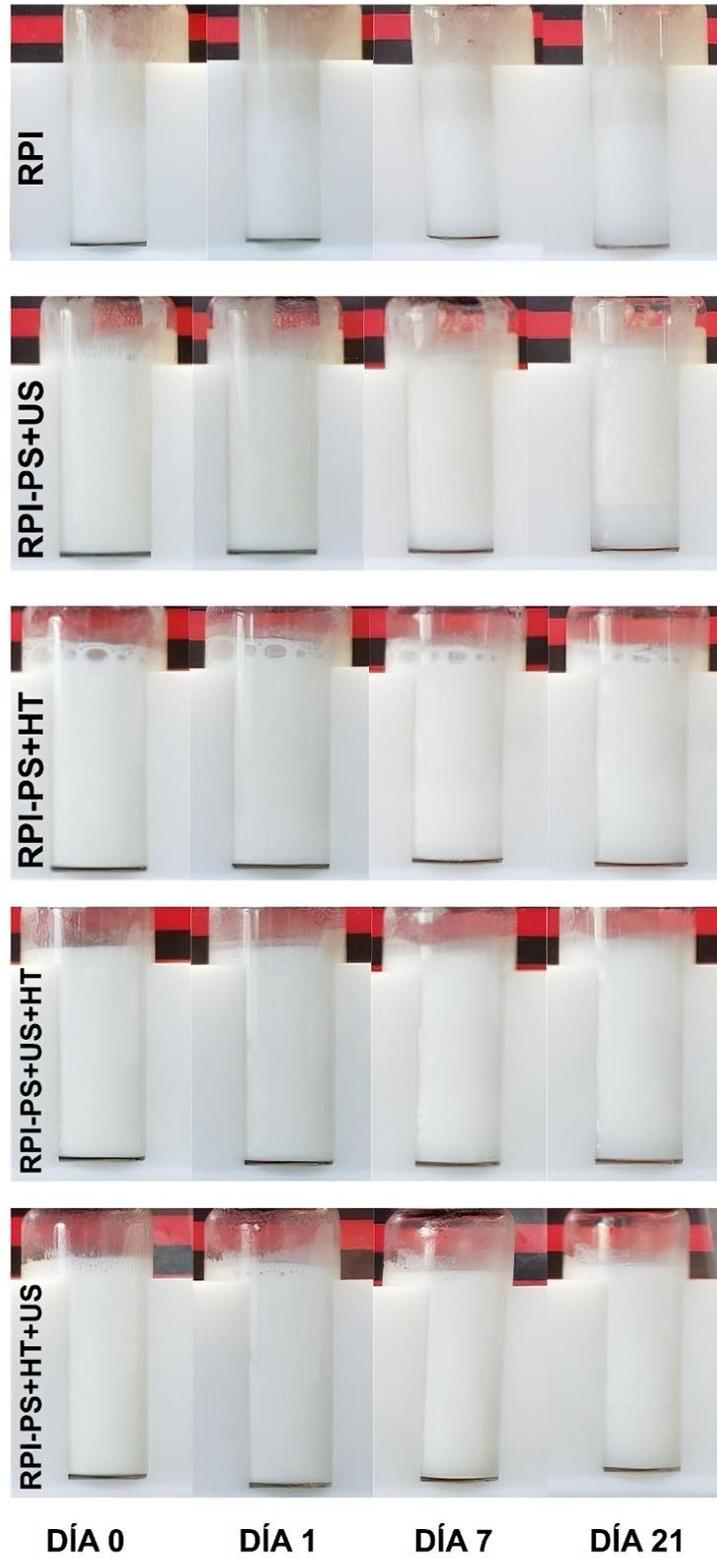


Figura 42. Registro fotográfico de las emulsiones estabilizadas por RPI en los días 0, 1, 7 y 21.

Según los perfiles de retrodispersión (%BS), las emulsiones obtenidas con RPI sin tratar mostraron una rápida separación en una capa de crema estratificada, presentando un incremento de %BS en la zona superior del tubo, debido a un aumento de la concentración de la fase dispersa, y una reducción de %BS en las zonas media e inferior, debido a una disminución de la concentración de las partículas en esta parte (Figura 40). Las gotas y flóculos de diferentes tamaños presentan diferentes velocidades de movimiento (Ecuación 2, Ley de Stokes), por lo que aquellas de mayor tamaño presentan mayor velocidad para la formación de crema, que las de menores tamaños (McClements, 2004). Por lo tanto, la estratificación observada podría justificarse por la presencia de gotas y flóculos de diferentes tamaños, como se puede reflejar en la DTP (Figura 37). Durante el almacenamiento de las muestras se observó a simple vista una rápida desestabilización por cremado. Como se presenta en la Figura 42, todas las emulsiones frescas mostraron un color blanco lechoso homogéneo y se puede observar la progresión del cremado de la emulsión preparada con el control de RPI desde el día 0 hasta los 21 días.

Respecto a los perfiles de %BS y %T, las emulsiones obtenidas con RPI-PS+US presentaron la formación de una capa de crema homogénea y no estratificada (Figura 40) y una capa de suero clarificado (Figura 41 y 42). La migración de las gotas resultó ser más homogénea debido a que las mismas tenían un tamaño más uniforme (que el control de RPI) y, por ende, migraron a una misma velocidad. Esta muestra es la única que demostró la aparición de señal en los perfiles de %T, lo cual se debe a la clarificación de la dispersión, la cual produce interferencia en los perfiles de %BS.

Las emulsiones preparadas con RPI-PS+HT se desestabilizaron según el perfil %BS (Figura 40), pero no se observó clarificación de la capa inferior según los perfiles %T (Figura 41). Nuevamente, estos resultados sugieren que la combinación PS+HT es más efectiva que la combinación PS+US, no solo para aumentar la solubilidad de las proteínas sino también para mejorar sus propiedades emulsionantes. Asimismo, Cheng et al. (2021) demostraron que las emulsiones estabilizadas con RPI-PS+HT presentaron mayor actividad interfacial y estabilidad de la emulsión que las obtenidas con RPI sin tratar. Ambos resultados podrían justificarse por el hecho de que RPI-PS+HT presentó agregados de proteínas solubles y subunidades de proteínas con alta hidrofobicidad que podrían adsorberse efectivamente en la interfaz aceite-agua, promoviendo la estabilidad de la emulsión.

Finalmente, la combinación de tres tratamientos (RPI-PS+HT+US y RPI-PS+US+HT) condujo a una mayor estabilidad de las emulsiones. Si bien las muestras demostraron desestabilización según el perfil de %BS, la misma fue menos progresiva que para las demás muestras y, según el registro fotográfico, las emulsiones mantuvieron una apariencia uniforme de color blanco lechoso aún en el día 21 de almacenamiento (Figuras 40 y 42). El aumento en la estabilidad de la emulsión podría deberse principalmente al pequeño tamaño de las gotas individuales y de los flóculos y a su fuerte resistencia a la coalescencia durante el almacenamiento.

En resumen, todas las emulsiones presentaron desestabilización física por cremado. Sin embargo, a medida que se redujo el tamaño de partícula, la migración de las gotas resultó ser más uniforme y lenta y, por ende, el fenómeno de cremado se generó a menor velocidad. De esta manera, la combinación de tres tratamientos condujo a una mayor estabilidad de las emulsiones. En conjunto, estos resultados demuestran que la combinación de cambios de pH, ultrasonido y tratamientos térmicos puede mejorar en gran medida la solubilidad del RPI y la estabilidad de las emulsiones estabilizadas con RPI modificado.

5. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se evaluó el impacto de combinar tratamientos de cambio de pH (PS), ultrasonido (US) y/o calor (HT) en las características de un aislado de proteínas de arroz comercial (RPI), incluyendo su capacidad para estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W). Es de interés resaltar que este es el primer trabajo en que la combinación de los tres tratamientos es evaluada sobre proteínas de arroz, destacando su relevancia científica. Asimismo, los resultados obtenidos permitieron cumplir tanto con el objetivo general como con los objetivos específicos planteados al inicio de esta investigación.

Refiriéndonos a los primeros dos objetivos específicos, se lograron obtener diez muestras de RPI modificado por combinación de tratamientos PS, US y/o HT, y las mismas fueron caracterizadas. En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos para las muestras modificadas en comparación al control de RPI sin tratamiento.

Muestra	Solubilidad (%)	Potencial ζ (mV)	H ₀ (%)	Fluorescencia (RFU)	Tamaño D[3,2] (μm)	Microscopías
RPI	2,7 ± 1,0	-33,8 ± 5,3	100	1137	9,5 ± 0,8	Agregados grandes y compactos
RPI-US	=	=	=	+	=	Agregados grandes y compactos
RPI-HT	=	=	=	+	=	Agregados grandes y compactos
RPI-US+HT	=	=	=	+	=	Agregados grandes y compactos
RPI-HT+US	=	=	=	+	=	Agregados grandes y compactos
RPI-PS	=	-	=	-	=	Agregados grandes y compactos
RPI-PS+US	+	=	+	++	=	Agregados menos compactos y más dispersos
RPI-PS+HT	++	=	+	++	=	Agregados menos compactos y más dispersos
RPI-PS+US+HT	+++	=	+	++	=	Agregados más pequeños y completamente dispersos
RPI-PS+HT+US	+++	=	+	++	-	Agregados más pequeños y completamente dispersos

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos al caracterizar las muestras de RPI modificado respecto al control de RPI sin tratar

De esta forma, se pudo demostrar que los tratamientos realizados a pH neutro (RPI, RPI-US, RPI-HT y RPI-US+HT y RPI-HT+US) no modificaron significativamente la solubilidad y las demás características, debido a la elevada agregación y baja dispersabilidad que presenta el RPI en dichas condiciones de pH, por lo que se decidió no continuar trabajando con estas muestras para la posterior evaluación de su capacidad emulsionante.

Por otra parte, el tratamiento con PS solo permitió obtener una mejora pequeña pero no significativa en la solubilidad de las proteínas. Como se explicó a lo largo del trabajo, la técnica de secado por aspersión, con la cual se obtuvo el RPI empleado, modifica el estado de agregación de las proteínas dificultando su redispersión en medios acuosos, lo cual explica la necesidad de realizar tratamientos más intensos para mejorar la solubilidad de este tipo de aislados.

La combinación del cambio de pH con tratamiento térmico o ultrasónico (RPI-PS+US y RPI-PS+HT) aumentó significativamente la solubilidad, induciendo cambios en la estructura superficial de las proteínas y produciendo agregados de proteínas menos compactos y más dispersos respecto a RPI y RPI-PS.

Finalmente, la combinación de los tres tratamientos condujo a los mejores resultados. Específicamente, las muestras tratadas mediante cambio de pH, calentamiento y ultrasonido (RPI-PS+HT+US y RPI-PS+US+HT) aumentaron la solubilidad de las proteínas hasta en un 91,8% y la hidrofobicidad de la superficie hasta en un 283%, lo que llevó a la formación de agregados de proteínas menos compactos y más dispersos que el control RPI sin tratar y las muestras donde se combinaron solo dos tratamientos. Además, considerando los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca y el SDS-PAGE, podemos concluir que la combinación de estos tres tratamientos indujo cambios en la estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas del arroz. El cambio de pH indujo el despliegue de moléculas y agregados de proteínas, mejorando la repulsión electrostática y produciendo un estado similar a un glóbulo fundido, dejándolos disponibles para su modificación mediante ultrasonido y calentamiento, lo que se supone que induce un mayor despliegue de proteínas, la exposición de aminoácidos hidrofóbicos y la hidrólisis de proteínas.

Considerando el tercer objetivo, las muestras tratadas mediante cambio de pH junto a ultrasonido y/o calentamiento (RPI-PS+US, RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT y RPI-

PS+HT+US) se utilizaron para preparar emulsiones O/W. En la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos en comparación a la emulsión preparada con la muestra control de RPI sin tratar.

Muestra	Microscopias	Tamaño D[4,3]	Estabilidad física
RPI	Se observó coalescencia y floculación	Flóculos de gran tamaño y coalescencia.	Formación rápida de capa de crema estratificada
RPI-PS+US	Solo se observó floculación	Flóculos de menor tamaño	Formación rápida de capa de crema homogénea y una capa de suero clarificado
RPI-PS+HT	Solo se observó floculación	Flóculos y gotas individuales más pequeños	Formación de capa de crema homogénea
RPI-PS+US+HT	Solo se observó floculación	Flóculos y gotas individuales más pequeños	Formación lenta de capa de crema homogénea
RPI-PS+HT+US	Solo se observó floculación	Flóculos y gotas individuales con el menor tamaño	Formación lenta de capa de crema homogénea

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos al caracterizar las emulsiones O/W estabilizadas con RPI modificado respecto con el control de RPI sin tratar.

De esta forma se pudo observar que si bien todas las emulsiones preparadas sufrieron un proceso de floculación y desestabilización física por cremado, ninguna presentó coalescencia, demostrando una marcada mejora respecto del control de RPI sin tratar. Las muestras RPI-PS+US+HT y RPI-PS+HT+US fueron las que permitieron obtener los tamaños de partícula más pequeños, tanto de gotas individuales como de flóculos, y una mayor estabilidad frente al cremado. Podemos concluir entonces que el aumento en la solubilidad y las modificaciones a nivel de superficie de proteínas y agregados de proteínas de arroz dieron lugar a mejoras significativas en su capacidad emulsionante. A su vez, estos resultados permitieron cumplir con el tercer objetivo específico.

En conclusión, el enfoque físico y químico combinado propuesto tuvo un desempeño eficaz en la modificación de las estructuras de las proteínas para mejorar la solubilidad del RPI y sus propiedades emulsionantes, confirmando la hipótesis del presente trabajo. Por lo tanto, la implementación de este RPI modificado podría significar una nueva estrategia para ampliar la aplicación de los subproductos del arroz en la industria alimentaria.

En cuanto a perspectivas, como bien se planteó a lo largo de la discusión de este trabajo, se deberían comprobar ciertas suposiciones en relación a los resultados obtenidos. Por un lado, habría que confirmar la hidrólisis de proteínas, posible fenómeno causante de la coloración observada en todo el rango de PM para RPI-PS+HT, RPI-PS+US+HT Y RPI-PS+HT+US. Por otra parte, tal como se mencionó, la causa de la floculación observada en todas las emulsiones preparadas podría deberse a la baja concentración de proteínas, por lo que se planteó evaluar el efecto de incrementar dicha concentración.

Al mismo tiempo, se propone evaluar si el RPI modificado puede mejorar otras propiedades funcionales, como las propiedades espumantes, y si los diversos tratamientos aplicados inducen cambios en la composición de aminoácidos y la digestibilidad de las proteínas. Además, se propone analizar la capacidad emulsionante de estas proteínas modificadas en condiciones de pH ácido, que son las comúnmente encontradas en los aderezos alimentarios. Considerando que se pasará por el punto isoeléctrico de las proteínas (estimado a pH 4,0), es posible hipotetizar que las propiedades emulsionantes se verán afectadas. Por lo tanto, se propone a su vez estudiar si es necesario adicionar algún polisacárido como estabilizante. En ese sentido, se debería poner a punto el tipo de polisacárido, la relación de masa proteína-polisacárido y el valor de pH para obtener el máximo rendimiento posible.

6. Referencias bibliográficas

Adebisi, A. P., Adebisi, A. O., Ogawa, T., & Muramoto, K. (2007). Preparation and characterization of high-quality rice bran proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(7), 1219-1227.

Adebisi, A. P., Adebisi, A. O., Hasegawa, Y., Ogawa, T., y Muramoto, K. (2009). Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *European Food Research and Technology*, 228, 391-401.

Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. *Springer Science & Business Media*.

Alavi, F., Chen, L., Wang, Z., & Emam-Djomeh, Z. (2021a). Consequences of heating under alkaline pH alone or in the presence of maltodextrin on solubility, emulsifying and foaming properties of faba bean protein. *Food Hydrocolloids*, 112, 106335.

Alavi, F., Chen, L., & Emam-Djomeh, Z. (2021b). Effect of ultrasound-assisted alkaline treatment on functional property modifications of faba bean protein. *Food Chemistry*, 354, 129494.

Alizadeh-Pasdar, Nooshin, & Li-Chan, E. C. Y. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(2), 328–334.

Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. Y. (2001). Application of PRODAN fluorescent probe to measure surface hydrophobicity of proteins interacting with karrageenan. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 285–294.

Alzate Calderón, P. C. (2018). Desarrollo de materiales micro/nano estructurados en base a almidones para la estabilización, liberación controlada, soporte de preservadores y extensión de la vida útil de los alimentos. (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017a). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in food science & technology*, 64, 1-12.

- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017b). Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 18-26.
- Bechtel, D. B., & Juliano, B. O. (1980). Formation of protein bodies in the starchy endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): a re-investigation. *Annals of Botany*, 45(5), 503-509.
- Bolbarán Gómez, M. P. (2014). Niveles de mieloperoxidasa (MPO) en lesiones periapicales de origen endodóntico. (Tesis de grado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Cagampang, G. B., Cruz, L. J., Espiritu, S. G., Santiago, R. G., & Juliano, B. O. (1966). Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry*, 43, 145-155.
- Cao, X., Wen, H., Li, C., & Gu, Z. (2009). Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *Journal of cereal science*, 50(2), 184-189.
- Champagne, E. T., Wood, D. F., Juliano, B. O., & Bechtel, D. B. (2004). The rice grain and its gross composition. *Rice chemistry and technology*, 3, 77-107.
- Cheng, Y. H., Wei, X. N., Liu, F., Xu, Z., & Chen, M. L. (2021). Synergistic effects of pH, temperature and glycosylation on the functional properties of rice protein. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 5286–5295.
- Childs N. W. (2004). Production and utilization of rice. In E. T. Champagne (Ed.), *Rice: Chemistry and technology* (3rd ed., pp 1-23). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Chrastil, J. (1992). Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1683-1686.
- Consultation, F. E. (2011). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO Food Nutr. Pap, 92, 1-66.
- Copado, C. N., Ixtainaa, V. Y., Diehlb, B. W., & Tomasa, M. C. (2020). Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por aspersión utilizando productos de la reacción de Maillard. *Revista del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (RFANUS), Volumen 2 (N°3- 2020)*.

- Dai, H., Zhan, F., Chen, Y., Shen, Q., Geng, F., Zhang, Z., & Li, B. (2023). Improvement of the solubility and emulsification of rice protein isolate by the pH shift treatment. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(1), 355-366.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. *Protein functionality in food systems*, 9, 1-37.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of food science*, 70(3), R54-R66.
- De Groot, A. P.; Slump, P. (1969). Effects of Severe Alkali Treatment of Proteins on Amino Acid Composition and Nutritive Value. *Journal of Nutrition* 98(1), 45–56.
- Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 130-140.
- Elshereef, R., Budman, H., Moresoli, C., & Legge, R. L. (2006). Fluorescence spectroscopy as a tool for monitoring solubility and aggregation behavior of β -lactoglobulin after heat treatment. *Biotechnology and bioengineering*, 95(5), 863-874.
- Fabian, C., & Ju, Y. H. (2011). A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(9), 816-827.
- Fang, Z., Cai, X., Wu, J., Zhang, L., Fang, Y., & Wang, S. (2021). Effect of simultaneous treatment combining ultrasonication and pH-shifting on SPI in the formation of nanoparticles and encapsulating resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 111, 106250.
- Fennema O R (1996). Food Chemistry, Marcel Dekker, New York, USA.
- Ferrando, M., & Spiess, W. E. L. (2000). Confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science Revisión: Microscopía láser confocal de barrido. Una potente herramienta en la ciencia de los alimentos. *Food Science and Technology International*, 6(4), 267-284.
- Formulacion (2017). Turbiscan®: User Guide. (Ed. 4).
- Gao, K., Zha, F., Yang, Z., Rao, J., & Chen, B. (2022). Structure characteristics and functionality of water-soluble fraction from high-intensity ultrasound treated pea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 125, 107409.

- Ghanghas, N., MT, M., Sharma, S., & Prabhakar, P. K. (2022). Classification, composition, extraction, functional modification and application of rice (*Oryza sativa*) seed protein: A comprehensive review. *Food Reviews International*, 38(4), 354-383.
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., ... & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food chemistry*, 187, 322-330.
- Goto, Y., Calciano, L. J., & Fink, A. L. (1990). Acid-induced folding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(2), 573-577.
- Grefa Andi, J. L. (2017). Extracción mecánica de la Torta de Guachanzo (*Caryodendron orinocense* Karst) y su caracterización de proteínas y polifenoles (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Hamada, J. S. (1997). Characterization of protein fractions of rice bran to devise effective methods of protein solubilization. *Cereal Chemistry*. 74, 662-668.
- Han, S. W., Chee, K. M., & Cho, S. J. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food chemistry*, 172, 766-769.
- Hansen, L.P., Hosek, R., Callan, M., and Jones, F.T. (1981). The development of high-protein rice flour for early childhood feeding. *Food Technology*, 35:38–42.
- Helm, R. M., & Burks, A. W. (1996). Hypoallergenicity of rice protein. *Cereal foods world*, 41(11), 839-843.
- Hettiarachchy, N. S., Kalapathy, U., & Myers, D. J. (1995). Alkali-modified soy protein with improved adhesive and hydrophobic properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(12), 1461-1464.
- Hibino, T.; Kidzu, K.; Masumura, T.; Ohtsuki, K.; Tanaka, K.; Kawabata, M.; Fujii, S. (1989). Amino Acid Composition of Rice Prolamin Polypeptides. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(2), 513–518.
- Hoogenkamp, H., Kumagai, H., & Wanasundara, J. P. D. (2017). Rice protein and rice protein products. In *Sustainable protein sources* (pp. 47-65). Academic Press.

Igartúa, D. E., Platania, F. A., Balcone, A., Palazolo, G. G., & Cabezas, D. M. (2022). Impact of heat treatment in whey proteins-soluble soybean polysaccharides electrostatic complexes in different pH and biopolymer mass ratio conditions. *Applied Food Research*, 2(2), 100184.

Israelachvili J N (1992). *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Londres, Reino Unido.

Jayaprakash, G., Bains, A., Chawla, P., Fogarasi, M., & Fogarasi, S. (2022). A narrative review on rice proteins: current scenario and food industrial application. *Polymers*, 14(15), 3003.

Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7576-7583.

Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). pH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(13), 8035-8042.

Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2011). Role of β -conglycinin and glycinin subunits in the pH-shifting-induced structural and physicochemical changes of soy protein isolate. *Journal of food science*, 76(2), C293-C302.

Jiang, J., Zhu, B., Liu, Y., & Xiong, Y. L. (2014). Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1683-1691.

Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 835-842.

Ju, Z. Y.; Hettiarachchy, N. S.; Rath, N. Extraction, (2001). Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, 66(2), 229–232.

Juliano, B.O. (2007). *Rice Chemistry & Quality*. Manila, Philippines: Philippine Rice Research Institute.

- Kawase, S. I., Matsumura, Y., Murakami, H., & Mori, T. (1998). Comparison of antioxidative activity among three types of prolamin subunits. *Journal of Cereal Science*, 28(1), 33-41.
- Krishnan, H.B., White, J.A., and Pueppke, S.G. (1992). Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. *Plant Science*. 81:1–11.
- Kubota, M., Saito, Y., Masumura, T., Kumagai, T., Watanabe, R., Fujimura, S., & Kadowaki, M. (2010). Improvement in the in vivo digestibility of rice protein by alkali extraction is due to structural changes in prolamin/protein body-I particle. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(3), 614-619.
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., ... & Kennedy, J. F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595.
- Lakowicz, J. R. (1999). Protein fluorescence. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 445-486.
- Lam, R. S., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food chemistry*, 141(2), 975-984.
- Landers, P. S.; Hamaker, B. R. (1994). Antigenic Properties of Albumin, Globulin, and Protein Concentrate Fractions from Rice Bran. *Cereal Chemistry*,. 71(5), 409–411.
- Li, Y., Cheng, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Mintah, B. K., Dabbour, M., ... & Ma, H. (2020). Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment: Ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105240.
- Li, Y., Zhang, C., Liang, Y., Wang, L., & Xiong, W. (2022). Solubility and conformational characterization of rice glutelin after high temperature treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 1720–1726.
- Liu, K., Zheng, J., & Chen, F. (2021). Heat-induced changes in the physicochemical properties and in vitro digestibility of rice protein fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1368–1377.

- Mäkinen, O. E., Zannini, E., Koehler, P., & Arendt, E. K. (2016). Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chemistry*, 196, 17–24.
- Malvern Instruments Ltd. (2013a). Zetasizer Nano Series User Manual (MAN0485 Issue 1.1).
- Malvern Instruments Ltd. (2013b). Mastersizer 3000 User Manual (MAN0474 Issue 2.1).
- Mao, C., Wu, J., Zhang, X., Ma, F., & Cheng, Y. (2020). Improving the solubility and digestibility of potato protein with an online ultrasound-assisted pH shifting treatment at medium temperature. *Foods*, 9(12), 1908.
- Márquez A (2009). Obtención y caracterización de cremas formuladas a base de leche de soja y fortificadas con calcio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Argentina.
- Matsumura, Y., Murakami, H., & Mori, T. (1998). Comparison of antioxidative activity among three types of prolamin subunits. *Journal of Cereal Science*, 28(1), 33-41.
- McClements, D. J. (2004). Food emulsions: principles, practices, and techniques. CRC press.
- Ministerio de Salud de la Nación. SARA 2: Tabla de composición química de alimentos para Argentina. Compilación para ENNyS 2 / 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2022.
- Mun, S., Surh, J., & Shin, M. (2020). Methods to improve rice protein dispersal at moderate pH. *Food Science and Biotechnology*, 29(10), 1401-1406.
- Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58(1), 64-73.
- Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S., & Maberly, G. F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the new york Academy of Sciences*, 1324(1), 7-14.

- Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., & Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2022). Principios de bioquímica de Lehninger. Artmed Editora.
- Nielsen, P. M. (1997). Functionality of protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 443-472.
- Ogawa, M., Kumamaru, T., Satoh, H., Iwata, N., Omura, T., Kasai, Z., & Tanaka, K. (1987). Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant and Cell Physiology*, 28(8), 1517-1527.
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. Longmans, Green and Company.
- Padhye, V. W., & Salunkhe, D. K. (1979). Extraction and characterization of rice proteins. *Cereal Chemistry*. 56, 389-393.
- Palazolo G. G. (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP), Argentina.
- Pantoa, T., Kubota, M., Suwannaporn, P., & Kadowaki, M. (2020). Characterization and bioactivities of young rice protein hydrolysates. *Journal of Cereal Science*, 95, 103049.
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Porfiri M. C., Wagner J. R., Cabezas D. M. (2017). Insoluble soybean polysaccharides: Obtaining and evaluation of their O/W emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 73:262-273.
- Proteintech Group, Inc. (2023). IF imaging: Widefield versus confocal microscopy. <https://www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/>

Qamar, S., Bhandari, B., & Prakash, S. (2019). Effect of different homogenisation methods and UHT processing on the stability of pea protein emulsion. *Food Research International*, 116, 1374–1385.

Romero, M. V. (2014). Rice proteins. *Applied Food Protein Chemistry*, 305-321.

Sceni, P., & Wagner, J. R. (2007). Study on sodium caseinate foam stability by multiple light scattering. *Food Science and Technology International*, 13(6), 461-468.

Sceni, P. (2021). Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.

Schramm, L.L. (2014) Emulsions, Foams, Suspensions, and Aerosols: Microscience and Applications, 2nd Edition. John Wiley & Sons.

Sha, L., Koosis, A. O., Wang, Q., True, A. D., & Xiong, Y. L. (2021). Interfacial dilatational and emulsifying properties of ultrasound-treated pea protein. *Food Chemistry*, 350, 129271.

Shen, Q., Dai, H., Wen, L., Zheng, W., Li, B., Dai, J., Li, B., & Chen, Y. (2023). Effects of pH-shifting treatments on the emulsifying properties of rice protein isolates: Quantitative analysis of interfacial protein layer. *Food Research International*, 164, 112306.

Shewry, P. R., & Casey, R. (1999). Seed proteins. Kluwer Academic Publishers.

Shih, F. F.; Champagne, E. T.; Daigle, K.; Zarins, Z. (1999). Use of Enzymes in the Processing of Protein Products from Rice Bran and Rice Flour. *Food/Nahrung*. 43(1), 14–18.

Shih, F. F.; Daigle, K. W. (2000). Preparation and Characterization of Rice Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 77(8), 885–889.

Shih, F. F. (2003). An update on the processing of high-protein rice products. *Food/Nahrung*, 47(6), 420-424.

Shih, F.F. (2004). Rice proteins. In: Champagne, E.T. (ed) Rice Chemistry and Technology. St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc. pp. 143–162.

Shyur, L. F., Zia, K. K., & Chen, C. S. (1988). Purification and some properties of storage proteins in japonica rice. *Bot. Bull. Academia Sinica*, 29, 113-122.

Singh, T. P., Siddiqi, R. A., & Sogi, D. S. (2021). Enzymatic modification of rice bran protein: Impact on structural, antioxidant and functional properties. *Lwt*, 138, 110648.

Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA). (2023). Informe del arroz campaña 22/23.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.

Takaiwa, F., Ogawa, M., & Okita, T. W. (1999). Rice glutelins. *Seed proteins*, 401-425.

USDA. (2015). Grain: World markets and trade. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service.

Vargas, S. A., Delgado-Macuil, R. J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-López, M., & Amador-Espejo, G. G. (2021). High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105340.

Walstra P (1983). Formation of emulsion. En: Encyclopedia of emulsion technology: basic theory, Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 57-127

Walstra P (1996). Emulsion stability. En Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 4, Ed. Becher, P, pp. 1-62, Marcel Dekker, New York, USA.

Wang, Q., Jin, Y., & Xiong, Y. L. (2018). Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10827-10834.

Wang, T., Chen, X., Wang, W., Wang, L., Jiang, L., Yu, D., & Xie, F. (2021). Effect of ultrasound on the properties of rice bran protein and its chlorogenic acid complex. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105758.

- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*, 175(1), 231-237.
- Xia, N., Wang, J., Gong, Q., Yang, X. Q., Yin, S. W., & Qi, J. R. (2012). Characterization and in vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, 56, 482-489.
- Yan, S., Xu, J., Zhang, S., & Li, Y. (2021). Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate. *Lwt*, 142, 110881.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., Huang, S., & Ma, H. (2017). Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 19–28. 554
- Yildiz, G., Andrade, J., Engeseth, N. E., & Feng, H. (2017). Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermo-sonication. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 836-846.
- Zhang, L., Pan, Z., Shen, K., Cai, X., Zheng, B., & Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of cereal science*, 79, 204-209.
- Zhang, J., Liu, Q., Chen, Q., Sun, F., Liu, H., & Kong, B. (2022). Synergistic modification of pea protein structure using high-intensity ultrasound and pH-shifting technology to improve solubility and emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 88, 106099
- Zhao, M., Xiong, W., Chen, B., Zhu, J., & Wang, L. (2020). Enhancing the solubility and foam ability of rice glutelin by heat treatment at pH12: Insight into protein structure. *Food Hydrocolloids*, 103, 105626.
- Zheng, L., Regenstein, J. M., Wang, Z., Zhang, H., & Zhou, L. (2023). Reconstituted rice protein: The raw materials, techniques and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 133.

Zhi, Z., Yan, L., Li, H., Dewettinck, K., Van der Meeren, P., Liu, R., & Van Bockstaele, F. (2022). A combined approach for modifying pea protein isolate to greatly improve its solubility and emulsifying stability. *Food Chemistry*, 380, 131832.

Zhu, Y., Fu, S., Wu, C., Qi, B., Teng, F., Wang, Z., ... & Jiang, L. (2020). The investigation of protein flexibility of various soybean cultivars in relation to physicochemical and conformational properties. *Food Hydrocolloids*, 103, 105709.