UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



# CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y EN LA CRISTALIZACIÓN DE LA LACTOSA POR LA PRESENCIA DE BIOMOLÉCULAS.

POR:

M. C. YANIRA IVONNE SÁNCHEZ GARCÍA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORADO EN CIENCIAS** 

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

DICIEMBRE 2021



Chihuahua, Chih., a 18 de noviembre de 2021. Oficio: 99/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes Secretario de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: "Cambios en las propiedades fisicoquímicas y en la cristalización de la lactosa por la presencia de biomoléculas", presentada por la M.C. Yanira Ivonne Sánchez García, alumna del programa de Doctorado en Ciencias.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e "Por la ciencia para bien del hombre"

Yarely Leal Romas

Dra. Martha Yarely Leal Ramos Asesora de tesis

Dr. Iván Salmerón Ochoa Asesor de tesis

Dr. Nestor Guiérrez Méndez Director de tesis

H. Rumos 2

Dr. Víctor Hugo Ramos Sánchez Asesor de tesis

Dr. David<sup>1</sup>Sepúlveda Ahumada Asesor de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes Secretario de Investigación y Posgrado



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS SECRETARIA INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Circuito Universitario Campus Universitario #2 C.P. 31125 Tel. +52 (614) 236 6000 Chihuahua, Chihuahua, México http://www.fcq.uach.mx 22 de octubre de 2021

Dr. Ildebrando Pérez Reyes SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua

Estimado Dr. Ildebrando por medio de este conducto le informo que la M.C. Yanira Ivonne Sánchez García estudiante del Doctorado en Ciencias, ha concluido satisfactoriamente el escrito de tesis del trabajo "Cambios en las propiedades fisicoquímicas y en la cristalización de la lactosa por la presencia de biomoléculas." Por lo que en mi carácter de Director de Tesis le liberó su escrito de tesis, para que sea turnado a los correspondientes asesores para comentarios, correcciones o retroalimentación.

En este trabajo de tesis participan los siguientes investigadores como susasesores: Dra. Martha Yarely Leal Ramos (FCQ-UACH) Dra. Víctor Hugo Ramos Sánchez (FCQ-UACH)Dra. Iván Salmerón Ochoa (FCQ-UACH) Dr. David Sepúlveda Ahumada (CIAD-Cuauhtémoc)

Sin otro particular quedo de usted

Atentamente,

D.C. NESTOR GUTIÉRREZ MÉNDEZ

Director de tesis

#### AGRADECIMIENTOS

Ser parte de un Posgrado, sin duda alguna ha sido uno de los retos más grandes de mi vida, con mucho crecimiento personal y profesional, sin embargo, nada habría sido posible sin la ayuda de quienes citaré a continuación.

Antes que nada, quiero agradecer a Dios, Él, que nunca me ha soltado, fortaleciéndome en días difíciles e iluminando mi mente.

A Julio, mi fiel compañero, al que incluso en los días en los que ni yo misma creía en mí, siempre supo cómo levantarme, eres el mejor amigo, esposo y equipo. Te amo infinitamente.

Agradezco hoy y siempre a mi familia, por tanto, sin duda, gracias a ustedes soy la persona que soy y no podría lograr todo lo que me he propuesto. Gracias por la paciencia, el apoyo y tanto amor.

A mi director de tesis, Dr. Néstor Gutiérrez Méndez, por su orientación y soporte, por siempre poner su confianza en mí y mi trabajo. Gracias por todo lo que me ha enseñado y lo mucho que he crecido bajo su dirección.

A mis asesores y profesores, por la colaboración brindada durante toda la tesis y el doctorado, por ayudarme a crecer profesionalmente, sin duda alguna, son mis mayores ejemplos para mi futuro en la investigación y docencia.

A mis compañeros de doctorado -Jessie, Nallely, Daniel y Anahí- a mis hermanos académicos -Caro, Diego, Arenis, Víctor, Laura, Kevin y Rubí- a mis compañeros – Aztrid, Neder, Velvet, Denisse, Erick, Bety, Marina, Elsa, Saúl, Elí, Kevin, Danger, Melissa... cada uno de ustedes hicieron siempre más llevaderas las arduas jornadas de trabajo, gracias por su inestimable ayuda en esta aventura.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua a través de la Facultad de Ciencias Químicas; al director, Dr. Pedro Javier Martínez Ramos, al director del área de Investigación y Posgrado de la UACH, Ing. Alfredo Urbina Valenzuela, al secretario del área de Investigación y Posgrado de la FCQ, Dr. Ildebrando Pérez y al Coordinador de Posgrado, Dr. Jaime Adame, por su apoyo constante desde hace ya varios años.

Gracias a este 2020, creí era un año perdido, sin embargo, me enseñó tanto y me ayudó a crecer en muchos aspectos

Y, por último, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por darme la oportunidad de desarrollarme como profesionista e investigador a través de sus programas y financiamiento durante estos años. Gracias por su apoyo a miles de jóvenes mexicanos, porque un país que apuesta por la Ciencia es un país que apuesta por el futuro.

#### DEDICATORIAS

A Julio, en él encontré las fuerzas necesarias para llegar aquí.

A mis padres, Raúl y Silvia, los pilares de mi vida.

A mi hermana y mi Santi, mis mejores regalos.

A los sueños por cumplir.



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS i			
DEDICATORIASiii			
ÍNDICEiv			
ÍNDICE DE TABLAS			
ÍNDICE DE FIGURAS x			
LISTA DE ABREVIATURASxiii			
RESUMEN 1			
ABSTRACT			
1. INTRODUCCIÓN			
2. ANTECEDENTES			
2.1 Lactosa5			
2.2 Suero de queso7			
2.2.1 Recuperación de la lactosa a partir de suero de queso			
2.3 Cristalización de la lactosa 11			
2.3.1 Supersaturación11			
2.3.2 Nucleación14			
2.3.3 Crecimiento de los cristales16			
2.3 Alternativas al proceso tradicional de cristalización de lactosa 17			
2.3.4 Carragenina 17			
2.3.5 Flavonoides			
2.4 Formación de co- cristales25			
3 JUSTIFICACIÓN			



4	HIP	ÓTESIS	27
5 OBJETIVO.			27
!	BJETIVO GENERAL	27	
!	5.2 (	OBJETIVOS PARTICULARES (Fase 1)	27
:	5.3 (	OBJETIVOS PARTICULARES (Fase 2)	28
6	MET	TODOLOGÍA GENERAL	29
7	MAT	TERIALES Y MÉTODOS	30
	7.1	FASE 1:	30
	7.1.	1 Materiales	30
	7.1.2	2 Diseño de experimentos	30
	7.1.:	3 Propiedades viscoelásticas de las soluciones de lactosa	31
	7.1.4	4 Medición de anómeros $\beta$ / $\alpha$ en soluciones de lactosa	31
	7.1.	5 Determinación de la solubilidad de la lactosa	33
	7.1.0	6 Estimación de la supersaturación de lactosa	34
	7.1.	7 Determinación de la zona metaestable (ZM)	35
	7.1.8	8 Cromatografía de capa fina (TLC)	35
	7.2	FASE 2	35
	7.2.	1 Materiales	35
	7.2.2	2 Optimización geométrica de polifenoles	37
	7.2.3	3 Acoplamiento molecular.	39
	7.2.4	4 Selección de polifenoles con una alta afinidad hacia el sitio activo	de
	α-LC	G y β-LA	40
	7.2.	5 Interacción entre proteínas de suero y flavonoides: Estud	oit
	expe		40
	7.2.0	6 Cristalización de soluciones de lactosa- proteína- flavonoides	41





	7.2.7	Caracterización de los co- cristales de lactosa	
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN			
8.1 FASE 1			
	8.1.1	Propiedades viscoelásticas de las soluciones de lactosa44	
	8.1.2	Mutarrotación de la lactosa en presencia de carrageninas 46	
	8.1.3	Solubilidad y sobresaturación de lactosa en presencia de carragenina. 49	
	8.1.4 carrage	Cambios en la zona metaestable de lactosa por la presencia de enina	
8	.2 FAS	SE 2	
	8.2.1	Selección de Funcionales56	
	8.2.2	Cálculo de ángulos diedros60	
	8.2.3	Orbitales Moleculares Frontera65	
	8.2.4	Parámetros de reactividad química69	
	8.2.5	Selección de polifenoles de acuerdo con el acoplamiento molecular 72	
	8.2.6	Interacciones moleculares: Rutina y EGCG77	
	8.2.7 suero.	Interacciones experimentales de los polifenoles con las proteínas del 81	
	8.2.8	Interacciones de los flavonoides y la lactosa	
	8.2.9	Cinéticas de cristalización de soluciones de lactosa- proteína-	
	flavono	ides85	
	8.2.10	Distribución de tamaños de cristal (CSD)	
	8.2.11	Caracterización de los cristales91	
9	CONCI	_USIONES	
9	.1 Red	comendaciones	

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



10 BIBLIOGRAFÍA			
11 APÉNDICES 113			
11.1 Apéndice I. Curvas de calibración113			
11.2 Apéndice II. Protocolo para la elaboración y uso de geles de			
poliacrilamida SDS-PAGE 114			
11.3 Apéndice III. Comparación de distancias y ángulos teóricos y			
experimentales de DFT: B3LYP/6-311G (A) y DFT: B3LYP/6-31G (B 120			
11.4 Apéndice IV. Parámetros de reactividad de moléculas de las moléculas			
de flavonoides121			
11.5 Apéndice V. Análisis estadísticos: FASE 1 122			
11.6 Apéndice VI. Análisis estadísticos: FASE 2 129			
11.7 Apéndice VII. Artículos135			



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> . Formas conocidas de Lactosa (Listiohadi, 2005)7
Tabla 2. Fuentes y beneficios de algunos flavonoides
Tabla 3. Ecuaciones de parámetros de reactividad global
Tabla 4. Efecto sobre el tiempo (min) requerido para alcanzar el equilibrio de
mutarrotación (tMeqm), y la fracción de $\alpha$ -lactosa monohidratada (f $\alpha$ -LMH) y $\beta$ -
lactosa (fβ-L) en equilibrio de mutarrotación por la incorporación de carrageninas
en una solución de lactosa (10% P / V, 25 ºC) 49
Tabla 5. Solubilidad de soluciones modelo de lactosa adicionadas con $\iota$ y $\kappa$ -
carragenina a diferentes temperaturas52
Tabla 6. Resultados de ANOVA para el efecto de la adición de 1 and $\kappa$ -
carragenina y la temperatura de la solubilidad de lactosa
.Tabla 7. Cambios en la zona metaestable (MZ) de la lactosa por la incorporación
de carrageninas a diferentes concentraciones56
Tabla 8. Distancias de enlaces interatómicos (Á) para la molécula de quercetina.
<b>Tabla 9.</b> Ángulos de enlaces interatómicos (°) para la molécula de quercetina 59
Tabla 10. Ángulos diedros de las estructuras de los flavonoides optimizados con
B3LYP / 6-311G (d, p)61
Tabla 11. Mapeo de orbitales moleculares de los flavonoides, calculados con
B3LYP/6-311G (d,p) en fase acuosa con el modelo continuo de solvatación CPCM
usando agua como solvente66
Tabla 12. Parámetros de reactividad de moléculas de flavonoides con B3LYP/6-
311G (d,p) con el modelo continuo de solvatación CPCM usando como solvente
agua. Todos los parámetros de reactividad están en (eV)
<b>Tabla 13</b> . Análisis de las interacciones moleculares entre la $\beta$ LG (PDB ID: 3npo) y
diversos flavonoides proporcionados por simulaciones de acoplamiento molecular.



**Tabla 14**. Análisis de las interacciones moleculares entre la αLA (PDB ID: 3b0) y diversos flavonoides proporcionados por simulaciones de acoplamiento molecular.



### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de recuperación de lactosa del suero de queso
(Sánchez-García et al., 2018)10
Figura 2. Diagrama de solubilidad de la lactosa (Zamanipoor & Mancera, 2014) 12
Figura 3. Representación del mecanismo de mutarrotación de la lactosa basada
en el sistema publicado por Jawad et al., (2012)
Figura 4. Clasificación del proceso de nucleación (de Castro & Priego-Capote,
2007)
Figura 5. Repetición de estructuras de disacáridos de (a) $\lambda$ -carragenina (R= H o
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) y (b) ι-carragenina (R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), κ-carragenina (R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )19
Figura 6. Clasificación de los antioxidantes fenólicos
Figura 7. Esquema general de la metodología seguida para cumplir con los
objetivos planteados
Figura 8. Rotación óptica observada ([a obs]°D) a lo largo del tiempo en solución
de lactosa (10% p/v) sin carragenina (control) a 25 °C. Datos ajustados a
decaimiento exponencial, donde a es el decaimiento exponencial, Mk es la tasa de
mutarrotación, <i>t</i> es el tiempo en minutos y $[\alpha_{\alpha-LMH/\beta-L}]^{\circ}_{eqm}$ es la rotación óptica en



**Figura 14.** Acoplamiento molecular de las proteínas del Suero: α-lactoalbúmina (αLA) y β-lactoglobulina (βLG) con flavonoides (rutin and EGCG) y lactosa. La figura muestra las mejores interacciones para **A.** rutina-αLA, **B.** rutina-βLG, **C.** EGCG-αLA, **D.** EGCG-βLG, **E.** lactosa-αLA, y **F.** lactosa-βLG. Las líneas azules representan los puentes de hidrogeno y las líneas amarillas son las interacciones  $\pi$ -catión y  $\pi$ - $\pi$ .

Figura 15. La interacción entre proteínas y flavonoides se evaluó (A) mediante turbidimetría y (B) midiendo el número de grupos amino libres (GAL) en las proteínas del suero (expresado en nmol mL<sup>-1</sup> de L-leucina). Las barras representan medias  $(n = 3) \pm DE$ . Las barras representan medias  $(n = 3) \pm DE$ . Las barras con diferentes letras mayúsculas o minúsculas indican diferencias Figura 16. Análisis por cromatografía de capa fina (TLC) de soluciones de lactosa (10%) con o sin rutina (1 mg mL<sup>-1</sup>) y EGCG (1 mg mL<sup>-1</sup>). Carril 1: solución de lactosa (control), carril 2: solución de EGCG, carril 3: solución de lactosa + EGCG, carril 4: solución de rutina, carril 5: solución de lactosa + rutina. Rf = factores de retención. El análisis de TLC se realizó en una placa de gel de sílice procesada con acetato de etilo: ácido acético: 1-butanol: agua (4: 3: 2: 2) y se visualizó con Figura 17. Efecto de la adición de polifenoles (rutina y EGCG) y proteínas de suero sobre la cristalización de soluciones de lactosa al 30% (p / v). A. Cristalización de soluciones de lactosa sin flavonoides o proteínas del suero (control) **B.** Soluciones de lactosa con proteínas del suero (1% w/v) 1 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas de suero; C. soluciones de lactosa con proteínas del suero y rutina (1mg mL<sup>-1</sup>). **D.** soluciones de lactosa con proteínas del Suero y EGCG (0.5mg mL<sup>-1</sup>). 87





**Figura 18.** Distribución de tamaños de cristal (CSD) de lactosa cristalizada con o sin adición de proteínas (1 mg mL<sup>-1</sup>), rutin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>), and EGCG (0.5 mg mL<sup>-1</sup>).

Figura 19. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de lactosa cristalizada con la adición de proteínas de suero (1 mg mL<sup>-1</sup>) y polifenoles (rutina y EGCG) A. Control (solución de lactosa) B. Co- cristales de lactosa- proteína; C. Co- cristales de lactosa-proteína-rutina; **D**. Co- cristales de lactosa-EGCG; **E**. Estándares de α- y β- lactosa **F.** Estándares de rutina y EGCG. ......95 Figura 20. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de BSA para la cuantificación de proteínas......113 Figura 21. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas Figura 22. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas Figura 23. Curva de calibración a partir de dos marcadores de peso molecular con pesos conocidos (Kaleidoscope Prestained Standards y Precision plus protein standard Biorad) para la identificación de bandas en SDS-PAGE. ..... 119 Figura 24. Comparación de distancias teóricas y experimentales de DFT: B3LYP/6-311G (A) y DFT: B3LYP/6-31G (B).....120 Figura 25. Comparación de ángulos teóricos y experimentales de DFT: B3LYP/6-311G dp (A) Y DFT: B3LYP/6-31G (B)...... 120 Figura 26. Parámetros de reactividad de moléculas de las moléculas de flavonoides A. Afinidad Electrónica (A) B. Potencial de Ionización (I) C. Electronegatividad (X) D. Dureza ( $\eta$ ) E. Potencial Químico ( $\mu$ ) F. Electrofilicidad ( $\omega$ ) con B3LYP/6-311G (d,p) y el método continuo de solvatación CPCM usando agua 

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



## LISTA DE ABREVIATURAS

αL- α- Lactosa	LYS- Lisina	
αLM- α- lactosa monohidratada	MET- Metionina	
αLA- α-lactolbumina	μL- Microlitros	
ALA- Alanina	Mk - Tasa de mutarrotación	
ARG- Arguinina	mL- Mililitros	
ASN- Asparagina	mg- Miligramos	
ASP- ácido aspártico	N- Normalidad	
βL- β-Lactosa	PI- Potencial de ionización	
βLG- β-lactoglobulina	[α α-LM]° - Rotación óptica de αLM	
Å- Armstrong	[α β-L]° - Rotación óptica de βL	
AE- afinidad electrónica	[α] °D - Rotación óptica observada	
DSC- Calorimetría diferencial de	[α <sub>α-LM / β-L</sub> ]° <sub>eqm</sub> - Rotación óptica en equilibrio	
$\chi$ – Electronegatividad	$[\alpha$ -LMH / $\beta$ -L]° t0 - Rotación óptica al t=0	
ΔH- Entalpía	μ- potencial químico	
CSD- Distribución del tamaño de los cristales	SER- Serina	
η - dureza química	S- Sobresaturación	
EC- Epigalocatequina	$C_{s\alpha-LM}$ . Solubilidad de $\alpha LM$	
EGCG - Epigalocatequina -3-galato	PRO- Prolina	
EGT- Epigalocatequingalato	THR- Treonina	
ω- Electrofilicidad	<i>t</i> = tiempo	
$f_{\alpha-LM}$ - Fracción de $\alpha LM$	<i>tMeqm</i> - Tiempo para alcanzar el equilibrio de	
	mutarrotación	
f β-L - Fracción de βL	TLC - Cromatografía en capa fina	
GLU- Ácido glutámico	TRP- Triptofano	
°C- grados centígrados	TYR- Tirosina	
g- Gramos	VAL- Valina	
HIS- Histidina	η *- Viscosidad compleja	
LEU- Leucina	WPI- Aislado de proteína de suero	
L- Litros	MZ - Zona metaestable	



#### RESUMEN

La recuperación tradicional de lactosa a partir de suero de queso es un proceso largo, costoso y genera una lactosa de baja calidad, por lo que en fechas recientes se han buscado alternativas para mejorar la obtención de este carbohidrato. En diversos estudios se reporta que biomoléculas como las carrageninas y las proteínas del suero pueden influir en la cristalización de la lactosa. Por una parte, la presencia de carragenina en el proceso de cristalización de la lactosa incrementa la velocidad de cristalización y reduce el tamaño de los cristales. Sin embargo, aún no es concluyente si estos efectos se deben a que promueve cambios en la mutarrotación, solubilidad y sobresaturación de la lactosa. Por otra parte, las proteínas del suero reducen la pureza de los cristales de lactosa, por lo que se buscan alternativas para su control. El objetivo de este trabajo fue evaluar como la presencia de carragenina modifica propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución como la solubilidad, mutarrotación y la supersaturación. Además, se estudió como la presencia de flavonoides y proteínas del suero afectan el proceso de cristalización de lactosa e induce la formación de cocristales de lactosa-proteína-flavonoides. Lo anterior debido a que los flavonoides pueden interactuar tanto con la lactosa como con las proteínas, generando así un ingrediente funcional. La presencia de carrageninas modificó tanto el tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarrotación como la proporción de isómeros  $\beta / \alpha$  en el equilibrio de mutarrotación. Asimismo, disminuyeron la solubilidad de la lactosa y redujeron el ancho de la zona metaestable (MZW). Por otro lado, la incorporación de flavonoides en co- cristales de lactosa-proteína depende de la naturaleza hidrofílica de los flavonoides. La epigalocateguina-3-galato (EGCG) que es de naturaleza hidrofílica se incorporó en la red cristalina de lactosa y evitó la inclusión de proteínas de suero en los cristales. Por el contrario, el flavonoide rutina de naturaleza más hidrofóbica que la EGCG interactuó con las proteínas del suero y la lactosa, lo que llevó a la formación de co- cristales que contienen lactosa, proteína y una gran concentración de rutina.

1



Palabras clave: Lactosa, carragenina, flavonoides, proteínas del suero

#### ABSTRACT

# Changes in the physicochemical properties and the lactose crystallization by biomolecules

The traditional recovery of lactose from cheese whey is a long, expensive process and generates low-quality lactose. Thus, alternatives have recently been sought to improve the lactose recovery from cheese whey. In various studies, it has been reported that presence of carrageenan in the lactose crystallization process increases the crystallization rate and reduces the size of the crystals. However, it is not yet conclusive whether these effects promote changes in lactose mutarotation, solubility, and supersaturation. In the case of whey proteins, these reduce the purity of lactose crystals, thus alternatives are required to control the presence of proteins. This work aimed to evaluate how the presence of carrageenan modifies physicochemical properties of lactose in solution, like solubility, mutarotation, and supersaturation. In addition, it was studied how the presence of flavonoids and whey proteins affect the lactose crystallization process and induce the formation of lactose-protein-flavonoid co-crystals since flavonoids may interact with both lactose and proteins. The carrageenans modified both the time to reach mutarotation balance and the ratio of  $\beta$  /  $\alpha$  isomers at mutarotation equilibrium. Furthermore, carrageenans decreased the solubility of lactose and reduced the width of the metastable zone (MZW). On the other hand, the incorporation of flavonoids in lactose-protein co-crystals depends on the hydrophilic nature of the flavonoids. For example, the hydrophilic epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was incorporated into the lactose crystal lattice and avoided the inclusion of whey proteins in the crystals. In contrast, the less water-soluble rutin interacted with whey proteins and lactose, leading to the formation of co-crystals containing lactose, protein, and a large concentration of rutin.

Key words: Lactose, carrageenan, flavonoids, whey proteins





#### 1. INTRODUCCIÓN

La lactosa es el mayor carbohidrato de la leche y su concentración puede variar de 0 a 10% p/p (McSweeney, 2009). Este azúcar es un disacárido que contiene una molécula de D-glucosa y una de D-galactosa, las cuales se encuentran unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 en el grupo aldehído de la galactosa (Listiohadi, 2005). Este carbohidrato puede estar presente en cualquiera de sus dos estereoisómeros: los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  (Listiohadi, 2005). En solución, la lactosa se abre y vuelve a formar la estructura del anillo que intercambia entre sus isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  (mutarrotación). El equilibrio de mutarrotación de la lactosa a 20°C se alcanza cuando la relación de isómeros  $\beta$  /  $\alpha$  es de 1,70 (63:37), aunque esta proporción es altamente dependiente de la temperatura. En equilibrio, la forma  $\beta$  del isómero es más abundante y más soluble (500 g L<sup>-1</sup>) que el isómero  $\alpha$ -lactosa (70 g L<sup>-1</sup>) (McSweeney, 2009).

La lactosa es recuperada a partir del suero de queso, un remanente de la industria láctea (Sánchez-García et al., 2018). La clave para hacer un proceso de recuperación de lactosa económico consiste en desarrollar un procesamiento rápido que comience con una baja concentración de lactosa de 19 a 25% p/v, es decir, modificar su solubilidad y con un alto contenido de pureza en los cristales, en una sola etapa de cristalización (R. K. Bund & A. B. Pandit, 2007). El proceso tradicional comienza con una etapa de evaporación (hasta 55-65% de sólidos) (R Bund & A Pandit, 2007). Luego, las proteínas son removidas por medio de coagulación ácida. Este procedimiento usualmente deja un contenido residual de proteínas que va de 0.1 a 0.2%, disminuyendo la calidad del producto final (Sánchez-García et al., 2018). El suero concentrado es rápidamente enfriado a 30 °C y luego de forma lenta para asegurarse de disminuir la solubilidad de la lactosa lo suficiente para que pueda cristalizar (A Pisponen et al., 2014). Finalmente, los cristales brutos de lactosa resultantes se eliminan por centrifugación. En estas



condiciones, el proceso de recuperación de lactosa es prolongado (hasta 72 h), difícilmente controlable y los cristales de lactosa suelen tener mala calidad (rendimiento, tamaño, pureza) (Dhumal et al., R. S. Dhumal, S. V. Biradar, A. R. Paradkar, & P. York, 2008; Sanjay R. Patel & Murthy, 2012; Siddique et al., 2015; Zamanipoor & Mancera, 2014). En consecuencia, los cristales crudos de lactosa deben re-disolverse, someterse a desmineralización y eliminación de proteínas del suero y recristalizarse, lo que consume tiempo y recursos (R. K. Bund & A. B. Pandit, 2007; Sanjay R. Patel & Murthy, 2012). Es por esto que se buscan alternativas que, por una parte, puedan modificar la solubilidad de la lactosa, haciendo menos exigente el paso de evaporación; y, por otro lado, técnicas que controlen los efectos negativos de la presencia de los remanentes de proteínas del suero.

En diversos estudios se reporta que biomoléculas como las carrageninas y las proteínas del suero pueden influir en la cristalización de la lactosa. En esta búsqueda por conocer dicho proceso se abordó la problemática desde ambas perspectivas. La presencia de carragenina en la cristalización de lactosa acelera la cristalización de lactosa. Además, la interacción de los agregados de carragenina con las proteínas de suero genera el tamaño más pequeño de cristales (6 µm), la distribución de tamaño de cristal (CDS) más estrecha y disminuye la formación de lactosa amorfa (Sánchez-García et al., 2018). A pesar de estos resultados, todavía no está claro si los cambios en la mutarrotación, solubilidad y sobresaturación de la lactosa están involucrados en el efecto de las carrageninas sobre la cristalización de lactosa. En el mismo sentido, el remanente de proteínas que permanecen en el suero impacta tanto positiva como negativamente el proceso de cristalización de lactosa (T. Huppertz & Gazi, 2016; Y. I. Sanchez-Garcia et al. (2018); Sánchez-García et al. 2019), mermando la calidad de los cristales, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas para el manejo de las proteínas en la cristalización de la lactosa. La incorporación de proteínas de suero en la red



cristalina de la lactosa ha sido confirmada por espectroscopía Raman (Sánchez-García et al., 2019), lo que sugiere la formación de co- cristales de proteína de lactosa. Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), un cocristal es un material cristalino compuesto por dos o más moléculas diferentes que interactúan de forma no iónica en la misma red cristalina (Food and Drug Administration (FDA), 2018). En tal sentido, existe una gran cantidad de evidencia sobre la interacción de los flavonoides con sacáridos y las proteínas del suero (N. A. Al-Shabib et al., 2019; Butimea-Cantua et al., 2018; Yildirim-Elikoglu & Erdem, 2017).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar como la presencia de biomoléculas como las proteínas del suero, carragenina y flavonoides modificarán algunas propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución, así como el proceso de cristalización de la lactosa.

#### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 Lactosa

La lactosa es el mayor carbohidrato de la leche y su concentración puede variar de 0 a 10% p/p (McSweeney, 2009). Este azúcar es un disacárido que contiene molécula de D-glucosa y una de D-galactosa, las cuales se encuentran unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 en el grupo aldehído de la galactosa (Listiohadi, 2005). Ambos monosacáridos se encuentran en la forma de anillo piranoso. La lactosa es un azúcar reductor debido a que el grupo aldehído del residuo de glucosa se encuentra libre, por lo que puede actuar como un donador de iones H<sup>+</sup> (Walstra, P. W. et al., 2006).





carbohidrato puede presente en cualquiera Este estar de sus dos estereoisómeros:  $\alpha$  y  $\beta$  (Tabla 1) (Listionadi, 2005). En solución, la lactosa se abre y vuelve a formar la estructura del anillo que intercambia isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ (mutarrotación). El equilibrio de mutarrotación de la lactosa a 20 °C se alcanza cuando la relación de isómeros  $\beta$  /  $\alpha$  es de 1.70 (63:37), aunque esta proporción es altamente dependiente de la temperatura. En equilibrio, la forma β del isómero es más abundante y más soluble (500 g L<sup>-1</sup>) que el isómero  $\alpha$ -lactosa (70 g L<sup>-1</sup>) (McSweeney, 2009). Por lo tanto, la  $\alpha$ -lactosa suele cristalizar en algunos productos lácteos. Por lo tanto, el isómero α cristalizará primero en una solución sobresaturada de lactosa, como un suero de queso concentrado. Estos cristales son rígidos, ligeramente higroscópicos, muy grandes y se disuelven lentamente (Walstra, P. W. et al., 2006). Mientras que la  $\beta$ -lactosa forma cristales anhidros, por lo que el rendimiento de  $\alpha$ -lactosa es ~5% mayor que el de  $\beta$ -lactosa.

La lactosa puede ser separada de la leche o del suero a partir de un proceso de cristalización. La lactosa cristalizada es producida en grandes cantidades y puede ser utilizada por la industria alimenticia como materia prima para la producción de derivados químicos o enzimáticos, como lactitol, lactulosa y oligosacáridos (Walstra, P. W. et al., 2006). Éste carbohidrato también puede usarse como fuente de carbono para la producción de bacterias ácido lácticas (LAB), o la producción de ácido láctico (McSweeney, 2009). En la industria farmacéutica, la lactosa se utiliza como excipiente de medicamentos (S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011). La lactosa posee la ventaja de tener una superficie lisa y un mejor flujo, por lo que mejora la administración de los fármacos a las vías respiratorias inferiores a partir de inhaladores de polvo seco. Este tipo de sistema de administración de fármacos, necesita excipientes con una distribución de tamaño de partícula estrecho con una forma regular y una alta pureza de los cristales (S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011).



Cristalina	Monohidratada	α-Lactosa
	Anhidra	α-Lactosa inestable
		α-Lactosa estable
		β-Lactosa
Amorfa		Mezcla de β-Lactosa y α-
		Lactosa

**Tabla 1**. Formas conocidas de Lactosa (Listiohadi, 2005).

#### 2.2 Suero de queso

El suero de queso es el principal subproducto de la industria láctea, y se crea como resultado del procesamiento del queso tras la coagulación de las proteínas (Das, B. et al., 2015). Este subproducto contiene una gran cantidad de nutrientes como lactosa (4.5 a 5% p/v), proteínas solubles (0.6 a 0.8% p/v), lípidos (0.4 a 0.5% p/v) y sales minerales (8 a 10% del extracto seco). Las proteínas solubles presentes en el lactosuero son  $\alpha$ -lactolbumina ( $\alpha$ LA) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG), con pequeñas cantidades de albúmina sérica e inmunoglobulinas (Chandrapala et al., 2011). Anteriormente, el lactosuero era considerado como un producto de desecho y era utilizado como alimento para animales de granja o descartado en campos o alcantarillas. Consideraciones económicas y ambientales dictan que se debe de hacer un mejor uso de este subproducto. Gracias a esto y a sus nutrientes, el lactosuero puede ser usado como una fuente de bajo costo para la obtención de lactosa y proteínas, que pueden ser empleadas en las industrias alimenticia, láctea y farmacéutica (R. Bund & A. Pandit, 2007).

En lo que respecta a la producción de suero de queso en Chihuahua, aproximadamente un 85% del total de la leche utilizada en la manufactura del queso es descartada como suero (R. Bund & A. Pandit, 2007). En 2015, Chihuahua ocupó el cuarto lugar a nivel nacional con 1,034,227 miles de litros de leche, de los cuales se destinó aproximadamente un 38% al procesamiento de



queso, por lo tanto, la producción de lactosuero representa la generación de más de 300,000 litros de suero (SIAP-SAGARPA, 2016).

#### 2.2.1 Recuperación de la lactosa a partir de suero de queso

Las técnicas utilizadas para la recuperación de lactosa se describen en la Figura 1. Cómo se puede observar, es un proceso largo y costoso, que consta de varias etapas. Además, la fase de cristalización de lactosa provee de una lactosa de muy baja calidad, y los rendimientos de cristalización son escasos. Uno de los métodos más antiguos utilizados para mejorar el proceso de cristalización es la siembra de lactosa. Este enfoque consiste en la adición de pequeños cristales de lactosa en el suero concentrado (siembra de núcleos) justo antes de la segunda etapa de enfriamiento. La adición de cristales de lactosa puede inducir una nucleación secundaria que acelera el proceso de cristalización y reduce la CSD (Zamanipoor & Mancera, 2014). Sin embargo, este método tiene baja reproducibilidad porque su éxito depende de la adición de cristales en el momento adecuado (de Castro & Priego-Capote, 2007). Más recientemente, se han explorado métodos alternativos tales como el uso de anti- solvente, la adición de carragenina o sonocristalización para ayudar a la cristalización de lactosa. La adición de compuestos no disolventes en el suero concentrado (cristalización anti- solvente) disminuye la solubilidad de la lactosa, estrecha la zona metaestable y reduce los tiempos de inducción de la nucleación. Los principales inconvenientes de la cristalización con anti- solvente son las grandes cantidades de disolvente utilizado y los costosos pasos de separación y purificación requeridos para eliminar estos compuestos del producto. En general, la cristalización con anti- solventes mejora el rendimiento de la cristalización y reduce el tamaño de los cristales de lactosa (S. Patel & Z. Murthy, 2011; S R Patel & Murthy, 2009). Los principales inconvenientes de la cristalización anti- solvente son las grandes cantidades de disolvente utilizado y los costosos pasos de separación y purificación requeridos para eliminar el anti-



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

solvente del producto (Kougoulos, Marziano, & Miller, 2010; Zamanipoor & Mancera, 2014).

Comúnmente, la lactosa se cristaliza en presencia de impurezas, tras la centrifugación para la remoción de grasa, el suero es desproteinizado, dejando un remanente de proteínas del suero que va de 0.1 a 0.2% (Figura 1). Según lo reportado por la bibliografía, las proteínas del suero tienen un impacto significativo en la cristalización de la lactosa (T. Huppertz & Gazi, 2016; Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018; Sánchez-García et al., 2019). Por una parte, las proteínas reducen la distribución de tamaño de los cristales de lactosa (Sánchez-García et al., 2019) y aceleran la cristalización (Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018). Sin embargo, las proteínas del suero inducen la formación de lactosa amorfa, disminuyen la pureza de los cristales de lactosa (Sánchez-García et al., 2019) y disminuyen el rendimiento de cristalización (R. K. Bund & A. B. Pandit, 2007), mermando la calidad de los cristales, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas para el manejo de las proteínas en la cristalización de la lactosa.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Figura 1. Esquema del proceso de recuperación de lactosa del suero de queso (Sánchez-García et al., 2018)

MICHS FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



#### 2.3 Cristalización de la lactosa

La cristalización de la lactosa es un proceso industrial importante y paso final de una serie de operaciones a partir de suero de queso. Consiste en tres fases: la sobresaturación, la nucleación (aparición de los cristales) y por último, el crecimiento de los cristales (Zisu et al., 2014). La lactosa puede existir en varias formas cristalinas y no cristalinas (Tabla 1). Estas formas afectan el comportamiento de la lactosa, principalmente en el procesamiento y almacenamiento de productos derivados de dicho disacárido (McSweeney, 2009).

#### 2.3.1 Supersaturación

La sobresaturación de soluciones de lactosa es el primer paso en el proceso de cristalización ya que se requiere una condición de no equilibrio para la generación espontánea de núcleos de lactosa (Erdemir, 2009). A cualquier temperatura dada, se puede disolver una cantidad máxima de soluto en un solvente. Cuando una solución se satura con un soluto, se considera que está en equilibrio termodinámico. Cualquier incremento adicional en la concentración por encima del punto de saturación (solubilidad) perturba el equilibrio e induce un estado de pseudo- equilibrio o supersaturación. La nucleación y, por lo tanto, la cristalización no se producirá en el punto de supersaturación (al menos no espontáneamente) ya que la energía disponible es insuficiente para inducir la formación del núcleo. Sin embargo, más allá del estado de pseudo- equilibrio (zona lábil), la nucleación tiene lugar espontáneamente. La región entre la solubilidad y la súper solubilidad (supersaturación) se conoce como la zona metaestable (MZ). El ancho de esta región (MZW) se obtiene representando la solubilidad y la súper-solubilidad del soluto en función de la temperatura. A partir de estas curvas, es posible establecer la temperatura y la concentración de solutos requeridas en un proceso de cristalización (Wong & Hartel, 2014; Zamanipoor & Mancera, 2014). El proceso convencional de cristalización de lactosa tiene un amplio MZW, lo que significa



que es necesaria una sobresaturación muy alta para inducir la nucleación (<u>Figura</u> <u>2</u>) (Dhumal et al., 2008; Raghavan et al., 2000).



Concentración de la solución de lactosa (g g-1)



#### 2.3.1.1 Mutarrotación

Independientemente de la forma de la lactosa que se adicione a una solución, la rotación óptica cambiará con el tiempo, a medida que se alcance el equilibrio entre las formas de  $\alpha$  y  $\beta$ - lactosa. El cambio de rotación y la conversión de una forma a otra en solución se llama mutarrotación (<u>Figura 3</u>) (Holsinger, 1997). La mutarrotación en solución puede ser seguida por medios de mediciones polarimétricas (Visser, 1982); este comportamiento proporciona un método útil



para determinar, por ejemplo, la cantidad de lactosa cristalina presente en los polvos de suero secados por aspersión (Holsinger, 1997).

Actualmente se cree que la mutarrotación de lactosa implica la formación de la forma de aldehído libre de la unidad de glucosa que se inicia mediante la protonación del O5, seguida de la rotura del enlace O1-H. El estado inicial en el esquema de reacción es la forma  $\alpha$ , (Figura 3), su rotación óptica estándar se ha medido como +89.4 °. El estado final en el proceso de interconversión, como se describe en el esquema de reacción, es la forma  $\beta$  y su rotación óptica estándar es +35 ° (Walstra et al., Jawad et al., 2012; 2006). El equilibrio de establecerá a [ $\alpha$ ] °D = +55.3° a 20 °C, lo que representa ~37%  $\alpha$ -lactosa y 63% de  $\beta$ -lactosa. El radio de  $\beta/\alpha$  puede modificarse por la temperatura, pero es independiente del pH (Morrissey, 1985). La mutarrotación de la lactosa también puede ser modificada por la presencia de impurezas como sales, ácidos orgánicos y otras sustancias (Parimaladevi & Srinivasan, 2014).

Durante la etapa de enfriamiento, la lactosa se mueve a través de la MZ. La nucleación espontánea de la lactosa ocurre cuando se excede la sobresaturación, es decir, fuera del MZ (T. Huppertz & Gazi, 2016; Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018). Por lo tanto, el ancho del MZ determina la caída de temperatura necesaria para inducir la nucleación de lactosa (Luque de Castro & Priego-Capote, 2007). Después de la nucleación, el crecimiento de los cristales depende de la saturación de lactosa y de la temperatura, ya que esta última afecta la solubilidad de la lactosa (Bhargava, 1996). El proceso general de cristalización de la lactosa es lento, por lo que la mutarrotación puede ocurrir durante la nucleación o el crecimiento de los cristales. Sin embargo, si la tasa de mutarrotación dominará sobre la



nucleación y el crecimiento de cristales (Kirk, Dann, & Blatchford, 2007; H. Siddique et al., 2015).



**Figura 3**. Representación del mecanismo de mutarrotación de la lactosa basada en el sistema publicado por Jawad et al., (2012).

#### 2.3.2 Nucleación

El proceso de cristalización consta de dos fases: la primera es la formación de soluciones sobresaturadas, debido a que la aparición de una nueva fase se da cuando el sistema no está en equilibrio. La segunda fase consta de la agregación de las moléculas disueltas en la solución lo que provoca la consecuente nucleación, la cual es la base de la cristalización (Erdemir, 2009). La nucleación es, por lo tanto, la creación de conjuntos de nuevas moléculas (McLeod et al., 2011), y a su vez, la velocidad de nucleación puede definirse, como el cambio en el número de partículas en el tiempo (Dincer et al., 2009).

La descripción termodinámica del proceso de nucleación fue desarrollada en el siglo 19 por Joshia Gibbs. Se definió a la energía libre de cambio que es requerida



para la formación de agregados ( $\Delta$ G) como la suma de la energía (libre de cambio) necesaria para un cambio de fase ( $\Delta$ G<sub>v</sub>) y la energía (libre de cambio) requerida para la formación de una superficie nueva ( $\Delta$ G<sub>s</sub>). La principal fuerza para que la cristalización inicie a partir de una solución sobresaturada es el sobreponerse a la deposición (Erdemir, 2009). Como el sólido es más estable que el líquido,  $\Delta$ G<sub>v</sub> es un término negativo y tiende a reducir la energía libre de Gibbs del sistema. En cambio, la introducción de un sólido al líquido aumenta la energía libre de Gibbs de manera proporcional a la superficie del agregado formado. Como resultado, el crecimiento del núcleo va a depender directamente de la competición entre  $\Delta$ G<sub>v</sub> que favorece el crecimiento y  $\Delta$ G<sub>s</sub> que favorece la disolución. A medida que el tamaño del agregado aumenta pasa a un tamaño crítico (rc), por encima del cual la energía libre total disminuye continuamente y el crecimiento es termodinámicamente favorable resultando en la aparición de un núcleo (Erdemir, 2009).

Existen dos tipos de nucleación: nucleación primaria y nucleación secundaria (Figura 4). La primera ocurre cuando un cristal es nucleado en una solución sin cristales pre- existentes; si la nucleación se realiza en una solución sin fases sólidas es denominada nucleación homogénea. En cambio, sí en la creación de los cristales está involucrada una fase sólida diferente a la de la solución se trata de una nucleación heterogénea. Finalmente, la nucleación secundaría es la inducción de la cristalización a partir de un cristal pre- existente, actuando como bases para la creación de nuevos cristales (de Castro & Priego-Capote, 2007).





Figura 4. Clasificación del proceso de nucleación (de Castro & Priego-Capote, 2007).

#### 2.3.3 Crecimiento de los cristales

El crecimiento de cristales de lactosa está controlado por varios factores, pero la variable clave que determina la tasa de nucleación es la sobresaturación (McLeod et al., 2011). Si la nucleación es rápida, muchos cristales se forman simultáneamente, y crecerán hasta tamaños aproximadamente idénticos. Por el contrario, si la nucleación es lenta y se cristalizan menos cristales a la vez, la sobresaturación en la solución disminuye lentamente, la nucleación de nuevos cristales continúa y la solución presenta una distribución de tamaños de cristal más amplia (CSD) (Vekilov, 2010). Otras variables que afectan el crecimiento del cristal son la temperatura, la viscosidad, el pH, la presencia de sales y las proteínas de suero; que modifican los niveles de sobresaturación y, en consecuencia, la nucleación y el crecimiento del cristal (Bhargava, 1996; Thom Huppertz & Gazi, 2015a; A Pisponen et al., 2014). Hablando de impurezas como





sales y proteínas, estas pueden acelerar o inhibir el crecimiento del cristal. Las impurezas inducen una nucleación heterogénea y se incorporan frecuentemente en la red cristalina. Además, la presencia de impurezas afecta la solubilidad y la súper-solubilidad de la sustancia que se cristaliza, modificando la nucleación y el crecimiento del cristal. Está bien establecido que las sales pueden aumentar o disminuir la velocidad de crecimiento de los cristales de lactosa. La presencia de cloruro de calcio, lactato de calcio, sulfato de magnesio y cloruro de litio aumenta la velocidad de cristalización, a diferencia del fosfato de potasio (Bhargava, 1996). Del mismo modo, las proteínas de suero promueven la nucleación, pero ralentizan el crecimiento de los cristales de lactosa. Este efecto se atribuye a su alta capacidad de retención de agua que crea áreas de sobresaturación de lactosa, que son favorables para la nucleación (Thom Huppertz & Gazi, 2015a).

#### 2.3 Alternativas al proceso tradicional de cristalización de lactosa.

Como ya se mencionó anteriormente (<u>sección 2.2.1</u>) se han estudiado diferentes enfoques para superar los inconvenientes de la cristalización de la lactosa. Algunos de estos enfoques son la siembra de núcleos de lactosa, el uso de antisolventes (es decir, etanol y acetona) y la aplicación de ultrasonidos de alta potencia (Y. I. Sánchez-García et al., 2021). En esta sección se describen otras dos alternativas al proceso tradicional de cristalización de lactosa: adición de carragenina y polifenoles.

#### 2.3.4 Carragenina

Los polisacáridos (pectina, almidón modificado, goma xantana, goma de algarrobo, goma guar, alginato, etc.) son conocidos por su uso como aditivos alimentarios funcionales y se utilizan para mejorar la textura y viscosidad de los productos finales (Błaszak, Gozdecka, & Shyichuk, 2018; Černíková et al., 2008). Por su parte, las carrageninas son polisacáridos particularmente importantes en la



industria alimentaria, debido a su capacidad de formación de gel termorreversible (Ikeda, 2001).

Las carrageninas son polisacáridos de la pared celular de las algas rojas (*Rhodophycae*). Son polímeros lineales, con una estructura de cadena principal de residuos de galactosa enlazados  $\alpha$ -1, 4 y  $\beta$  -1, 3 alternados (Figura 5) (Drohan, 1997). Hay tres fracciones principales ( $\kappa$  — kappa,  $\iota$  — iota y  $\lambda$  — lambda) con número y posición variables de grupos sulfato en el dímero de galactosa (Černíková et al., 2008), que imparten una carga negativa a las moléculas e influyen en su funcionalidad (Drohan, 1997). K tiene un sulfato en el dímero de galactosa,  $\iota$  tiene dos y  $\lambda$  tiene tres (Langendorff, 2000).

ι- y κ-carragenina en solución acuosa experimentan una transición de espiral (dependiente de la temperatura, estado desordenado) a hélice (ordenada) (Cerníková et al., 2008). La temperatura de transición depende principalmente del ambiente iónico. La formación de hélice está estrechamente asociada con la gelificación, aunque aún no se comprende la relación exacta entre los dos eventos (Stephen, 2016). La formación de gel requiere la agregación en hélice para kcarragenina. Ambas carrageninas pueden formar geles. La k-carragenina generalmente forma geles firmes y quebradizos y la l-carragenina genera geles suaves y elásticos. La fuerza del gel formado por ambos polisacáridos está fuertemente influenciada por la presencia de cationes. La κ-carragenina es especialmente sensible al potasio y la i-carragenina a los iones de calcio (Černíková et al., 2008). Por otro lado, la  $\lambda$ -carragenina, adopta una conformación en espiral independientemente de las condiciones iónicas y de temperatura y no puede formar geles (Langendorff, 2000). La carragenina se utiliza como agente gelificante en productos cárnicos, salchichas e incluso alimentos enlatados para mascotas. El mercado de carragenina es el cuarto mercado de hidrocoloides más



grande del mundo y el mayor mercado de derivados de algas marinas. Se estima que su producción global está en el rango de aproximadamente 70,000 TM año<sup>-1</sup> a más de 110,000 TM año<sup>-1</sup>(Błaszak et al., 2018). Además, las carrageninas se utilizan como agentes espesantes y estabilizantes en la industria láctea (Černíková et al., 2008).



**Figura 5.** Repetición de estructuras de disacáridos de (a) λ-carragenina (R= H o  $SO_3^{-}$ ) y (b) ι-carragenina (R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub> =  $SO_3^{-}$ ), κ-carragenina (R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>=  $SO_3^{-}$ ).

# 2.3.4.1 Efecto de la adición de la carragenina en el proceso de cristalización de lactosa

La cristalización de azúcares es importante en los productos alimenticios (Hartel & Shastry, 2009). Durante décadas, productos como los jarabes de maíz, los azúcares invertidos, la gelatina, las grasas y los sólidos lácteos, han sido utilizados por la industria de la confitería para controlar el azúcar. Se han utilizado oligosacáridos de jarabe de maíz para reducir la tasa de crecimiento de los cristales de sacarosa (Tjuradi, 1995). De manera similar, se ha informado que los



sacáridos de jarabe de maíz reducen la Tg e inhiben la cristalización de la sacarosa amorfa. Por su parte, Kouassi et al., (2002), incorporaron  $\kappa$ - carragenina a un sistema de lactosa-sacarosa-invertasa como agente formador de redes, inmovilizando a los cristales a crecer; sugiriendo que los efectos de la carragenina podrían no prevenir la formación de cristales, pero si retrasar su crecimiento. En el mismo sentido, Sánchez-García et al., (2018), probaron el efecto de la  $\kappa$ -carragenina sobre la cristalización de la lactosa. Se reportó que la adición de una pequeña cantidad del hidrocoloide aniónico (150 mg L<sup>-1</sup>) en la solución de lactosa aceleró la cristalización de lactosa. Además, la interacción de los agregados de carragenina con las proteínas de suero generó el tamaño más pequeño de cristales (6 µm), la distribución de tamaño de cristal (CDS) más estrecha y disminuyó la formación de lactosa amorfa. A pesar de estos resultados, todavía no está claro si los cambios en la mutarrotación, solubilidad y sobresaturación de la lactosa están involucrados en el efecto de las carrageninas sobre la cristalización de la lactosa.

#### 2.3.5 Flavonoides

Recientemente, ha habido un interés creciente por parte de los consumidores y productores de alimentos por aditivos alimentarios más saludables, como los flavonoides (Nasser Abdulatif Al-Shabib et al., 2018). Los flavonoides, son una especie de compuestos fenólicos, se distribuyen ampliamente en plantas y frutas (Tabla 2). La estructura primaria de los flavonoides consta de dos estructuras: grupos benzopirano (anillos A y C) y fenilo (anillo B). La variación en el anillo C y el enlace entre los grupos benzopirano y fenilo es la base para la clasificación de los flavonoides, incluidas las flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Figura 6) (Li et al., 2018). En las plantas, los flavonoides protegen contra herbívoros, microorganismos y radiación ultravioleta (Heim, 2002). En los seres humanos, se han asociado efectos positivos para la salud con el consumo de flavonoides, la tabla 2 muestra los beneficios de algunos de estos compuestos.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Figura 6. Clasificación de los antioxidantes fenólicos.



Flavonoide	Fuente	Beneficios
Apigenina	Perejil (Shahidi &	Terapia prometedora contra la neuroinflamación crónica en la
	Ambigaipalan, 2015),	enfermedad de Alzheimer (Venigalla, 2015).
	apio (El Gharras,	
	2009), flores de la	
	planta de manzanilla,	
	toronja (Venigalla,	
	2015)	
Catequina	Vino tinto (Katalinić et	Neutralización de radicales libres y disminución del riesgo de
	al., 2004), te verde	cáncer al detener el crecimiento celular en los tumores,
		mejora la pérdida y el mantenimiento de peso (Cory et al.,
		2018).
		Posee actividades anticancerígenas, antidiabéticas,
		antimicrobianas, cardioprotectoras y neuroprotectoras (P. R.
		Das & Eun, 2018).
Cianidina	Mora (El Gharras,	Colorante alimentario (De Ugaz, 1997).
	2009), cereza,	
	frambuesa, fresa, uvas	
	(Shahidi &	
	Ambigaipalan, 2015)	
Epicatequina	Albaricoque, cereza,	Posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias,
	uva, melocotón, mora,	antibacterianas, anticancerígenas, antihipertensivas,
	manzana, té verde, té	neuroprotectoras y reductoras del colesterol (Budziak-
	negro, vino tinto, sidra	Wieczorek & Maciolek, 2021). Está asociada con efectos anti-
	(El Gharras, 2009)	obesogénicos (Cory et al., 2018).
Epigalocatequina	Té verde y negro	Puede neutralizar los radicales libres y disminuir el riesgo de
	(Shahidi &	cáncer al detener el crecimiento celular en los tumores,
	Ambigaipalan, 2015)	mantenimiento del peso (Cory et al., 2018).
Epigalocatequina -	Té (Shahidi &	Puede proteger contra enfermedades similares al Alzheimer y
3 - galato	Ambigaipalan, 2015)	la demencia a través de propiedades antioxidantes,
		inmunomoduladoras y depuradoras que protegen las
		neuronas y la inhibición de los efectos neurotóxicos de la
		proteína beta-amiloide, cuya acumulación está relacionada
		con la enfermedad de Alzheimer, asímismo puede neutralizar
		los radicales libres y disminuir el riesgo de cáncer al detener el
		crecimiento celular en los tumores (Cory et al., 2018).
Genisteína	Soya (El Gharras,	Quimio-prevención de cánceres de mama y próstata,
	2009), leguminosas	enfermedades cardiovasculares y dolencias posmenopáusicas

# Tabla 2. Fuentes y beneficios de algunos flavonoides.



	(Dixon, 2002).	(Dixon, 2002).
Kaempferol	té, brócoli, repollo, col	Actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana,
	rizada, frijoles,	anticancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora,
	escarola, puerro,	antidiabética, antiosteoporótica, estrogénica / antiestrogénica,
	tomate, fresas y uvas)	ansiolítica, analgésica y antialérgica (M Calderon-Montaño,
	y en plantas o	2011).
	productos botánicos	
	comúnmente utilizados	
	en la medicina	
	tradicional (M	
	Calderon-Montaño,	
	2011).	
Liquirritina	Regaliz (Glycyrrhizae	Efecto neuroprotector y un efecto antitumoral (Khosravi &
	radix) (Khosravi &	Sahihi, 2014).
	Sahihi, 2014).	
Leuteolina	Apio, perejil, brócoli,	Reduce el riesgo de contraer hipertensión, enfermedades
	hojas de cebolla,	inflamatorias y cáncer (Lin, 2008).
	zanahorias, pimientos,	
	coles, pieles de	
	manzana y flores de	
	crisantemo (Lin, 2008).	
Naringenina	Cítricos, bergamota,	Posee actividades biológicas, como antioxidantes,
	tomates y otras frutas	antitumorales, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios,
	(Salehi et al., 2019;	antiadipogénicos y cardioprotectores (Salehi et al., 2019).
	Shahidi &	
	Ambigaipalan, 2015).	
Quercetina	Col rizada, cebolla,	Mejora de la salud cardiovascular, enfermedades oculares,
	lechuga, brócoli,	trastornos alérgicos, artritis, reducción del riesgo de cáncer,
	tomate, té, bayas,	entre otros (Lakhanpal, 2007).
	manzanas, aceite de	
	oliva, arándano (El	
	Gharras, 2009; Shahidi	
	& Ambigaipalan, 2015)	
Rutina	Plantas como: Labisia	Las propiedades reductoras de la rutina sobre diferentes
	pumila (Blume) Mez	especies oxidantes como los radicales superóxido, peroxilo e
	(Primulaceae),	hidroxilo proporcionan un efecto antioxidante sustancial.
	Sophora japonica L.	También posee efectos farmacológicos como efectos
	(Fabaceae), Strelitzia	anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios. Además,



reginae Banks ex Aiton	la	rutina	ha	mostrado	superioridades	en	diabetes,
(Strelitziaceae),	hipo	olipidem	ia y d	iferentes tun	nores (Negahdari	et al.,	2021).
Maranta leuconeura E.							
Morren (Marantaceae),							
Eucalyptus spp.							
(Myrtaceae) y Canna							
edulis Ker Gawl							
(Negahdari et al.,							
2021)							

2.3.5.1 Interacción de los polifenoles con los componentes del suero Además de los efectos beneficiosos de los flavonoides, existe una gran cantidad de evidencia sobre la interacción de los flavonoides con los principales componentes de los alimentos, como sacáridos, lípidos y proteínas (N. A. Al-Shabib et al., 2019; Buitimea-Cantua et al., 2018; Yildirim-Elikoglu & Erdem, 2017). Los flavonoides interactúan con las proteínas, formando complejos covalentes o no covalentes. Pueden ocurrir interacciones multi- sitio o multi- dentado entre flavonoides y proteínas. La primera interacción se refiere a varios flavonoides unidos a una molécula de proteína. En contraste, la interacción multi- dentada ocurre cuando un flavonoide se une a varios sitios proteicos o moléculas proteicas (Rawel, 2005). La fuerza de unión de los polifenoles con las proteínas depende de varios factores, los posibles mecanismos implican interacciones covalentes y / o no covalentes que conducen a una unión reversible o irreversible. Las interacciones no covalentes como los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrófobas y las atracciones de van der Waals están involucradas en la unión reversible de proteína-polifenoles. Las interacciones irreversibles se logran principalmente mediante enlaces covalentes formados en condiciones específicas (Yildirim-Elikoglu & Erdem, 2017).

En cuanto a los carbohidratos, los flavonoides forman enlaces de hidrógeno entre los grupos –OH de los flavonoides y los átomos de oxígeno de los enlaces



glicosídicos en los disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Además, se asume que pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas entre sacáridos y flavonoides (L. Jakobek, 2015; Le Bourvellec & Renard, 2012).

# 2.4 Formación de co- cristales

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), un co- cristal es un material cristalino compuesto por dos o más moléculas diferentes que interactúan de forma no iónica en la misma red cristalina (Food and Drug Administration (FDA), 2018). La co- cristalización es una técnica usada para mejorar las propiedades fisicoquímicas de fármacos y algunos otros compuestos (Al-Otaibi, Sheena Mary, Shyma Mary, Panicker, & Thomas, 2019). Asimismo, es una técnica prometedora para modificar la biodisponibilidad (por ejemplo, solubilidad, permeabilidad y estabilidad) y otras propiedades fisicoquímicas para una amplia gama de compuestos bioactivos (Budziak-Wieczorek & Maciolek, 2021). El componente principal de un co- cristal es el ingrediente farmacéutico activo (API), que se asocia con el co- formador a través de interacciones no covalentes, como hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlaces de enlaces halógenos, interacciones  $\pi - \pi \circ \pi$  – catión y fuerzas de van der Waals (Budziak-Wieczorek & Maciolek, 2021; Food and Drug Administration (FDA), 2018; Lara-Ochoa & Espinosa-PÉRez, 2007).

# 3 JUSTIFICACIÓN

El suero de queso se produce como subproducto durante la fabricación de queso y caseína y contiene algunos componentes importantes como lactosa y proteínas. Debido a la enorme producción de lactosuero y a su alto contenido orgánico, es considerado como un problema ambiental y su eliminación crea una dificultad para la industria láctea. Por lo tanto, se buscan alternativas para un aprovechamiento más sustentable. La lactosa, por su parte, que es recuperada a partir del suero de





queso, puede ser utilizada tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica. Sin embargo, este es un proceso largo, costoso y que genera una lactosa de baja calidad. Recientemente, se ha estudiado la adición de carragenina para aumentar la velocidad de cristalización, disminuir el tamaño de los cristales y aumentar el rendimiento del proceso, no obstante, se desconoce si los cambios en la mutarrotación, solubilidad y sobresaturación de la lactosa están involucrados en el efecto de las carrageninas sobre la cristalización de lactosa. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo, en una primera fase, fue evaluar como la presencia de un biopolímero como carragenina modifica algunas propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución como la solubilidad, mutarrotación y la supersaturación.

Por otro lado, se ha reportado que la lactosa se cristaliza típicamente en presencia de impurezas como las proteínas del suero. Según lo informado por diferentes autores, las proteínas del suero tienen un impacto significativo en la cristalización de la lactosa. Por ejemplo, las proteínas reducen la distribución de tamaño de los cristales de lactosa y aceleran la cristalización. Además, las proteínas del suero inducen la formación de lactosa amorfa, disminuyen la pureza de los cristales de lactosa y disminuyen el rendimiento de cristalización. La incorporación de proteínas de suero en la red cristalina sugiere la formación de co- cristales de proteína de lactosa. Existe una gran cantidad de evidencia sobre la interacción de los flavonoides con los principales componentes de los alimentos, como los sacáridos, los lípidos y las proteínas. Los flavonoides interactúan con las proteínas, formando complejos covalentes o no covalentes. Por lo que, la segunda fase de este estudio plantea la hipótesis de que la incorporación de flavonoides antes de la cristalización de las soluciones de proteína de suero y lactosa formará co- cristales de lactosa, flavonoides y proteínas, debido a que los flavonoides pueden interactuar tanto con la lactosa como con las proteínas.





# 4 HIPÓTESIS.

La presencia de un biopolímero como carragenina modificará algunas propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución como la solubilidad, mutarrotación y la supersaturación, lo cual podría tener un impacto favorable en la cristalización de la lactosa. Por otra parte, la adición de biomoléculas como polifenoles en el lactosuero antes de la cristalización de las soluciones de proteína de suero y lactosa formará co- cristales de lactosa, flavonoides y proteínas, debido a que los flavonoides pueden interactuar tanto con la lactosa como con las proteínas, generando así un ingrediente funcional.

# 5 OBJETIVO.

# 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar como la presencia de biomoléculas como las proteínas del suero, carragenina y flavonoides modificarán algunas propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución, así como el proceso de cristalización de la lactosa.

# 5.20BJETIVOS PARTICULARES (Fase 1)

- 5.2.1 Evaluar como la presencia de un biopolímero como carragenina modifica algunas propiedades fisicoquímicas de la lactosa en solución como la solubilidad, mutarrotación y la supersaturación (Fase 1).
- 5.2.2 Evaluar las propiedades reológicas de ι y κ- carragenina.
- 5.2.3 Evaluar el efecto de la adición de ι y κ- carragenina sobre la solubilidad de la lactosa.
- 5.2.4 Determinar el porcentaje de  $\alpha$  y  $\beta$  lactosa, así como la proporción  $\beta/\alpha$  denominada Km.



- 5.2.5 Evaluar el efecto de la adición de ι y κ- carragenina sobre la supersaturación relativa (S) y supersaturación absoluta (Cα - Cαs) de α- lactosa.
- 5.2.6 Generar curvas de solubilidad a partir de soluciones de lactosa sobresaturadas adicionadas con distintos polímeros.
- 5.2.7 Evaluar el efecto de la adición de ι y κ- carragenina sobre la zona metaestable.

# 5.3 OBJETIVOS PARTICULARES (Fase 2)

- 5.3.1 Determinar como la adición de biomoléculas como polifenoles antes de la cristalización de las soluciones de proteína de suero y lactosa va a formar co- cristales de lactosa, flavonoides y proteínas, debido a que los flavonoides pueden interactuar tanto con la lactosa como con las proteínas, generando así un ingrediente funcional (Fase 2).
- 5.3.2 Evaluar por medio de química teórica la interacción polifenoles-proteína.
- 5.3.3 Evaluar de manera experimental (con los polifenoles elegidos de manera teórica) el efecto que tienen los polifenoles en las proteínas de suero.
- 5.3.4 Evaluar el efecto de la adición de polifenoles sobre parámetros cinéticos de cristalización (velocidad de cristalización y velocidad de crecimiento), el tamaño y número de los cristales de lactosa, el rendimiento de cristalización y la cristalinidad en suero de queso.
- 5.3.5 Crear co- cristales de lactosa, proteína y flavonoides a partir de soluciones modelo.



# 6 METODOLOGÍA GENERAL



Figura 7. Esquema general de la metodología seguida para cumplir con los objetivos planteados.



# 7 MATERIALES Y MÉTODOS

# 7.1 FASE 1:

# 7.1.1 Materiales

La  $\alpha$ -lactosa monohidratada ( $\alpha$ LM) se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Las carrageninas utilizadas en este estudio fueron iota- y kappa-carragenina. La carragenina lambda no se incluyó porque este tipo de carragenina tiene una formación de espiral aleatoria a todas las temperaturas y no puede formar geles. La  $\iota$ -carragenina de algas *Eucheuma spinosum* se obtuvo de Sigma-Aldrich (artículo: C1138, St. Louis, MO). La  $\kappa$ -carragenina de algas (con trazas de  $\lambda$ carragenina) se obtuvo de un productor local (A&N, Chihuahua, México). El agua desionizada (> 18 MΩcm) se obtuvo de un sistema de purificación de agua ultrapura (Thermo Scientific, D8611, Dubuque, IO).

# 7.1.2 Diseño de experimentos.

Se utilizó un diseño factorial para evaluar el efecto de la adición de las carrageninas sobre la solubilidad y sobresaturación de la lactosa. Este diseño involucró un factor categórico (x1 = tipo de carragenina) y dos factores numéricos (x2 = concentración de carragenina y x3 = temperatura de la solución de lactosa). Para estas variables, los niveles fueron x1: sin carragenina, con I-carragenina y con  $\kappa$ -carragenina; x2: 0, 150 y 300 mg L<sup>- 1</sup>; x3: 60, 40, 25 y 10 °C. En total, se realizaron 24 tratamientos (Tabla 5), y cada tratamiento se realizó por triplicado. Los datos recopilados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias múltiples (análisis de Tukey-Kramer) con el software Minitab 16 (Minitab Inc. State College, PA).

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



# 7.1.3 Propiedades viscoelásticas de las soluciones de lactosa

La viscosidad compleja ( $\eta$  \*) en soluciones de lactosa se midió usando un reómetro oscilante AR2000ex, una placa de aluminio ( $\emptyset$  4.0 cm, 0 °) y una trampa de solvente (60 mm) para evitar la evaporación de la muestra (TA Instrument, New Castle, DE, EUA). Se estableció la región viscoelástica lineal (LVR) con un barrido de deformación a diferentes frecuencias. Las pruebas de oscilación se realizaron con una rampa de temperatura de 10 a 60 °C a una frecuencia fija de 0.5 Hz y una deformación del 1%. Los datos recopilados se analizaron utilizando Rheology Advantage Data Analysis V5.7 (TA Instruments, New Castle, DE).

#### 7.1.4 Medición de anómeros $\beta / \alpha$ en soluciones de lactosa.

Las mediciones de rotación óptica estimaron la proporción de anómeros  $\beta$  /  $\alpha$  en soluciones de lactosa. Para ello, se utilizó un polarímetro Polax-2L (ATAGO Co. Ltd, Tokio, Japón) que emite una radiación monocromática de línea D de sodio ( $\lambda$ = 589 nm), y una celda cilíndrica con un recorrido de 100 mm (1 dm). La rotación óptica observada ([α] °D) en las soluciones de lactosa se calculó con la Ecuación (1), donde  $\alpha$  era el ángulo de ración, *l* era la longitud del camino celular (dm) y C era la concentración de lactosa en la solución (g 100 mL<sup>-1</sup>). Primero, se midieron las soluciones de lactosa sin carragenina (control) a lo largo del tiempo (400 min) a 25 °C para estimar la rotación óptica de  $\alpha LM$  ([ $\alpha_{\alpha-LM}$ ]°) y  $\beta$ -lactosa ([ $\alpha_{\beta-L}$ ]°). Los cambios en la rotación óptica ( $[\alpha]^{\circ}_{D}$ ) con el tiempo (t) fueron graficados (Figura 8) y ajustados a una función de decaimiento exponencial (Ecuación (2)). En esta ecuación, el término a denota la amplitud de desintegración, Mk es la tasa de mutarrotación y [a g-LM / B-L] <sup>o</sup>eam es el valor de rotación óptica en equilibrio. La interpolación y extrapolación de la Ecuación (2) permitió obtener la rotación óptica de las soluciones de lactosa en el tiempo cero ( $[\alpha \alpha-LMH / \beta-L]^{\circ}$  to), y el tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarrotación (t<sub>Megm</sub>). Luego, se escribió la Ecuación (3) conociendo el valor de  $[\alpha_{\alpha-LMH/\beta-L}]^{\circ}$  to y la pureza de los cristales de  $\alpha LM$  (99%);



donde f  $_{\alpha-LM}$  y f  $_{\beta-L}$  era la fracción de  $\alpha LM$  y  $\beta L$  en la solución de lactosa en el equilibrio de mutarrotación. La ecuación (4) se desarrolló con [ $\alpha \alpha-LMH / \beta-L$ ]° eqm y considerando los datos de referencia de f  $\alpha-LMH$  y f  $\beta-L$  para soluciones de lactosa a 25 °C (T. Huppertz & Gazi, 2016; Jawad et al., 2012; Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018). Luego, se estimaron [ $\alpha\alpha-LMH$ ]° y [ $\alpha\beta-L$ ]° (73.213° y 35.195°, respectivamente) resolviendo las ecuaciones (3) y (4) simultáneamente. Finalmente, se utilizaron las ecuaciones (5) y (6) para calcular el valor de f  $_{\alpha-LMH}$  y f  $_{\beta-L}$  en soluciones de lactosa con carragenina en equilibrio de mutarrotación.

$$[\alpha]^{\circ}_{D} = \frac{100 \times \alpha}{l \times C}$$
(1)

$$[\alpha]^{\circ}_{D} = ae^{-M_{k}t} + [\alpha_{\alpha-\text{LMH}/\beta-\text{L}}]^{\circ}_{eqm}$$
<sup>(2)</sup>

 $[\alpha_{\alpha\text{-LMH}/\beta\text{-L}}]^{o}_{t0} = (f_{\alpha\text{-LMH}} \times [\alpha_{\alpha\text{-LMH}}]^{o}) + (f_{\beta\text{-L}} \times [\alpha_{\beta\text{-L}}]^{o})$ 

$$\therefore 72.83 = (0.99 \times [\alpha_{\alpha-LMH}]^{0}) + (0.01 \times [\alpha_{\beta-L}]^{0})$$
(3)

 $[\alpha_{\alpha\text{-LMH}/\beta\text{-L}}]^{o}_{eqm} = (f_{\alpha\text{-LMH}} \times [\alpha_{\alpha\text{-LMH}}]^{o}) + (f_{\beta\text{-L}} \times [\alpha_{\beta\text{-L}}]^{o})$ 

$$\therefore 49.26 = (0.37 \times [\alpha_{\alpha-LMH}]^{0}) + (0.63 \times [\alpha_{\beta-L}]^{0})$$
(4)

$$f_{\alpha LMH} = \frac{\left[\alpha_{\beta-L}\right]^{\circ} - \left[\alpha_{\alpha-LMH}/\beta-L\right]^{\circ} e_{qm}}{\left[\alpha_{\beta-L}\right]^{\circ} - \left[\alpha_{\alpha-LMH}\right]^{\circ}}$$
(5)

$$f_{\beta L} = \frac{\left[\alpha_{\alpha-LMH}\right]^{\circ} - \left[\alpha_{\alpha-LMH}/\beta - L\right]^{\circ} e_{qm}}{\left[\alpha_{\alpha-LMH}\right]^{\circ} - \left[\alpha_{\beta-L}\right]^{\circ}}$$
(6)





**Figura 8**. Rotación óptica observada ( $[\alpha \ obs]^\circ$  D) a lo largo del tiempo en solución de lactosa (10% p/v) sin carragenina (control) a 25 °C. Datos ajustados a decaimiento exponencial, donde *a* es el decaimiento exponencial, *Mk* es la tasa de mutarrotación, *t* es el tiempo en minutos y  $[\alpha \ \alpha-LMH / \beta-L]^\circ$ <sub>eqm</sub> es la rotación óptica en equilibrio. M <sub>eqm</sub> es el tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarrotación y  $[\alpha \ \alpha-LMH / \beta-L]^\circ$  to es la rotación óptica de las soluciones de lactosa en el tiempo cero.

#### 7.1.5 Determinación de la solubilidad de la lactosa

Considerando la temperatura y la solubilidad de lactosa de referencia (Visser, 1982) se pesaron cristales de αLM (con un exceso de 2 g) para preparar 50 mL de solución de lactosa. Las soluciones de lactosa se ajustaron (si era necesario) a pH 7 con NaOH (1 N) y se mantuvieron en agitación continua. Algunas soluciones se agregaron con ι- ο κ-carragenina de acuerdo con el diseño del experimento (DDE) descrito en la <u>Sección 7.1.2</u>. Las soluciones de lactosa con / sin carragenina se mantuvieron a 10, 25, 40 o 60 °C en un circulador de baño de agua (Julabo, Allentown, PA) durante 24 h, excepto el tratamiento a 60 °C, que se mantuvo



durante ocho horas. Pasado este tiempo, las soluciones de lactosa se filtraron utilizando filtros con un tamaño de poro de 0.45 μm (Merck Millipore, Billerica, MA). Los filtros con lactosa sin disolver se secaron al vacío a 60 °C y 0,02 atm (15 mm Hg) de presión (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR).

La solubilidad de  $\alpha$ LM ( $_{C s\alpha-LM}$ ) se calculó con la Ecuación (7) y se expresó en gramos de lactosa (monohidratada) por 100 g de H2O. Donde  $m_s$  representaba la masa de lactosa antes de la adición de agua (g),  $m_r$  era la masa de lactosa sin disolver (g) y  $m_w$  era la masa de agua utilizada en la solución de lactosa (g). La solubilidad de la lactosa también se expresó en términos de lactosa anhidra ( $C_s$ ) con la Ecuación (8).

$$C_{s\alpha-LM} = (m_s - m_r) \frac{100}{m_a}$$
(7)

$$C_s = \frac{0.95 C_{s\alpha-LM}}{1 + 0.0005 C_{s\alpha-LM}} \tag{8}$$

#### 7.1.6 Estimación de la supersaturación de lactosa.

La supersaturación de la lactosa (S) en presencia o no de carragenina se calculó con la Ecuación (9) a 60, 40, 25 y 10 °C. En esta ecuación, *F* denota un factor dependiente de la temperatura previamente informado por Visser, 1982 (Visser, 1982); *C* era la concentración de lactosa y  $C_s$  era la solubilidad de la lactosa expresada en términos de lactosa anhidra. La fracción de  $\beta$ L y  $\alpha$ LM (f  $_{\beta L}$  y f  $_{\alpha LM}$ ) se determinó como se describe en la <u>Sección 7.1.3</u>.



$$C_{\alpha} - C_{\alpha s} = \frac{C - C_{s} + F(f_{\beta L}/f_{\alpha LM})(C - C_{s})}{(1 + (f_{\beta L}/f_{\alpha LM}))}$$
(9)

#### 7.1.7 Determinación de la zona metaestable (ZM).

Las curvas de solubilidad y sobresaturación de la lactosa se trazaron juntas y se ajustaron a ecuaciones cuadráticas para calcular la MZ. Las ecuaciones cuadráticas se integraron entre los límites de 10 °C y 60 °C para estimar el área bajo cada curva. La diferencia entre ambas áreas se definió como el MZ de lactosa. El MZW se definió como el cambio de temperatura requerido para mover una concentración específica de lactosa de un estado saturado a uno sobresaturado.

#### 7.1.8 Cromatografía de capa fina (TLC)

La interacción entre carragenina y lactosa se determinó mediante cromatografía en capa fina (TLC), como se describe en Sánchez-García, 2021 (Y. I. Sánchez-García et al., 2021). Para ello, soluciones de lactosa (10% p / v) con o sin carragenina (100 mg L<sup>-1</sup>) fueron analizadas. El análisis de TLC se realizó en placas de gel de sílice (60 F254, Selecto Scientific, Suwannee, GA) y se corrieron con acetato de etilo: ácido acético: 1-butanol: agua (4: 3: 2: 2). Se visualizó la migración de soluciones de lactosa en placas de TLC pulverizando una solución de dihidrocloruro de 1-naftil etilendiamina (0,5% p / v) y calentando a 120 °C durante 5 min.

# 7.2FASE 2.

#### 7.2.1 Materiales

La lactosa anhidra, el hidrato de rutina y la epigalocatequina -3-galato (EGCG) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El agua desionizada (> 18 M $\Omega$ cm)



se obtuvo de un sistema de purificación de agua ultrapura (Thermo Scientific, D8611, Dubuque, IO). Las proteínas de suero obtuvieron de una proteína de suero comercial aislada (WPI, GNC, México).

# 7.2.1.1 Purificación de las proteínas del suero.

Las proteínas de suero se purificaron a partir de una proteína de suero comercial aislada (WPI, GNC, México). Se añadieron lentamente soluciones de WPI al 2% con sulfato de amonio hasta alcanzar el 20% de saturación. A continuación, los precipitados se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 3000 x g (E. L. V. Harris). Las proteínas recolectadas se disolvieron en un pequeño volumen de agua (~ 1 mL) y se concentraron usando un concentrador para centrífuga (30K MWCO) a 3000 x g durante 20 min a 4 ° C. La concentración final de proteína se midió con el método de Bradford descrito en la bibliografía (Bradford, 1976). La presencia de  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ LA) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) (Figura 9). fue corroborada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), el protocolo de elaboración de geles se encuentra en el <u>Apéndice II</u>.





**Figura 9**. SDS- Page de proteína de suero comercial aislada (WPI) aislada con sulfato de amonio al 2%. Línea1: Marcador de peso molecular (MPM); Línea 2: Aislado de proteína de suero (WPI)

#### 7.2.2 Optimización geométrica de polifenoles

Todos los cálculos fueron realizados con el programa Gaussian 09, empleando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) (Hohenberg & Kohn, 1964). Los funcionales utilizados para la validación de los resultados fueron: el método de mecánica cuántica Hartree- Fock, funcional híbrido de energía de intercambio de Becke con tres parámetros semi- empíricos y de energía de correlación de Lee – Yang – Parr (B3LYP) (Becke, 1998) y el funcional meta-GGA hibrido (M06) (Zhao, 2005) desarrollado por el grupo de Truhlar. Estos funcionales se combinaron con el conjunto base tipo 6-311G (d,p) y el modelo continuo de solvatación conocido como CPCM (Tomasi, 1994) usando como solvente agua. Estas metodologías permitieron obtener las optimizaciones geométricas, seguidas de un cálculo de frecuencias, para confirmar que la estructura se encuentra en su estado de





mínima energía. Los datos teóricos se compararon con los datos experimentales provenientes de cristalografía de Rayos- X (A. M. a. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2004). Además, la DFT ha sido ampliamente utilizada para calcular y analizar la reactividad química de moléculas, empleando algunos conceptos químicos tales como: afinidad electrónica (AE) (Lewars, 2003), potencial de ionización (PI) (Lewars, 2003), electronegatividad ( $\chi$ ) (Pearson, 1986), dureza química ( $\eta$ ) (Pearson, 1986), potencial químico ( $\mu$ ) (Parr, 1999) y electrofilicidad ( $\omega$ ) (Parr, 1999) son obtenidos por la diferencia de energía en forma catiónica, aniónica y neutra. Las ecuaciones de los descriptores de reactividad se muestran en la Tabla <u>3</u>.

Tabla 3. Ecuaciones de parámetros	s de reactividad global.
-----------------------------------	--------------------------

Parámetro de reactividad	Ecuación	
Afinidad electrónica (AE)	$A = E_{N=N0} - E_{N=N0+1}$	(10)
Potencial de ionización (PI)	$A = E_{N=N0-1} - E_{N=N0}$	(11)
Electronegatividad (χ)	$X = \frac{1}{2} \left( PI + AE \right)$	(12)
Dureza química (η)	$\eta = \frac{1}{2} \left( PI - AE \right)$	(13)
Potencial químico (µ)	$\mu = -X$	(14)
Electrofilicidad (ω)	$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$	(15)

\* Energía neutra (N=N<sub>0</sub>), aniónica (N=N<sub>0+1</sub>) y catiónica (N=N<sub>0-1</sub>) de la molécula

A continuación, se enlistan, una serie de polifenoles, que fueron seleccionados para determinar la afinidad de estos con las proteínas de suero:  $\alpha$ - lactoglobulina y  $\beta$ - lactoalbúmina ( $\alpha$ -LG y  $\beta$ -LA).

- 1. Quercetina
- 2. Leuteolina
- 3. Epigalocatequina -3 galato



- 4. Epicatequina
- 5. Catequina
- 6. Epigalocatequina
- 7. Rutina
- 8. Apigenina
- 9. Cianidina
- 10. Genisteína
- 11. Kaempferol
- 12. Liquirritina
- 13. Naringenina

# 7.2.3 Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular es un método computacional utilizado para predecir la formación de complejos intermoleculares entre moléculas y proteínas relativamente pequeñas (Jiang et al., 2020). Se utilizó un acoplamiento molecular ciego para obtener una idea del mecanismo de los flavonoides rutina y EGCG con las proteínas de suero αLA y βLG, y las proteínas de suero con lactosa. La estructura de las proteínas del suero αLA y βLA se tomaron del Banco de datos de proteínas (PDB ID ID3b0o y 3NOP, respectivamente). El software PyMOL se utilizó para - ajustar la estructura 3D de αLA y βLG (receptor de proteína) en las condiciones de cálculo. El acoplamiento molecular se calculó con el programa AutoDock 4.2 empleando el algoritmo genético lamarckiano (LGA) (Morris, 1998). Como ligando, se utilizaron las estructuras optimizadas calculadas por DFT: B3LYP / 6-311G (d, p) de los flavonoides (apigenina, categuina, cianidina, EC, EGCG, EGT, genisteína, isoguercitina, kaempferol, liguirritina, luteolina. naringenina, quercetina y rutina). Los acoplamientos de proteína-ligando se realizaron con la interfaz Autodock Vina centrándose en el bolsillo del sitio activo de  $\alpha LA \gamma \beta LA$ . La tolerancia de agrupamiento se estableció en 2.0 Å de la desviación media cuadrática (RMSD) entre el ligando optimizado y el ligando



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

acoplado. Las condiciones para realizar el acoplamiento de  $\alpha$ LA-flavonoides fueron las siguientes: center x =13.91, center y =-26.932, center z =11.567, size x =100, size y =100, size z =118. Los parámetros para el acoplamiento de  $\beta$ LG-flavonoides fue: center x =-13.772, center y =1.706, center z =-0.26, size x =122, size y =106, size z =102. Se utilizó una rejilla de espaciamiento de 0.375 Å en AutoGrid (Morris, 1998). Se consideraron diez posiciones los flavonoides para realizar los cálculos y se seleccionó la que tuviera una menor energía de enlace para el sitio activo.

# 7.2.4 Selección de polifenoles con una alta afinidad hacia el sitio activo de $\alpha$ -LG y $\beta$ -LA

La energía de unión de la proteína y el ligando se analizó para estimar la afinidad (kcal / mol) de cada ligando con las proteínas del suero  $\alpha$ -LG y  $\beta$ -LA. Además, se analizó el tipo de interacciones moleculares que cada ligando presentó con los aminoácidos del bolsillo del sitio activo. Esta información permitió identificar los polifenoles con más posibilidades de unirse a  $\alpha$ -LG y  $\beta$ -LA.

# 7.2.5 Interacción entre proteínas de suero y flavonoides: Estudio experimental.

La interacción proteína-flavonoide se midió mediante turbidimetría y evaluando los grupos amino libres (GAL) en complejos proteína-flavonoide. Las medidas de turbidimetría se realizaron utilizando un lector de microplacas (Elx808, Biotek, EE. UU.). Primero, se prepararon soluciones de proteínas de suero (1 mg mL <sup>-1</sup>) con agua desionizada. Luego, se agregaron diferentes concentraciones de rutina (0.5 a 2 mg mL<sup>-1</sup>) o EGCG (0.5 a 1 mg mL<sup>-1</sup>) a las soluciones de proteína. Los cambios de absorbancia en las soluciones de proteína-flavonoides se siguieron a 595 nm durante 24 horas a 8 °C ± 1 (Liu, Ma, McClements, & Gao, 2017).





La cantidad de GAL se determinó mediante el método de Adler-Nissen (1979), con algunas modificaciones (Adler-Nissen, 1979). Para esto, se mezclaron 0.25 mL de solución de proteína-flavonoide con 2 mL de tampón fosfato (212 mM, pH 8,2) y 2 mL de ácido 2,4,6- trinitrobenzenilsulfónico (TNBSA) (0.01%, p / v). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 2 horas con agitación constante (baño de agua 1217, Shel lab, EE. UU.). La reacción se detuvo mediante la adición de cuatro mililitros de HCI (0.1 N). Luego, se midieron las absorbancias a 430 nm usando un lector de microplacas (Elx808, Biotek, EE. UU.). La cantidad de FAG se estimó con una curva de calibración y se expresó como nanomol de L-leucina por mL de solución (Apéndice 1).

# 7.2.6 Cristalización de soluciones de lactosa- proteína- flavonoides.

Se prepararon soluciones con 30% (p / v) de lactosa y 1% de proteínas de suero. Algunas soluciones de lactosa-proteína se agregaron con rutina (concentración final de 1 mg mL<sup>-1</sup>) o EGCG (concentración final de 0.5 mg mL<sup>-1</sup>). Tras la preparación de las soluciones, se calentaron a 60  $\pm$  2 °C para disolver la lactosa por completo. Las soluciones se enfriaron a 30 °C y después a 8  $\pm$  2 ° C con agitación constante (120 rpm, DS-500, Orbital Shaker, VQR Scientific products, EE.UU.) durante 72 horas. Durante el proceso de cristalización se midieron los cambios de absorbancia a 595 nm (Elx808, Biotek, EE. UU.). Después de 72 horas, todas las soluciones se centrifugaron a 1300 xg durante 30 minutos para recuperar los cristales. Los cristales húmedos se lavaron con etanol y se dejaron secar en un desecador a temperatura ambiente durante 24 horas.

Los cambios en los parámetros cinéticos de cristalización de lactosa se analizaron utilizando el modelo general de nucleación heterogénea (ecuación 10). En esta ecuación, *k* representa la frecuencia de unión de la molécula que conduce a la



formación de cristales y *a* describe la respuesta máxima. Los datos recolectados fueron graficados y ajustados a la ecuación de dependencia del tiempo logístico (ecuación 11) obtenida de la integración de la ecuación 10. Cuando se alcanza la respuesta máxima y = a, y t = 2tc. Por lo tanto, 2tc se consideró el tiempo necesario para completar la cristalización o alcanzar la región de meseta. Finalmente, la tasa máxima de cristalización (*W max*) se calculó como *W max* = ka / 4 (Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018).

$$\frac{d_n(t)}{d_t} = k_n(t) \left[ 1 - \frac{n(t)}{a} \right]$$
(10)

$$n = \frac{a}{1 + e^{-k}(t - t_c)}$$
(11)

#### 7.2.7 Caracterización de los co- cristales de lactosa

# 7.2.7.1 Incorporación de proteína en los cristales de lactosa

Para la cuantificación de la incorporación de proteína en los cristales se realizó la técnica de Bradford con algunas modificaciones para su adaptación a escala de microplacas. Los cristales previamente secados (desecador) se diluyeron con agua. La placa fue leída en un microlector de placas (Biotek, Elx808, EUA) a una longitud de onda de 595 nm después de 5 min de incubación a 25 °C. La determinación de proteína se realizó a partir de la curva de calibración (Apéndice J) realizada con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Los resultados se expresan como mg mL<sup>-1</sup>.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



# 7.2.7.2 Contenido de polifenoles totales en los cristales.

En un tubo de 2 mL se depositaron 50  $\mu$ L de la dilución de los cristales (previamente secados) y agua y 250  $\mu$ L del reactivo de Folin al 0.2 N. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente y en obscuridad durante 5 minutos. Se adicionaron 200  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio (75g L<sup>-1</sup>). Se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L de la solución anterior y se depositó en un pozo de la microplaca. La microplaca con las muestras se colocó en la cámara del microlector y se incubó a temperatura ambiente por 120 minutos. La microplaca se lee a una longitud de onda de 760 nm. La determinación de polifenoles totales se realizó a partir de la curva de calibración (Apéndice 1) realizada con ácido gálico. Los resultados se expresan como mg de GAL mL<sup>-1</sup> de la dilución o bien mg GAL g<sup>-1</sup> de cristales de lactosa (Alvarado-Díaz et al., 2019).

# 7.2.7.3 Distribución del tamaño de cristal (CSD).

Las muestras de co- cristales se resuspendieron en etanol y se colocaron en portaobjetos de vidrio para microscopio para su análisis. Luego, los cristales se observaron con un microscopio óptico (Bx41 Olympus Optical Co. Ltd., Tokio) con una cámara digital (KP-D50, Hitachi Kokusai Electronic Inc., Tokio). Las imágenes tomadas con la cámara del microscopio se analizaron con el software ImageJ (versión 1.43u, National Institutes of Health, EE. UU.). Se realizaron distribuciones estadísticas para estimar la distribución del tamaño de los cristales (CSD) con ~300 mediciones por tratamiento.

# 7.2.7.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Al menos 12 horas antes del análisis, las muestras de cristales (previamente secados en la estufa de vacío) se colocarán en un desecador sobre gel de sílice a 25 °C. Se tomarán muestras de cristales de cada tratamiento (3,5-4 mg) y se



colocarán en bandejas de aluminio que se sellarán después herméticamente. Las propiedades térmicas de los cristales de lactosa se caracterizarán en un calorímetro diferencial de barrido (DSC 200PC, Netzsch, Alemania) bajo una atmósfera de nitrógeno. La calibración del equipo se llevará a cabo con (temperaturas de fusión de 156, 231,9 y 271 °C respectivamente) indio, estaño y bismuto. Las muestras se analizarán bajo un calentamiento dinámico de 50 a 300 °C (10 °C min-1). Los termogramas de cada muestra se registrarán a la sensibilidad de 5 mV, 0.5 °C y se analizarán con el software Proteus Netzsch - Análisis Térmico (Versión 4.2.1, Netzsch, Alemania). Se determinará el número de moles por mol de lactosa anhidra (n) con la ecuación siguiente (Khankari, Law, & Grant, 1992):

$$n = \frac{\Delta H_{deshidratación} x M_{lactosa}}{(\Delta H_{vw} - \Delta H_{deshidratación}) x M_{agua}}$$

(12)

Dónde:

- ΔH<sub>deshidratación</sub> = Entalpia de deshidratación de α-lactosa
- ΔH<sub>vw</sub> = Entalpía de vaporización de agua (2261 J g<sup>-1</sup>)
- Mlactosa = Masa molecular de la lactose anhidra (342.3 g mol<sup>-1</sup>)
- M<sub>agua</sub> = Masa molecular del agua (18 g mol<sup>-1</sup>)

# 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 8.1 FASE 1

8.1.1 Propiedades viscoelásticas de las soluciones de lactosa.

No se presentó un cambio significativo con la adición de ι y κ- carragenina sobre las propiedades viscoelásticas de las soluciones de lactosa (p> 0.05). Las soluciones de lactosa tenían un módulo elástico (G') entre 0.023 y 0.118 Pa, un



módulo viscoso (G ' ') en un rango de 0.007-0.130 Pa y una viscosidad compleja (n \*) de 0.003-0.029Pas. Vale la pena mencionar que las soluciones de lactosa carecían de sales, y en ausencia de sales, las carrageninas mantienen su estado de espiral aleatorio nativo y forman una dispersión no gelificante (Ikeda, 2001). En presencia de cationes como K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>, las carrageninas exhiben propiedades gelificantes al adoptar una formación de hélice ordenada. La κ- carragenina es propensa a gelificarse en presencia de iones K<sup>+</sup>, mientras que la ι- carragenina es sensible a los iones Ca<sup>2+</sup> (Banerjee & Bhattacharya, 2012; Zia et al., 2017). Kouassi et al., (2002) estudiaron los cambios en las soluciones de lactosa-sacarosa añadiendo κ- carragenina (0,3%) y KCI (0.018%). Estos autores describieron que, en condiciones de gelificación, la k- carragenina dificulta la difusividad de la lactosa debido a la creación de entrelazamientos moleculares. En el caso presentado en el presente estudio, las soluciones de lactosa-carragenina se encontraban en condiciones no gelificantes y no aumentaban la viscosidad de las soluciones de lactosa. Sin embargo, el estado nativo (espiral aleatoria desordenada) de las carrageninas y los grupos éster sulfato en su estructura también podrían alterar la difusividad de la lactosa. Para probar esta teoría, las soluciones de lactosa (desprovistas de sales) con y sin carragenina se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) como describen Lata y colaboradores, (2018). El análisis de TLC reveló que ambas carrageninas retrasaron la difusión de lactosa a través de la placa de gel de sílice (Figura 10). Esta reducción en la difusividad de la lactosa fue más notoria con l- carragenina, probablemente debido a su mayor proporción de éster sulfato (32%) que la k-carragenina (25%). Considerando que se pueden formar interacciones ion-dipolo entre los grupos sulfato de carragenina y los grupos hidroxilo de lactosa o su grupo aldehído durante el proceso de mutarrotación.



**Figura 10.** Análisis de cromatografía de capa fina (TLC) de soluciones de lactosa (10%) con/sin carrageninas (100 mg L<sup>-1</sup>), carril 1: solución de lactosa (control), carril 2:  $\kappa$ -carragenina, carril 3: -carragenina, carril 4: lactosa +  $\kappa$ - carragenina, carril 5: lactosa + 1- carragenina. Fr = factor de retención.

#### 8.1.2 Mutarrotación de la lactosa en presencia de carrageninas.

La incorporación de carragenina en soluciones de lactosa redujo el tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarrotación (tMeqm) y la relación de isómeros  $\beta$  /  $\alpha$  en equilibrio. Las soluciones de lactosa sin carragenina (control) alcanzaron su tMeqm en ~ 5.5 h a 25°C (Figura 8, Tabla 4). Del mismo modo, Raghavan y



colaboradores, (2000) describieron que las soluciones de lactosa a 18.8 °C alcanzaron el equilibrio de mutarrotación en 6.5 h. La incorporación de carragenina en soluciones de lactosa redujo el tMeqm a 4.7- 2.9 h. Cuanto mayor fue la concentración de carragenina, menor fue la t Meqm (<u>Tabla 4</u>).

La proporción de isómeros  $\beta$  /  $\alpha$  en equilibrio de mutarrotación también se modificó por la presencia de carragenina (Tabla 4). El tratamiento control mostró una proporción  $\beta$  /  $\alpha$  de 1.63 a 25 °C, con 38% de  $\alpha$ -lactosa y 62% de  $\beta$ -lactosa. Estos resultados fueron consistentes con estudios previos, que reportan una proporción de 63:37 para los isómeros  $\beta$  y  $\alpha$  en equilibrio de mutarrotación a 20 °C (Listiohadi, 2005). La adición de carragenina (a cualquier nivel) aumentó la fracción de  $\alpha$ lactosa y redujo la  $\beta$ -lactosa (Tabla 4). Por ejemplo, la adición de 100 mg L<sup>-1</sup> de  $\kappa$ carragenina en una solución de lactosa disminuyó la relación  $\beta$  /  $\alpha$  a 1.15 con 54:46 de isómeros  $\beta$  y  $\alpha$ .

Los cambios observados en la mutarrotación de lactosa (Tabla 4) pueden estar relacionados con la interacción de lactosa con la carragenina y cambios en la solubilidad de lactosa. La lactosa abre y reconstruye su estructura de anillo durante la mutarrotación (Figura 3). En la forma abierta, el grupo aldehído (–COH) está expuesto y puede reaccionar con los grupos éster sulfato (–OSO<sub>3</sub>-) de las carrageninas a través de interacciones ion-dipolo. Esta reacción del grupo aldehído de la lactosa con los grupos sulfato en los carragenina podría interferir con el proceso de mutarrotación. En este trabajo, los cristales de  $\alpha$ -lactosa monohidratada se disolvieron en agua y se siguió la conversión de  $\alpha$ - en  $\beta$ -lactosa hasta el equilibrio. En ausencia de carragenina, se observó una conversión extensa de la forma  $\alpha$ - en  $\beta$ -lactosa (Tabla 4). Sin embargo, la incorporación de carragenina disminuyó el intercambio entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , con una reducción concomitante en el tiempo para alcanzar el equilibrio (Tabla 4). Sobre los cambios



en la solubilidad de la lactosa y la mutarrotación, se ha establecido que la  $\alpha$ lactosa, menos soluble, se convierte en la  $\beta$ -lactosa, más soluble, para mantener el equilibrio. De lo contrario, una gran cantidad de  $\alpha$ -lactosa no disuelta se acumulará y nucleará rápidamente (Raghavan et al., 2000; H. Siddique et al., 2015). Sin embargo, si la solubilidad de la lactosa se modifica como lo hizo con las carrageninas (<u>Sección 8.1.3</u>), el equilibrio dinámico de la mutarrotación se alterará, así como el tiempo para alcanzar el equilibrio de la mutarrotación.

La aceleración de la mutarrotación (Tabla 4) abre la posibilidad de incrementar la tasa de cristalización y acortar los largos tiempos de cristalización de la lactosa. El proceso de cristalización de la lactosa debe ser lo suficientemente lento para igualar la velocidad de mutarrotación. Cuando la tasa de cristalización es similar a la tasa de mutarrotación, la  $\alpha$ -lactosa nuclea y cristaliza primero, obteniendo cristales de  $\alpha$ -lactosa monohidratada. Sin embargo, se formará lactosa amorfa si la velocidad de cristalización es más rápida que la velocidad de mutarrotación (Raghavan et al., 2000; Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018; Sánchez- Gracía et al., 2019; H. Siddique et al., 2015).



**Tabla 4.** Efecto sobre el tiempo (min) requerido para alcanzar el equilibrio de mutarrotación (tMeqm), y la fracción de  $\alpha$ -lactosa monohidratada (f $\alpha$ -LMH) y  $\beta$ -lactosa (f $\beta$ -L) en equilibrio de mutarrotación por la incorporación de carrageninas en una solución de lactosa (10% P / V, 25 °C).

					f <sub>α-LMH</sub>	f <sub>β-L</sub>	β/α	t <sub>Meqm</sub>
Lactosa (control)			0.379 <sup>d</sup> ±0.002	0.621 <sup>a</sup> ±0.003	1.639 <sup>a</sup> ±0.018	331.0 <sup>a</sup> ±36		
L	+	50mg	L-1	1-	0.423 <sup>c</sup> ±0.007	0.577 <sup>b</sup> ±0.007	1.364 <sup>b</sup> ±0.040	283.5 <sup>b</sup> ±10.6
car	rager	nina						
L	+	100mg	L <sup>-1</sup>	1-	0.518 <sup>a</sup> ±0.012	0.482 <sup>d</sup> ±0.013	0.932 <sup>d</sup> ±0.047	174.5°±6.3
car	rager	nina						
L	+	50mg	L <sup>-1</sup>	К-	0.459 <sup>b</sup> ±0.001	0.541 <sup>c</sup> ±0.001	1.178°±0.006	205.5 <sup>d</sup> ±10.6
carragenina								
L	+	100mg	L.	К-	0.464 <sup>b</sup> ±0.014	0.536 <sup>c</sup> ±0.014	1.155°±0.066	189.0 <sup>d</sup> ±14.1
carragenina								

# 8.1.3 Solubilidad y sobresaturación de lactosa en presencia de carragenina.

La temperatura fue el factor que más afectó la solubilidad ( $C_s$ ) y sobresaturación (S) de la lactosa (Figura 11, Tabla 5 y 6). Al igual que otros azúcares, la solubilidad de la lactosa depende en gran medida de la temperatura (Peter, 2002). En el rango de temperaturas estudiado, el tratamiento control (lactosa sin carragenina) presentó los valores más altos de  $C_s$  (Figura 11). A 25, 40 y 60 °C, los valores de Cs para el control fueron 17.5, 31.2 y 53.7 g de lactosa anhidra por 100 g de agua. De manera similar, Visser y Foremost, (1982) reportaron valores de C para la lactosa de 21.8, 32.7 y 58.4 g de lactosa anhidra por 100 g de agua a 25, 40 y 60 °C, respectivamente. Mientras tanto, otros autores reportan valores de  $C_s$  para lactosa de 12 g 100 g<sup>-1</sup> a 0 °C, 18-19 g 100 g<sup>-1</sup> a 20 °C y 24.4 g 100 g<sup>-1</sup> a 30 °C (Bhargava, 1996; Listiohadi, 2005; Roos, 2009; Wong & Hartel, 2014).



El segundo factor que más afectó a las C<sub>s</sub> y S de la lactosa fue la concentración de carragenina añadida a la solución de lactosa (Figura 11, Tabla 5 y 6). Por el contrario, el tipo de carragenina ( $\iota \circ \kappa$ ) no afectó a C y S de la lactosa (Tabla 6). Según diferentes autores, cuando la lactosa se encuentra con otras sustancias, su solubilidad disminuye (Visser, 1982; Wong & Hartel, 2014). Majd y Nickerson, (1976) abordaron que la C de lactosa en mezclas acuosas con alcohol es inversamente proporcional a la concentración de alcohol añadida (Majd, 1976). Por su parte, Peter, (2002) encontró que la solubilidad de la lactosa disminuye apreciablemente cerca del punto de congelación al agregar sacarosa (Peter, 2002). En cuanto a los carragenina, a 40 °C, la solubilidad de la lactosa descendió de 31.2 g 100 g  $^{-1}$  a 26.3 y 25.7 g 100 g  $^{-1}$  con la incorporación de  $\kappa$  y  $\iota$ carragenina a 100 mg por litro de solución de lactosa. La capacidad de retención de agua de las carragenina podría explicar la reducción de la solubilidad de la lactosa. Las carrageninas en un medio acuoso tienen una alta capacidad de captación de agua ya que sus grupos hidroxilo (-OH) y éster sulfato (-OSO3-) generan enlaces de hidrógeno e interacciones ion-dipolo con moléculas de agua. En consecuencia, una fracción de agua en la solución deja de estar disponible para los solutos cercanos. La influencia de las carrageninas sobre la solubilidad de la lactosa fue más evidente a altas temperaturas que a bajas temperaturas, particularmente a 60 °C (Figura 11). Las  $\kappa$ - y  $\iota$ - carragenina muestran un comportamiento similar en una solución acuosa. Ambas carrageninas adoptan un estado ordenado (hélice) a bajas temperaturas, pero experimentan un estado desordenado termo-reversible (espiral) a altas temperaturas. Bajo una disposición de espiral aleatoria, las carrageninas exponen sus grupos éster sulfato ( $-OSO_3$ ), aumentando su capacidad de unión al agua (Černíková et al., 2008; Zia et al., 2017). Por tanto, el efecto sobre la solubilidad de la lactosa que ejercen las carrageninas es más evidente a altas temperaturas.

La solubilidad es una característica esencial de la lactosa que regula la proporción de isómeros  $\beta$  /  $\alpha$  en equilibrio de mutarrotación. Además, esta característica



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

determina la concentración de lactosa requerida para iniciar la nucleación (a una temperatura específica) e influir en el proceso de cristalización de lactosa (Listiohadi, 2005; McSweeney, 2009; Zamanipoor & Mancera, 2014). Si la solubilidad de la lactosa disminuye, entonces la nucleación y por lo tanto la cristalización podrían tener lugar a una concentración más baja. En la práctica, esto significaría un proceso de evaporación menos extenso del suero de queso, el subproducto utilizado para recuperar la lactosa.



**Figura 11.** Cambios en la solubilidad de lactosa ( $C_s$ ) por la incorporación de **A**.  $\kappa$  - carragenina **B**. o I - carragenina en soluciones modelo de lactosa

Factor A	Factor B	Factor C	Respuesta		
Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tipo de carragenina	Solubilidad de lactosa (g 100 g <sup>-1</sup> agua)		
0	60	I	53.7066 <sup>a</sup>		
0	60	К	53.7066 <sup>a</sup>		
50	60	К	48.0394 <sup>b</sup>		
50	60	I	42.9849 <sup>c</sup>		
100	60	К	42.6097 <sup>c</sup>		
100	60	I	38.2041 <sup>d</sup>		
0	40	I	31.2046 <sup>e</sup>		
0	40	К	31.2046 <sup>e</sup>		
50	40	I	28.1824 <sup>ef</sup>		
100	40	К	26.3871 <sup>f</sup>		
100	40	I	25.9544 <sup>f</sup>		
50	40	К	25.7993 <sup>f</sup>		
50	25	I	17.6852 <sup>g</sup>		
0	25	I	17.5546 <sup>gh</sup>		
0	25	К	17.5546 <sup>gh</sup>		
100	25	I	17.5341 <sup>gh</sup>		
100	25	К	17.3974 <sup>ghi</sup>		
50	25	К	14.4883 <sup>hij</sup>		
0	10	К	14.3895 <sup>ij</sup>		
0	10	I	14.3895 <sup>ij</sup>		
50	10	I	13.4907 <sup>jk</sup>		
100	10	К	11.3964 <sup>jkl</sup>		
100	10	I	11.0554 <sup>kl</sup>		
50	10	К	10.1715 <sup>1</sup>		

**Tabla 5.** Solubilidad de soluciones modelo de lactosa adicionadas con  $\iota$  y  $\kappa$ - carragenina a diferentes temperaturas.

Significancia: \*p < 0.01 una cola, \*p < 0.0001.



Efecto	Df	SS	MS	F-Value	P-Value
Factor A (Concentración de	) 2	381.3	190 65	193 61	0 0001***
Carragenina mg L <sup>-1</sup> )	-	00110	100.00	100101	0.0001
Factor B (Temperatura °C)	3	12412	4137.32	4201.65	0.0001***
Factor C (Tipo de carragenina)		0.2	0.18	0.18	0.671
Factor A * Factor B		288.4	48.07	48.81	0.0001***
Factor A * Factor C	2	14.9	7.45	7.57	0.001**
Factor B * Factor C	3	56.5	18.82	19.11	0.0001***
Factor A* Factor * Factor C	6	36.8	6.13	6.22	0.0001***
Error	48	47.3	0.98		

**Tabla 6**. Resultados de ANOVA para el efecto de la adición de I and  $\kappa$  -carragenina y la temperatura de la solubilidad de lactosa.

8.1.4 Cambios en la zona metaestable de lactosa por la presencia de carragenina.

Las soluciones de lactosa pura (control) mostraron el área más amplia entre las curvas de solubilidad y sobresaturación (MZ) en un rango de temperatura de 10–60 °C (Tabla 7, Figura 12). El ancho de la MZ fue desigual en todo el rango de temperaturas estudiado. Por ejemplo, la caída de temperatura de 30 °C a 22.01 °C (MZW = 7.9 °C) mueve a la solución de lactosa (21.95 g 100 mL <sup>-1</sup>) de un estado de saturación a uno de sobresaturación (Tabla 7, Figura 12). En contraste, la MZ fue de 8.3 °C alrededor de los 60 °C, lo que significa que una solución de lactosa (53.7 g 100 mL<sup>-1</sup>) debe enfriarse de 60 °C a 51.7 °C para mover la lactosa a través del MZ (Tabla 7, Figura 12). Por lo tanto, inducir la nucleación espontánea de



lactosa requiere mover la lactosa a través del MZ al estado sobresaturado, donde la energía disponible es suficiente para hacer posible la nucleación de las moléculas de lactosa (Sander, Zeiger, & Suslick, 2014; Zamanipoor & Mancera, 2014; Zhang et al., 2015).

La incorporación de carragenina redujo el área de MZ de la lactosa (Figura 12). Sin embargo, el ancho de MZ solo disminuyó a ciertas temperaturas y concentraciones de carrageninas (Tabla 7, Figura 12). Solo la concentración de κcarragenina a 50 mg L<sup>-1</sup> disminuyó el ancho de MZ en todo el rango de temperaturas estudiado (Figura 12). A bajas temperaturas (10 °C), ambas carrageninas (I y  $\kappa$ ) en ambas concentraciones (50 y 100 mg L <sup>-1</sup>) redujeron la MZ (Tabla 7). Estos cambios en la MZ estaban estrechamente relacionados con el efecto que tenían las carrageninas para disminuir la solubilidad y sobresaturación de la lactosa (Tabla 7, Figura 12). Sin embargo, es interesante que el ancho de MZ de la lactosa solo se redujo (en todo el rango de temperaturas) por una baja concentración de k-carragenina. Un aumento adicional en la concentración de carrageninas no produjo una reducción adicional de la MZ. Se infiere que las carrageninas interaccionan a altas temperaturas, y no contienen más moléculas de agua ni interactúan con moléculas de lactosa. En un estudio anterior, observamos un efecto similar sobre la cristalización de soluciones de lactosa con carrageninas. Los tratamientos que contienen concentraciones más bajas de carrageninas tuvieron un mayor impacto en la cristalización de lactosa que aquellos con una concentración más alta de carrageninas, particularmente en la tasa de cristalización (Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018).





**Figura 12.** Cambios en la solubilidad ( $C_s$ ), sobresaturación (S) y la zona metaestable (MZ) de soluciones de lactosa adicionadas con I y  $\kappa$  carragenina a diferentes concentraciones.



**.Tabla 7.** Cambios en la zona metaestable (MZ) de la lactosa por la incorporación de carrageninas a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Área MZ (10-60 °C)		Ancho de la ZM a 10°C		Ancho de la ZM a 40°C		Ancho de la ZM a 60°C	
	g100 g-′	1 °C	°C		°C	°C		
Lactosa pura (control)	364.302 ±	18.872ª	11.905 ±	0.657ª	6.204 ±	2.346 <sup>b</sup>	8.337 ±	1.766 <sup>ab</sup>
L + 50 mgL <sup>-1</sup> I- carragenina	304.266 ±	31.136 <sup>ab</sup>	5.308 ±	0.734 <sup>b</sup>	8.473 ±	0.391 <sup>ab</sup>	9.136 ±	0.364 <sup>ab</sup>
L + 100 mgL <sup>-1</sup> I- carragenina	295.06 ±	24.953 <sup>b</sup>	2.997 ±	0.21 <sup>b</sup>	11.053 ±	0.495ª	10.9053 ±	0.659ª
L + 50 mgL <sup>-1</sup> κ- carragenina	285.942 ±	32.314 <sup>b</sup>	6.643 ±	1.39 <sup>ab</sup>	5.404 ±	0.302 <sup>b</sup>	7.267 ±	0.126 <sup>b</sup>
L + 100 mgL <sup>-1</sup> κ- carragenina	299.688 ±	10.266 <sup>ab</sup>	4.766 ±	0.842 <sup>b</sup>	9.177 ±	0.265 <sup>ab</sup>	9.2236 ±	0.633 <sup>ab</sup>

<sup>a- b</sup> Letras diferentes dentro de una columna indican una diferencia significativa (prueba de Tukey-Kramer,  $\alpha = 0.05$ ). L = lactosa.

#### 8.2 FASE 2

#### 8.2.1 Selección de Funcionales

La estructura de la quercetina se optimizó en fase gaseosa con todas las metodologías mencionadas en el <u>apartado 7.2.2</u>, seguido de un cálculo de frecuencias para confirmar que la molécula se encontrara en su estado de mínima energía. Se analizaron los ángulos y las distancias teóricos de la quercetina los cuales fueron comparados con los resultados de cristalografía de Rayos- X (A. M. Mendoza-Wilson et al., 2007; A. M. a. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2004), esto con la finalidad de elegir la metodología que describiera mejor las propiedades de interés. La <u>Figura 13</u> muestra la estructura optimizada de la quercetina con la metodología DFT: B3LYP/6-311G (d,p).




El análisis de correlación de las distancias y ángulos de enlace obtenidos se usaron para evaluar cuál de las aproximaciones se ajustaban mejor a los datos experimentales (Apéndice III). Las Tablas 8 y 9 muestran correlaciones (distancias y ángulos, respectivamente) de diversas metodologías, mostrando hasta 0.982 para distancias de enlace y para los ángulos 0.871. Basado en estos resultados, se decidió trabajar con la metodología de DFT: B3LYP/6-311G (d,p). DFT presentó el mejor ajuste debido a que esta toma en cuenta la correlación existente entre electrón- electrón y electrón- nube electrónica. El conjunto de bases, por su parte, sirve para la descripción de la zona donde se moverán los electrones, y habla de probabilidades. 6-311G trata de una base extendida con una valencia dividida en tres, es decir, divide a los orbitales en 3 Gaussians internos, uno intermedio y uno externo, aumentado la probabilidad de encontrar la zona del electrón. Asimismo, se agregó una doble polarizada (d, p\*\*) que representa a los orbitales que no están ocupados en el estado fundamental del átomo (Hohenberg & Kohn, 1964; Weigend & Ahlrichs, 2005). Con la selección del método a usar (DFT: B3LYP/6-311G (d,p)) se prosiguió con la optimización del resto de los flavonoides (usando como solvente agua), se realizó el cálculo de los ángulos diedros y los parámetros de reactividad.

Distancias	Experimental*	HF/ 3- 21G	B3LYP/STO- 3G	B3LYP/6- 31G dp	B3LYP/6 311G dp	M06
C1-C6	1.36	1.372	1.406	1.389	1.386	1.3803
C5-C6	1.4	1.389	1.429	1.404	1.401	1.3959
C1-C2	1.419	1.406	1.446	1.425	1.423	1.4182
C1-O25	1.364	1.353	1.407	1.352	1.350	1.3385
C2-C3	1.391	1.387	1.436	1.410	1.407	1.4006
C2-C12	1.421	1.451	1.462	1.454	1.454	1.4482
C3-O9	1.369	1.357	1.408	1.356	1.354	1.3439
C3C4	1.389	1.383	1.423	1.398	1.396	1.3917
C5O23	1.358	1.360	1.410	1.359	1.358	1.3466
C4C5	1.386	1.374	1.411	1.390	1.387	1.3819
C12C13	1.44	1.473	1.504	1.469	1.469	1.4637
C10O11	1.268	1.225	1.298	1.242	1.235	1.2269
C12C13	1.36	1.325	1.386	1.364	1.361	1.3553
O9C12	1.368	1.388	1.436	1.382	1.380	1.3712
C12C14	1.474	1.464	1.485	1.463	1.463	1.4561
C13O31	1.355	1.370	1.379	1.352	1.351	1.3406
C14C16	1.397	1.397	1.423	1.411	1.409	1.4031
C14C15	1.393	1.384	1.420	1.405	1.402	1.3962
C16C19	1.390	1.369	1.408	1.388	1.385	1.3792
C19C21	1.386	1.394	1.441	1.410	1.408	1.4026
C19O27	1.384	1.375	1.418	1.366	1.365	1.3533
C17C21	1.373	1.374	1.416	1.394	1.391	1.3849
C21O28	1.385	1.369	1.415	1.362	1.361	1.3499
O31H32	0.906	0.974	1.108	0.988	0.983	0.9802
O24H26	0.948	0.965	1.027	0.967	0.964	0.9619
O23H25	0.914	0.965	1.026	0.966	0.963	0.9612
O27H30	0.990	0.964	1.026	0.966	0.963	0.9603
O28H29	0.975	0.964	1.026	0.966	0.963	0.9608
Validación		0.981	0.968	0.986	0.982	0.979

## Tabla 8. Distancias de enlaces interatómicos (Á) para la molécula de quercetina.

\* Datos experimentales provenientes de cristalografía de Rayos- X (A. M. a. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2004)

			DFT: B3LYP/STO-	DFT: B3LYP/6-	DFT: B3LYP/6-	
Angulo	Experimental*	HF/3-21G	3G	31G	311G	M06
C1C6C5	119.1	120.6	119.6	120.1	120.2	120.3
C2C1C6	121.5	120.3	120.9	120.8	120.7	120.6
C6C1 O24	119.8	121.6	123.3	121.6	121.5	121.5
C2C1 O24	118.8	118.1	115.7	117.6	117.8	117.89
C3C2C10	120.4	118.9	117.9	118.3	118.4	118.5
C2C3O9	120.1	121.0	124.7	121.9	121.9	121.9
C2C3C4	123.0	122.6	121.0	122.8	122.7	122.6
C3C4C5	117.0	118.6	119.3	118.3	118.4	118.4
C4C5C6	122.1	120.4	121.0	121.0	120.9	120.8
C4C5O23	117.8	123.1	123.0	122.6	122.7	122.6
C2C10C13	116.8	115.5	116.5	115.9	115.7	115.4
C2C10 O11	122.8	127.5	122.0	127.4	127.4	127.4
C10C13 O11	120.5	116.9	111.5	116.7	116.9	117.1
C12C13C14	128.1	129.1	126.0	129.0	128.9	128.5
09C12C14	111.2	112.7	113.1	112.6	112.5	112.6
C10C13C12	120.8	123.2	122.2	122.8	122.8	122.6
C10C13 O31	117.5	113.7	108.1	113.0	113.2	113.3
C12C13O31	121.7	123.1	129.7	124.2	124.0	123.9
C3O9C12	121.3	123.2	117.9	122.7	122.6	122.5
C12C14C15	121.5	122.3	119.5	121.9	122.1	119.7
C15C14C16	119.0	118.7	119.2	118.2	118.1	118.2
C14C16C19	120.3	121.4	120.8	121.6	121.7	121.7
C14C15C17	120.6	119.6	120.4	120.1	120.0	119.9
C16C19C21	120.0	119.7	119.5	119.7	119.6	119.5
C21C19O27	118.2	116.8	116.3	117.0	117.0	116.9
16C19C21	120.2	119.7	119.5	119.7	119.6	119.5
C17C21O28	119.3	123.8	124.3	123.8	123.8	123.8
13O31H32	110.3	107.9	93.1	102.0	102.6	102.8
C1 O24H26	101.9	113.5	103.2	108.9	108.9	108.8
C5O23H25	113.2	113.8	103.3	109.4	109.6	109.6
C19O27H30	112.6	112.3	102.5	108.5	108.7	108.7
C21O28H29	101.8	112.6	102.7	108.6	108.8	108.8
Validación		0.605	0.712	0.868	0.881	0.862

## Tabla 9. Ángulos de enlaces interatómicos (°) para la molécula de quercetina.

\* Datos experimentales obtenidos de un estudio de cristalografía de Rayos- X (A. M. Mendoza-Wilson et al., 2007)





**Figura 13.** Estructura molecular de la Quercetina, optimizada con el modelo DFT: B3LYP/6-311G dp.

#### 8.2.2 Cálculo de ángulos diedros

En la <u>Tabla 10</u> se muestran los ángulos diedros presentes en los flavonoides estudiados. Los ángulos diedros de los flavonoides quercetina, apigenina, cianidina, genisteína, luteolina, kampferol, y naringenina están cerca de cero, lo que muestra que estas moléculas están muy cerca de ser completamente planas, lo que concuerda con la bibliografía (De Souza et al., 2017; Justino & Vieira, 2010). Sin embargo, las uniones de la cromenona con el fenilo, en algunos de los flavonoides antes mencionados, muestran una ligera rotación registrando los siguientes ángulos: apigenina con un valor de -9.335°, cianidina con -1.358°, luteolina con -13.691°, naringenina con -51.974° y quercetina con 2.753°. Las moléculas que poseen una mayor torsión entre la cromenona y el fenilo son regularmente más débiles o inactivas, debido a que el ángulo diedro es un factor importante en la superposición de los orbitales en los anillos aromáticos. Una conformación desfavorable del anillo heterocíclico contribuye a una reactividad



relativamente baja (A. M. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2006). Por otro lado, catequina, EC, EGCG, EGT, isoquercitina, liquiritina y rutina presentan la mayor parte de ángulos alejados de 0 y 180°, es decir, sus estructuras no presentan planaridad, lo que podría favorecer la interacción espacial entre sus átomos y otros átomos o grupos de átomos de otra molécula (Wagner, 2015).

**Tabla 10**. Ángulos diedros de las estructuras de los flavonoides optimizados con B3LYP / 6-311G (d, p).

















8.2.3 Orbitales Moleculares Frontera.

Para obtener los orbitales moleculares de frontera se realizaron cálculos para determinar los patrones de energía presentes en las moléculas. Los orbitales de frontera utilizados fueron HOMO (primer orbital molecular desocupado) y LUMO (último orbital molecular ocupado). Este análisis se llevó a cabo para identificar las regiones con alta densidad electrónica permitiéndonos identificar las zonas de las estructuras de los flavonoides que tendrían una mayor interacción con el sitio de unión de las proteínas del suero ( $\alpha$ LA y  $\beta$ LG). La <u>Tabla 11</u> muestra los resultados del mapeo de los 14 flavonoides estudiados. Flavonoides como la apigenina, categuina, EC, EGT, liguirritina y luteolina, tanto la densidad electrónica de HOMO como de LUMO se encuentra distribuida en el fenilo. Por su parte, en la cianidina y quercetina, las densidades electrónicas de HOMO y LUMO se encuentran localizadas en la cromenona. En la genisteína, kempferol y naringenina la densidad electrónica de HOMO se encuentra posicionada a lo largo de la molécula. Asimismo, la densidad electrónica de LUMO de estas últimas moléculas se encuentra distribuida a lo largo de la molécula, con excepción de la naringenina, donde se posiciona en la cromenona.



Por otro lado, se realizó el cálculo del GAP entre HOMO y LUMO, es decir, la diferencia entre sus energías intrínsecas para caracterizar su estabilidad química (Landeros-Martínez et al., 2018). La cianidina es el flavonoide con un menor GAP, es decir, la molécula con menor estabilidad química, seguido de manera creciente, en cuanto a estabilidad por quercetina < kaempferol < isoquercitina < rutina < luteolina < genisteína < apigenina <EGCG < naringenina < liquirritina < EC < catequina < EGT.

Molécula	НОМО	LUMO
Apigenina		
Catequina		
Cianidina		

**Tabla 11**. Mapeo de orbitales moleculares de los flavonoides, calculados con B3LYP/6-311G (d,p) en fase acuosa con el modelo continuo de solvatación CPCM usando agua como solvente.













8.2.4 Parámetros de reactividad química

Los parámetros de reactividad obtenidos en los flavonoides son: Afinidad Electrónica (*AE*) Potencial de ionización (I), Electronegatividad ( $\chi$ ), dureza ( $\eta$ ), potencial químico ( $\mu$ ) y electrofilicidad ( $\omega$ ). De acuerdo con la <u>Tabla 12</u> (Apéndice IV) la *AE*, mide la capacidad de una molécula para aceptar electrones y formar aniones donde podemos observar que este parámetro fluctuó entre los valores de 0.41 a 2.45 eV. De acuerdo a Mendoza-Wilson et al., (2005) una molécula o átomo con mayor AE tiende a tomar electrones fácilmente, como es el ejemplo de la cianidina que tiene un valor de 2.45 eV. Como se puede observar la EA en los



flavonoides decrece en el orden: rutina > isoquercetina > kaempferol > luteolina > apigenina > genisteína > naringenina > liquiritina > EGCG > EGT > categuina > EC. De acuerdo con lo anterior, el grupo de las flavanolas (categuinas) son las que mayor tendencia a aceptar electrones pueden tener. Por otro lado, el potencial de ionización se define como la cantidad de energía requerida para eliminar un electrón de una molécula. Por lo tanto, un alto potencial de ionización indica que los sistemas no pierden electrones con facilidad (A. M. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2005). En este sentido, el mayor potencial de ionización lo presentó la liquirritina y de manera decreciente se encuentran: naringenina > rutina > apigenina > EGCG > EGT > Genisteína > categuina > luteolina > EC > isoquercitina > kaempferol > quercetina > cianidina. Por su parte, la electronegatividad es una medida de la tendencia a atraer electrones en un enlace químico y se define como el negativo del potencial químico en DFT (Zheng et al., 2017), siendo la rutina el flavonoide con la mayor  $\chi$  de 4.27 eV y la EC la que presentó el menor valor con 3.16 eV. La dureza es un parámetro importante debido a que mide la resistencia de un sistema al cambio en su configuración electrónica. Como podemos observar en la Tabla 11 (Apéndice IV) la n fluctuó entre 0.78 a 2.79 eV en los flavonoides. La menor dureza se presentó en la cianidina, lo cual significa que esta molécula es la más reactiva a diferencia de la EGT con 2.79 eV la cual esperamos que tenga una menor interacción en el sitio activo. Por lo tanto, la  $\eta$  decrece en el orden EGT > Categuina > EC > Liquirritina > Naringenina > EGCG > Apigenina > Genisteína > Luteolina > Rutina > Kaempferol > Quercetina > Isoquercitina > Cianidina. Por su parte, el µ de acuerdo a Mendoza-Wilson et al., (2005) nos permite clasificar a los flavonoides estudiados con antioxidantes debido a que poseen la tendencia a donar electrones más que a atraerlos. Finalmente, la o cuantifica la tendencia de una molécula para absorber electrones y mide la desintegración de la energía de unión debido a un flujo máximo de electrones entre un donante y un receptor (A. M. Mendoza-Wilson & Glossman-Mitnik, 2005), por lo tanto, entre mayor sea el índice de electrofilicidad, mayor es la propensión del complejo de atraer electrones de una molécula



-

donante (Landeros-Martinez et al., 2018). Como podemos ver la  $\omega$  de los flavonoides decrece en el siguiente orden: cianidina > isoquercitina > rutina > quercetina > kaempferol > luteolina > apigenina > genisteína > naringenina > liquirritina > EGCG > EGT > categuina > EC.

**Tabla 12**. Parámetros de reactividad de moléculas de flavonoides con B3LYP/6-311G (d,p) con el modelo continuo de solvatación CPCM usando como solvente agua. Todos los parámetros de reactividad están en (eV).

Flavonoides	EA	Ι	χ	η	μ	ω
Apigenina	1.994	6.084	4.039	2.045	-4.039	3.988
Catequina	0.442	5.937	3.189	2.748	-3.189	1.851
Cianidina	2.449	4.008	3.229	0.779	-3.229	6.687
EC	0.405	5.905	3.155	2.750	-3.155	1.810
EGCG	1.618	6.027	3.823	2.204	-3.823	3.315
EGT	0.441	6.016	3.229	2.788	-3.229	1.870
Genisteína	1.920	5.972	3.946	2.026	-3.946	3.843
Isoquercitina	2.392	5.846	4.119	1.727	-4.119	4.912
Kaempferol	2.057	5.681	3.869	1.812	-3.869	4.131
Liquiritina	1.792	6.474	4.133	2.341	-4.133	3.649
Luteolina	1.994	5.925	3.959	1.966	-3.959	3.988
Naringenina	1.859	6.292	4.076	2.217	-4.076	3.747
Quercetina	2.072	5.595	3.833	1.762	-3.833	4.170
Rutina	2.397	6.150	4.274	1.877	-4.274	4.866



# 8.2.5 Selección de polifenoles de acuerdo con el acoplamiento molecular

La Tabla 13 muestra las interacciones moleculares entre la  $\beta$ LG y los flavonoides. Se han reportado sitios posibles para la unión en la  $\beta$ LG, como una gran cavidad hidrófoba presente en la lámina β (TRP<sub>19</sub>- ARG<sub>124</sub>), donde los ligandos pueden interaccionar (Sahihi, Heidari-Koholi, & Bordbar, 2012). Este fue el sitio donde todos los flavonoides estudiados pudieron interaccionar con diferentes energías de unión. También se puede observar que la presencia de oxidrilos en las estructuras de flavonoides favorece la energía de unión de las interacciones entre la βLG y los flavonoides, a excepción de liquirritina que posee la menor energía de enlace y un número reducido de oxidrilos. Asimismo, la presencia de este grupo funcional beneficia la creación de puentes de hidrógeno entre ligando-receptor. Por lo tanto, la interacción de estos flavonoides polifenólicos con BLG no es principalmente hidrófoba y los grupos fenólicos de OH en sus estructuras tienen un papel importante en el proceso de unión (Sahihi et al., 2012).

Los flavonoides que presentaron la mayor cantidad de puentes de hidrógeno y una menor energía libre ( $\Delta G^{\circ}$ ) son rutina, liquirritina, apigenina, EGCG, categuina, EGT, EC, genisteína e isorquercetina. La rutina, por su parte, es un fitoquímico muy útil debido a sus importantes actividades biológicas, por ejemplo, su capacidad antioxidante, antidiabética, terapia hormonal y neuroprotectora. Asimismo, muestra actividad antibacteriana y antifúngica contra las cepas de Escherichia coli y Candida gattii (Nasser Abdulatif Al-Shabib et al., 2018). Como se observa en la Tabla 13, es uno de los flavonoides con una menor energía de unión con -7.3 kcal mol<sup>-1</sup>. Esto puede deberse a su capacidad de torsión ya mencionada con anterioridad, con ocho ángulos diedros que le permiten una mejor interacción con el sitio activo. Asimismo, se determinó la presencia de un puente de hidrógeno con la PRO<sub>30</sub>, GLU<sub>62</sub> y ASN<sub>109</sub> debido al gran número de oxidrilos en su estructura



(10 oxidrilos). Este flavonoide tiene de los valores más altos de potenciales de ionización, lo que reafirma su capacidad antioxidante.

La <u>Tabla 13</u> muestra la presencia de tres puentes de hidrógeno entre la liquirritina y LYS<sub>69</sub>, ASN<sub>98</sub>, ASN<sub>119</sub> y SER<sub>116</sub>. Del mismo modo, fue el único flavonoide en presentar una unión  $\pi$ -catión con la LYS<sub>60</sub>. Por otro lado, la interacción de  $\beta$ LG y la liquirritina no es principalmente hidrofóbica, y las interacciones de enlace de hidrógeno tienen un papel importante en la unión de estos. Al igual que la rutina, la liquirritina posee un gran número de oxidrilos (5) y es una molécula con rotabilidad, lo que permite una mejor interacción en el sitio activo (Khosravi & Sahihi, 2014).

La unión de este flavonoide se vio favorecida debido a su alta dureza y electrofilicidad. La apigenina con una energía de unión de -6.5 kcal mol<sup>-1</sup>, presentó un puente de hidrógeno con ILE<sub>78</sub>, genisteína dos puentes de hidrógeno con los aminoácidos ASN<sub>88</sub> y ASN<sub>90</sub> ( $\Delta G^\circ$ = -6.3 kcal mol<sup>-1</sup>) e isoquercetina con un puente de hidrógeno con PRO<sub>38</sub> ( $\Delta G^\circ$ = -6.3 kcal mol<sup>-1</sup>).

Por otro lado, las catequinas, son flavonoides clasificados como flavonolas y son conocidas por su presencia en el té verde (Grzesik et al., 2018). Se han estudiado los beneficios para la salud de este tipo de té, incluidos sus efectos anticancerígenos, antiobesidad, antidiabéticos, antiinflamatorios y neurodegenerativos (Pervin et al., 2018), asimismo, se le ha asociado con la disminución del riesgo de cáncer de mama (Xiang et al., 2016). La EC presento una energía de unión de -6.9 kcal mol<sup>-1</sup> y la formación de un puente de hidrógeno con el aminoácido ASN<sub>90</sub> a una distancia de 1.899. La catequina tuvo una  $\Delta G^{\circ}$  de -6.5 kcal mol<sup>-1</sup> con un puente de hidrógeno unido a ASN<sub>90</sub>. Por su parte, la EGT con una  $\Delta G^{\circ}$  de -6.6 kcal mol<sup>-1</sup> y un puente de hidrógeno unido a la ASN<sub>90</sub>. Finalmente, la EGCG, el cual a pesar de tener una energía de interacción menor),



mostró dos puentes de hidrógeno uno de ellos unidos al aminoácido SER<sub>116</sub> y otro al ASN<sub>88</sub>.

Polifenol	Energía (kcal/mol)	Puentes de Hidrógeno	p- catión	Residuos
Rutina	-7.3	PRO 38 GLU 62 ASN 109		SER 36, PRO 38, LEU 39, LYS 60, GLU 62, LYS 69, ASN 88, ASN 90, MET 107, ASN 109, SER 116, LEU 117
Liquirritina	-7	LYS 69   ASN 98   ASN 109   SER 116	LYS 60	SER 36, PRO 38, LYS 60, LYS 69, ASN 88, ASN 90, ASN109, SER 116
Cianidina	-6.7			THR 18, TRP 19, GLU 44, GLN 59, GLU 158
Quercetina	-6.7			LEU 39, LYS 69, ASN 88, ASN 90, MET 107, GLU 108, ASN 109
Luteolina	-6.7			LEU 39, LYS 69, ASN 88, ASN 90, MET 107, ASN 109
EGT	-6.6	ASN 90		ASN 90, MET 107, GLU 108, ASN 109, SER 116
Apigenina	-6.5	ILE 78		GLN 12, ILE 13, LYS 75, THR 76, ILE 78, PRO 79, PHE 82
Catequina	-6.5	ASN 90		LEU 39, ASN 88, ASN 90, GLU 108, ASN 109, SER 116
Kaempferol	-6.5			LEU 39, LYS 69, ASN 88, ASN 90, MET 107, GLU 108, ASN 109, SER 116
Epicatequina	-6.4	ASN 90		ASN 88, ASN 90, MET 107, SER 116
Naringenina	-6.4			LEU 39, LYS 69, ASN 88, ASN 90, ASN 109, SER 116, LEU 117

**Tabla 13**. Análisis de las interacciones moleculares entre la βLG (PDB ID: 3npo) y diversos flavonoides proporcionados por simulaciones de acoplamiento molecular.



Genisteína	-6.3	ASN ASN 90	88	LEU 87, ASN 88, ASN 90, ASN 109, SER 116
				PRO 38, LEU 39, LYS 69, ASN 88,
				ASN 90, MET 107, GLU 108, ASN
Isoquercetina	-6.3	PRO 38		109, SER 116
		ASN	88	VAL 41, LYS 69. ASN 88, MET
EGCG	-6.2	SER 116		107, ASN 109, SER 116

En el mismo sentido, se pueden apreciar también (Tabla 14) las interacciones moleculares de  $\alpha$ LA con los flavonoides. A diferencia de las uniones con la proteína  $\beta$ LG,  $\alpha$ LA mostró dos regiones donde los flavonoides interaccionaron, en la hendidura entre dominios de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  y con los residuos ILE<sub>41</sub>, GLU<sub>43</sub>, THR<sub>48</sub>, TYR<sub>50</sub>, SER<sub>64</sub>, GLN<sub>65</sub>, LEU<sub>81</sub>. Sin embargo, fue el primero de ellos el que contó con las mejores energías de unión.

En la <u>Tabla 14</u> se observa que la menor energía de unión se logró con los polifenoles EGCG y rutina con un valor de 7.1 kcal mol<sup>-1</sup>. Por su parte, EGCG formó puentes de hidrógeno con ASN<sub>44</sub> y GLU<sub>49</sub> y un par de interacciones  $\pi$ -catión con LYS<sub>58</sub> y LYS<sub>108</sub>; y la rutina formó tres puentes de hidrógeno con los aminoácidos GLU<sub>49</sub>, TYR<sub>103</sub> y TRP<sub>104</sub> y dos interacciones  $\pi$ - $\pi$  con TRP<sub>104</sub>. Al contrario, a pesar de tener una energía de unión mayor (-6.5 kcal mol<sup>-1</sup>), la isoquercetina logró la formación de un puente de hidrógeno (HIS<sub>107</sub>), interacciones  $\pi$ -catión (LYS 58 y LYS 108) y una interacción  $\pi$ - $\pi$  (TRP<sub>60</sub>). A diferencia de las interacciones moleculares con la  $\beta$ LG,  $\alpha$ LA únicamente formó puentes de hidrógeno con EGT y catequina (Tabla 14).

La determinación de las interacciones moleculares con las proteínas del suero  $\alpha$ LA y  $\beta$ LG, permitieron la selección de flavonoides a usar en la fase experimental del presente trabajo. En primera instancia se seleccionó la Rutina que presentó las mejores energías de unión tanto con  $\alpha$ LA (7.1 kcal mol<sup>-1</sup>) y con  $\beta$ LG (-7.3 kcal mol<sup>-1</sup>)



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

<sup>1</sup>) con la efectiva formación de interacciones  $\pi$ -catión y puentes de hidrógeno. Por otro lado, se eligió trabajar experimentalmente con EGCG debido a que, a pesar de tener la energía de unión menos efectiva con la  $\beta$ LG, tuvo la mejor unión con la  $\alpha$ LA (7.1 kcal mol<sup>-1</sup>). Asimismo, posee una mejor solubilidad en agua, lo que favorecerá la etapa experimental del presente trabajo.

Elavonaida	Energía	Puentes de	р-	n n	Residuos	
Flavonoide	(kcal mol <sup>-1</sup> )	Hidrógeno	catión	р- р		
EGCG	-7.1	ASN44 GLU 49	LYS 58 LYS 108		ASN 44, GLU 49, LYS 58, LEU 59, TRP 60, TYR 103, HIS 107, LYS 108	
Rutina	-7.1	GLU 49 TYR 103 TRP 104		(2) TRP 104	THR 33, VAL 42, ASN 44, GLU 49, SER 56, LYS 58, TYR 103, TRP 104, HIS 107, LYS 108	
Liquirritina	-7.0				THR 33, VAL 42, GLU 49, SER 56, LEU 59, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Quercetina	-6.9				GLU 49, GLN 54, LYS 58, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Cianidina	-6.8				GLN 54, SER 56, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Kaempferol	-6.8	GLU 49			GLU 49, SER 56, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Luteolina	-6.6				GLU 49, LYS 58, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Apigenina	-6.5				GLU 49, LYS 58, LYS 99, TYR 103, LYS 108	
Isoquercetina	-6.5	HIS 107	LYS 58 LYS 108	TRP 60	ASN 44, GLU 49, SER 56, LYS 58, TRP 60, TYR 103, HIS 107, LYS 108	

**Tabla 14**. Análisis de las interacciones moleculares entre la  $\alpha$ LA (PDB ID: 3b0) y diversos flavonoides proporcionados por simulaciones de acoplamiento molecular.



Naringenina	-6.5			GLU 49, GLN 54, LYS 58, LYS 99, TYR 103, LYS 108
Genisteína	-6.4			GLU 49, SER 56, LYS 58, LEU 59, TYR 103, LYS 108
EGT	-6.4		LYS 99	GLU 49, GLN 54, LEU 59, LYS 99, TYR 103, HIS 107, LYS 108
Catequina	-6.4		LYS 99	GLU 49, LYS 99, THR 103, HIS 107
Epicatequina	-6.3	TYR 103		GLU 49, LEU 59, TRP 103, HIS 107

## 8.2.6 Interacciones moleculares: Rutina y EGCG

El acoplamiento molecular de aLA con rutina y EGCG mostró que los flavonoides interaccionan con  $\alpha$ LA en la hendidura entre los dominios  $\alpha$ -helicoidal y la lámina  $\beta$ (Figura 14). Katouzian, Jafari, Maghsoudlou, Karami, and Eikani (2020) observaron resultados similares con el acoplamiento molecular del polifenol oleuropeína de oliva con αLA. Ellos reportaron que la hendidura entre los dominios  $\alpha$ -helicoidal y la lámina  $\beta$  en la proteína  $\alpha$ LA era el sitio de enlace preferencial para el polifenol oleuropeína con una energía de enlace de -6.3 kcal mol<sup>-1</sup> (Katouzian et al., 2020). De acuerdo con diferentes autores, las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas juegan un papel importante en la unión de los polifenoles con las proteínas (Nasser Abdulatif Al-Shabib et al., 2018; Sahihi et al., 2012). En este estudio, la rutina y EGCG presentaron una energía de unión de -7.1 kcal mol<sup>-1</sup> en la región de la hendidura de  $\alpha$ LA (Figura 14). El flavonoide rutina fue capaz de la formación de tres puentes de hidrógeno con los grupos amida de los aminoácidos TYR<sub>103</sub>, TRP<sub>104</sub>, and GLU<sub>49</sub>. Asimismo, este flavonoide mostró interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  con los anillos aromáticos de TRP<sub>104</sub> (Figura 14). Por su parte, EGCG formó dos puentes de hidrógeno con los residuos de ASN44 and GLU49. Además, los grupos –OH de LYS<sub>58</sub> y LYS<sub>108</sub> interaccionaron a través de enlaces π-catión





con los anillos aromáticos de EGCG (Figura 14). Adicionalmente, la región de la hendidura de αLA, se encontró otro sitio de interacción potencial con los residuos ILE<sub>41</sub>, GLU<sub>43</sub>, THR<sub>48</sub>, TYR<sub>50</sub>, SER<sub>64</sub>, GLN<sub>65</sub>, LEU<sub>81</sub>. Sin embargo, este sitio alternativo mostró una energía de interacción baja con los flavonoides que la observada en la hendidura entre los dominios α-helicoidal y la lámina β. Por otra parte, la interacción de la molécula de lactosa con la proteína αLA presentó una energía de interacción se encontró en la hendidura de αLA, sin embargo, solo se encontró la creación de un puente de hidrógeno con el aminoácido HIS<sub>107</sub>, y no se observaron interacciones  $\pi$ -π (Figura 14).

El análisis de docking molecular de  $\beta$ LG con rutina y EGCG indicó que estos flavonoides interaccionaron en la cavidad interna de la proteína  $\beta$ LG (Figura 14). Otros autores han sugerido dos sitios de enlace diferentes, un sitio en la cavidad interior del barril  $\beta$  y un sitio en las afueras del barril  $\beta$  (Nasser Abdulatif Al-Shabib et al., 2018). La energía de unión prevista para la rutina- $\beta$ LG fue de -7,3 kcal mol<sup>-1</sup> y -6,2 kcal mol<sup>-1</sup> para EGCG- $\beta$ LG. El complejo rutina- $\beta$ LG se estabilizó mediante tres enlaces de hidrógeno con los residuos PRO<sub>38</sub>, GLU<sub>62</sub> y ASN<sub>109</sub>. Mientras tanto, el complejo EGCG- $\beta$ LG creó dos enlaces de hidrógeno con los aminoácidos ASN<sub>88</sub> y SER<sub>116</sub> (Figura 14). En contraste, la interacción de lactosa con la proteína  $\beta$ LG presentó una energía de unión de -5.5 kcal mol<sup>-1</sup>, formando dos enlaces de hidrógeno con los residuos ASN<sub>90</sub> y SER<sub>116</sub> (Figura 14).

El análisis de acoplamiento molecular confirmó la interacción de la lactosa con las proteínas de suero αLA y βLG, principalmente a través de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los flavonoides tuvieron una interacción más fuerte con las proteínas del suero que la lactosa. La rutina y el EGCG contienen diversos grupos –OH en su estructura, lo que promueve la formación de enlaces de hidrógeno con las



proteínas (Rawel, 2005). Además, el análisis de acoplamiento molecular reveló la formación de interacciones  $\pi$ -catión y  $\pi$ - $\pi$  entre los flavonoides y las proteínas del suero. Igualmente, la proteína  $\beta$ LG tiene regiones hidrófobas que se unen a moléculas no polares como el retinol y algunos ácidos grasos (Walstra et al., 2006). Por lo tanto, los anillos de benceno de los flavonoides podrían formar interacciones no polares con las regiones hidrófobas de  $\beta$ LG. También vale la pena mencionar que las moléculas de flavonoides son más voluminosas que la lactosa; en consecuencia, no pueden penetrar profundamente en las proteínas del suero.





**Figura 14.** Acoplamiento molecular de las proteínas del Suero: α-lactoalbúmina (αLA) y βlactoglobulina (βLG) con flavonoides (rutin and EGCG) y lactosa. La figura muestra las mejores interacciones para **A.** rutina-αLA, **B.** rutina-βLG, **C.** EGCG-αLA, **D.** EGCG-βLG, **E.** lactosa-αLA, y **F.** lactosa-βLG. Las líneas azules representan los puentes de hidrogeno y las líneas amarillas son las interacciones π-catión y π- π.



8.2.7 Interacciones experimentales de los polifenoles con las proteínas del suero.

La medición de la turbidez es una técnica útil para determinar la agregación proteína-proteína en soluciones de proteína-flavonoides debido a interacciones no covalentes (Siddique et al., 2017). En estos experimentos, se observó que la incorporación del flavonoide de rutina (0.5 a 1 mg mL<sup>-1</sup>) en una solución de proteína de suero (1 mg mL<sup>-1</sup>) disminuyó la turbidez (Figura 15 A, barras negras). La rutina es un flavonoide de baja solubilidad en agua  $(0.13 \text{ g L}^{-1})$ ; por lo tanto, puede haber ocurrido la interacción de la rutina con las regiones hidrófobas de las proteínas del suero. La unión de la rutina con las proteínas del suero aumentó la solubilidad de las proteínas del suero, probablemente al bloquear las regiones no polares o al impedir la formación de agregados proteína-proteína. A diferencia de la rutina, la adición de EGCG (0.5 a 1 mg mL<sup>-1</sup>) aumentó la turbidez de las soluciones de proteína de suero (Figura 15 A, barras grises), lo que indica la formación de aglomerados de proteína-proteína. El EGCG es un flavonoide sustancialmente más soluble (20 g L<sup>1</sup>) (Nguyen et al., 2017) que la rutina. Por lo tanto, es probable que la naturaleza hidrófila de EGCG promoviera la formación de complejos proteína-proteína por competencia de agua con proteínas de suero o disminuyendo la solubilidad de la proteína a través de la desnaturalización parcial de proteínas.

El número de grupos amino libres (GAL) en las proteínas del suero disminuyó por la presencia de rutina (1 mg mL<sup>-1</sup>) pero aumentó por la adición de EGCG (Figura 2B). Estas discrepancias entre el efecto de los flavonoides probablemente se asociaron con la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica de la rutina y el EGCG. El análisis GAL evalúa cómo las proteínas se unen a los polifenoles a través del nitrógeno nucleofílico de la cadena lateral  $\varepsilon$ -amino de los aminoácidos, como



arginina, lisina, asparagina y glutamina (Qie et al., 2020). La disminución de GAL en las proteínas del suero indica la formación de complejos proteína-polifenoles (Qie et al., 2020). Sin embargo, un aumento de GAL en soluciones de proteínas de suero puede implicar la exposición de grupos amino que se encuentran al interior de las proteínas, a través del despliegue parcial de su forma terciaria. Nuestros resultados sugieren que la rutina favoreció la formación de complejos de proteínaflavonoides, pero no el EGCG. En cambio, EGCG indujo el despliegue parcial de las proteínas del suero. La desnaturalización de las proteínas expone sus grupos internos no polares y sulfhidrilo, disminuyendo la solubilidad de las proteínas y formando aglomerados proteína-proteína (Pelegrine & Gasparetto, 2005); como lo confirman los ensayos turbidimétricos para soluciones de proteína de suero de leche EGCG (Figura 15 A). Es relevante destacar que otros autores (Qie et al., 2020) han informado una disminución de GAL en las proteínas de suero cuando EGCG se adiciona en una concentración más baja (0.045 mg mL<sup>-1</sup>) que la utilizada en este estudio (0.5 a 1 mg mL<sup>-1</sup>).





**Figura 15.** La interacción entre proteínas y flavonoides se evaluó (A) mediante turbidimetría y (B) midiendo el número de grupos amino libres (GAL) en las proteínas del suero (expresado en nmol mL<sup>-1</sup> de L-leucina). Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras representan medias (n = 3)  $\pm$  DE. Las barras con diferencias mayúsculas o minúsculas indican diferencias significativas (prueba de Tukey-Kramer,  $\alpha$  = 0.05).

#### 8.2.8 Interacciones de los flavonoides y la lactosa.

El análisis de TLC mostró que tanto EGCG como la rutina interactúan con la lactosa (Figura 16). Cuando EGCC (1 mg mL<sup>-1</sup>) y lactosa (10% p / v) estaban juntos en solución, la difusión de EGGC en la placa de sílice se vio retenida (Figura 16), lo que indica una interacción lactosa-flavonoide. De manera similar, la migración de rutina se mantuvo en presencia de lactosa, creando un efecto de gradiente en la placa de TLC (Figura 16). Según diferentes autores, los polifenoles pueden interactuar con los carbohidratos a través de enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Lidija Jakobek, 2015; Le Bourvellec & Renard, 2012). Sin embargo, estas interacciones polifenoles-carbohidratos dependen en gran



medida de la hidrofilia, el peso molecular y la estructura de los polifenoles y carbohidratos (Amoako & Awika, 2016).



**Figura 16.** Análisis por cromatografía de capa fina (TLC) de soluciones de lactosa (10%) con o sin rutina (1 mg mL <sup>-1</sup>) y EGCG (1 mg mL <sup>-1</sup>). Carril 1: solución de lactosa (control), carril 2: solución de EGCG, carril 3: solución de lactosa + EGCG, carril 4: solución de rutina, carril 5: solución de lactosa + rutina. Rf = factores de retención. El análisis de TLC se realizó en una placa de gel de sílice procesada con acetato de etilo: ácido acético: 1-butanol: agua (4: 3: 2: 2) y se visualizó con diclorhidrato de 1-naftil etilendiamina al 0.5% (p / v).



8.2.9 Cinéticas de cristalización de soluciones de lactosa- proteínaflavonoides.

La Figura 17 y Tabla 15 muestran las cinéticas de cristalización de soluciones de lactosa, proteína y flavonoides. La cristalización de lactosa en ausencia de proteínas de suero y flavonoides (control) mostró un tiempo de inducción prolongado (6,72 horas), una velocidad de cristalización lenta (k = 0010 abs min <sup>-1</sup>), y el proceso finalizó (2tc) en 80 horas (Figura 17A). Otros autores también han reportado tiempos de inducción prolongados en la cristalización de lactosa que van de 2 a 20 horas, dependiendo del nivel de saturación (Raghavan et al., 2001; H. Siddique et al., 2015). Un tiempo de inducción prolongado es responsable del lento proceso de cristalización de lactosa y conduce a cristales de mala calidad (R. S. Dhumal et al., 2008). De acuerdo con diferentes autores, todo el proceso de cristalización de lactosa es lento y puede extenderse hasta 72 horas, lo que se convierte en el mayor inconveniente de la cristalización industrial de lactosa a partir del suero de queso (R. S. Dhumal et al., 2008; Anna Pisponen et al., 2016).

La incorporación de proteínas de suero en una solución saturada de lactosa acortó drásticamente el tiempo de inducción (Figura 17B) y aumentó la velocidad de cristalización (k = 0031 abs min -1), terminando todo el proceso en una hora (2tc = 65 min). Estudios previos sobre cristalización de lactosa también han demostrado que la adición de proteínas de suero aumenta la tasa de cristalización de lactosa y disminuye el tiempo de inducción (Sánchez-García et al., 2019; Y. I. Sanchez-Garcia et al., 2018; Sánchez-García et al., 2019). Algunos autores sugieren que la alta capacidad de retención de lactosa locales que promuevan la nucleación de la lactosa (Bhargava, 1996). Además, las proteínas del suero podrían estimular la nucleación heterogénea primaria de la lactosa, actuando como núcleos, un mayor



de núcleos un mayor número de cristales serán producidos a una mayor velocidad (D. Das & Langrish, 2012).

La rutina disminuyó el efecto de las proteínas del suero sobre la cristalización de la lactosa (Figura 17C). La velocidad de cristalización fue menor para las soluciones de lactosa-proteína-rutina (k = 0024 abs min<sup>-1</sup>) que las observadas en las soluciones de lactosa-proteína (k = 0031 abs min<sup>-1</sup>). De manera similar, todo el proceso de cristalización de lactosa-proteína fue más largo con rutina (9,5 horas) que sin este flavonoide (una hora). Anteriormente, describimos que las proteínas de suero son propensas a unirse a la rutina (Figura 14) a través de interacciones hidrófobas,  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno (Figura 14). La unión de la rutina por las proteínas del suero podría haber minimizado el efecto de estas proteínas sobre la cristalización de la lactosa. Además, los cambios cinéticos observados en la cristalización de lactosa podrían estar relacionados con las interacciones rutina-lactosa (Figura 16).

El flavonoide EGCG tuvo un impacto menor que la rutina en la cristalización de la proteína de lactosa-suero (Figura 4D). Por ejemplo, todo el proceso de cristalización terminó en dos horas y media con EGCG, a diferencia de la rutina que lo terminó en nueve horas o una hora sin flavonoides (Figura 14D). Estos resultados sugieren que EGCG interactuó más pobremente con las proteínas del suero. En cambio, los cambios cinéticos en la cristalización de lactosa podrían ser el resultado de interacciones lactosa-EGCG. Esta suposición está respaldada por la tendencia de EGCG a promover aglomerados proteína-proteína en lugar de complejos proteína-EGCG (Figura 15) y la interacción probada entre EGCG y lactosa (Figura 16).





**Figura 17.** Efecto de la adición de polifenoles (rutina y EGCG) y proteínas de suero sobre la cristalización de soluciones de lactosa al 30% (p / v). **A.** Cristalización de soluciones de lactosa sin flavonoides o proteínas del suero (control) **B.** Soluciones de lactosa con proteínas del suero (1% w/v) 1 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas de suero; **C.** soluciones de lactosa con proteínas del suero y rutina (1mg mL<sup>-1</sup>). **D.** soluciones de lactosa con proteínas del Suero y EGCG (0.5mg mL<sup>-1</sup>).



Tabla 15. Parámetros cinéticos observados durante la cristalización de lactosa en presencia de proteínas de suero y polifenoles (rutina y EGCG).

	Máxima respuesta		Frecuencia de adhesión molecular velocidad de nucleación.	Velocidad de cristalización	Tiempo para alcanzar la máxima respuesta
	n	XC	k	W max	t (min)
Lactosa	2.0270	2405.3850	0.0019	0.0010	4810.7699
Lactosa +Proteína	1.6917	14.6196	0.0109	0.0046	29.2392
Lactosa +Proteína +Rutina	2.1008	254.0233	0.0070	0.0037	508.0466
Lactosa +Proteína +EGCG	1.8853	18.6970	0.0219	0.0103	37.3941

Los parámetros matemáticos ns, tc, k se obtuvieron ajustando los datos de cristalización experimental a la ecuación logística n = ns / 1 + exp [ – k (t – tc) ]. 2tc representa el tiempo para alcanzar la región de la meseta cuando n = ns. La velocidad de cristalización se obtuvo a partir de Wmax = kns / 4. 2tc = tiempo para completar el proceso de cristalización, k = velocidad de cristalización.



## 8.2.10 Distribución de tamaños de cristal (CSD)

La incorporación de proteínas de suero en soluciones saturadas de lactosa redujo significativamente la CSD (Figura 18). Los cristales formados a partir de soluciones de lactosa sin proteínas ni flavonoides (control) tenían un tamaño con media y mediana de 23.96 y 15.84 µm, respectivamente. La inclusión de proteínas de suero en las soluciones de lactosa redujo el tamaño los cristales con una media y mediana de 20.96 y 13.10 µm (Figura 18). Del mismo modo, algunos otros estudios han observado una reducción de la lactosa CSD por las proteínas del suero (Sánchez-García et al., Bhargava, 1996; 2019). Algunos autores sugieren que las proteínas del suero pueden actuar como centros para núcleos en la cristalización de lactosa, aumentando el número de núcleos y cristales con una reducción concomitante del tamaño de los cristales. (Sánchez-García et al., 2019). El efecto de las proteínas de suero de leche sobre la CSD también podría estar relacionado con la capacidad de unión de agua de estas proteínas. Según Bhargava (1996), las proteínas del suero disminuyen la solubilidad de la lactosa debido a su alta capacidad de retención de agua. Esta mayor capacidad de unión al agua crea puntos de sobresaturación de lactosa, promoviendo la nucleación y favoreciendo la cristalización de la lactosa. Además, la capacidad de las proteínas de unirse al agua disminuye la movilidad de las moléculas de lactosa. En consecuencia, el crecimiento de cristales disminuye y la CSD es pequeña. (D. Das & Langrish, 2012; McLeod et al., 2011; Zamanipoor & Mancera, 2014). Reducir la CSD es un criterio primordial en los fabricantes de lactosa debido a que la lactosa cristaliza de forma incontrolable. Lograr uniformidad y reducir la variabilidad dentro de los cristales de lactosa es beneficioso tanto para el procesamiento como para el punto de vista de la calidad (Parimaladevi & Srinivasan, 2014; Zamanipoor & Mancera, 2014).





La incorporación de EGCG mejoró el efecto de las proteínas del suero al disminuir, aún más, el tamaño de los cristales, por el contrario, la adición de rutina aumentó el tamaño de los cristales (Figura 18). Los cristales de las soluciones de lactosaproteína-EGCG mostraron un tamaño con media y mediana de 19.17 y 16.74 µm. Por el contrario, los cristales de las soluciones de lactosa-proteína-rutina tenían una media y mediana de 27.48 y 23.31 µm. Como se describió anteriormente, el EGCG promueve las interacciones proteína-proteína (Figura 15), lo que podría potenciar el efecto de las proteínas limitando el crecimiento de cristales. Además, las moléculas de EGCG podrían haber actuado como núcleos durante la cristalización de lactosa, ya que este flavonoide tiende a interactuar con la lactosa (Figura 16). En consecuencia, la adición de EGCG aumentó el número de núcleos disponibles para el crecimiento de cristales con una disminución resultante en el tamaño de los cristales. Por otro lado, la rutina tiende a unirse a las proteínas del suero (Figura 15). Por tanto, es probable que la rutina interactúe con las proteínas del suero durante la cristalización de la lactosa, formando complejos flavonoidesproteína. La complejación de las proteínas del suero con la rutina podría dificultar parcialmente la unión de las moléculas de lactosa con las proteínas del suero. Como resultado, el número de posibles núcleos disminuyó y aumentó el tamaño de los cristales.





**Figura 18.** Distribución de tamaños de cristal (CSD) de lactosa cristalizada con o sin adición de proteínas (1 mg mL<sup>-1</sup>), rutin (0.5 mg mL<sup>-1</sup>), and EGCG (0.5 mg mL<sup>-1</sup>).

#### 8.2.11 Caracterización de los cristales.

El análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (<u>Tabla 17</u>, <u>Figura 19</u>) mostró que las soluciones de lactosa sin proteínas o flavonoides (control) crearon principalmente cristales de  $\alpha$ -lactosa monohidratada ( $\alpha$ LM) y  $\beta$ -lactosa anhidra ( $\beta$ L). Además, la formación de lactosa amorfa en los cristales de control fue mínima (<u>Tabla 17</u>, <u>Figura 19</u>). La relación de moles de agua por mol de lactosa anhidra fue de 0.72 (<u>Tabla 17</u>), lo que confirma la alta proporción de  $\alpha$ LM en estos cristales.  $\alpha$ LM es la forma cristalina más estable de lactosa, que contiene aproximadamente un mol de agua por mol de lactosa anhidra (Ravindra S Dhumal et al., 2008; Thom Huppertz & Gazi, 2015b; S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011).



La formación de αLM se promueve cuando el proceso de cristalización es lento o lo suficientemente lento como para igualar la tasa de mutarrotación de lactosa (Thom Huppertz & Gazi, 2015b; Y. I. Sánchez-García et al., 2021), lo que coincide con nuestros resultados (Figura 4).

Los cristales de αLM disminuyeron sustancialmente al agregar proteínas de suero en soluciones de lactosa. En cambio, la cristalización de soluciones de lactosaproteína promovió la formación de cristales anhidros de βL y lactosa amorfa (Tabla 17, Figura 19). La proporción reducida de αLM y el predominio de βL anhidra se confirmó por la baja proporción de moles de agua por mol de lactosa anhidra (0,14). La formación de lactosa amorfa mediante la adición de proteínas de suero de leche se ha reportado anteriormente, especialmente si la solución de lactosaproteína tiene un pH neutro (Sánchez-García et al., 2019). La formación de βL y lactosa amorfa fue probablemente una consecuencia del rápido proceso de cristalización en soluciones de proteína de suero de lactosa (Figura 17), ya que la lactosa amorfa se crea cuando la cristalización ocurre más rápido que la tasa de mutarrotación (Thom Huppertz & Gazi, 2015b). Por otro lado, los cristales obtenidos a partir de soluciones de lactosa-proteína mostraron un contenido de proteína de 0.36 mg por 100 mg de cristales (Tabla 16), lo que indica la formación de co- cristales con lactosa y proteínas. De igual forma, resultados de un estudio previo sobre el efecto de las proteínas del suero en la cristalización de lactosa también confirmaron la incorporación de proteínas en la red cristalina de la lactosa (Sánchez-García et al., 2019). Este efecto está relacionado con la interacción activa entre las proteínas del suero y las moléculas de lactosa, como se discutió anteriormente (Figura 14).

La formación de cristales de ßL también prevaleció cuando el EGCG se incorporó a soluciones de lactosa-proteína. Además, el EGCG aumentó la formación de


FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

lactosa amorfa (Tabla 17, Figura 19). Curiosamente, no se detectó proteína en los cristales de las soluciones de lactosa-proteína-EGCG. El EGCG promueve la formación de aglomerados de proteínas (Figura 15), lo que podría haber limitado las interacciones entre las proteínas del suero y las moléculas de lactosa. El EGCG se encontró en los cristales de lactosa a  $0.308 \pm 0.063$  mg por 100 mg de cristales. Como se discutió anteriormente, el EGCG tiende a interactuar con las moléculas de lactosa (Figura 16). Por tanto, este flavonoide podría haber actuado como núcleo, dando lugar a la formación de co-cristales de lactosa- EGCG o, más precisamente, lactosa amorfa-EGCG, debido a que el análisis de DSC mostró un pico alto de lactosa amorfa cuando EGCG fue añadida (Tabla 17, Figura 19).

En contraste con EGCG, la rutina promovió la formación de αLM (Tabla 17, Figura 19) y mejoró la inclusión de proteínas de suero en los cristales ( $0.569 \pm 0.037$  mg de proteína por 100 mg de cristales). Asimismo, se integró una cantidad considerable de rutina en los cristales  $(3.468 \pm 0.392 \text{ mg por } 100 \text{ mg de cristales})$ , aproximadamente diez veces la concentración de EGCG observada en los cristales de lactosa. Según el análisis de acoplamiento computacional, el flavonoide de rutina interactuó fuertemente con las proteínas del suero, particularmente con la  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 14). Esta proteína tiene regiones hidrofóbicas que se unen a moléculas no polares, como la rutina. La complejación de las proteínas del suero con la rutina probablemente bloqueó las zonas hidrofóbicas de las proteínas y la rutina, aumentando su solubilidad. Estos cambios pueden haber mejorado la inclusión de proteínas y rutina en los cristales de lactosa. Además, también es probable que las moléculas de rutina de baja polaridad migraran a la estructura cristalina para minimizar su exposición al disolvente polar (agua). En resumen, estos resultados confirman la formación de co- cristales que contienen lactosa, proteína y una gran concentración de rutina.



**Tabla 16.** Incorporación de proteínas y polifenoles en cristales de lactosa luego de 72 h de cristalización de soluciones de lactosa (30% p/v) adicionadas con  $(1 \text{ mg mL}^{-1})$  proteínas de suero y flavonoides (rutina y EGCG)

Tipo de cristal/ co- cristal	Proteína (mg proteína 100mg cristal <sup>-1</sup> )	Contenido de polifenoles totales (mg 100 mg cristal <sup>-1</sup> )
Cristales de lactosa	NP <sup>°</sup>	NP <sup>b</sup>
Co- cristales de lactosa- proteína	0.369 ± 0.029 <sup>b</sup>	0.308 ± 0.063 <sup>b</sup>
Co- cristales de lactosa- proteína- rutina	0.569 ± 0.037 ª	3.468 ± 0.392 ª
Co- cristales de lactosa- EGCG	NP °	0.272 ± 0.093 <sup>b</sup>

**Tabla 17.** Entalpías (ΔH) de los picos endotérmicos más característicos observados en el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de lactosa cristalizada con la adición de proteínas de suero (1 mg mL<sup>-1</sup>) y polifenoles (rutina y EGCG).

Cristales de soluciones que contienen	Deshidratación de agua cristalina en α- LM	fusión de αL anhidra inestable	Fusión de αLM	Fusión de βL	Fusión de lactosa amorfa	Moles de agua por mol de lactosa anhidra [w]/[αL]
Lactosa	144.5 (-89.43)	169.5 (-17.79)	216.3 (-33.78)	225.3 (-29.59)	244.8 (-9.671)	0.72
Lactosa + proteína Lactosa +	138.2 (-18.26) 151.9	`151.2´ (-15.23)	183.8 (-39.84) 199.3	201.5 (-62.98) 212.8	234.3 (-28.61) 242.8	0.14 0.68
proteina + rutin Lactosa + proteína + EGCG	(-83.55) 153.1 (-81.11)		(-71.25) 196.9 (-16.60)	(-51.46) 202.2 (-50.46)	(-17.86) 221.4 (-49.97)	0.66
Estándar α - Lactosa Estándar β - Lactosa	144 (-99.64) 140 (-5.79)	163.6 (-22.36)	216.9 (-14.19)	233 (-159) 234.4 (-107.2)	252.9 (-11.98) 249.9 (-20.27)	0.8 0.05
Bibliografía	130-146 <sup>1</sup>	170 <sup>2</sup>	201-220 <sup>3</sup>	220-235 <sup>4</sup>	240-241 5	

<sup>1</sup>: (R. S. Dhumal et al., 2008; Kougoulos et al., 2010; S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011), <sup>2</sup>: (Islam & Langrish, 2010); <sup>3</sup>: R. S. Dhumal et al., 2008; Islam & Langrish, 2010; Kougoulos et al., 2010; S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011); <sup>4</sup>: (Islam & Langrish, 2010; Kougoulos et al., 2010; S. R. Patel & Z. V. P. Murthy, 2011); <sup>5</sup>: (Y. I. Sánchez-García, Gutiérrez-Méndez, et al., 2019; Wu et al., 2014), (identificada experimentalmente con el estándar de  $\beta$ -L).



**Figura 19.** Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de lactosa cristalizada con la adición de proteínas de suero (1 mg mL<sup>-1</sup>) y polifenoles (rutina y EGCG) **A**. Control (solución de lactosa) **B**. Co- cristales de lactosa- proteína; **C**. Co- cristales de lactosa-proteína-rutina; **D**. Co- cristales de lactosa-EGCG; **E**. Estándares de  $\alpha$ - y  $\beta$ - lactosa **F**. Estándares de rutina y EGCG.



## 9 CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo confirmaron que las carrageninas alteran el proceso de mutarrotación en una solución de lactosa. Los efectos más notables fueron la reducción del tiempo para alcanzar el equilibrio de mutarrotación (tMeqm) y la modificación de la relación de isómeros β / α en equilibrio. También se demostró que las carrageninas disminuyen la solubilidad (Cs) y la súper solubilidad (S) de la lactosa con la consecuente reducción de MZ. El efecto de la carragenina sobre las propiedades de la lactosa se atribuyó a la interacción de la lactosa con las moléculas de carragenina y la capacidad de retención de agua de este polisacárido.
- El análisis de acoplamiento molecular confirmó la interacción de la lactosa con las proteínas de suero αLA y βLG, principalmente a través de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los flavonoides tuvieron una interacción más fuerte con las proteínas del suero que la lactosa. La rutina y el EGCG contienen diversos grupos –OH en su estructura, lo que promueve la formación de enlaces de hidrógeno con las proteínas, así como presentan una interacción en las regiones hidrófobas de las proteínas. Por otra parte, esta interacción se verificó experimentalmente, encontrando que la rutina promueve la interacción proteína- polifenol, al contrario de la presencia de EGCG, que es un flavonoide sustancialmente más soluble que el anterior, por lo que promueve la formación de complejos proteína- proteína por competencia con las moléculas de agua, además de inducir el despliegue parcial de las proteínas del suero.
- Como se sabe, la presencia de proteínas de suero aumenta la velocidad de cristalización de la lactosa y reduce el tiempo de inducción y cristalización.
   Por una parte, la adición de rutina disminuyó la velocidad de cristalización, lo que llevó a tener un tiempo de cristalización más amplio. Y, por otra



parte, el EGCG, al interactuar más pobremente con las proteínas del suero, no limitó su impacto en el proceso.

- En cuanto a la distribución del tamaño de cristales, las proteínas redujeron significativamente el tamaño de los cristales, lo que es imprescindible para la industria. La incorporación de EGCG mejoró el efecto de las proteínas del suero al disminuir, aún más, el tamaño de los cristales, debido a la complejación proteína- proteína, que limita el crecimiento de los cristales, por el contrario, la adición de rutina aumentó el tamaño de estos, al interaccionar con las proteínas dificultar parcialmente la unión de las moléculas de lactosa con las proteínas del suero. Como resultado, el número de posibles núcleos disminuyó y aumentó el tamaño de los cristales.
- Esto llevó a obtener tres tipos de co- cristales: lactosa- proteína, lactosaproteína- rutina y lactosa amorfa- EGCG. La adición de rutina promovió la formación de αLM y aumentó la inclusión de proteínas de suero en los cristales. Asimismo, se integró una cantidad considerable de rutina en los cristales (3.468 ± 0.392 mg por 100 mg de cristales). Por su parte, la EGCG, a pesar de inhibir la incorporación de proteína a los cristales, aumentó la formación de βL y de lactosa amorfa. Sin embargo, se encontró la adición del flavonoide en el cristal, infiriendo que actúa como núcleo en el proceso.

#### 9.1 Recomendaciones

Se recomiendan investigaciones futuras para la posible aplicación de este sistema modelo en un sistema más complejo como lo es el suero de queso para su escalamiento a la industria láctea. Así mismo, se recomienda la confirmación de los efectos del uso de flavonoides en el proceso de cristalización de la lactosa a partir de el té verde, para poder verificar la viabilidad del proyecto. Finalmente, tras comprobar que el presente trabajo puede realizarse a partir de desechos





industriales, poder utilizar los co- cristales de lactosa, proteína y flavonoides como un ingrediente funcional en la industria de alimentos.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Al-Otaibi, J. S., Sheena Mary, Y., Shyma Mary, Y., Panicker, C. Y., & Thomas, R. (2019). Cocrystals of pyrazinamide with p-toluenesulfonic and ferulic acids: DFT investigations and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, *1175*, 916-926. doi: 10.1016/j.molstruc.2018.08.055
- Al-Shabib, N. A., Khan, J. M., Malik, A., Alsenaidy, M. A., Rehman, M. T., AlAjmi, M. F., . . . Khan, R. H. (2018). Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies. *Journal of Molecular Liquids, 269*, 511-520. doi: 10.1016/j.molliq.2018.07.122
- Al-Shabib, N. A., Khan, J. M., Malik, A., Sen, P., Alsenaidy, M. A., Husain, F. M., . .
  Shahzad, S. A. (2019). A quercetin-based flavanoid (rutin) reverses amyloid fibrillation in beta-lactoglobulin at pH2.0 and 358K. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 214*, 40-48. doi: 10.1016/j.saa.2019.02.004
- Alvarado-Díaz, C. S., Gutiérrez-Méndez, N., Mendoza-López, M. L., Rodríguez-Rodríguez, M. Z., Quintero-Ramos, A., Landeros-Martínez, L. L., . . . Leal-Ramos, M. Y. (2019). Inhibitory effect of saccharides and phenolic compounds from maize silks on intestinal α-glucosidases. *Journal of Food Biochemistry, 43*(7). doi: 10.1111/jfbc.12896
- Amoako, D., & Awika, J. M. (2016). Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Current Opinion in Food Science, 8*, 14-18. doi: 10.1016/j.cofs.2016.01.010





- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2012). Food gels: gelling process and new applications. *Crit Rev Food Sci Nutr, 52*(4), 334-346. doi: 10.1080/10408398.2010.500234
- Becke, A. D. (1998). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, *98*(7), 5648–5652.
- Bhargava, A., Jelen, P. (1996). Lactose solubility and crystal growth as affected by mineral impurities. *J Food Sci, 61*, 180-184. doi: doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb14754.x
- Błaszak, B., Gozdecka, G., & Shyichuk, A. (2018). Carrageenan as a functional additive in the production of cheese and cheese-like products [pdf]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 17(2), 107-116. doi: 10.17306/j.afs.2018.0550
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Budziak-Wieczorek, I., & Maciolek, U. (2021). Synthesis and Characterization of a
   (-)-Epicatechin and Barbituric Acid Cocrystal: Single-Crystal X-ray
   Diffraction and Vibrational Spectroscopic Studies. ACS Omega, 6(12), 8199-8209. doi: 10.1021/acsomega.0c06239
- Buitimea-Cantua, N. E., Gutierrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2018).
  Phenolic-Protein Interactions: Effects on Food Properties and Health Benefits. *J Med Food*, *21*(2), 188-198. doi: 10.1089/jmf.2017.0057
- Bund, R., & Pandit, A. (2007). Sonocrystallization: Effect on lactose recovery and crystal habit. *Ultrasonics Sonochemistry, 14*, 143-152.
- Bund, R. K., & Pandit, A. B. (2007). Sonocrystallization: effect on lactose recovery and crystal habit. *Ultrason Sonochem*, 14(2), 143-152. doi: 10.1016/j.ultsonch.2006.06.003
- Černíková, M., Buňka, F., Pavlínek, V., Březina, P., Hrabě, J., & Valášek, P. (2008). Effect of carrageenan type on viscoelastic properties of processed



cheese. *Food Hydrocolloids,* 22(6), 1054-1061. doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.05.020

- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr, 5*, 87. doi: 10.3389/fnut.2018.00087
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason Sonochem, 18*(5), 951-957. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.12.016
- Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*. doi: 10.1016/j.psep.2015.05.006
- Das, D., & Langrish, T. A. G. (2012). Activated-rate theory: Effect of protein inhibition and the temperature dependence of crystallization kinetics for lactose-protein mixtures. *Food Res Int,* 48(2), 367-373. doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.019
- Das, P. R., & Eun, J. B. (2018). A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chem*, 253, 22-29. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.080
- de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrasonics Sonochemistry, 14*, 717-724.
- De Souza, L. A., Tavares, W. M. G., Lopes, A. P. M., Soeiro, M. M., & De Almeida, W. B. (2017). Structural analysis of flavonoids in solution through DFT 1H NMR chemical shift calculations: Epigallocatechin, Kaempferol and Quercetin. *Chemical Physics Letters*, 676, 46-52. doi: 10.1016/j.cplett.2017.03.038

De Ugaz, O. L. S. (1997). Colorantes naturales. Fondo Editorial PUCP.



- Dhumal, R. S., Biradar, S. V., Paradkar, A. R., & York, P. (2008). Ultrasound assisted engineering of lactose crystals. *Pharm Res, 25*(12), 2835-2844. doi: 10.1007/s11095-008-9653-9
- Dhumal, R. S., Biradar, S. V., Paradkar, A. R., & York, P. (2008). Ultrasound Assisted Engineering of Lactose Crystals. *Pharmaceutical research, 25*, 2835-2844.
- Dincer, T. D., Ogden, M. I., & Parkinson, G. M. (2009). Crystal growth mechanisms of the (0 1 0) face of α-lactose monohydrate crystals. *Journal of Crystal Growth*, 311, 2427-2432. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2009.02.030
- Dixon, R. A., & Ferreira, D. . (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205-211.
- Drohan, D. D., Tziboula, A., McNulty, D., & Horne, D. S. (1997). Milk proteincarrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, *11*(1), 101.
- E. L. V. Harris, S. A. Protein Purification Methods A Practical Approach
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications a review. *International Journal of Food Science & Technology, 44*(12), 2512-2518. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
- Erdemir, D., Lee, A., and Myerson, A. . (2009). Nucleation of Crystals from Solution: Classicaland Two-Step Models. *Accounts of Chemical research*, 42, 621-629.
- Regulatory classification of pharmaceutical co-crystals guidance for industry (2018).
- Grzesik, M., Naparlo, K., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem, 241*, 480-492. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117
- Hartel, R. W., & Shastry, A. V. (2009). Sugar crystallization in food products. *Crit Rev Food Sci Nutr, 30*(1), 49-112. doi: 10.1080/10408399109527541
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, *13*(10), 572-584.



- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review, 136*(3B), B864-B871. doi: 10.1103/PhysRev.136.B864
- Holsinger, V. H. (1997). Physical and chemical properties of lactose *In Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 3, pp. 1-38). Boston, MA: Springer.
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2015a). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science, 98*, 1-10. doi: 10.3168/jds.2015-10033
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2015b). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6842-6851. doi: 10.3168/jds.2015-10033
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *J Dairy Sci, 99*(8), 6842-6851. doi: 10.3168/jds.2015-10033
- Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). "Weak gel"-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ-carrageenan helices. *Journal of agricultural* and food chemistry, 49(9), 4436-4441.
- Islam, M. I. U., & Langrish, T. A. G. (2010). An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. *Food Res Int, 43*(1), 46-56. doi: 10.1016/j.foodres.2009.08.010
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem, 175*, 556-567. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry, 175*, 556-567. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013
- Jawad, R., Elleman, C., Vermeer, L., Drake, A. F., Woodhead, B., Martin, G. P., & Royall, P. G. (2012). The measurement of the beta/alpha anomer composition within amorphous lactose prepared by spray and freeze drying using a simple (1)H-NMR method. *Pharm Res, 29*(2), 511-524. doi: 10.1007/s11095-011-0575-6



- Jiang, Z., Li, T., Ma, L., Chen, W., Yu, H., Abdul, Q., . . . Tian, B. (2020). Comparison of interaction between three similar chalconoids and alphalactalbumin: Impact on structure and functionality of alpha-lactalbumin. *Food Res Int, 131*, 109006. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109006
- Justino, G. C., & Vieira, A. J. (2010). Antioxidant mechanisms of Quercetin and Myricetin in the gas phase and in solution--a comparison and validation of semi-empirical methods. *J Mol Model, 16*(5), 863-876. doi: 10.1007/s00894-009-0583-1
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry, 86*(4), 593-600. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.10.007
- Katouzian, I., Jafari, S. M., Maghsoudlou, Y., Karami, L., & Eikani, M. H. (2020).
   Experimental and molecular docking study of the binding interactions between bovine α-lactalbumin and oleuropein. *Food Hydrocolloids, 105*, 105859. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105859
- Khankari, R. K., Law, D., & Grant, D. J. W. (1992). Determination of water content in pharmaceutical hydrates by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 82, 117-127. doi: doi:10.1016/0378-5173(92)90080-L
- Khosravi, I., & Sahihi, M. (2014). Computational Studies on the Interaction of Arctiin and Liquiritin With β-lactoglobulin. *Journal of Macromolecular Science, Part B, 53*(9), 1591-1600. doi: 10.1080/00222348.2014.946844
- Kirk, J. H., Dann, S. E., & Blatchford, C. G. (2007). Lactose: a definitive guide to polymorph determination. *Int J Pharm, 334*(1-2), 103-114. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.026
- Kouassi, K., Jouppila, K., & Roos, Y. H. (2002). Effects of κ-Carrageenan on Crystallization and Invertase Activity in Lactose-Sucrose Systems. *J Food Sci*, 67(6), 2190-2195.
- Kougoulos, E., Marziano, I., & Miller, P. R. (2010). Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size.



*Journal of Crystal Growth,* 312(23), 3509-3520. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2010.09.022

Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update, 2*(2), 22-37.

- Landeros-Martinez, L. L., Glossman-Mitnik, D., & Flores-Holguin, N. (2018). Studying the chemical reactivity properties of the target tumor-environment tripeptides NGR (asparagine-glycine-arginine) and RGD (arginine-glycineaspartic acid) in their interactions with tamoxifen through conceptual density functional theory. *J Mol Model, 24*(12), 336. doi: 10.1007/s00894-018-3868-4
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., & Parker, A. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, *14*(4), 273-280.
- Lara-Ochoa, F., & Espinosa-PÉRez, G. (2007). Cocrystals Definitions. *Supramolecular Chemistry, 19*(8), 553-557. doi: 10.1080/10610270701501652
- Lata, K., Sharma, M., Patel, S. N., Sangwan, R. S., & Singh, S. P. (2018). An integrated bio-process for production of functional biomolecules utilizing raw and by-products from dairy and sugarcane industries. *Bioprocess Biosyst Eng*, *41*(8), 1121-1131. doi: 10.1007/s00449-018-1941-0
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr, 52*(3), 213-248. doi: 10.1080/10408398.2010.499808
- Lewars, E. (2003). Computational chemistry. Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics: Springer Science & Business Media.
- Li, T., Hu, P., Dai, T., Li, P., Ye, X., Chen, J., & Liu, C. (2018). Comparing the binding interaction between beta-lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking.



Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 201, 197-206. doi: 10.1016/j.saa.2018.05.011

- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets, 8*(7), 634-646.
- Listiohadi, Y. D., Hourigan, J. A., Sleigh, R., Steele, R. J. (2005). Propierties of Lactose and its caking behaviour. *Australian Journal of Dairy Technology,* 60, 33-52.
- Liu, F., Ma, C., McClements, D. J., & Gao, Y. (2017). A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution. *Food Hydrocolloids*, 63, 625-634. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.09.041
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrason Sonochem, 14*(6), 717-724. doi: 10.1016/j.ultsonch.2006.12.004
- M Calderon-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro,
   M. . (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(4), 298-344.
- Majd, F., & Nickerson, T. A. (1976). Effect of alcohols on lactose solubility. *J Dairy Sci, 59*(6), 1025-1032.
- McLeod, J., Paterson, A. H. J., Jones, J. R., & Bronlund, J. E. (2011). Primary nucleation of alpha-lactose monohydrate: The effect of supersaturation and temperature. *International Dairy Journal*, 21(7), 455-461. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.01.006
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (2009). Lactose, Water, Salts, and Minor Constitutens. In Springer (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 3). New York, E.U.A.
- Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2005). CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *Journal of*



*Molecular Structure: THEOCHEM, 716*(1-3), 67-72. doi: 10.1016/j.theochem.2004.10.083

- Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2006). Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM,* 761(1-3), 97-106. doi: 10.1016/j.theochem.2006.01.001
- Mendoza-Wilson, A. M., Lardizabal-Gutiérrez, D., Torres-Moye, E., Fuentes-Cobas, L., Balandrán-Quintana, R. R., Camacho-Dávila, A., . . . Glossman-Mitnik, D. (2007). Optimized structure and thermochemical properties of flavonoids determined by the CHIH(medium)–DFT model chemistry versus experimental techniques. *Journal of Molecular Structure*, 871(1-3), 114-130. doi: 10.1016/j.molstruc.2007.02.008
- Mendoza-Wilson, A. M. a., & Glossman-Mitnik, D. (2004). CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 681*(1-3), 71-76. doi: 10.1016/j.theochem.2004.04.054
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K.,
  & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Morrissey, P. A. (1985). Lactose: Chemical and phisicochemical propierties *In Developments in dairy chemistry*—3 (pp. 1-34): Springer, Dordrecht.
- Negahdari, R., Bohlouli, S., Sharifi, S., Maleki Dizaj, S., Rahbar Saadat, Y., Khezri, K., . . . Raeesi, S. (2021). Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytother Res, 35*(4), 1719-1738. doi: 10.1002/ptr.6904
- Nguyen, T. T. H., Kim, N. M., Yeom, S.-C., Han, S., Kwak, S.-H., Kim, S.-B., . . . Kim, D. (2017). Biological characterization of epigallocatechin gallate complex with different steviol glucosides. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(5), 512-517. doi: 10.1007/s12257-017-0286-x



- Parimaladevi, P., & Srinivasan, K. (2014). Influence of supersaturation level on the morphology of α-lactose monohydrate crystals. *International Dairy Journal*, 39(2), 301-311. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.08.007
- Parr, R. G., Szentpály, L. v., & Liu, S. . (1999). Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society, 121*(9), 1922-1924.
- Patel, S., & Murthy, Z. (2011). Anti-solvent sonocrystallisation of lactose. *Chemical* and Process Engineering, 32(4). doi: 10.2478/v10176-011-0030-6
- Patel, S. R., & Murthy, Z. V. P. (2009). Ultrasound assisted crystallization for the recovery of lactose in an anti-solvent acetone. *Crystal Research and Technology*, 44, 889-896.
- Patel, S. R., & Murthy, Z. V. P. (2011). Effect of process parameters on crystal size and morphology of lactose in ultrasound-assisted crystallization. *Crystal Research and Technology*, 46(3), 243-248. doi: 10.1002/crat.201000694
- Patel, S. R., & Murthy, Z. V. P. (2012). Lactose Recovery Processes from Whey: A Comparative Study Based on Sonocrystallization. *Separation & Purification Reviews*, 41(4), 251-266. doi: 10.1080/15422119.2011.594142
- Pearson, R. G. (1986). Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(22), 8440-8441.
- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. LWT - Food Science and Technology, 38(1), 77-80. doi: 10.1016/j.lwt.2004.03.013
- Pervin, M., Unno, K., Ohishi, T., Tanabe, H., Miyoshi, N., & Nakamura, Y. (2018).
   Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases.
   *Molecules*, 23(6). doi: 10.3390/molecules23061297
- Peter, P. N. (2002). Solubility Relationships of Lactose-Sucrose Solutions. I. Lactose-Sucrose Soluabilities at Low Temperatures. *The Journal of Physical Chemistry*, 32(12), 1856-1864.
- Pisponen, A., Mootse, H., Poikalainen, V., Kaart, T., Maran, U., & Karus, A. (2016). Effects of temperature and concentration on particle size in a lactose



solution using dynamic light scattering analysis. *International Dairy Journal, 61*, 205-210. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.06.006

- Pisponen, A., Pajumägi, S., Mootse, H., Sats, A., Poikalainen, V., & Karus, A. (2014). Effect of cooling rates and low crystallization temperatures on morphology of lactose crystals obtained from Ricotta cheese whey. *Agronomy Research, 12*(3), 787-792.
- Qie, X., Chen, Y., Quan, W., Wang, Z., Zeng, M., Qin, F., . . . He, Z. (2020).
  Analysis of beta-lactoglobulin-epigallocatechin gallate interactions: the antioxidant capacity and effects of polyphenols under different heating conditions in polyphenolic-protein interactions. *Food Funct, 11*(5), 3867-3878. doi: 10.1039/d0fo00627k
- Raghavan, S. L., Ristic, R. I., Sheen, D. B., & Sherwood, J. N. (2001). The bulk crystallization of α-lactose monohydrate from aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*(7), 823-832. doi: 10.1002/jps.1036
- Raghavan, S. L., Ristic, R. I., Sheen, D. B., Sherwood, J. N., Trowbridge, L., & York, P. (2000). Morphology of crystals of α-lactose hydrate grown from aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, *104*(51), 12256-12262.
- Raghavan, S. L., Ristic, R. I., Sheen, D. B. y Sherwood, J. N. (2000). Morphology of Crystals of r-Lactose Hydrate Grown from Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemestry*, 104, 12256–12262.
- Rawel, H. M., Meidtner, K., & Kroll, J. . (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4228-4235.
- Roos, Y. H. (2009). Solid and Liquid States of Lactose. In P. F. M. P. L. H. Fox (Ed.), Advanced dairy chemistry volume 3: lactose, water, salt and minor constituents (Vol. 3, pp. 17-33). New York: Springer.
- Sahihi, M., Heidari-Koholi, Z., & Bordbar, A.-K. (2012). The Interaction of Polyphenol Flavonoids with β-lactoglobulin: Molecular Docking and



Molecular Dynamics Simulation Studies. *Journal of Macromolecular Science, Part B, 51*(12), 2311-2323. doi: 10.1080/00222348.2012.672854

- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel), 12*(1). doi: 10.3390/ph12010011
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. . (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2 ed.): Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez-García, Y. I., Ashokkumar, M., Mason, T. J., & Gutiérrez-Méndez, N. (2019). Influence of ultrasound frequency and power on lactose nucleation. *Journal of Food Engineering, 249*, 34-39. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.01.007
- Sánchez-García, Y. I., Bhangu, S. K., Ashokkumar, M., & Gutiérrez-Méndez, N. (2018). Sonocrystallization of lactose from whey. In INTECH (Ed.), *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing* (pp. 51-71).
- Sanchez-Garcia, Y. I., Garcia-Vega, K. S., Leal-Ramos, M. Y., Salmeron, I., & Gutierrez-Mendez, N. (2018). Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and kappa-carrageenan. *Ultrason Sonochem, 42*, 714-722. doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.12.020
- Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sánchez, V. H., & Leal-Ramos, M. Y. (2019). Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. *Food Research International, 116*, 455-461. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.061
- Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Salmerón, I., Ramos-Sánchez, V. H., Leal-Ramos, M. Y., & Sepúlveda, D. R. (2021). Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans. *Food Res Int, 142*, 110204. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110204
- Sanchez-Garcia, Y. I., Gutierrez-Mendez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sanchez, V. H., Leal-Ramos, M. Y. (2019). Individual and combined effect



of pH and whey proteins on lactose crystallization. *Food Res Int, 116*, 455-461. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.061

- Sander, J. R., Zeiger, B. W., & Suslick, K. S. (2014). Sonocrystallization and sonofragmentation. Ultrason Sonochem, 21(6), 1908-1915. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.02.005
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018
- SIAP-SAGARPA. (2016). *Boletín de leche*. Mexico D.F.: Servicio de Información Agroalimentartia y Pesquera Retrieved from <u>http://www.siap.gob.mx/estudios/</u>.
- Siddique, H., Brown, C. J., Houson, I., & Florence, A. J. (2015). Establishment of a Continuous Sonocrystallization Process for Lactose in an Oscillatory Baffled Crystallizer. Organic Process Research & Development, 19(12), 1871-1881. doi: 10.1021/acs.oprd.5b00127
- Siddique, M. A. B., Maresca, P., Pataro, G., & Ferrari, G. (2017). Influence of pulsed light treatment on the aggregation of whey protein isolate. *Food Res Int*, 99(Pt 1), 419-425. doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.003
- Stephen, A. M., & Phillips, G. O. (2016). Food polysaccharides and their applications (2nd ed.): CRC press.
- Tjuradi, P., & Hartel, R. W. (1995). Corn syrup oligosaccharide effects on sucrose crystallization. *J Food Sci, 60*(6), 1353-1356.
- Tomasi, J., & Persico, M. . (1994). Molecular interactions in solution: an overview of methods based on continuous distributions of the solvent. *Chemical Reviews*, *94*(7), 2027-2094. doi: 10.1021/cr00031a013,
- Vekilov, P. G. (2010). Nucleation. *Cryst Growth Des, 10*(12), 5007-5019. doi: 10.1021/cg1011633
- Venigalla, M., Gyengesi, E., & Münch, G. (2015). Curcumin and Apigenin–novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research, 10*(8), 1181.



- Visser, R. A. (1982). Supersaturation of α-lactose in aqueous solutions in mutarotation equilibrium. *Netherlands Milk and Dairy Journal.*
- Wagner, J. P., & Schreiner, P. R. (2015). London Dispersion in Molecular Chemistry— Reconsidering Steric Effects. Angewandte Chemie International Edition, 54(42), 12274-12296.
- Walstra, P., J. T. M. Wouters, and T. M. Geurst. . (2006). *Dairy Science and Technology* (Second Ed. ed.). Boca Raton FL: CRC press.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurst, T. M. (2006). *Dairy Science and Technology* (Second ed.). Boca Raton FL: CRC press.
- Walstra, P. W., Jan. Geurts, Tom. (2006). *Dairy Science and Technology* (Second ed.).
- Weigend, F., & Ahlrichs, R. (2005). Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys Chem Chem Phys, 7*(18), 3297-3305. doi: 10.1039/b508541a
- Wong, S. Y., & Hartel, R. W. (2014). Crystallization in lactose refining-a review. *J* Food Sci, 79(3), R257-272. doi: 10.1111/1750-3841.12349
- Wu, L., Miao, X., Shan, Z., Huang, Y., Li, L., Pan, X., . . . Wu, C. (2014). Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 336-341. doi: 10.1016/j.ajps.2014.07.006
- Xiang, L. P., Wang, A., Ye, J. H., Zheng, X. Q., Polito, C. A., Lu, J. L., . . . Liang, Y.
  R. (2016). Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients, 8*(8). doi: 10.3390/nu8080458
- Yildirim-Elikoglu, S., & Erdem, Y. K. (2017). Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. *Food Reviews International, 34*(7), 665-697. doi: 10.1080/87559129.2017.1377225
- Zamanipoor, M. H., & Mancera, R. L. (2014). The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. *Trends in Food Science & Technology*, 38(1), 47-59. doi: 10.1016/j.tifs.2014.04.005



- Zhang, Z., Sun, D.-W., Zhu, Z., & Cheng, L. (2015). Enhancement of Crystallization Processes by Power Ultrasound: Current State-of-the-Art and Research Advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 303-316. doi: 10.1111/1541-4337.12132
- Zhao, Y., Schultz, N. E., & Truhlar, D. G. (2005). Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions.
- Zheng, Y. Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D. F., Guo, R., & Lai, R. C. (2017). Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Sci Rep*, 7(1), 7543. doi: 10.1038/s41598-017-08024-8
- Zia, K. M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *Int J Biol Macromol, 96*, 282-301. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095
- Zisu, B., Sciberras, M., Jayasena, V., Weeks, M., Palmer, M., & Dincer, T. D. (2014). Sonocrystallisation of lactose in concentrated whey. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 2117-2121. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.03.031



# **11 APÉNDICES**



11.1 Apéndice I. Curvas de calibración

**Figura 20.** Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de BSA para la cuantificación de proteínas.



**Figura 21.** Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.





**Figura 22.** Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de L-leucina para la cuantificación de grupos amino libres.

# 11.2 Apéndice II. Protocolo para la elaboración y uso de geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Reactivos (Sistema tampón, Laemmli)

#### A. Bis/Acrilamida (30% T, 2.67% C).

- 87.6 g de acrilamida (29.2g / 100 mL)
- 2.4 g N,N'-metilenbisacrilamida (0.87/100 mL)
- Mezclar y llevar hasta 300 mL con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4 °C en un lugar.

#### B. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

• 27.23 g Tris base (18.15 g /100 mL)



- 80 ML de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 6N.
- Llevar a 150 mL con agua destilada y almacenar a 4 °C.

## C. 0.5M Tris-HCl, pH 8.8 6 g

- Tris base 60 mL de agua destilada
- Ajustar pH a 6.8 con HCI 6N.
- Aforar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4 °C

## D. Sodio dodecil sulfato (SDS 10%)

• Disolver 10g de SDS en 90 mL de agua destilada, agite cuidadosamente y afore a 100 mL con agua destilada.

## E. Persultato de amonio (PA 10%)

 0.1g de PA, se mezcló con 1 mL de agua destilada. Preparar reactivo diariamente.

## F. Azul de Comassie.

- 2.5 g de azul brillante
- 300 mL metanol
- 600 mL agua destilada
- 100 mL ácido acético

## G. Solución reveladora

- 600 mL de agua destilada
- 100 mL ácido acético
- 300 mL metanol



## H. Solución amortiguadora de carga (almacenar a temperatura ambiente)

- 3.8 mL agua destilada
- mL 0.5M Tris-HCI (pH 6.8)
- 0.8 mL glycerol
- 1.6 mL (p/v) SDS al 10%
- 0.4 mL 2-mercaptoetanol
- 0.4 mL azul de bromofenol al 1 %
- Diluir la muestra al menos 1:4 con la solución amortiguadora de carga, y calentar a 95 °C por 4 min.

## I. Solución amortiguadora de corrida 5X

- 9 g Tris base (15 g L<sup>-1</sup>)
- 43.2 g glicina (72 g L <sup>-1</sup>)
- 3 g SDS (5 g L <sup>-1</sup>)
- Llevar hasta 600 mL con agua destilada.
- Almacenar a 4 °C. diluir 60 mL 5X stock con 240 mL de agua destilada antes de cada corrida de electroforesis.

Metodología para geles SDS-PAGE (Sambrook, 1989)

## 1. Gel separador

En la <u>Tabla 18</u>, se muestra la mezcla de reactivos que se elaboró para obtener la parte del gel poliacrilamida separador (SDS-PAGE). En el orden que se muestran en el cuadro, los reactivos fueron mezclados. Dicha mezcla, se vertió lentamente sobre la abertura formada entre las dos placas de vidrio, se dejó reposar 30 minutos en posición vertical a temperatura ambiente o hasta que la polimerización finalizara. Después se adicionó agua destilada sobre el gel formado para remover



cualquier resto de acrilamida no polimerizada. Con la punta de una toalla de papel se removió el exceso de agua.

## 2. Gel compactador

En la <u>Tabla 18</u>, se muestra la mezcla de reactivos que se elaboró para obtener la parte del gel poliacrilamida compactador (SDS-PAGE). La mezcla se vertió sobre el gel separador previamente polimerizado, inmediatamente se colocó el peine formador de pozos, evitando la formación de burbujas. Se dejó polimerizar 30 minutos.

## 3. Condiciones de prueba

De cada una de las muestras a analizar, se tomaron 6  $\mu$ L y se mezclaron con 24  $\mu$ L de la solución amortiguadora de carga, dicha mezcla se calentó 4 minutos a 95°C, desnaturalizando así las proteínas. Los 30  $\mu$ L se depositaron en uno de los pozos del gel de poliacrilamida (previamente montado en la cámara junto con la solución amortiguadora de corrida). Los geles se sometieron a una corriente de 80 voltz, durante los primeros 30 minutos, para después aumentar a 100 voltz por 2 horas aproximadamente.

## 4. Tinción de gel

Con la cámara de electroforesis apagada, se desmontaron las placas de vidrio que contenían el gel. Seguido de esto y con la ayuda de una espátula, el gel fue retirado y colocado en un recipiente con azul de Comassie; en donde permaneció por 1 hora en agitación suave (Orbital Shaker DS-500).



## 5. Revelado del gel

Una vez que el gel fue tenido, este se colocó en otro recipiente con la solución reveladora donde se lavó cada 30 minutos y se retiró el exceso de colorante; este procedimiento se repitió de 3 a 4 veces o hasta que el gel se tornara transparente.

**Tabla 18.** Protocolo de preparación de geles para para electroforesis SDS-PAGE.

Soluciones		2 Separado 12%	geles r Compactador 5%	1 Separador 12%	gel Compactador 5%
Agua	mL	3.57	3	1.785	1
Bis/acrilamida	mL	4.2	0.9	2.1	300 µL
Tris HCI 1.5 M pH 8.8	mL	2.625		1.3125	
Tris HCI 0.5 M pH 6.8	μL		1.35		450
SDS 10%	μL	105	52.5	52.5	17.5
PSA 10%	μL	52.5	26.25	26.25	8.8
Temed	μL	5.25	5.25	2.62	1.8
Total	mL	10.5		5.3	1.8





**Figura 23.** Curva de calibración a partir de dos marcadores de peso molecular con pesos conocidos (Kaleidoscope Prestained Standards y Precision plus protein standard Biorad) para la identificación de bandas en SDS-PAGE.



11.3 Apéndice III. Comparación de distancias y ángulos teóricos y experimentales de DFT: B3LYP/6-311G (A) y DFT: B3LYP/6-31G (B



**Figura 24.** Comparación de distancias teóricas y experimentales de DFT: B3LYP/6-311G (A) y DFT: B3LYP/6-31G (B).



**Figura 25.** Comparación de ángulos teóricos y experimentales de DFT: B3LYP/6-311G dp (A) Y DFT: B3LYP/6-31G (B).



## 11.4 Apéndice IV. Parámetros de reactividad de moléculas de las moléculas



## de flavonoides

**Figura 26.** Parámetros de reactividad de moléculas de las moléculas de flavonoides A. Afinidad Electrónica (A) B. Potencial de Ionización (I) C. Electronegatividad (X) D. Dureza ( $\eta$ ) E. Potencial Químico ( $\mu$ ) F. Electrofilicidad ( $\omega$ ) con B3LYP/6-311G (d,p) y el método continuo de solvatación CPCM usando agua como solvente.



#### 11.5 Apéndice V. Análisis estadísticos: FASE 1

11.5.1 Análisis estadísticos del efecto de la adición de carrageninas sobre el tiempo (min) requerido para alcanzar el equilibrio de mutarrotación (tMeqm), y la fracción de α-lactosa monohidratada (fα-LMH) y β-lactosa (fβ-L) en equilibrio de mutarrotación por la incorporación de carrageninas en una solución de lactosa (10% P / V, 25 °C).

#### **Analysis of Variance**

Source DF Adj SS Adj MS F-Value P-Value

Treatment40.0318450.00796195.150.000Error100.0008370.0000840.000084Total140.032682

#### **Model Summary**

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

 $0.0091469 \ 97.44\% \quad 96.42\% \quad 94.24\%$ 

#### **Comparisons for fα-LMH**

Tukey Pairwise Comparisons: Response =  $f\alpha$ -LMH, Term = Treatment Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence **Treatment N Mean Grouping** 

100 mg i-carra30.517667 A100 mg k-carra30.464000 B50 mg k-carra30.459000 B50 mg i-carra30.423000 CLactose (control)30.379000 DMeans that do not share a letter are significantly different.

General Linear Model:  $f\beta$ -L versus Treatment Method Factor coding (-1, 0, +1)

#### **Factor Information**

Factor Type Levels Values Treatment Fixed 5 100 mg i-carra, 100 mg k-carra, 50 mg i-carra, 50 mg k-carra, Lactose (control)



#### **Analysis of Variance**

Source DF Adj SS Adj MS F-Value P-Value

Treatment40.0318450.00796195.150.000Error100.0008370.0000840.000084Total140.032682

#### Model Summary

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

0.0091469 97.44% 96.42% 94.24%

#### Comparisons for f<sub>β</sub>-L

Tukey Pairwise Comparisons: Response =  $f\beta$ -L, Term = Treatment Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence **Treatment** N Mean Grouping

Lactose (control) 3 0.621000 A 50 mg i-carra 3 0.577000 B 50 mg k-carra 3 0.541000 C 100 mg k-carra 3 0.536000 C 100 mg i-carra 3 0.482333 D Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: fβ-L/fα-LMH versus Treatment

Method Factor coding (-1, 0, +1)

#### **Analysis of Variance**

Source DF Adj SS Adj MS F-Value P-Value

Treatment 4 0.83893 0.209733 121.40 0.000 Error 10 0.01728 0.001728 Total 14 0.85621

#### Model Summary

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

0.0415652 97.98% 97.18% 95.46%

#### Comparisons for $f\beta$ -L/f $\alpha$ -LMH

Tukey Pairwise Comparisons: Response =  $f\beta$ -L/f $\alpha$ -LMH, Term = Treatment Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence **Treatment** N Mean Grouping

Lactose (control) 3 1.63933 A 50 mg i-carra 3 1.36467 B 50 mg k-carra 3 1.17800 C



100 mg k-carra31.15567C100 mg i-carra30.93233DMeans that do not share a letter are significantly different.

#### **Analysis of Variance**

Source DF Adj SS Adj MS F-Value P-Value

Factor 4 17814.7 4453.7 40.52 0.000 Error 6 659.5 109.9 Total 10 18474.2

#### **Model Summary**

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

10.4841 96.43% 94.05% 87.56%

#### **Tukey Pairwise Comparisons**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor N Mean Grouping

50 mg i-carra 2 283.50 A lactose control 3 254.00 A 50 mg k-carra 2 205.50 B 100 mg k-carra 2 189.0 B 100 mg i-carra 2 174.50 B Means that do not share a letter are significantly different.

#### **Analysis of Variance**

Source DF Adj SS Adj MS F-Value P-Value

Factor 4 0.000074 0.000019 1.33 0.358 Error 6 0.000084 0.000014 Total 10 0.000158

#### **Model Summary**

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

 $0.0037350 \ 47.03\% \ 11.71\% \ 0.00\%$ 

#### **Tukey Pairwise Comparisons**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor N Mean Grouping

100 mg i-carra-Mk 2 0.01440 A 100 mg k-carra-Mk 2 0.01290 A Lactose-Mk 3 0.01270 A 50 mg k-carra-Mk 2 0.01070 A 50 mg i-carra-Mk 2 0.00660 A Means that do not share a letter are significantly different.



Tukey Simultaneous 95% CIs

11.5.2 Análisis estadístico del efecto de la adición de carrageninas sobre la solubilidad de la lactosa.

#### **Factor Information**

Factor Type Levels Values

 Factor A Fixed
 3 0, 50, 100

 Factor B Fixed
 4 10, 25, 40, 60

 Factor C Fixed
 2 Iota, Kappa

#### **Analysis of Variance**

DF	Adj	SS A	dj MS	F-Val	ue P-V	alue
2	381.	3 19	0.65 1	193.61	0.00	0
3	1241	2.0 4	137.32	4201.	.65 0.	.000
1	0.2	0.1	8 0.1	8 0.6	71	
	6	288.4	48.0	07 48	.81 0.	.000
	2	14.9	7.45	7.57	0.00	)1
	3	56.5	18.82	2 19.1	11 0.0	000
*Fac	ctor C	6	36.8	6.13	6.22	0.000
18	47.3	0.9	8			
11	3237	.2				
	DF 2 3 1 *Fac 8 1 1	DF Adj 2 381. 3 12413 1 0.2 6 2 3 *Factor C 8 47.3 1 13237	DF         Adj SS         A           2         381.3         19           3         12412.0         4           1         0.2         0.1           6         288.4           2         14.9           3         56.5           *Factor C         6           48         47.3         0.9           1         13237.2	DF Adj SS Adj MS 2 381.3 190.65 1 3 12412.0 4137.32 1 0.2 0.18 0.1 6 288.4 48.0 2 14.9 7.45 3 56.5 18.82 *Factor C 6 36.8 8 47.3 0.98 1 13237.2	DF Adj SS Adj MS F-Val 2 381.3 190.65 193.61 3 12412.0 4137.32 4201 1 0.2 0.18 0.18 0.6 6 288.4 48.07 48 2 14.9 7.45 7.57 3 56.5 18.82 19.3 *Factor C 6 36.8 6.13 48 47.3 0.98 1 13237.2	DF         Adj SS         Adj MS         F-Value         P-Value           2         381.3         190.65         193.61         0.000           3         12412.0         4137.32         4201.65         0.1           1         0.2         0.18         0.18         0.671           6         288.4         48.07         48.81         0           2         14.9         7.45         7.57         0.00           3         56.5         18.82         19.11         0.0           *Factor C         6         36.8         6.13         6.22           48         47.3         0.98         1         13237.2

#### **Model Summary**

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)

0.992316 99.64% 99.47% 99.20%

## **Comparisons for Respuesta**

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor A Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence **Factor A N Mean Grouping** 

0 24 29.2138 A 50 24 25.1052 B 100 24 23.8173 C Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor B Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence **Factor B N Mean Grouping** 

60 18 46.5419 A

40 18 28.1221 B



25 18 17.0357 C 10 18 12.4822 D Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor C Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor C N Mean Grouping

Kappa 36 26.0954 A Iota 36 25.9955 A Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor A\*Factor B Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor

A\*Factor B N Mean Grouping

0 60	6 53.7066 A			
50 60	6 45.5121	В		
100 60	6 40.4069	С		
0 40	6 31.2046	D		
50 40	6 26.9908		Е	
100 40	6 26.1707		Е	
0 25	6 17.5546		F	
100 25	6 17.4658		F	
50 25	6 16.0868		FG	
0 10	6 14.3895		G	
50 10	6 11.8311		Н	
100 10	6 11.2259		Н	
	1			

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor A\*Factor C Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor

#### A\*Factor C N Mean Grouping

0 Iota12 29.2138 A0 Kappa12 29.2138 A50 Iota12 25.5858 B50 Kappa12 24.6246 B100 Kappa12 24.4477 B100 Iota12 23.1870 CMeans that do not share a letter are significantly different.Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor B\*Factor CGrouping Information Using the Tukey Method and 95% ConfidenceFactorB\*Factor C NMeanGrouping

60 Kappa 9 48.1186 A 60 Iota 9 44.9652 B 40 Iota 9 28.4471 C



 40 Kappa
 9 27.7970
 C

 25 Iota
 9 17.5913
 D

 25 Kappa
 9 16.4801
 D

 10 Iota
 9 12.9785
 E

 10 Kappa
 9 11.9858
 E

 Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Response = Respuesta, Term = Factor A\*Factor B\*Factor C Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence Factor A\*Factor **B\*Factor C** N Mean Grouping

L
В
С
С
D
Е
E
ΕF
F
F
F
G
G H
GΗ
G H
GHI
НІЈ
IJ
ΙJ
JK
JKL
K L
L

Means that do not share a letter are significantly different.

11.5.3 Análisis estadístico del efecto de la adición de carrageninas sobre el ancho de la zona metaestable de la lactosa a 25°C.

## Información del factor

Factor	Тіро	<b>Niveles Valores</b>
C1	Fijo	3 0, 50, 100
C3	Fijo	2 lota, Kappa
	1. 1/	

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	80.99	40.496	4.13	0.043
C3	1	33.72	33.725	3.44	0.089
C1*C3	2	53.05	26.523	2.70	0.107



Error	12	117.80	9.817
Total	17	285.56	

## Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
3.13316	58.75%	41.56%	7.18%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1*C3	Ν	Media	Agrupación
50 lota	3	13.6059	А
0 lota	3	13.4462	А
0 Карра	3	13.4462	А
100 lota	3	8.7285	А
100 Карра	3	8.0950	А
50 Карра	3	6.0267	А

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

11.5.4 Análisis estadístico del efecto de la adición de carrageninas sobre el ancho de la zona metaestable de la lactosa a 40°C.

## Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
A	Fijo	3 0, 50, 100
}C	Fijo	2 lota, Kappa

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
А	2	51.854	25.927	13.44	0.001
}C	1	12.228	12.228	6.34	0.027
A*}C	2	7.181	3.590	1.86	0.198
Error	12	23.142	1.928		
Total	17	94.405			

#### **Resumen del modelo**

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
1.38869	75.49%	65.27%	44.85%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

A*}C	Ν	Media	Agrupación
100 lota	3	11.0538	A

100 1014	5	11.0550 A	
100 Карра	3	9.1774 A	В
50 lota	3	8.4730 A	В


0 lota	3	6.2047	В
0 Карра	3	6.2047	В
50 Карра	3	5.4041	В

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

# 11.6 Apéndice VI. Análisis estadísticos: FASE 2

11.6.1 Análisis estadístico de la interacción entre proteínas y rutina evaluada mediante turbidimetría.

# Información del factor

Factor	Тіро	Niveles Valores
conce	Fijo	4 0.0, 0.5, 1.0, 2.0
nálicie	do V	orionzo

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
conce	3	0.68860	0.229533	91.16	0.000
Error	8	0.02014	0.002518		
Total	11	0.70874			

**Resumen del modelo** 

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0501780	97.16%	96.09%	93.61%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

conce	Ν	Media	Agrupación
2.0	3	2.13067	А
0.0	3	2.05867	A B
1.0	3	1.95133	В
0.5	3	1.51367	С

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

11.6.2 Análisis estadístico de la interacción entre proteínas y EGCG evaluada mediante turbidimetría.

## Información del factor

Factor Tipo Niveles Valores



concent Fijo 3 0.0, 0.5, 1.0

# Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
concent	2	0.518649	0.259324	274.35	0.000
Error	6	0.005671	0.000945		
Total	8	0.524320			

## **Resumen del modelo**

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0307445	98.92%	98.56%	97.57%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

concent	Ν	Media	Agrupación
1.0	3	2.64433	А
0.5	3	2.39700	В
0.0	3	2.05867	С

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

11.6.3 Análisis estadístico de la interacción entre proteínas y rutina evaluada mediante el número de grupos amino libres (GAL) en las proteínas del suero (expresado en nmol mL<sup>-1</sup> de L-leucina).

# Información del factor

Factor	Тіро	Niveles Valores
Concentración	Fijo	4 0.0, 0.5, 1.0, 2.0

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	3	0.3985	0.132841	21.87	0.000
Error	24	0.1457	0.006073		
Total	27	0.5443			
		1 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C			

## Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0779284	73.22%	69.87%	63.55%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Concentración	Ν	Media	Agrupación
0.0	7	0.542240	A
2.0	7	0.453854	A B
1.0	7	0.363412	В
0.5	7	0.219527	С

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



11.6.4 Análisis estadístico de la interacción entre proteínas y EGCG evaluada mediante el número de grupos amino libres (GAL) en las proteínas del suero (expresado en nmol mL<sup>-1</sup> de L-leucina).

# Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
cenc	Fijo	3 0.0, 0.5, 1.0
	_	

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
cenc	2	38.839	19.4196	110.35	0.000
Error	18	3.168	0.1760		
Total	20	42.007			

## **Resumen del modelo**

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.419504	92.46%	91.62%	89.74%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

## cenc N Media Agrupación

0.5	7	3.43844 A
1.0	7	3.41572 A
0.0	7	0.54224

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

В

11.6.5 Estadísticos descriptivos del efecto de la adición de polifenoles

y proteína sobre la distribución de tamaños de cristal.

## a. Lactosa

## **Estadísticas**

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
lactosa	300	0	23.96	1.91	33.06	0.10	0.71	15.84	27.99	222.66



b. Lactosa- proteína

# **Estadísticas**

				Error estándar de la					
Variable	Ν	N*	Media	media	Desv.Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3
lactose protein	300	0	20.955	0.829	14.367	3.600	13.105	17.815	23.597
Variable	Máx	ximo							
lactose protein	10	9.336	-						

## c. Lactosa-proteína-rutina

# **Estadísticas**

				Error estándar de la						
Variable	Ν	N*	Media	media	Desv.Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
rutin	300	0	27.481	0.944	16.358	0.000	15.794	23.312	35.391	101.882

d. Lactosa- proteína- EGCG

# **Estadísticas**

				Error estándar de la						
Variable	Ν	N*	Media	media	Desv.Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
EGCG	300	0	19.168	0.682	11.807	0.000	12.007	16.740	22.517	91.016

11.6.6 Análisis estadístico de la adición de proteína en los cristales

de lactosa.

# Información del factor

Factor	Тіро	Niveles Valores
C1	Fijo	4 EGCG, lac-prot, Lactose, rutin
Análisis	de V	/arianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	0.719757	0.239919	433.36	0.000
Error	8	0.004429	0.000554		
Total	11	0.724186			



# Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0235291	99.39%	99.16%	98.62%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	Ν	Media	Agrupación
rutin	3	0.568975	A
lac-prot	3	0.368906	В
EGCG	3	-0.000000	С
Lactose	3	-0.000000	С

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

11.6.7 Análisis estadístico de la adición de polifenoles totales en los

cristales de lactosa.

# Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
C1	Fijo	4 EGCG, lac-prot, Lactose, rutin
hálicie	de V	arianza

# Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	25.4628	8.48762	207.33	0.000
Error	8	0.3275	0.04094		
Total	11	25.7904			

## **Resumen del modelo**

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.202332	98.73%	98.25%	97.14%

# Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	Ν	Media	Agrupación
rutin	3	3.46804	A
EGCG	3	0.27215	В
lac-prot	3	0.06393	В
Lactose	3	-0.00000	В

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



11.6.8 Análisis estadístico del efecto de la adición de carrageninas sobre el ancho de la zona metaestable de la lactosa a 10°C.

# Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
А	Fijo	3 0, 50, 100
С	Fijo	2 lota, Kappa

# Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
А	2	207.823	103.911	19.98	0.000
С	1	4.817	4.817	0.93	0.355
A*C	2	2.550	1.275	0.25	0.786
Error	12	62.413	5.201		
Total	17	277.603			

## Resumen del modelo

	R-cuad.		R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
2.28059	77.52%	68.15%	49.41%

# **Comparaciones por parejas de Tukey: A\*C**

# Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

A*C	Ν	Media	Agrupación
0 lota	3	11.9054	A
0 Карра	3	11.9054	A
50 Карра	3	6.6435	A B
50 lota	3	5.3086	В
100 Карра	3	4.7668	В
100 lota	3	2.9977	В

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



## 11.7 Apéndice VII. Artículos

# 11.7.1 Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans.

Food Research International 142 (2021) 110204



Contents lists available at ScienceDirect Food Research International



### Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans

ABSTRACT

Yanira I. Sánchez-García <sup>a</sup>, Néstor Gutiérrez-Méndez <sup>a,\*</sup>, Iván Salmerón <sup>a</sup>, Víctor H. Ramos-Sánchez <sup>a</sup>, Martha Y. Leal-Ramos <sup>a</sup>, David R. Sepúlveda <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The Graduate School, Graduate Program in Chemistry, Chemistry School, Autonomous University of Chihuahua, Mexico <sup>b</sup> Research Center for Food and Development (CIAD), Cuauhtemoc City, Mexico

#### ARTICLE INFO

Keywords: Lactose Carrageenan Solubility Mutarotation Supersaturation Metastable zone Polarimetry It has been reported that polysaccharides like carrageenan can change the crystallization of lactose. However, it is still unclear whether changes in lactose mutarotation, solubility, and super-solubility are involved in carrageenans 'effect on lactose crystallization. It has been established that the conversion of  $\alpha$  to  $\beta$ -lactose forms (mutarotation) in an aqueous solution has a significant impact on lactose crystallization. Similarly, lactose solubility changes lead to changes in the metastable zone (MZ), a region between the solubility and super-solubility of lactose. The width of this MZ determines the temperature drop necessary to induce lactose nucleation. This work aimed to study the effect of carrageenans on lactose mutarotation and solubility. For this purpose, lactose solutions were added with 1 and  $\kappa$ - carrageenan at two concentrations: 50 and 100 mg L<sup>-1</sup>. Optical rotation measurements estimated the proportion of  $\beta/\alpha$  isomers at mutarotation equilibrium. Carrageenans decreased the solubility of lactose in a range of temperatures between 10 and 0° °C and reduced the metastable zone width (MZW).

#### 1. Introduction

Lactose is a disaccharide of galactose and glucose joined by a glycosidic bond ( $\beta$  1–4). Like other reducing sugars, lactose can adopt a ring structure by forming a hemiacetal link between a hydroxyl group and the aldehyde group. This bond creates a new asymmetric carbon (chiral center), leading to two possible isomeric forms,  $\alpha$  or  $\beta.$  In solution, lactose opens and re-forms its ring structure, varying between  $\boldsymbol{\alpha}$  and  $\beta$  isomers (mutarotation) until reaching equilibrium (McSweeney, 2009; Raghavan et al., 2000). The optical rotation ( $\lceil \alpha \rceil^\circ n$ ) of  $\alpha$ -lactose at 20 °C is +89.4°, and +35° for  $\beta\text{-lactose.}$  In equilibrium, the  $[\alpha]^{20}D$  is +55.3° since a mixture of both isomers is present; approximately 37% of  $\alpha$  and 63% of  $\beta$  form (ratio  $\beta/\alpha \sim$  1.64). An increase in lactose concentration and a temperature rise can alter the proportion of  $\beta/\alpha$  lactose. The pH does not alter the  $\beta/\alpha$  ratio, but it changes the time to reach the mutarotation equilibrium (t\_{Meqm}). A variety of substances can also alter the mutarotation process of lactose. It has been described that salts shorten the  $t_{Meqm}$  by increasing the rate of the mutarotation reaction. In contrast, a high concentration of sugars such as sucrose decreases the rate of mutarotation considerably (Thom Huppertz & Gazi, 2015; Walstra,

Wouters, & Geurst, 2006). Furthermore, it has been reported that minerals and saccharides like sucrose change the solubility of lactose (Bhargava & Jelen, 1996; Huppertz & Gazi, 2016; Roos, 2009). However, the effect of sugars other than sucrose or polysaccharides on lactose mutarotation and solubility has not been described, even though these carbohydrates are commonly used in the food industry to control the crystallization of amorphous lactose (Kouassi, Jouppila, & Roos, 2002a).

Lactose is recovered mainly by crystallization from cheese whey. This by-product of cheese making contains 0.8–1% protein, 0.06% fat, 4.5–6% lactose, and 90–92% water (de Souza et al., 2010). To crystallize lactose from the cheese whey, it needs to be first defatted, deproteinated and evaporated to concentrate lactose between 39 and 56% (Sánchez-García, Bhangu, Ashokkumar, & Gutiérrez-Méndez, 2018; Wong & Hartel, 2014). At this concentration, lactose will crystallize when the evaporated whey is cooled enough (i.e., 20–25 °C). During the cooling step, lactose moves through and beyond the MZ, a region between the solubility and super-solubility of lactose. The spontaneous nucleation of lactose occurs when the super-solubility is exceeded outside the MZ (T. Huppertz & Gazi, 2016; Sánchez-García et al., 2018). Therefore, the

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Chihuahua C.P. 31125, México. E-mail address: ngutierrez@uach.mx (N. Gutiérrez-Méndez).

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110204 Received 7 September 2020; Received in revised form 25 January 2021; Accepted 30 January 2021 Available online 14 February 2021

<sup>0963-9969/© 2021</sup> Elsevier Ltd. All rights reserved.



width of the MZ determines the temperature drop necessary to induce lactose nucleation (de Castro & Priego-Capote, 2007). After nucleation, crystals' growth depends on lactose saturation and the temperature, since the last one affects lactose solubility (Bhargava & Jelen, 1996). The overall process of lactose crystallization is slow. In consequence, mutarotation can occur during the nucleation or the growth of crystals. However, if the mutarotation rate is lower than the crystallization rate, the kinetics of mutarotation will dominate over the nucleation and crystal growth (Kirk, Dann, & Blatchford, 2007; Siddique, Brown, Houson, & Florence, 2015).

Different approaches have been studied to overcome the drawbacks of lactose crystallization. Some of these approaches are the seeding of lactose nuclei, anti-solvents (i.e., ethanol and acetone), and the appliance of high-power ultrasound (Huppertz & Gazi, 2016; Patel & Murthy, 2011: Sánchez-García et al., 2018). Also, it has been reported that polysaccharides like carrageenans can change the crystallization of lactose. Carrageenans are high molecular weight sulfated polysaccharides with linear chains of D-galactopyranosyl units joined with alternating (1-3)-α-D and (1-4)-β-D-glycosidic linkages (Kouassi, Jouppila, & Roos, 2002b; Zia et al., 2017). There are three significant fractions of carrageenans (1-iota,  $\kappa$ -kappa, and  $\lambda$ -lamda) with different numbers and positions of sulfate groups on the galactose section (Černíková et al., 2008). The κ-carrageenan has one negative charge per disaccharide repeating unit, whereas the 1-carrageenan has two sulfate groups per disaccharide. In the food industry, the  $\kappa\text{-}$  and  $\iota\text{-}carrageenans$ are frequently used as thickeners, binders, and stabilizers. The use of  $\lambda$ -carrageenan is less extended than  $\kappa$ - and  $\iota$ -carrageenans since this cannot form gels and has a random coil conformation at all temperatures (Thommes & Kleinebudde, 2006; Zia et al., 2017). In the dairy industry, carrageenans are used as a stabilizer in ice cream and condensed sweet milk (Kouassi et al., 2002a). However, some studies have shown carrageenans also affect lactose crystallization in lactose-sucrose systems like ice cream or condensed sweet milk. According to Kouassi et al. (2002a), incorporating carrageenans in lactose-sucrose systems (0.9 g of carrageenan, 66.33 g of lactose, 35 g of sucrose, 56 mg of KCl in 295 mL of water) limited the growth of lactose crystals. Sanchez-Garcia, Garcia-Vega, Leal-Ramos, Salmeron, and Gutierrez-Mendez (2018) incorporated carrageenans (150–300 mg  $L^{-1})$  and whey proteins (0.64% w/v) in lactose solutions (25% w/v), which were later sonocrystallized. In that study, carrageenans reduced the mean size of crystals (from 26 µm to 12.9  $\mu$ m), increased the number of crystals per mL (from 2.5  $\times$  10<sup>5</sup> to  $41.1\times10^5$  ), and slowed down the crystal's growth. Carrageenans also sped up the crystallization rate from 0.19 crystals  $mL^{-1}\ h^{-1}$  (control) to 1.61 crystals mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Despite these results, it is still unclear whether changes in lactose mutarotation, solubility, and super-solubility are involved in carrageenans' effect on lactose crystallization. Therefore, this work aimed to study the effect of adding carrageenans on lactose mutarotation and solubility.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Materials

The  $\alpha$ - lactose monohydrate ( $\alpha$ -LMH) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Carrageenans used in this study were iotaand kappa-carrageenan. The lambda carrageenan was not included because this type of carrageenan has a random coil formation at all temperatures and cannot form gels. The J-carrageenan from algae (*Eucheuma spinosum*) was obtained from Sigma-Aldrich (item: C1138, St. Louis, MO). The  $\kappa$ -carrageenan from algae (with traces of  $\lambda$ -carrageenan) was obtained from a local producer (A&N, Chih, Mex). The deionized water (>18 M\Omega cm) was obtained from an ultra-pure water purification system (Thermo Scientific, D8611, Dubuque, IO).

#### Food Research International 142 (2021) 110204

#### 2.2. Experimental design

A factorial design was used to assess the effect of adding carrageenan on the solubility and supersaturation of lactose. This design involved one categorical ( $x_1$  = type of carrageen) and two numerical factors ( $x_2$  = concentration of carrageenan, and  $x_3$  = temperature of lactose solution). For these variables, the levels were  $x_1$ : without carrageenan, with t-carrageenan, and with  $\kappa$ -carrageenan;  $x_2$ : 0, 150 and 300 mg L<sup>-1</sup>;  $x_3$ : 60, 40, 25, and 10 °C. In total, 24 treatments were performed (see supplementary data 1), and each treatment was carried out in triplicate. Data collected were subject to analysis of variance (ANOVA) and multiple mean comparisons (Tukey-Kramer analysis) with the Minitab software 16 (Minitab Inc. State College, PA).

#### 2.3. Viscoelastic properties of lactose solutions

The complex viscosity  $(\eta^*)$  in lactose solutions was measured using an oscillating rheometer AR2000ex, an aluminum plate ( $\phi$  4.0 cm,  $0^\circ$ ), and a solvent trap (60 mm) to prevent sample evaporation (TA Instrument, New Castle, DE, USA). A strain sweep at different frequencies established the linear viscoelastic region (LVR). The oscillation tests were conducted with a temperature ramp from 10 to 60 °C at a fixed frequency of 0.5 Hz and a strain of 1%. Data collected were analyzed using Rheology Advantage Data Analysis V5.7 (TA Instruments, New Castle, DE).

#### 2.4. Measurement of $\beta/\alpha$ anomers in lactose solutions

Optical rotation measurements estimated the proportion of  $\beta/\alpha$ anomers in lactose solutions. For this purpose, it was used a Polax-2L polarimeter (ATAGO Co. Ltd, Tokyo, Japan) which emit a sodium D line monochromatic radiation ( $\lambda = 589$  nm), and a cylindrical cell with a path length of 100 mm (1 dm). The optical rotation observed ( $[\alpha]^{\circ}_{D}$ ) in lactose solutions was calculated with Equation (1), where  $\alpha$  was the angle of ration, *l* was the cell path length (dm), and *C* was the concentration of lactose in the solution (g/100 mL). First, lactose solutions without carrageenan (control) were measured over time (400 min) at 25 °C to estimate the optical rotation of  $\alpha$ -LMH ( $[\alpha_{\alpha,LMH}]^{\circ}$ ) and  $\beta$ -lactose ( $[\alpha_{\mu_1}]^{\circ}$ ). Briefly, the changes in optical rotation ( $[\alpha]^{-}_D$ ) over time (*t*) were plotted (Fig. 1) and fitted to an exponential decay function (Equation (2)). In this equation, the term *a* denoted the decay amplitude,



Fig. 1. Optical rotation observed  $([\alpha_{obs}]_D)$  over time in lactose solution (10% w/v) without carrageenan (control) at 25 °C. Data fitted to exponential decay, where *a* is the exponential decay, *Mk* is the mutarotation rate, t is the time in minutes, and  $[\alpha_{\alpha_{\rm LMH/PL}}]_{\rm eqm}$  is the optical rotation in equilibrium.  $M_{\rm eqm}$  is the time to reach the mutarotation equilibrium, and  $[\alpha_{\alpha_{\rm LMH/PL}}]_{\rm to}$  is the optical rotation is factored by the optical rotation of lactose solutions at time zero.



## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

#### Y.I. Sánchez-García et al.

 $M_k$  was the rate of mutarotation, and  $[\alpha_{\alpha-LMH/\beta-L}]^\circ_{eqm}$  was the optical rotation value in equilibrium. Inter- and extrapolation from Equation (2) allowed to obtain the optical rotation of lactose solutions at time zero  $[(\alpha_{\alpha-LMH/\beta-L}]^\circ_{00})$ , and the time to reach the mutarotation equilibrium  $(K_{Meqm})$ . Then, Equation (3) was written knowing the value of  $[\alpha_{\alpha-LMH/\beta}]^\circ_{10}$  and the purity of  $\alpha$ -LMH crystals (99%); where  $f_{\alpha-LMH}$  and  $f_{\beta-L}$  was the fraction of  $\alpha$ -LMH and  $\beta$ -L in the lactose solution at mutarotation equilibrium. Equation (4) was developed with  $[\alpha_{\alpha-LMH/\beta-L}]^\circ_{eqm}$  and considering reference data of  $f_{\alpha-LMH}$  and  $f_{\beta-L}$  for lactose solutions at 25 °C (Huppertz & Gazi, 2016; Jawad et al., 2012; Sánchez-García et al., 2018). Then,  $[\alpha_{\alpha-LMH}]^\circ$  and  $[\alpha_{\beta-L}]^\circ$  were estimated (73.213° and 35.195°, respectively) by solving Equations (3) and (4) simultaneously. Finally, Equations (5) and (6) were used to calculate the value of  $f_{\alpha-LMH}$  and  $f_{\beta-L}$  in lactose solutions at 25 °C (1000 m considering reference (300 m considering reference) and  $[\alpha_{\beta-L}]^\circ$  were estimated (73.213° and 35.195°, respectively) by solving Equations (3) and (4) simultaneously. Finally, Equations (5) and (6) were used to calculate the value of  $f_{\alpha-LMH}$  and  $f_{\beta-L}$  in lactose solutions with carrageenan at mutarotation equilibrium.

$$\left[\alpha\right]_{D}^{\circ} = \frac{100 \times \alpha}{l \times C} \tag{1}$$

$$\left[\alpha\right]_{D}^{\circ} = ae^{-M_{k}t} + \left[\alpha_{\alpha-\text{LMH}/\beta-\text{L}}\right]_{eqm}^{\circ}$$
(2)

$$\left[\alpha_{a-\underline{\mathsf{LMH}}}\right]_{0}^{*} = \left(f_{a-\underline{\mathsf{LMH}}} \times \left[\alpha_{a-\underline{\mathsf{LMH}}}\right]^{*}\right) + \left(f_{\beta-\underline{\mathsf{L}}} \times \left[\alpha_{\beta-\underline{\mathsf{L}}}\right]^{*}\right)$$

 $\therefore 72.83 = (0.99 \times \left[\alpha_{\alpha-\text{LMH}}\right]^{\circ}) + (0.01 \times \left[\alpha_{\beta-\text{L}}\right]^{\circ})$ 

$$\begin{bmatrix} \alpha_{\alpha-\text{LMH}/\beta-\text{L}} \end{bmatrix}_{\text{eqm}}^{\circ} = (f_{\alpha-\text{LMH}} \times \begin{bmatrix} \alpha_{\alpha-\text{LMH}} \end{bmatrix}^{\circ}) + (f_{\beta-\text{L}} \times \begin{bmatrix} \alpha_{\beta-\text{L}} \end{bmatrix}^{\circ})$$
  
$$\therefore 40.96 = (0.97 \times \begin{bmatrix} \alpha_{\alpha-\text{LMH}} \end{bmatrix}^{\circ}) + (0.63 \times \begin{bmatrix} \alpha_{\alpha-\text{L}} \end{bmatrix}^{\circ})$$

$$[a_{\beta-L}]^{\circ} = [a_{\alpha-LMH\beta}] + (0.05 \times [a_{\beta-L}])$$

$$f_{aLMH} = \frac{1}{\left[a_{\beta-L}\right]^{\circ} - \left[a_{a-LMH}\right]^{\circ}} \tag{5}$$

$$f_{\beta L} = \frac{\left[a_{\alpha-LMH}\right] - \left[a_{\alpha-LMH/\beta-L}\right]_{com}}{\left[a_{\alpha-LMH}\right] - \left[a_{\beta-L}\right]}$$
(6)

#### 2.5. Determination of lactose solubility

Considering the temperature and the reference lactose solubility (Visser, 1982), crystals of a-LMH were weighed (with an excess of 2 g) to prepare 50 mL of lactose solution. Lactose solutions were adjusted (if necessary) to pH 7 with NaOH (1 N) and were kept under continuous stirring. Some solutions were added with J- or  $\kappa$ -carrageenan according to the design of experiment (DOE) described in Section 2.2. Lactose solutions with/without carrageenan were maintained at 10, 25, 40, or 60 °C in a water bath circulator (Julabo, Allentown, PA) for 24 h, except for the treatment at 60 °C, which was held eight hours. After this time, lactose solutions were filtered using filters with a pore size of 0.45  $\mu$ m (Merck Millipore, Billerica, MA). The filters with undissolved lactose were vacuum dried at 60 °C and 0.02 atm (15 mm Hg) of pressure (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, OR).

The solubility of  $\alpha$ -LMH ( $C_{sr-LMH}$ ) was calculated with Equation (7) and expressed as grams of lactose (monohydrate) per 100 g of H<sub>2</sub>O. Where  $m_k$  was the mass of lactose before the addition of water (g),  $m_r$  was the mass of undissolved lactose (g), and  $m_w$  was the mass of water used in the lactose solution (g). The solubility of lactose was also expressed in terms of anhydrous lactose ( $C_s$ ) with Equation (8).

$$C_{sa-LMH} = (m_s - m_r) \frac{100}{m_s}$$
 (7)

$$C_s = \frac{0.95 C_{sa-LMH}}{1 + 0.0005 C_{sa-LMH}}$$
(8)

#### 2.6. Estimation of lactose super-solubility

The super-solubility of lactose (S) in the presence or not of carrageenan was calculated with Equation (9) at 60, 40, 25, and 10  $^{\circ}$ C. In this equation, F denoted a temperature-dependent factor previously reported by Visser, 1982 (Visser, 1982); C was the concentration of lactose, and  $C_s$  was the solubility of lactose expressed in terms of anhydrous lactose. The fraction of  $\beta$ -L and  $\alpha$ -LMH ( $f_{\beta L}$ , and  $f_{\alpha LMH}$ ) were determined as described in Section 2.4.

$$F = \frac{C - C_s + F(f_{\beta L}/f_{aLMH})(C - C_s)}{1 + (f_{\delta L}/f_{aLMH})}$$
(9)

#### 2.7. Metastable zone width

Solubility and super-solubility curves of lactose were plotted together and fitted to quadratic equations to calculate the MZ. The quadratic equations were integrated between the limits of 10 °C and 60 °C to estimate the area under each curve. The difference between both areas was defined as the MZ of lactose. The MZW was defined as the change in temperature required to move a specific lactose concentration from a saturated to a supersaturated state.

#### 3. Results and discussion

(3)

(4)

#### 3.1. Viscoelastic properties of lactose solutions

The addition of  $\iota$  and  $\kappa\text{-}$  carrageenan did not significantly change the viscoelastic properties of lactose solutions (p > 0.05). Lactose solutions had an elastic modulus (G') between 0.023 and 0.118 Pa, a viscous modulus (G") in a range of 0.007–0.130 Pa, and a complex viscosity ( $\eta^*$ ) of 0.003-0.029Pas. It is worth mentioning that the lactose solutions were devoid of salts, and in the absence of salts, carrageenans keep their native random coil state and form a nongelling dispersion (Ikeda & Nishinari, 2001). In the presence of cations like K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, or Ca<sup>2+</sup> carrageenans exhibit gelling properties by adopting an ordered helix formation. The  $\kappa\text{-}carrageenan$  is prone to gel with  $K^+$  ions, whereas 1-carrageenan is sensitive to Ca<sup>2+</sup> ions (Banerjee & Bhattacharya, 2012; Zia et al., 2017). Kouassi et al. (2002b) studied the changes in lactose sucrose solutions by adding  $\kappa$ -carrageenan (0.3%) and KCl (0.018%). These authors described that, under gelling conditions, the k-carrageenan hinder lactose diffusivity because of the creation of molecular entanglements. In our case, lactose-carrageenan solutions were under nongelling conditions and did not increase the viscosity of lactose solutions. However, the native (disordered random coil) state of carrageenans and the ester sulfate groups in their structure could also alter lactose diffusivity. In order to prove this theory, lactose solutions (devoid of salts) with and without carrageenans were analyzed by thinlayer chromatography (TLC) as described by Lata, Sharma, Patel, Sangwan, and Singh (2018). The TLC analysis revealed that both carrageenans delayed lactose diffusion through the silica gel plate (Fig. 2). This reduction in lactose diffusivity was more noticeable with 1-carrageenan, probably because of its higher proportion of ester sulfate (32%) than  $\kappa$ -carrageenan (25%). Considering that ion-dipole interactions can be formed between carrageenan's sulfate groups and the hydroxyl groups of lactose or its aldehyde group during the mutarotation process.

#### 3.2. Mutarotation of lactose in the presence of carrageenans

Incorporating carrageenans in lactose solutions reduced the time to reach the mutarotation equilibrium ( $t_{Meqm}$ ) and the ratio of  $\beta/\alpha$  isomers at equilibrium. Lactose solutions without carrageenan (control) reached their  $t_{Meqm}$  in -5.5 h at  $25^{\circ}$  (Fig. 1, Table 1). Similarly, Raghavan et al. (2000) described that lactose solutions at 18.8 °C attained the mutarotation equilibrium in 6.5 h (Raghavan et al., 2000). Incorporating carrageenans in lactose solutions reduced the  $t_{Meqm}$  (Table 1). The proportion of  $\beta/\alpha$  isomers in mutarotation equilibrium was also changed by carrageenans' presence (Table 1). The control treatment showed a  $\beta/\alpha$  ratio of 1.63 at 25 °C, having 38% α-lactose and 62%  $\beta$ -lactose.

3





Fig. 2. Thin-layer chromatography (TLC) analysis of lactose solutions (10%) with or without carrageenans (100 mg L<sup>-1</sup>). Lane 1: lactose solution (control), lane 2: κ-carrageenan solution, lane 3: t-carrageenan solution, lane 4: lactose + κ-carrageenan, lane 5: lactose + t-carrageenan. Rf = retention factors. The TLC analysis was performed on a silica gel plate run with ethyl acetate: acetic acid:1-butanol: water (4:3:2:2) and visualized with 0.5% (w/v) 1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride.

#### Table 1

Effect on the time (min) required to reach the mutarotation equilibrium ( $t_{Meqm}$ ), and the fraction of  $\alpha$ -lactose monohydrated ( $f_{\alpha,LMH}$ ) and [ $\beta$ -lactose ( $f_{\beta,L}$ ) at mutarotation equilibrium by incorporation of carrageenans in a lactose solution (10% w/v, 25 ° C).

Treatment	$f_{\alpha-\text{LMH}}$	$f_{eta ext{-L}}$	β/α	t <sub>Meqm</sub> min
Pure lactose (control)	$0.379^d \pm$	$0.621^{a} \pm$	$1.639^{a} \pm$	$331.0^{a} \pm$
	0.002	0.003	0.018	36
$L + 50 mg L^{-1}$	$0.423^{c} \pm$	$0.577^{b} \pm$	$1.364^b~\pm$	$283.5^{b} \pm$
1-carrageenan	0.007	0.007	0.040	10.6
$L + 100 mgL^{-1}$	$0.518^{a} \pm$	$0.482^d \pm$	$0.932^{d} \pm$	$174.5^{\circ} \pm$
1-carrageenan	0.012	0.013	0.047	6.3
$L + 50 mgL^{-1}$	$0.459^{b} \pm$	$0.541^{\circ} \pm$	$1.178^c~\pm$	$205.5^d \pm$
κ-carrageenan	0.001	0.001	0.006	10.6
$L + 100 mg L^{-1}$	$0.464^{b} \pm$	$0.536^{e} \pm$	$1.155^{e}$ $\pm$	$189.0^d\ \pm$
κ-carrageenan	0.014	0.014	0.066	14.1

 $^{\rm a-d}$  Different letters within a column indicated a significant difference (Tukey – Kramer test, a=0.05). L = lactose.

report proportions of 63:37 for  $\beta$  and  $\alpha$  isomers in mutarotation equilibrium at 20 °C (Listiohadi, Hourigan, Sleigh, & Steele, 2005). The addition of carrageenans (at any level) increased the fraction of  $\alpha$ -lactose and reduced the  $\beta$ -lactose (Table 1). For instance, adding 100 mg L^-1 of  $\kappa$ -carrageenan in a lactose solution decreased the  $\beta/\alpha$  ratio at 1.15 with 54:46 of  $\beta$  and  $\alpha$  isomers.

#### Food Research International 142 (2021) 110204

The observed changes in lactose mutarotation (Table 1) can be related to lactose interaction with carrageenans and lactose solubility changes. Lactose opens and reconstructs its ring structure during mutarotation. In the open form, the aldehyde group (-COH) is exposed and can react with the ester sulfate groups (-OSO3) of carrageenans via ion-dipole interactions. This reaction of lactose aldehyde group with sulfate groups in carrageenans could interfere with the process of mutarotation. In this work, crystals of a-lactose monohydrated were dissolved in water, and the conversion of  $\alpha\text{-}$  to  $\beta\text{-lactose}$  was followed until equilibrium. In the absence of carrageenans, it was observed an extensive conversion of  $\alpha$ - to  $\beta$ -lactose form (Table 1). However, incorporating carrageenans decreased the exchange between  $\alpha$  and  $\beta$  isoform, with a concomitant reduction in the time to reach the equilibrium (Table 1). About changes in lactose solubility and mutarotation, it has been stated that the less soluble  $\alpha$  -lactose converts into the more soluble  $\beta$ -lactose to keep an equilibrium. Otherwise, a large amount of undissolved α-lactose will accumulate and nucleate rapidly (Raghavan et al., 2000; Siddique et al., 2015). However, if the solubility of lactose is modified as carrageenans did (Section 3.3), the dynamic equilibrium of mutarotation will be altered as well as the time to reach the mutarotation equilibrium.

The acceleration of mutarotation by carrageenans (Table 1) opens the possibility to increase the rate of crystallization and to shorten the long times of lactose crystallization. The process of lactose crystallization must be slow enough to match the velocity of mutarotation. When the crystallization rate is similar to the mutarotation rate, the  $\alpha$ -lactose nucleates and crystallizes first, obtaining crystals of  $\alpha$ -lactose monohydrated. Nevertheless, amorphous lactose will form if the crystallization rate is faster than the velocity of mutarotation (Raghavan et al., 2000; Sanchez-Garcia et al., 2018; Sanchez-Garcia, Gutierrez-Mendez, Orozco-Mena, Ramos-Sanchez, & Leal-Ramos, 2019; Siddique et al., 2015).

#### 3.3. Solubility and super-solubility of lactose in the presence of carrageenans

The temperature was the factor that most affected the solubility ( $G_2$ ) and super solubility (S) of lactose (Fig. 3, Table 2). Like other sugars, lactose solubility is strongly temperature-dependent (Peter, 2002). In the range of temperatures studied, the control treatment (lactose without carrageenan) had the highest values of  $C_c$  (Fig. 4). At 25, 40, and 60 °C,  $C_c$  values for the control were 17.5, 31.2, and 53.7 g of anhydrous lactose per 100 g of water. Similarly, Visser and Foremost reported values of  $C_c$  for lactose of 21.8, 32.7, and 58.4 g of anhydrous lactose per 100 g of water at 25, 40, and 60 °C, respectively (Visser, 1982). Meanwhile, other authors report  $C_c$  values for lactose of 12 g 100 g<sup>-1</sup> at 0 °C, 18–19 g 100 g<sup>-1</sup> at 20 °C, and 24.4 g 100 g<sup>-1</sup> at 30 °C (Bhargava & Jelen, 1996; Listiohadi et al., 2005; Roos, 2009; Wong & Hartel, 2014).

The second factor that most affected the Cs and S of lactose was the concentration of carrageenan added into the lactose solution (Table 2 Fig. 5). Still, the type of carrageenan (ι or κ) did not affect lactose Cs and S (Table 2). According to different authors, when lactose is with other substances, its solubility decrease (Visser, 1982; Wong & Hartel, 2014). Majd and Nickerson (1976) addressed that the  $C_s$  of lactose in aqueous mixtures with alcohol is inversely proportional to the concentration of alcohol added (Majd and Nickerson (1976)). Similarly, Peter (2002) found that lactose solubility decreases appreciably near the freezing point by adding sucrose (Peter, 2002). Concerning carrageenans, at 40 °C, lactose's solubility dropped from 31.2 g 100 g<sup>-1</sup> to 26.3 and 25.7g 100 g  $^{-1}$  with incorporating  $\kappa\text{-}$  and  $\iota\text{-}carrageenan$  at 100 mg per liter of lactose solution. The water-binding properties of carrageenans could explain the reduction in lactose solubility. Carrageenans in an aqueous milieu have a high water-binding capacity since its hydroxyl (-OH) and ester sulfate groups (-OSO3) generate hydrogen-bonding and ion-dipole interactions with water molecules. Consequently, a fraction of water in the solution becomes unavailable to nearby solutes. The influence of



Food Research International 142 (2021) 110204



Fig. 3. Changes in lactose solubility (Cs) by incorporating K-carrageenan (left size) or I-carrageenan (right size) in lactose solutions.

#### Table 2

Analysis of variance on the changes in lactose solubility and lactose super solubility by adding two types of carrageenans (J or K) at different concentrations (0, 50 and 100mgL<sup>-1</sup>) at different temperatures (10, 25, 40 and 60 °C).

Effect	Solubility	Super solubility	
	Sum of square		
Carrageenan concentration (mgL <sup>-1</sup> )	381.3***	0.073***	
Temperature (°C)	12412***	1.829***	
Type of Carrageenan (ι or κ)	0.2	0.000	
Concentration * Temperature	288.4***	0.068***	
Concentration * Type	14.9**	0.003**	
Temperature * Type	56.5***	0.015***	
Concentration * Temperature * Type	36.8***	0.010***	
Error	47.3	0.013	
Total	13237.2	2.012	

Significance:  $p^{**} < 0.01$  one tailed,  $p^{***} < 0.0001$ .

carrageenans on lactose solubility was more evident at high temperatures than at low temperatures, particularly at 60 °C (Fig. 2). The  $\kappa$ - and  $\iota$ -carrageenans aboyt an ordered state (helix) at low temperatures, but they undergo a thermo-reversible disordered state (coil) at high temperatures. Under random coil arrangement, carrageenans expose their ester sulfate groups (-OSO<sub>3</sub>), increasing their water-binding capacity (Černíková et al., 2008; Zia et al., 2017). Therefore, the effect on lactose solubility exerted by carrageenans is more evident at high temperatures.

Solubility is an essential characteristic of lactose that regulates the proportion of  $\beta/\alpha$  isomers at mutarotation equilibrium. Besides, this feature determines the concentration of lactose required to start the nucleation (at a specific temperature) and influence the process of lactose crystallization (Fox, 2009; Listiohadi et al., 2005; Zamanipoor & Mancera, 2014). If the solubility of lactose decreases, then the nucleation and hence the crystallization could take place at a lower concentration. In practice, this would mean a less extensive evaporation process of cheese whey, the by-product used to recover lactose.

#### 3.4. Changes in the metastable zone of lactose by carrageenans

The solutions of pure lactose (control) showed the broader area between the solubility and super solubility curves (MZ) in a temperature range of 10–60 °C (Table 3). The width of the MZ was uneven in all the range of temperatures studied. For instance, the drop of temperature



Fig. 4. Solubility (Cs), super-solubility (S), and metastable zone width (MZW) of pure lactose.

from 30 °C to 22.01 °C (MZW = 7.9 °C) moves a lactose solution (21.95 g/100 mL) from saturation to a supersaturation state (Fig. 4). In contrast, the MZW was 8.3 °C around the 60 °C, meaning that a lactose solution (53.7 g/100 mL) must be cooled from 60 °C to 51.7 °C to move lactose through the MZ (Table 3). Therefore, inducing the spontaneous nucleation of lactose requires to move lactose through the MZ to the supersaturated state, where the energy available is enough to nucleate lactose molecules (Sander, Zeiger, & Suslick, 2014; Zamanipoor & Mancera, 2014; Zhang, Sun, Zhu, & Cheng, 2015).

The incorporation of carrageenans shrunk the area of the lactose MZ (Table 3). However, the MZ width only decreased at certain temperatures and concentrations of carrageenans (Table 3). Only the concentration of  $\kappa$ -carrageenan at 50mgL^-1 diminished the MZ width in all the range of temperatures studied (Table 3). At low temperatures (10 °C), both carrageenans ( $\alpha$  and  $\kappa$ ) at both concentrations (50 and 100 mg L^-1)



Food Research International 142 (2021) 110204



Fig. 5. Changes in solubility (Cs), super-solubility (S), and the metastable zone width (MZW) of lactose by adding K-carrageenan or t-carrageenan at different concentrations.

#### Table 3

Changes in the metastable zone (MZ) of lactose by the incorporation of carrageenans at different concentrations.

Treatment	MZ area (10–60 ° C)	MZ width at 10 °C	MZ width at 40 °C	MZ width at 60 °C
	g100g <sup>-1</sup> °C	°C	°C	°C
Pure lactose	364.302 ±	11.905 ±	6.204 ±	8.337 ±
(control)	18.872 <sup>a</sup>	0.657 <sup>a</sup>	2.346 <sup>b</sup>	1.766 ab
$L + 50 mg L^{-1}$	$304.266 \pm$	5.308 $\pm$	$8.473 \pm$	$9.136 \pm$
1-carrageenan	31.136 <sup>ab</sup>	0.734 <sup>b</sup>	0.391 <sup>ab</sup>	0.364 <sup>ab</sup>
$L + 100 mg L^{-1}$	295.06 ±	2.997 ±	11.053 $\pm$	$10.9053 \pm$
1-carrageenan	24.953 <sup>b</sup>	0.210 <sup>b</sup>	0.495 <sup>a</sup>	0.659 <sup>a</sup>
$L + 50 mg L^{-1}$	$285.942 \pm$	$6.643 \pm$	5.404 $\pm$	7.267 $\pm$
κ-carrageenan	32.314 <sup>b</sup>	1.390 <sup>ab</sup>	0.302 <sup>b</sup>	0.126 <sup>b</sup>
$L + 100 mgL^{-1}$	$299.688 \pm$	4.766 ±	9.177 ±	9.2236 ±
κ-carrageenan	10.266 <sup>ab</sup>	0.842 <sup>b</sup>	0.265 <sup>ab</sup>	.633 <sup>ab</sup>

 $^{\rm a-b}$  Different letters within a column indicated a significant difference (Tukey – Kramer test,  $\alpha$  = 0.05). L = lactose.

reduced the MZW (Table 3). These changes in the MZ were closely related to the effect that carrageenans had to decrease lactose solubility and super solubility (Table 2, Figs. 3–5). Nevertheless, it is interesting that the width of lactose MZ was only shrunk (in all the range of temperatures) by a low concentration of x-carrageenan. A further increase in the concentration of carrageenans did not produce an additional reduction of the MZW. Carrageenans probably begin to interact at high concentrations instead of holding more water molecules or interacting with lactose molecules. In a previous study, we observed a similar effect on the crystallization of lactose solutions with carrageenans. The treatments containing lower concentrations of carrageenans had a greater impact on lactose crystallization than those with a higher concentration of carrageenan, particularly on the rate of crystallization (Sanchez-Garcia et al., 2018).

#### 4. Conclusions

Results from this work confirmed carrageenans alter the process of mutarotation in a lactose solution. The most noticeable effects were the reduction in time to reach the mutarotation equilibrium ( $t_{Meqm}$ ) and the

6



modification of the ratio of  $\beta/\alpha$  isomers at equilibrium. It was also proven that carrageenans decrease the solubility (Cs) and super solubility (S) of lactose with a consequently shrunk of the MZ. The effect of carrageenan on lactose properties was attributed to lactose interaction with carrageenan molecules and the water-holding capacity of this polysaccharide.

#### CRediT authorship contribution statement

Yanira Sánchez-García: Formal analysis, Investigation. Néstor Gutiérrez-Méndez: Conceptualization, Project administration, Writing - original draft. Iván Salmerón: Data curation. Víctor Ramos-Sánchez: Data curation. Martha Leal-Ramos: Methodology. David Sepúlveda: Data curation.

#### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

The Mexican National Council of Science and Technology (CON-ACYT) supported this research through the grant conceded to Yanira I. Sánchez-García (Grant number 661768).

#### References

- Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2012). Food gels: Gelling process and new applications Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52, 334–346. https://doi.org/10.1080/ 10408398.2010.500234
- Bhargava, A., & Jelen, P. (1996). Lactose solubility and crystal growth as affected by mineral impurities. Journal of Food Science, 61, 180–184. Černíková, M., Buňka, F., Pavlínek, V., Březina, P., Hrabě, J., & Valášek, P. (2008). Effect
- of carrageman type on viscoelastic properties of processed cheese. Food Hydrocolloids, 22(6), 1054–1061. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.05.020. de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound-assisted crystallization tallization). Ultra s Sonochemistry, 14, 717-724
- (2000) Constraints of the source of the s 2010 08 015
- F. (2009). Lactose: chemistry and properties. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney Fox, P (Eds.), Advanced dairy chemistry volume 3: lactose, water, salts and minor
- (cust), intracted and y learning volume 7, and one minor constituents (Third ed., Vol. 3, pp. 1–15). New York: Springer. Huppertz, T., & Gazi, I. (2015). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6842–6851. https://doi.org/ 10 3168/ide 20
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing a storage stability. Journal of Dairy Science, 99(8), 6842–6851. https://doi.org/
- Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). "Weak Gel"-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated x-carrageenan helices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9), 4436-4441. https://doi.org/10.1021/jf0103065.
- Cnemstry, 49(9), 4436-4441. https://doi.org/10.1021/jf0103005.
  Jawad, R., Elleman, C., Vermeer, L., Drake, A. F., Woodhead, B., Martin, G. P., & Royall, P. G. (2012). The measurement of the beta/alpha anomer composition within amorphous lactose prepared by spray and freeze drying using a simple (1)H-NMR method. *Pharmaceutical Research*, 29(2), 511-524. https://doi.org/10.1007/s11095-011-6575-6.

#### Food Research International 142 (2021) 110204

- Kirk, J. H., Dann, S. E., & Blatchford, C. G. (2007). Lactose: A definitive guide to (J. H., John, S. E., & Biatchtori, C. G. (2007). Lactose: A definitive guide t polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 334(1–2), 103–114. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.026. assi, K., Jouppila, K., & Roos, Y. H. (2002a). Effects of of k-Carrageenan on
- Koi crystallization and invertase activity in lactose-sucrose systems. Journal of Food Science, 67(5), 2190–2195.
- Koussi, K., Jouppila, K., & Roos, Y. H. (2002b). Effects of κ-carrageenan on crystallization and invertase activity in lactose-sucrose systems. *Journal of Food Science*, 67(6), 2190–2195.
- Lata, K., Sharma, M., Patel, S. N., Sangwan, R. S., & Singh, S. P. (2018), An integrated bio-process for production of functional biomolecules utilizing raw and by-produc from dairy and sugarcane industries. Bioprocess and Biosystems Engineering 41(8),
- 1121-1131. https://doi.org/10.1007/s00449-018-1941-0. Listiohadi, Y. D., Hourigan, J. A., Sleigh, R., & Steele, R. J. (2005). Propierties of Lactose and its caking behaviour. Australian Journal of Dairy Technology, 60, 33-52. Majd, F., & Nickerson, T. A. (1976). Effect of alcohols on lactose solubility. Journal of
- Dairy Science, 59(6), 1025-1032 McSweeney, P. L. (2009). Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose. New York:
- Springer. Patel, S., & Murthy, Z. (2011). Anti-solvent sonocrystallisation of lactose. Chemical and
- Process Engineering, 32(4), 379–389. https://doi.org/10.2478/v10176-011-0030-6.Peter, P. N. (2002). Solubility relationships of lactose-solutions. I. Lactosee soluabilities at low temperatures. The Journal of Physical Chemistry, 32(12),
- 1856-1864. Raghavan, S. L., Ristic, R. I., Sheen, D. B., Sherwood, J. N., Trowbridge, L., & York, P.
- (2000). Morphology of crystals of d-lactose hydrate grown from aqueous solution. The Journal of Physical Chemistry, 104(51), 12256–12262.
   s, Y. H. (2009). Solid and liquid states of lactose. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney
- (Eds.), Advanced dairy chemistry volume 3: lactose, in tractice and innor constituents (Vol. 3, pp. 17–33). New York: Springer. Sánchez-García, Y. I., Bhangu, S. K., Asbokkumar, M., & Gutiérrez-Méndez, N. (2018). Sonocrystallization of lactose from whey. In INTECH (Ed.), Technological
- Generative States and States and States and States and States whey proteins and kappa-carrageman. Ultrasonics Sonochemistry, 42, 714–722. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.020.
  Sanchez-Garcia, Y. I., Gutierrez-Mendez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sanchez, V. H.,
- & Leal-Ramos, M. Y. (2019). Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. *Food Research International*, 116, 455–461. https://doi.
- Sander, J. R. G., Zeiger, B. W., & Suslick, K. S. (2014). Sonocrystallization and ofragmentation. Ultrasonics Sonochemistry, 21, 1908–1915. https://doi. 1016/j.ultsonch.2014.02.005.
- Siddique, H., Brown, C. J., Houson, I., & Florence, A. J. (2015). Establishment of a continuous sonocrystallization process for lactose in an oscillatory baffled crystallizer. Organic Process Research & Development, 19(12), 1871–1881. https://doi. org/10.1021
- mmes, M., & Kleinebudde, P. (2006). Use of kappa-carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronisation. I. Thom penetration and to microcrystaline centuosis in extrusion/spheromation.i. Influence of type and fraction of filler. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 63(1), 59–67. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.10.002.
  Visser, R. A. (1982). Supersaturation of tractose in aqueous solutions in mutarotation equilibrium. Netherlands Mik and Daviry Journal.
  Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurst, T. M. (2006). Dairy science and technology (2nd
- a Roton EL CRC B
- Wong, S. Y., & Hartel, R. W. (2014). Crystallization in lactose refining-a review. Journal of Food Science, 79(3), R257-R272. https://doi.org/10.1111/175
- Zamanipoor, M. H., & Mancera, R. L. (2014). The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. Trends in Food Science & Technology, 38(1), 47–59. https:// doi.org/10.1016/j.tifs.2014.04.005.
- Zhang, Z., Sun, D.-W., Zhu, Z., & Cheng, L. (2015). Enhancement of crystallization processes by power ultrasound: current state-of-the-art and research advances. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14(4), 303-316. https://doi. org/10.1111/1541-4337.12132. Zia, K. M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2017).
- A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. International Journal of Biological Macromolecules, 96, 282–301. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.05 2016.11.095.

7



# 11.7.2 Crystallization of lactose-protein solutions in the presence of flavonoids

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender anddelete all copies.

## Crystallization of lactose-protein solutions in the presence of flavonoids

Journal:	Journal of Agricultural and Food Chemistry
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sánchez-García, Yanira; Autonomous University of Chihuahua, ChemistrySchool Gutierrez-Mendez, Nestor; Autonomous University of Chihuahua, Chemistry School Landeros-Martínez, Linda; Autonomous University of Chihuahua, Chemistry School Ramos-Sanchez, Victor; Universidad Autonoma de Chihuahua, Facultadde Ciencias Quimicas Orozco-Mena, Raúl; Autonomous University of Chihuahua, ChemistrySchool Salmerón, Ivan; Autonomous University of Chihuahua, Chemistry SchoolLeal- Ramos, Martha; Autonomous University of Chihuahua, Chemistry School Sepulveda, D. R.; Centro de Investigación en Alimentación y DesarrolloAC

# SCHOLARONE<sup>™</sup> Manuscripts

Submitted to: Journal of Agricultural and Food Chemistry][Topic:

Food and Beverage Chemistry/Biochemistry]



## Abstract

La lactosa se cristaliza comúnmente en presencia de proteínas de suero, formando co-cristales de lactosa y proteínas. Este trabajo planteó la hipótesis de que los flavonoides como la rutina o el 3-galato de epigalocatequina (EGCG) podrían incorporarse a la estructura del co-cristalde la lactosa y la proteína, debido a que los flavonoides pueden interactuar tanto con la lactosa como con las proteínas. Primero se estudiaron las interacciones entre las proteínas del suero y los flavonoides. Luego, se cristalizaron soluciones de lactosa-proteína con y sin flavonoides, midiendo los parámetros cinéticos de cristalización y caracterizando los cristales resultantes. La incorporación de flavonoides en los co-cristales de lactosa-proteína dependía de la naturaleza hidrofílica de los flavonoides. El EGCG hidrófilo apenas estaba encerrado en la red cristalina de lactosa y evitaba la inclusión de proteínas de suero en los cristales. Por el contrario, la rutina menos soluble en agua interactuó con las proteínas del suero y la lactosa, lo que llevó a la formación de cocristales que contienen lactosa, proteína y una gran concentración de rutina (3,468 ± 0,392 mg por 100 mg de cristales).

## **Keywords**

Lactose crystallization, lactose-flavonoid crystals, epigallocatechin-3-gallate, rutin, whey proteins, molecular docking.

## INTRODUCTION

Lactose is a natural disaccharide in mammalian milk comprising glucose and galactose linked by a  $\beta$ -1, 4-glycosidic bond. The food and pharmaceutical industries use lactose widely because of its low sweetness, low caloric value, and low glycemic index. Besides, this sugar has good compressibility, plasticity, and firmness, which are idyllic for the pharmaceutical sector. (1, 2). Lactose is mainly recovered from whey, a byproduct of cheese making. The cheese whey contains 4.5–6% lactose, 0.1–1% proteins, and traces of lipids (0.065%)(3). After undergoing a process of evaporation (40–65% of dry matter), the lactose in cheese whey becomes supersaturated and crystallizes spontaneously when the evaporated whey is cooled enough. This process of crystallization is commonly used in the industrial recovery of lactose (4, 5). Nowadays, the production of lactose exceeds 800 thousand tons of lactose powder per year (6).

Lactose is typically crystallized in the presence of impurities such as whey proteins. As reported by different authors, whey proteins impact lactose crystallization significantly (7-9). For instance, these proteins narrow the size distribution of lactose crystals (10) and speedup the crystallization (8). In addition, whey proteins induce the formation of amorphous lactose, diminish the purity of lactose crystals (9), and decrease the yield of crystallization (11). The incorporation of whey proteins into the crystal lattice of lactose has been confirmed by Raman spectroscopy (9), suggesting the formation of lactose-protein co-crystals. According to the Food and Drug Administration (FDA), a co-crystal is a crystalline material composed of two or more different molecules that interact non-ionically in the same crystal lattice (12).

The effects of whey proteins can hardly be avoided or controlled in the industrial process of lactose



crystallization. Lactose is recovered from evaporated whey with 39–56% of lactose. Before the process of crystallization, the cheese whey is defatted, and the soluble proteins are acid precipitated for their later removal by decantation or centrifugation. However, not all the proteins are removed, and concentrations between 0.1–0.2% may persist in the

concentrated whey (8, 13). Consequently, the process of lactose crystallization occurs in the presence of whey proteins with all the drawbacks mentioned above. In addition, the resulting lactose-protein co-crystals must undergo re-crystallization to remove whey proteins and improve the quality of lactose crystals (5). This last step is necessary since lactose intended for pharmaceutical uses requires a minimum lactose content of 99.6 g/100 g and a protein- free state (14).

On the other hand, there has been a growing interest by consumers and food producers for healthier food additives, such as flavonoids (15). Flavonoids are benzo-pyrone derivatives comprising two benzene rings linked with a three-carbon bridge (commonly cyclized with oxygen) (16). In plants, the flavonoids protect against herbivores, microorganisms, and ultraviolet radiation (17). In humans, beneficial health effects have been associated with flavonoid consumption. For instance, the epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a green tea (*Camellia sinensis*) flavonoid that has been related to beneficial and preventable effects on cardiovascular disease, type 2 diabetes, and cancer (18, 19). Furthermore, the EGCG has been reported to inhibit a neurotoxin producing a Parkinson's-like illness (20). Another example is rutin, a flavonoid found in vegetables, citrus fruits, and plant-derived beverages. Rutin has shown diverse biological activities such as antioxidant, antimicrobial, anti- inflammatory, anticancer, antidiabetic, and antiallergic (21-23).

Besides the beneficial effects of flavonoids, there is a large body of evidence on the interaction of flavonoids with major food components such as saccharides, lipids, and proteins (*15, 24, 25*). The flavonoids interact with proteins, forming covalent or non-covalentcomplexes. Multi-site or multi-dentate interactions can occur between flavonoids and proteins. The first interaction refers to several flavonoids bound to one protein molecule. In contrast, the multi-dentate interaction occurs when one flavonoid is bound to several protein sites or protein molecules (*26*). Regarding carbohydrates, flavonoids form hydrogen bonds between –OH groups of flavonoids and oxygen atoms of the glycosidic linkages in disaccharides, oligosaccharides, or polysaccharides. Additionally, it is assumed that hydrophobic interactions can occur between saccharides and flavonoids (*27, 28*). Therefore,

this study hypothesized that incorporating flavonoids before the crystallization of lactose- whey protein solutions will form co-crystals of lactose, flavonoids, and proteins since flavonoids may interact with both lactose and proteins.

## MATERIALS AND METHODS

## Materials

The anhydrous lactose, rutin hydrate, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). The deionized water (> $18M\Omega$ cm) was obtained from an ultra-pure water purification



system (Thermo Scientific, D8611, Dubuque, IO). Whey proteins were purified from a commercial whey protein isolated (WPI, GNC, Mexico). Briefly, 2% WPI solutions were slowly added with ammonium sulfate until reaching 20% ofsaturation. Next, the precipitates were separated from the supernatant by centrifugation at 3000 x g (29, 30). The proteins collected were dissolved in a small volume of water (~1 mL) and concentrated using a centrifugal concentrator (30K MWCO) at 3000 x g for 20 min at 4°C. The final protein concentration was measured with the Bradford method described elsewhere (31). The presence of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ LA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ LG) was corroborated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (32) (Supplementary Figure 1).7

# Interaction of whey proteins with flavonoids and lactose (computational molecular docking)

Molecular docking is a computational method used to predict the formation of intermolecularcomplexes between relatively small molecules and proteins (*33*). Here, a blind molecular docking was used to gain an insight into the binding mechanism of rutin and EGCG flavonoids with the whey proteins  $\alpha$ LA and  $\beta$ LG, and whey proteins with lactose. The molecular structures of  $\alpha$ - lactalbumin (PDB ID:3B0O) and  $\beta$ -lactoglobulin (PDB ID:NPO)were obtained from the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org) based on X-ray diffractiondata (*34*). The structures of rutin, EGCG, and lactose molecule (ligands) were obtained from PubChem (National Center for Biotechnology Information). These structures were optimized based on the functional density theory (DFT) method and using the hybrid density functionals B3LYP combined with the 6–31G (d,p) basis set (35) (Gaussian 09 software, Wallingford, CT, USA). All the calculations were performed using water as a solvent (*34*). The protein- ligand dockings were performed with the Autodock 4.2 software (San Diego, La Jolla, CA) (*36*). The parameters for  $\alpha$ LA-flavonoids dockings were: center x =13.91, center y =-26.932, center z =11.567, size x =100, size y =100, size z =118, energy range = 3. The parameters for  $\beta$ LG-flavonoids dockings were: center x =-13.772, center y =1.706, center z =-0.26, sizex =122, size y =106, size z =102, energy range = 3. The cluster tolerance was set to 2.0 Å of the root-square-mean deviation (RMSD). Docking results were visualized with the PyMOL software (DeLano Scientific LLC) and analyzed with the Autodock Tools 1.5.6 (*37*).

## Interaction between whey proteins and flavonoids

The protein-flavonoid interaction was measured by turbidimetry and assessing the free amino groups (FAG) in protein-flavonoid complexes. The turbidimetry measurements were carried out using a micro-plate reader (Elx808, Biotek, USA). First, solutions of whey proteins (1 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared with deionized water. Then, different concentrations of rutin (0.5 to 2 mg mL<sup>-1</sup>) or EGCG (0.5 to 1 mg mL<sup>-1</sup>) were added to the protein solutions. The absorbance changes in the protein-flavonoid solutions were followed at 595 nm for 24 hoursat 8 °C ± 1 (*38*).

The FAG in protein-flavonoid solutions were measured according to the method described by Adler-Nissen, with minor modification (*39*). Briefly, 0.25mL of protein-flavonoid solution was mixed with 2 mL of phosphate buffer (212.5 mM, pH 8.2) and 2 mL of TNBSAsolution (0.01%, w/v). The mixtures were incubated at 37 °C for 2 hours at constant stirring(Water bath 1217, Shel lab, USA). The reaction was stopped by the addition of four milliliters of HCI (0.1 N). Then, absorbances were measured at 430 nm using a micro-plate reader (Elx808, Biotek, USA). The amount of FAG was estimated with a calibration curve and expressed as nanomole of L-leucine per milliliter of solution.



## Interaction between flavonoids and lactose

The lactose-flavonoid interaction was determined by thin-layer chromatography (TLC), as described by Sánchez-García (*13*). For this purpose, lactose solutions (10% w/v) were addedor not with the flavonoids EGCG or rutin at 1 mg mL <sup>-1</sup>. The TLC analysis was performed on silica gel plates (60 F254, Selecto Scientific, Suwannee, GA) and run with ethyl acetate: acetic acid:1-butanol: water (4:3:2:2). Migration of lactose solutions on TLC plates was visualized by spraying a solution of 1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride (0.5% w/v).

## Crystallization of lactose-protein-flavonoid solutions

First, solutions with 30% (w/v) of lactose and 1% whey proteins were prepared. Some lactose-protein solutions were added with either rutin (1 mg mL<sup>-1</sup> final concentration) or EGCG (0.5 mg mL<sup>-1</sup> final concentration). After mixing the ingredients, the solutions were heated at  $60 \pm 2$  °C to dissolve the lactose completely. The solutions were cooled to 30 °C, and then, to 8  $\pm$  2 °C under constant stirring (120 rpm, DS-500, Orbital Shaker, VQR Scientific products, USA) for 72 hours. The crystallization process was followed by measuring absorbance changes at 595 nm (Elx808, Biotek, USA). After 72 hours, all the solutions were centrifuged at 1300 × *g* for 30 minutes to recover the crystals. The wet crystals were washed with ethanol and let dry in a desiccator at room temperature for 24 hours.

The changes in the kinetic parameters of lactose crystallization were analyzed using the general model for heterogeneous nucleation (equation one). In this equation, *k* represents the frequency of molecule attachment leading to the formation of crystals, and *a* describes the maximum response. Data collected were plotted and fitted to the logistic time dependence equation (equation two) obtained from the integration of equation one. When the maximumresponse is reached y = a, and t = 2tc. Therefore, 2tc was considered the necessary time to complete the crystallization or reach the plateau region. Finally, the maximum rate of crystallization (*W* max) was calculated as  $W \max = ka / 4$  (40).

## Characterization of co-crystals

Samples of co-crystals were resuspended in ethanol and placed in microscope glass slides for their analysis. Then, crystals were observed with an optical microscope (Bx41 Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo) with a digital camera (KP-D50, Hitachi Kokusai Electronic Inc., Tokyo). The images taken with the microscope camera were analyzed with the software ImageJ (version 1.43u, National Institutes of Health, USA) to estimate the crystal size distribution (CSD). The content of protein and flavonoids in the crystals were measured with the Bradford and Folin–Ciocalteu methods, respectively (*31, 41*).

Crystals were also analyzed with a differential scanning calorimeter (DSC 200PC, Netzsch, Germany) under a nitrogen atmosphere. Before the thermal analysis, crystal samples were put in a desiccator with silica gel for 12 hours at 25 °C. The equipment calibration was performed with indium (Tm=156 °C), tin (Tm=231.9 °C), and bismuth (Tm=271 °C). Weighted portions of co-crystals (3.5 to 4.0 mg) were deposited in aluminum pans and latersealed hermetically. Then, the pans were analyzed under dynamic heating from 50 to 300 °Cat a scan rate of 10 K min<sup>-1</sup> with a recorder sensitivity of 5mV and 0.5 °C. The software Netzsch Proteus (Version 4.2.1, Netzsch, Germany) was used to calculate the differential enthalpies ( $\Delta H$ ) in crystal samples. The number of moles per mole of anhydrous lactose (*n*) was determined with equation three (42). In this equation, the  $\Delta H$ 



dehydration represents the enthalpy of dehydration of  $\alpha$ -lactose monohydrate,  $\Delta H$  ve is the enthalpy of vaporization of water (2261 J g<sup>-1</sup>), *M* lactose is the molecular mass of anhydrous lactose (342.3 g mol<sup>-1</sup>), and *M* water is the molecular mass of water (18 g mol<sup>-1</sup>).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

# Whey proteins–flavonoids, and whey proteins-lactose interactions (computational molecular docking)

The molecular docking of aLA with flavonoids showed that flavonoids rutin and EGCG bind to aLA in the cleft between  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet domains (Figure 1). Katouzian, et al. (43) observed similar results with the molecular docking of olive polyphenol oleuropein with  $\alpha$ LA. They reported that the cleft between  $\alpha$ -helical and  $\beta$ sheet domains in the aLA was the preferential binding site for the oleuropein polyphenol, with predicted binding energy of -6.3kcal mol<sup>-1</sup> (43). According to different authors, the hydrophilic and hydrophobic interactionsplay an essential role in the union of polyphenols with whey proteins (15, 44). In this study, rutin and EGCG had binding energies of -7.1 kcal mol<sup>-1</sup> in the cleft region of αLA (Figure 1). The rutin flavonoid created three hydrogen bonds with the amide groups of TYR103, TRP104, and GLU49. Besides, this flavonoid showed  $\pi$ - $\pi$  interactions with the aromatic rings of TRP104 (Figure 1, Supplementary Video 1). In contrast, the EGCG formed two hydrogen bonds with ASN44 and GLU49 residues. Likewise, the -OH groups of LYS58 and LYS108 interacted through a  $\pi$ -cation bond with the EGCG aromatic rings (Figure 1, Supplementary Video 2) of the EGCG. In addition to the cleft region of aLA, another potential binding site was noticed with residues ILE41, GLU43, THR48, TYR50, SER64, GLN65, LEU81. However, this alternative binding site showed lower interaction energy with flavonoids than observed in the cleft between  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet domains. On the other hand, the interaction of lactose with αLA protein showed binding energy of -5.5 kcal mol<sup>-1</sup>. This interaction also occurred in the cleft region of  $\alpha$ LA, but only one hydrogen bond was formed (HIS107), and no  $\pi$ - $\pi$  interactions were observed (Figure 1, Supplementary Video 3).

Computational docking of  $\beta$ LG with rutin and EGCG indicated these flavonoids were bound in the internal cavity of  $\beta$ LG (Figure 1). Other authors have suggested two different bindingsites, a site in the inner cavity of the  $\beta$ -barrel and a site on the outskirts of the  $\beta$ -barrel (*15*). The predicted binding energy for rutin-  $\beta$ LG was -7.3 kcal mol<sup>-1</sup> and -6.2 kcal mol<sup>-1</sup> for EGCG- $\beta$ LG (Supplementary Videos 4 and 5). The rutin- $\beta$ LG complex was stabilized by

three hydrogen bonds with PRO38, GLU62, and ASN109 residues. Meanwhile, the EGCG- $\beta$ LG complex created two hydrogen bonds with amino acids ASN88 and SER116 (Figure 1). In contrast, the interaction of lactose with  $\beta$ LG protein had binding energy of -5.5 kcal mol<sup>-1</sup> (Supplementary Video 6), forming two hydrogen bonds with ASN90 and SER116 residues (Figure 1).

The molecular docking analysis confirmed the interaction of lactose with whey proteins  $\alpha LA$  and  $\beta LG$ , mainly through hydrogen bonds. However, the flavonoids had stronger interactionwith whey proteins than lactose. Rutin and EGCG contain diverse –OH groups in their structure, which promotes hydrogen bonds formation with proteins (*26*). In addition, the molecular docking analysis revealed the formation of  $\pi$ -cation and  $\pi$ - $\pi$  interactions



between flavonoids and whey proteins. Furthermore, the  $\beta$ LG has hydrophobic regions that bind non-polar molecules such as retinol and some fatty acids(*45*). Therefore, the benzene rings of flavonoids could form non-polar interactions with the hydrophobic regions of  $\beta$ LG. It is alsoworth mentioning that flavonoid molecules are bulkier than lactose; consequently, they cannot penetrate deeply into the whey proteins.



**Figure 1.** Molecular docking of whey proteins  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ LA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ LG) with flavonoids (rutin and EGCG) and lactose. The figure shows the best docking poses for **A.** rutin- $\alpha$ LA, **B.** rutin- $\beta$ LG, **C.** EGCG- $\alpha$ LA, **D.** EGCG- $\beta$ LG, **E.** lactose- $\alpha$ LA, and **F.** lactose- $\beta$ LG. Blue lines represent the hydrogen bonds, and yellow lines the  $\pi$ -cation and  $\pi$ - $\pi$  interactions.

## Whey proteins–flavonoids interactions

Turbidity measurement is a helpful technique to estimate protein-protein aggregates in protein-flavonoid solutions due to non-covalent interactions (46). In these experiments, it was observed that incorporating rutin flavonoid (0.5 to 1 mg mL<sup>-1</sup>) into a whey protein solution (1mg mL<sup>-1</sup>) decreased the turbidity (Fig. 2A, black bars). Rutin is a flavonoid with low solubility in water (0.13g L<sup>-1</sup>); therefore, the interaction of rutin with hydrophobic regions of whey proteins may have occurred. The binding of rutin with whey proteins increased the solubility of whey proteins, probably through blocking non-polar regions or hindering the formation of protein-protein aggregates. Unlike rutin, the addition of EGCG (0.5 to 1 mg mL<sup>-1</sup>) increased the turbidity of whey protein



solutions (Fig 2A, gray bars), indicating the formation of protein-protein agglomerates. The EGCG is a flavonoid substantially more soluble (20g L<sup>-1</sup>) (*47*) than rutin. Hence, it is likely that the hydrophilic nature of EGCG promoted the formation of protein-protein complexes by water competitionwith whey proteins or decreasing the protein solubility through partial denaturation of proteins.

The number of free amino groups (FAG) in whey proteins decreased by the presence of rutin (1mg mL<sup>-1</sup>) but increased by EGCG addition (Figure 2B). These discrepancies between flavonoids effect were probably associated with the hydrophobic and hydrophilic nature of rutin and EGCG. The FAG analysis evaluates how proteins bind polyphenols through the nucleophilic nitrogen of the  $\varepsilon$ -amino side chain of amino acids, such as arginine, lysine, asparagine, and glutamine (*48*). The decrement of FAG in whey proteins indicates the formation of protein-polyphenol complexes (*48*). However, an increase of FAG in whey proteins solutions may imply the exposure of buried amino groups through the partial unfolding of proteins. Our results suggest rutin favored the formation of protein-flavonoid complexes but not the EGCG. Instead, the EGCG induced the partial unfolding of whey proteins. Denaturation of protein-protein agglomerates(*49*); as confirmed by the turbidimetric assays for EGCG-whey protein solutions (Figure 2A). It is relevant to highlight that other authors (*48*) have reported a decrement of FAG in whey proteins when the EGCG is added at a lower concentration (0.045 mg mL<sup>-1</sup>) than used in this study (0.5 to 1 mg mL<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Interaction between proteins and flavonoids was assessed (A) through turbidimetryand (B) measuring the number of free amino groups (FAG) in whey proteins (expressed in nmol mL<sup>-1</sup> of L-leucine). Bars represent means (n = 3)  $\pm$  SD. Bars with different upper- or lowercase letters indicate significant differences (Tukey-Kramer test,  $\alpha = 0.05$ ).

## Flavonoids-lactose interactions

The TLC analysis showed that both EGCG and rutin interacts with lactose (Figure 3). When the EGCC (1mg mL<sup>-1</sup>) and lactose (10% w/v) were together in solution, the diffusion of EGGC on the silica plate was delayed (Figure 3), indicating a lactose-flavonoid interaction. Similarly, the migration of rutin was held up in the presence of lactose, creating a gradient effect on the TLC plate (Figure 3). According to different authors, polyphenols can interact with carbohydrates via hydrogen bonds or hydrophobic interactions (*27, 28*). Nevertheless, these



polyphenol-carbohydrate interactions highly depend on the hydrophilicity, molecular weight, and structure of polyphenols and carbohydrates (50).



**Figure 3**. Thin-layer chromatography (TLC) analysis of lactose solutions (10%) with or without flavonoids (1 mg mL<sup>-1</sup>). **Lane 1.** lactose (control), **lane 2.** EGCG, **lane 3**. lactose +EGCG, **lane 4.** rutin, **lane 5**. lactose + rutin. Rf = retention factors.

## Crystallization of lactose-protein-flavonoid solutions

Lactose crystallization in the absence of whey proteins and flavonoids (control) showed a long induction time (6.72 hours), a slow rate of crystallization (k = 0010 abs min <sup>-1</sup>), and the process ended (2*tc*) in 80 hours (Figure 4A). Other authors have also reported long inductiontimes in lactose crystallization ranging from 2 to 20 hours, depending on the level of saturation (*51, 52*). An extended induction time is responsible for the slow lactose crystallization process and leads to poor quality crystals (*53*). According to different authors, the entire lactose crystallization process is slow and may extend up to 72 hours, which becomes the major drawback of industrial lactose crystallization from cheese whey (*53, 54*).

The incorporation of whey proteins in a saturated lactose solution dramatically shortened the induction time (Figure 4B) and increased the rate of crystallization (k = 0031 abs min <sup>-1</sup>), finishing the entire process in one hour (2tc = 65 min). Previous studies on lactose crystallization have also shown that adding whey proteins increased lactose crystallization rate and decreased the induction time (*9, 10, 40*),. Some authors suggest that the high water-binding capacity of whey proteins might create local lactose supersaturation spots promoting nucleation of lactose (*55*). Furthermore, whey proteins could stimulate the primary heterogeneous nucleation of lactose, acting as nuclei (*56*).

Rutin diminished the effect of whey proteins over lactose crystallization (Figure 4C). The rate of crystallization was lower for lactose-protein-rutin solutions (k = 0024 abs min<sup>-1</sup>) thanthose observed in lactose-protein solutions (k = 0031 abs min<sup>-1</sup>). Similarly, the entire lactose-protein crystallization process was longer with rutin (9.5 hours)





than without this flavonoid (one hour). Previously, we described that whey proteins are prone to bind rutin (Figure 2) through hydrophobic,  $\pi$ - $\pi$  interactions and hydrogen bonds (Figure 1). The bind of rutin by whey proteins could have minimized the effect of these proteins on lactose crystallization. In addition, the kinetic changes observed in lactose crystallization could be related to rutin-lactose interactions (Figure 3).

The EGCG had a lower impact than rutin on lactose-whey protein crystallization (Figure 4D). For instance, the entire process of lactose-protein crystallization ended in two and half hours with EGCG rather than nine hours with rutin or one hour without flavonoids (Figure 4D). These results suggest EGCG interacted poorly with whey proteins. Instead, the kinetic changes in lactose crystallization could be the result of lactose-EGCG interactions. This supposition is supported by the tendency of EGCG to promote protein-protein agglomerates rather than protein-EGCG complexes (Figure 2) and the proven interaction between EGCG and lactose (Figure 3).



**Figure 4.** Effect of adding flavonoids (rutin and EGCG) and whey proteins on lactose crystallization kinetics. **A.** crystallization of lactose solutions 30% (w/v) without flavonoids or whey proteins (Control). **B.** lactose solution with whey proteins (1% w/v). **C.** lactose solutions with whey proteins and rutin (1mg mL <sup>-1</sup>). **D.** lactose solutions with whey proteins and EGCG (0.5mg mL <sup>-1</sup>). *2tc* = time to complete the crystallization process, k = crystallization rate.

## Crystal size distribution (CSD)

The incorporation of whey proteins into saturated lactose solutions narrowed the CSD significantly (Figure 5). Crystals formed from lactose solutions without proteins or flavonoids (control) had an average and median size of 23.96 and 15.84  $\mu$ m. The inclusion of whey proteins in the lactose solutions dropped the average and median crystal size to 20.96 and 13.10  $\mu$ m (Figure 5). Similarly, some other studies have observed a reduction in lactose CSD by whey proteins (*9, 55*),. Some authors suggest whey proteins may act as nuclei centers in lactose crystallization, increasing the number of nuclei and crystals with a concomitant reduction of crystal size (*9*). The effect of whey proteins on CSD could also be related to thewater-binding capacity of these proteins. According



to Bhargava (*55*), whey proteins decrease lactose solubility due to their high water-binding ability. This higher water-binding capacity creates lactose supersaturation spots, promoting nucleation and favoring lactose crystallization. Additionally, the water-binding ability of proteins decreases the mobility of lactose molecules. In consequence, the growth of crystals diminishes, and the CSD is small (*56-58*). Narrowing the CSD is a primordial criterion in the lactose manufacturers since lactose crystallizes uncontrollably. Achieving uniformity and reducing variability within lactose crystals are beneficial for both processing and quality points of view (*58, 59*).

The incorporation of EGCG enhanced the effect of whey proteins by decreasing, even more, the size of crystals, but the addition of rutin increased the size of crystals (Figure 5). Crystals from lactose-protein-EGCG solutions showed an average and median size of 19.17 and 16.74 µm. In contrast, crystals from lactose-protein-rutin solutions had an average and median size of 27.48 and 23.31 µm. As previously described, the EGCG promotes the interactions of protein-protein (Figure 2), which could boost the effect of proteins limiting the growth of crystals. In addition, the EGCG molecules could have acted as nuclei during lactose crystallization since this flavonoid tends to interact with lactose (Figure 3). Consequently, the addition of EGCG augmented the number of nuclei available for crystal growth with a resulting decrease in crystal size. On the other hand, rutin is prone to bind whey proteins (Figure 2). Therefore, it is probable that the rutin interacted with whey proteins during lactose crystallization, forming flavonoid-protein complexes. The complexation of whey proteins with rutin could partially hinder the attachment of lactose molecules with whey proteins. As a result, the number of possible nuclei decreased and increased the crystal sizes.





## Thermal characterization of crystals

The differential scanning calorimetry (DSC) analysis (Table 1, Figure 6) showed lactose solutions without proteins or flavonoids (control) created chiefly crystals of  $\alpha$ -lactose monohydrated ( $\alpha$ LM) and  $\beta$ -lactose anhydrous ( $\beta$ L). In addition, the formation of amorphouslactose in control crystals was minimal (Table 1, Figure 6). The ratio of water moles per moleof anhydrous lactose was 0.72 (Table 1), confirming the high proportion of  $\alpha$ LM in these crystals.  $\alpha$ LM is the most stable crystalline form of lactose, containing approximately one mole of water per mole of anhydrous lactose (7, 60, 61). The formation of  $\alpha$ LM is promoted when the crystallization process is slow or slow enough to match the rate of lactosemutarotation (7, 13), which coincides with our results (Figure 4).



Crystals of  $\alpha$ LM decreased substantially by adding whey proteins in lactose solutions. Instead, the crystallization of lactose-protein solutions promoted the formation of  $\beta$ L anhydrous crystals and amorphous lactose (Table 1, Figure 6). The reduced proportion of  $\alpha$ LM and the predominancy of  $\beta$ -L anhydrous was confirmed by the low ratio of water moles per mole of anhydrous lactose (0.14). The formation of amorphous lactose by adding whey proteins has been previously reported, particularly if the lactose-protein solution has a neutralpH (9). The formation of  $\beta$ L and amorphous lactose was likely a consequence of the rapid crystallization process in lactose-whey protein solutions (Figure 4) since amorphous lactose is created when the crystallization occurs faster than the mutarotation rate (7). On the other hand, the crystals obtained from lactose-protein solutions showed a protein content of 0.36mgper 100mg of crystals, indicating the formation of co-crystals with lactose and proteins. Results from a former study on the effect of whey proteins in lactose crystallization also confirmed the incorporation of proteins into the crystal lattice of lactose (9). This effect is related to the active interaction between whey proteins and lactose molecules, as previouslydiscussed (Figure 1).

The formation of  $\beta$ L crystals also prevailed when the EGCG was incorporated into lactose- protein solutions. In addition, the EGCG increased the formation of amorphous lactose (Table 1, Figure 6). Interestingly enough, no protein was detected in the crystals from lactose-protein-EGCG solutions. The EGCG promotes the formation of protein agglomerates (Figure 2), which could have limited the interactions between whey proteins and lactose molecules. On the contrary to whey proteins, the EGCG was found in the lactose crystals at 0.308 ± 0.063mg per 100 mg of crystals. As earlier discussed, the EGCG is prone to interact with lactose molecules (Figure 3). Therefore, this flavonoid might have acted as nuclei, leading to form co-crystals of lactose EGCG or, more precisely, amorphous lactose-EGCG because theDSC analysis showed a high peak of amorphous lactose when the EGCG was added (Figure 6).

In contrast to EGCG, rutin promoted the formation of  $\alpha$ LM (Figure 6, Table 1) and enhanced the inclusion of whey proteins in crystals (0.569 ± 0.037mg of protein per 100mg of crystals). Furthermore, a sizeable amount of rutin was integrated into the crystals (3.468 ± 0.392mg per 100mg of crystals), approximately ten times the EGCG concentration observed in lactose crystals. According to the computational docking analysis, rutin flavonoid strongly interacted with whey proteins, particularly with β-lactoglobulin (Figure 1). This protein has hydrophobic regions that bind non-polar molecules, such as rutin. The complexation of whey proteins with rutin probably blocked the hydrophobic zones of proteins and rutin, increasing their solubility (Figure 2). These changes may have enhanced the inclusion of both proteins and rutin in lactose crystals. Besides, it is also probable that the low-polar rutin molecules migrated into the crystal structure to minimize their exposure to the polar solvent (water). Insummary, these results confirm the formation of co-crystals containing lactose, protein, and a large concentration of rutin.



**Figure 6.** Differential Scanning Calorimetry (DSC) of lactose crystallized with the addition of whey proteins (1 mg mL<sup>-1</sup>) and polyphenols (rutin and EGCG) **A.** Lactose crystal **B.** Lactose-protein co-crystals; **C.** Lactose-protein-rutin co-crystals; **D.** Lactose-EGCG co- crystals. **E.**  $\alpha$ - and  $\beta$ - lactose standards **F.** Rutin and EGCG standards.

**Table 1.** Temperature (°C) and enthalpies ( $\Delta$ H expressed in J/g) of the most characteristic endothermic peaks observed in the differential scanning calorimetry (DSC) analysis of lactose crystallized with the addition of whey proteins (1 mg mL<sup>-1</sup>) and flavonoids (rutin andEGCG).

Crystals from solutionscontaining	Dehydratio n of crystalline water in αLM	Melting of unstable anhydrou sαL	Melting ofα-LM	Melting ofβ-L anhydrou s	Melting of amorpho uslactose	Moles of water per mol of anhydrou slactose [w]/[ɑL]
Lactose	144.5 (-89.43)	169.5 (-17.79)	216.3 (-33.78)	225.3 (-29.59)	244.8 (-9.671)	0.72
Lactose + proteins	138.2 (-18.26)	151.2 (-15.23)	183.8 (-39.84)	201.5 (-62.98)	234.3 (-28.61)	0.14



Lactose + proteins + rutin	151.9 (-83.55)		199.3 (-71.25)	212.8 (-51.46)	242.8 (-17.86)	0.68
Lactose + proteins + EGCG	153.1 (-81.11)		196.9 (-16.60)	202.2 (-50.46)	221.4 (-49.97)	0.66
α - Lactose standard	144 (-99.64)	163.6 (-22.36)	216.9 (-14.19)	233 (-159) 224.4	252.9 (-11.98) 240.0	0.8
$\beta$ - Lactose standard	(-5.79)			234.4 (-107.2)	(-20.27)	0.05
-	130-146	170	201-220	220-235	240-241	
Lactose peaks described in theliterature	(53, 61, 62)	(63)	(53, 61- 63)	(61-63)	( <i>9, 64</i> ),	

## Abbreviations Used

αLA: α-lactalbumin; αLM: α-lactose monohydrate; ALA: alanine; ASN: asparagine; ASP: aspartic acid; βL: β-Lactose; βLG: β- lactoglobulin; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; GLU: Glutamic acid; HIS: histidine; LEU: leucine; LYS: Lysine; MET: methionine; SER: serine; PRO: Proline; THR: threonine; TRP: Tryptophan; TYR: Tyrosine; VAL: valine; WPI:whey protein isolate

## Acknowledgment

The Mexican Nacional Council of Science and Technology (CONACYT) supported this research through the grant conceded to Yanira I. Sánchez-García (Grant number 661768).

## References

1. de Souza, R. R.; Bergamasco, R.; da Costa, S. C.; Feng, X.; Faria, S. H. B.; Gimenes,

M. L., Recovery and purification of lactose from whey. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2010, 49, 1137-1143.

2. Listiohadi, Y. D., Hourigan, J. A., Sleigh, R. W., & Steele, R. J., Properties of lactose and its caking behaviour. Australian Journal of Dairy Technology 2005, 60, 33.

3. Das, B.; Sarkar, S.; Sarkar, A.; Bhattacharjee, S.; Bhattacharjee, C., Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. Process Safety and Environmental Protection 2015.

4. McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F., Significance of Lactose in Dairy Products. 2009, 35-104.

5. Sánchez-García, Y. I.; Bhangu, S. K.; Ashokkumar, M.; Néstor, G.-M., Sonocrystallization of lactose from whey. In Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing, First ed.; Koca, N., Ed. IntechOpen: London, 2018; pp 51- 69.

6. Kravtsov, V. A.; Kulikova, I. K.; Anisimov, G. S.; Evdokimov, I. A.; Khramtsov, A. G., Variety of dairy ultrafiltration permeates and their purification in lactose production. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2021, 677, 032001.



7. Huppertz, T.; Gazi, I., Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. Journal of Dairy Science 2015, 99, 6842-6851.

 Sánchez-García, Y. I.; García-Vega, K. S.; Leal-Ramos, M. Y.; Salmeron, I.; Gutiérrez-Méndez, N., Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and κ-carrageenan. Ultrasonics Sonochemistry 2018, 42, 714-722.

9. Sánchez-García, Y. I.; Gutiérrez-Méndez, N.; Orozco-Mena, R. E.; Ramos-Sánchez,

V. H.; Leal-Ramos, M. Y., Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. Food Research International 2019, 116, 455-461.

10. Sánchez-García, Y. I.; Ashokkumar, M.; Mason, T. J.; Gutiérrez-Méndez, N., Influence of ultrasound frequency and power on lactose nucleation. Journal of Food Engineering 2019, 249, 34-39.

11. Bund, R. K.; Pandit, A. B., Sonocrystallization: effect on lactose recovery and crystal habit. Ultrasonics sonochemistry 2007, 14, 143-52.

12. Food and Drug Administration (FDA), Regulatory classification of pharmaceutical co-crystals guidance for industry. In Pharmaceutical Quality /CMC, Revision 1, Administration, F. a. D., Ed. U.S. Department of Healt and Human Services: Silver Spring, MD, 2018; p 7.

Sánchez-García, Y. I.; Gutiérrez-Méndez, N.; Salmerón, I.; Ramos-Sánchez, V. H.; Leal-Ramos, M.
 Y.; Sepúlveda, D. R., Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans. Food research international 2021, 142, 110204.

14. Rajka Božanić, I. B., Katarina Lisak,; Tratnik, J. a. L., Possibilities of Whey Utilisation. Austin Journal of Nutrition and Food Sciences 2014, 2, 1-7.

15. Al-Shabib, N. A.; Khan, J. M.; Malik, A.; Alsenaidy, M. A.; Rehman, M. T.; AlAjmi,

M. F.; Alsenaidy, A. M.; Husain, F. M.; Khan, R. H., Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies. Journal of Molecular Liquids 2018, 269, 511-520.

16. Abbas, M.; Saeed, F.; Anjum, F. M.; Afzaal, M.; Tufail, T.; Bashir, M. S.; Ishtiaq, A.; Hussain, S.; Suleria, H. A. R., Natural polyphenols: An overview. International Journal of Food Properties 2017, 20, 1689-1699.

17. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry 2002, 13, 572-584.

18. Fu, Z.; Yoo, M. J. Y.; Zhou, W.; Zhang, L.; Chen, Y.; Lu, J., Effect of (-)- epigallocatechin gallate (EGCG) extracted from green tea in reducing the formation of acrylamide during the bread baking process. Food Chem 2018, 242, 162-168.

19. Zhong, Y.; Shahidi, F., Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. J Agric Food Chem 2011, 59, 6526-33.

20. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J., The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. Frontiers in nutrition 2018, 5, 87.

21. Negahdari, R.; Bohlouli, S.; Sharifi, S.; Maleki Dizaj, S.; Rahbar Saadat, Y.; Khezri, K.; Jafari, S.; Ahmadian, E.; Gorbani Jahandizi, N.; Raeesi, S., Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. Phytotherapy research : PTR 2021, 35, 1719-1738.

22. Al-Shabib, N. A.; Khan, J. M.; Malik, A.; Sen, P.; Alsenaidy, M. A.; Husain, F. M.; Alsenaidy, A. M.; Khan, R. H.; Choudhry, H.; Zamzami, M. A.; Khan, M. I.; Shahzad, S. A., A quercetin-based flavanoid (rutin) reverses amyloid fibrillation in beta-lactoglobulin at pH2.0 and 358K. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy 2019, 214, 40-48.



23. Gullón, B.; Lú-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Lema, J. M.; Eibes, G., Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. Trends in Food Science & Technology 2017, 67, 220-235.

24. Buitimea-Cantua, N. E.; Gutierrez-Uribe, J. A.; Serna-Saldivar, S. O., Phenolic- Protein Interactions: Effects on Food Properties and Health Benefits. Journal of medicinal food 2018, 21, 188-198.

25. Yildirim-Elikoglu, S.; Erdem, Y. K., Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. Food Reviews International 2017, 34, 665-697.

26. Rawel, H. M., Meidtner, K., & Kroll, J., Binding of selected phenolic compounds to proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, 53, 4228-4235.

27. Le Bourvellec, C.; Renard, C. M., Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. Crit Rev Food Sci Nutr 2012, 52, 213-48.

28. Jakobek, L., Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins.

Food Chemistry 2015, 175, 556-567.

29. E. L. V. Harris, S. A., Protein Purification Methods A Practical Approach

30. Nasr, A. I.; Mohamed Ahmed, I. A.; Hamid, O. I., Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (Helianthus annuus) seeds. Food science & nutrition 2016, 4, 733-41.

31. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976, 72, 248-254.

Beltrán-Espinoza, J. A.; Domínguez-Lujan, B.; Gutiérrez-Méndez, N.; Chávez- Garay, D. R.; Nájera-Domínguez, C.; Leal-Ramos, M. Y., The impact of chymosin and plant- derived proteases on the acid-induced gelation of milk. International Journal of Dairy Technology 2021, 74, 297-306.

32. Jiang, Z.; Li, T.; Ma, L.; Chen, W.; Yu, H.; Abdul, Q.; Hou, J.; Tian, B., Comparison of interaction between three similar chalconoids and alpha-lactalbumin: Impact on structure and functionality of alpha-lactalbumin. Food research international 2020, 131, 109006.

33. Martínez-Ceniceros, M. C.; Landeros-Martínez, L.-L.; Sánchez-Bojorge, N.-A.; Sandoval-Salas, F.; Piñón-Castillo, H. A.; Hernández-Ochoa, L. R.; Rodríguez-Valdez, L. M., A Potential Inhibition Process of Ricin Protein with the flavonoids Quercetin and Epigallocatechin Gallate. A Quantum-Chemical and Molecular Docking Study. Processes 2020, 8, 1393.

34. Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F., & Frisch, M. J. (1994), Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. The Journal of physical chemistry 1994, 98, 11623-11627.

35. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 2009, 30, 2785-91.

36. Alvarado-Díaz, C. S.; Gutiérrez-Méndez, N.; Mendoza-López, M. L.; Rodríguez- Rodríguez, M. Z.; Quintero-Ramos, A.; Landeros-Martínez, L. L.; Rodríguez-Valdez, L. M.; Rodríguez-Figueroa, J. C.; Pérez-Vega, S.; Salmeron-Ochoa, I.; Leal-Ramos, M. Y., Inhibitory effect of saccharides and phenolic compounds from maize silks on intestinal α- glucosidases. Journal of Food Biochemistry 2019, 43.

37. Liu, F.; Ma, C.; McClements, D. J.; Gao, Y., A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution. Food Hydrocolloids 2017, 63, 625-634.

38. Adler-Nissen, J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food chemistry 1979, 27, 1256-1262.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



 Sanchez-Garcia, Y. I.; Garcia-Vega, K. S.; Leal-Ramos, M. Y.; Salmeron, I.; Gutierrez-Mendez, N., Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and kappa-carrageenan. Ultrasonics sonochemistry 2018, 42, 714-722

40. Sanchez-Garcia, Y. I.; Garcia-Vega, K. S.; Leal-Ramos, M. Y.; Salmeron, I.; Gutierrez-Mendez, N., Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and kappa-carrageenan. Ultrasonics sonochemistry 2018, 42, 714-722.

41. Blainski, A.; Lopes, G. C.; de Mello, J. C., Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L. Molecules 2013, 18, 6852-65.

42. Khankari, R. K., Law, D., & Grant, D. J., Determination of water content in pharmaceutical hydrates by differential scanning calorimetry. nternational journal of pharmaceutics 1992, 82, 117-127.

43. Katouzian, I.; Jafari, S. M.; Maghsoudlou, Y.; Karami, L.; Eikani, M. H., Experimental and molecular docking study of the binding interactions between bovine α- lactalbumin and oleuropein. Food Hydrocolloids 2020, 105, 105859.

44. Sahihi, M.; Heidari-Koholi, Z.; Bordbar, A.-K., The Interaction of Polyphenol Flavonoids with βlactoglobulin: Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Studies. Journal of Macromolecular Science, Part B 2012, 51, 2311-2323.

45. Walstra, P.; Wouters, J. T. M.; Geurst, T. M., Dairy Science and Technology. Second ed.; CRC press: Boca Raton FL, 2006.

46. Siddique, M. A. B.; Maresca, P.; Pataro, G.; Ferrari, G., Influence of pulsed light treatment on the aggregation of whey protein isolate. Food research international 2017, 99, 419-425.

Nguyen, T. T. H.; Kim, N. M.; Yeom, S.-C.; Han, S.; Kwak, S.-H.; Kim, S.-B.; Park, J.-S.; Mok, I. K.;
 Kim, D., Biological characterization of epigallocatechin gallate complex with different steviol glucosides.
 Biotechnology and Bioprocess Engineering 2017, 22, 512- 517.

48. Qie, X.; Chen, Y.; Quan, W.; Wang, Z.; Zeng, M.; Qin, F.; Chen, J.; He, Z., Analysis of betalactoglobulin-epigallocatechin gallate interactions: the antioxidant capacity and effects of polyphenols under different heating conditions in polyphenolic-protein interactions. Food & function 2020, 11, 3867-3878.

Pelegrine, D. H. G.; Gasparetto, C. A., Whey proteins solubility as function of temperature and pH.
 LWT - Food Science and Technology 2005, 38, 77-80.

50. Amoako, D.; Awika, J. M., Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. Current Opinion in Food Science 2016, 8, 14-18.

51. Raghavan, S. L.; Ristic, R. I.; Sheen, D. B.; Sherwood, J. N., The bulk crystallization of α-lactose monohydrate from aqueous solution. Journal of Pharmaceutical Sciences 2001, 90, 823-832.

52. Siddique, H.; Brown, C. J.; Houson, I.; Florence, A. J., Establishment of a Continuous Sonocrystallization Process for Lactose in an Oscillatory Baffled Crystallizer. Organic Process Research & Development 2015, 19, 1871-1881.

53. Dhumal, R. S.; Biradar, S. V.; Paradkar, A. R.; York, P., Ultrasound assisted engineering of lactose crystals. Pharmaceutical research 2008, 25, 2835-44.

54. Pisponen, A.; Mootse, H.; Poikalainen, V.; Kaart, T.; Maran, U.; Karus, A., Effects of temperature and concentration on particle size in a lactose solution using dynamic light scattering analysis. International Dairy Journal 2016, 61, 205-210.

55. Bhargava, A., Jelen, P., Lactose solubility and crystal growth as affected by mineral impurities. Journal of food science 1996, 61, 180-184.

56. Das, D.; Langrish, T. A. G., Activated-rate theory: Effect of protein inhibition and the temperature dependence of crystallization kinetics for lactose-protein mixtures. Food research international 2012, 48, 367-



373.

57. McLeod, J.; Paterson, A. H. J.; Jones, J. R.; Bronlund, J. E., Primary nucleation of alpha-lactose monohydrate: The effect of supersaturation and temperature. International Dairy Journal 2011, 21, 455-461.

58. Zamanipoor, M. H.; Mancera, R. L., The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. Trends in Food Science & Technology 2014, 38, 47-59.

59. Parimaladevi, P.; Srinivasan, K., Influence of supersaturation level on the morphology of α-lactose monohydrate crystals. International Dairy Journal 2014, 39, 301- 311.

60. Dhumal, R. S.; Biradar, S. V.; Paradkar, A. R.; York, P., Ultrasound Assisted Engineering of Lactose Crystals. Pharmaceutical research 2008, 25, 2835-2844.

61. Patel, S. R.; Murthy, Z. V. P., Effect of process parameters on crystal size and morphology of lactose in ultrasound-assisted crystallization. Crystal Research and Technology 2011, 46, 243-248.

62. Kougoulos, E.; Marziano, I.; Miller, P. R., Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size. Journal of Crystal Growth 2010, 312, 3509-3520.

63. Islam, M. I. U.; Langrish, T. A. G., An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. Food research international 2010, 43, 46- 56.

64. Wu, L.; Miao, X.; Shan, Z.; Huang, Y.; Li, L.; Pan, X.; Yao, Q.; Li, G.; Wu, C., Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 2014, 9, 336-341.



Table of content graphic