

Formulación y caracterización fisicoquímica de geles lácteos inducidos por agregado de calcio nutricionalmente enriquecidos con péptidos bioactivos.

Formulation and physicochemical characterization of calcium induced dairy gels nutritionally enriched with bioactive peptides

Satler, L.L. , Sihufe, G.A. , Olivares, M.L. 

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - UNL-CONICET. Santa Fe, Argentina.

* olivares@santafe-conicet.gov.ar

Resumen

El tratamiento térmico de la leche fortificada con calcio conduce a la formación de geles. Además, el aprovechamiento de las proteínas del lactosuero con fines nutricionales ha despertado atención, dado su elevado valor biológico y la comprobada presencia de péptidos con actividad bioactiva. En este trabajo, se propone la obtención de geles a base de leche (con agregado de calcio) y de concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC) o de hidrolizados enzimáticos de concentrado proteico de suero lácteo (WPH). Se formularon geles partiendo de dispersiones de leche al 30% m/m a la cual se le adicionaron sales de calcio (90 mmol/kg) y WPC o WPH (0.1-3% m/m). Luego, se indujo la gelificación mediante un tratamiento térmico a 80 °C durante 15 minutos. Se obtuvieron formulaciones con textura homogénea, sin presencia de grumos ni separación de fases. Asimismo, estos geles presentaron propiedades fisicoquímicas (sinéresis, capacidad de retención de agua e hidratación) y reológicas (viscosidad) adecuadas y con capacidades antioxidante, antihipertensiva y para retener calcio. Específicamente, se concluyó que los geles formulados con lactato de calcio y con 1% m/m de WPH podrían conformar la matriz base para distintos alimentos semi-sólidos como postres o productos untables salados.

Palabras clave: geles lácteos; hidrolizados enzimáticos; fisicoquímica; bioactividad; alimentos semi-sólidos.

Abstract

Heat treatment of calcium-fortified milk leads to the gel formation. Additionally, whey proteins have gained attention for nutritional purposes due to their high biological value and the proven presence of bioactive peptides. In this work, it was proposed to obtain dairy gels with added calcium and whey protein concentrate (WPC) or enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate (WPH). Gels were formulated from 30% w/w milk dispersions to which calcium salts (90 mmol/kg) and WPC or WPH (0.1-3% w/w) were added. Gelation was then induced by heat treatment at 80 °C for 15 minutes. Formulations with homogeneous texture were obtained, without the presence of large aggregates or phase separation. In addition, these gels showed good physicochemical (syneresis, water holding capacity and hydration) and rheological (viscosity) properties and with antioxidant, antihypertensive and calcium retention capacities. Specifically, it was concluded that gels formulated with calcium lactate and 1% w/w of WPH could form the base matrix for various semi-solid foods such as desserts or salted spreadable products.

Keywords: dairy gels; enzymatic hydrolysates; physical chemistry; bioactivity; semi-solid foods.



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción de alimentos suplementados con minerales es una estrategia importante a la hora de prevenir carencias de cationes. El calcio es un mineral esencial para los seres humanos, y gran parte de la población no satisface la ingesta diaria recomendada. En efecto, la osteoporosis, enfermedad en la que los huesos del esqueleto se vuelven frágiles y más propensos a fracturarse debido a la baja densidad causada por la pérdida de minerales de calcio, afecta a unos 75 millones de personas en todo el mundo. La deficiencia nutricional de calcio representa un riesgo mundial, y una forma de mitigar este problema es la fortificación de alimentos con este mineral (Vavrusova y Skibsted, 2014).

La leche y los productos a base de leche son buenos candidatos para el fortalecimiento mineral, no sólo debido a que son alimentos de consumo masivo, sino también por su alto valor alimenticio, su efecto protector sobre la digestión y la absorción de nutrientes, y por los efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo del ser humano (Lombardi *et al.*, 2016).

La adición de calcio en la leche neutraliza los residuos cargados negativamente en la superficie de las micelas de caseína, haciéndolos más susceptibles a la agregación (Ye y Harte, 2013). Trabajos previos han propuesto aprovechar este efecto desestabilizante del calcio para inducir la coagulación de leche fortificada con este mineral mediante un tratamiento térmico adecuado. Esta metodología permite obtener geles con diferentes consistencias y texturas, combinando la adición de diferentes sales de calcio a la leche, el ajuste del pH y el tratamiento térmico (Koutina *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018, Olivares *et al.*, 2022; Ramasubramanian *et al.*, 2014).

Aunque la estrategia de fortificación de productos lácteos con calcio más utilizada consiste en adicionar diferentes sales de calcio, esta forma de fortificación puede generar la formación de depósitos de fosfato de calcio durante la digestión gastrointestinal, lo que resulta en la mala absorción y baja biodisponibilidad del mineral (Vavrusova y Skibsted, 2014; Wang *et al.*, 2018). Para que el calcio sea absorbido, se debe disolver en el ambiente ácido del estómago o permanecer en solución si ya está disuelto. El 90% de la absorción de calcio ocurre en el intestino delgado y el calcio es absorbido en su forma soluble ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble para cruzar la pared intestinal (Wasserman, 2004). Una alternativa para mantener al calcio en estado soluble es formando un complejo con péptidos (Chen *et al.*, 2019).

Por otra parte, el uso y aprovechamiento de las proteínas del lactosuero con fines nutricionales ha despertado mucha atención, no sólo por su elevado valor biológico sino también por su importante contenido de aminoácidos azufrados, lo cual le confiere actividad antioxidante (Sinha *et al.*, 2007). El procesamiento de las proteínas del suero puede producir péptidos con propiedades bioactivas que poseen efectos fisiológicos en el cuerpo humano. La hidrólisis enzimática controlada de proteínas de suero lácteo es una herramienta sumamente útil para liberar péptidos bioactivos (Madureira *et al.*, 2010). Las principales funciones biológicamente activas (bioactivas) encontradas en los péptidos y oligopéptidos provenientes de las proteínas del lactosuero son de tipo antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas, inmunomoduladoras, ligante de minerales, entre otras (Dullius *et al.*, 2018).

Recientemente, Eberhardt *et al.* (2025) reportaron que hidrolizados enzimáticos de proteínas de lactosuero (WPH) obtenidos usando solo Alcalasa® 2.4 L o Alcalasa® 2.4 L seguido de Flavourzyme® 500 L presentaron capacidad quelante de calcio en soluciones acuosas. Por lo tanto, estos WPH se presentan como una excelente opción para adicionarlos en forma conjunta con una sal de calcio a los geles lácteos antes mencionados. El objetivo de este trabajo fue obtener geles lácteos por adición de calcio y de WPH y caracterizarlos en sus propiedades fisicoquímicas, reológicas y bioactivas, de manera tal que constituyan matrices para futuras formulaciones de alimentos semisólidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Formulación de geles lácteos con agregado de calcio y WPH

2.1.1. Dispersiones de leche

Se utilizó leche descremada en polvo (SanCor Cooperativas Unidas Ltda., Sunchales, Argentina) obtenida con un tratamiento de baja temperatura. En primer lugar, la cantidad necesaria de polvo para alcanzar una

concentración de 30% m/m se dispersó gradualmente al agua ultrapura a 25 °C y se dejó bajo agitación moderada durante 4 h. En segundo lugar, para evitar el crecimiento bacteriano, se añadió a las muestras azida sódica (0.02% m/v) antes de almacenarlas durante la noche a 25 °C, a los efectos de restablecer la hidratación proteica y el equilibrio iónico.

Al día siguiente, estas dispersiones se trataron térmicamente a 90 °C durante 5 min y se enfriaron nuevamente a 25 °C, dado que se ha reportado que este procedimiento permite obtener geles más fuertes (Ramasubramanian *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018). A estas muestras se les dispersó bajo agitación constante sales de cloruro de calcio (CaCl₂, Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) o lactato de calcio hidratado (C₆H₁₀CaO₆.xH₂O, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.) en una concentración de 90 mmol/kg. Luego, a algunas muestras se les adicionaron extractos WPH liofilizados o concentrados de proteínas de suero lácteo (WPC) en concentraciones de 0.1%, 1% y 3% m/v. Se incluyó una muestra control que contiene la sal de calcio correspondiente, sin agregado de WPH o WPC. Un resumen de las distintas formulaciones se presenta en la Tabla 1. Las muestras se dejaron reposar toda la noche permitiendo de esta forma que se restablezca el nuevo equilibrio iónico.

Se trabajó con concentrado de proteínas de suero lácteo marca LACPRODAN®-80, producido por Arla Food Ingredients S.A. (Buenos Aires, Argentina), el cual contiene aproximadamente 80 g de proteína por cada 100 g de muestra. Los WPH utilizados fueron obtenidos utilizando la enzima Alcalasa™ 2.4L (EC 3.4.21.62) de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca), con un grado de hidrólisis del 13% siguiendo el procedimiento propuesto por Eberhardt *et al.* (2019).

Tabla 1. Códigos y composición de las muestras formuladas.

Código de muestra	[Cloruro de calcio] (mmol/kg)	[Lactato de calcio] (mmol/kg)	[WPC] (% m/v)	[WPH] (% m/v)
CaCl ₂ -Control	90	-	-	-
CaCl ₂ -WPC0.1	90	-	0.1	-
CaCl ₂ -WPC1	90	-	1	-
CaCl ₂ -WPC3	90	-	3	-
CaCl ₂ -WPH0.1	90	-	-	0.1
CaCl ₂ -WPH1	90	-	-	1
CaCl ₂ -WPH3	90	-	-	3
Lac-Control	-	90	-	-
Lac-WPC0.1	-	90	0.1	-
Lac-WPC1	-	90	1	-
Lac-WPC3	-	90	3	-
Lac-WPH0.1	-	90	-	0.1
Lac-WPH1	-	90	-	1
Lac-WPH3	-	90	-	3

2.1.2. Geles

Para inducir la gelificación se realizó un tratamiento térmico a las dispersiones de leche, calentando las muestras a 80 °C durante 15 min, seguido de un enfriamiento a 25 °C durante 10 min (Olivares *et al.*, 2022). Luego, se llevaron a heladera toda la noche para dejar estabilizar la estructura de gel.

2.2. Caracterización de las dispersiones de leche y de los geles

2.2.1. pH y conductividad eléctrica

Se midió el pH, tanto de las suspensiones previas al tratamiento térmico como de los geles obtenidos, utilizando un medidor de pH Spear (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL, EE.UU.). La conductividad se midió en las dispersiones de leche (previas al tratamiento térmico) empleando un conductímetro inoLab Cond 720 WTW (Weilheim, Alemania).

2.2.2. Sinéresis

Se pesaron tubos *ependorf* (1.5 mL) vacíos, luego se llenaron con los geles, se volvieron a pesar y se centrifugaron a 1100 g durante 10 min a 10 °C, utilizando una centrífuga Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania). Luego, se extrajo el sobrenadante de cada tubo *ependorf* y se pesaron. La sinéresis se determinó como el porcentaje (m/m) de suero exudado por muestra de gel (Tarapata *et al.*, 2020). Estas mediciones se realizaron por triplicado.

2.2.3. Capacidad de retención de agua

Los *pellets* obtenidos de la primera centrifugación se centrifugaron nuevamente a 13500 g durante 30 min a 10 °C, se les extrajo el sobrenadante y se pesaron nuevamente. La capacidad de retención de agua (CRA) del gel se obtuvo al calcular el porcentaje (m/m) del *pellet* obtenido luego de la segunda centrifugación (Tarapata *et al.*, 2020).

2.2.4. Hidratación de las proteínas

Los *pellets* obtenidos de la segunda centrifugación se congelaron (-20 °C durante al menos 24 h), se liofilizaron en un equipo Freeze dryer Thermo, modelo Heto PowerDry PL600 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE.UU.) y se pesaron. La hidratación de proteínas se calculó como la relación entre la masa (g) de agua en el *pellet* luego de la segunda centrifugación y la masa (g) de sólidos en el *pellet* luego la liofilización (Tarapata *et al.*, 2020).

2.2.5. Caracterización reológica

Se determinaron las características reológicas de los geles obtenidos registrando la viscosidad de las formulaciones en función del incremento de la velocidad de corte o cizalla desde 0.1 a 500 1/s a 25 °C (Olivares *et al.*, 2016), utilizando un viscosímetro Brookfield DV3TRV (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, EE.UU.) con geometría cono-plato (CPA-52Z, 3° de ángulo y 24 mm de diámetro). La velocidad de corte se incrementó de forma escalonada cada 30 s, hasta completar un tiempo total de ensayo de 630 s. Antes de iniciar las mediciones, las muestras fueron equilibradas durante 1 min para eliminar cualquier efecto de historia mecánica.

2.2.6. Calcio retenido en la matriz de gel

Como medida indirecta de capacidad ligante de calcio, se cuantificó la cantidad de calcio presente en el *pool* de suero expulsado por los geles (calcio no retenido en la matriz de gel), obtenido luego de las centrifugaciones consecutivas. Para ello, se empleó un método colorimétrico siguiendo las recomendaciones del proveedor del *kit* para determinación de calcio (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). El mismo se fundamenta en que el calcio presente en las muestras reacciona con la o-cresolftaleín complexona (o-CPC) a pH alcalino, generando un complejo de color magenta que se mide fotocolorimétricamente a 570 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 60 UV-Visible (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, EE.UU.). Teniendo en cuenta la cantidad de calcio presente originalmente en los geles (concentración de calcio de la leche más concentración de calcio adicionada), por diferencia, los resultados obtenidos se expresaron como miligramos de calcio retenido por gramo de gel.

2.2.7. Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras estudiadas, se aplicó la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Este método consiste en la eliminación del radical ABTS [(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))], un cromóforo azul-verde cuya intensidad de color disminuye a medida que se reduce debido a la presencia de un compuesto antioxidante. En este método, se agrega un antioxidante a una solución radical ABTS preformado y después de un período de tiempo fijo, el ABTS restante se cuantifica espectrofotométricamente a 734 nm. Para expresar los resultados como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se utilizó el reactivo Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman2-carboxílico), un análogo de vitamina E soluble en agua que se utiliza como estándar. Se realizó una curva de calibrado con este compuesto (donde se grafica el porcentaje de eliminación del radical ABTS en función de la concentración de Trolox) y luego se ingresó con el porcentaje de eliminación de ABTS de las muestras incógnitas para expresar los resultados con esta equivalencia.

2.2.8. Actividad antihipertensiva

Para determinar la actividad antihipertensiva de las muestras, se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) empleando el método espectrofotométrico descrito por Hayakari *et al.* (1978) y modificado por Cian *et al.* (2011). El mismo se fundamenta en la reacción colorimétrica específica entre el ácido hipúrico liberado por acción de la ECA y la 2,4,6 triclora 1,3,5-triazina (TT), que genera un compuesto coloreado, cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 382 nm. Para ello, se extrajo la ECA a partir de pulmones de conejos adultos jóvenes provistos por la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja UNL (Esperanza, Argentina).

Cada mezcla de reacción se preparó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL enfriado en un baño de hielo molido. Seguidamente, cada preparación se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 45 min. La reacción se detuvo por la adición de 665 µL de TT en dioxano (30 mg/mL) y 1.1 mL de buffer fosfato 100 mM (pH 8.3). Luego de 10 min de espera para dar tiempo a la formación de color, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y se procedió a leer la absorbancia a 382 nm. La actividad de la ECA se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de la ECA} = \frac{(AM-ABM)}{(AES-ABES)} \times 100 \quad (1)$$

Donde AM es la absorbancia de la muestra (muestra + enzima + sustrato), ABM es la absorbancia del blanco de la muestra (muestra + enzima), AES es la absorbancia de la enzima + el sustrato, ABES es la absorbancia del blanco de la enzima + el sustrato. Finalmente, el porcentaje de inhibición de cada muestra se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \text{Actividad de la ECA} \quad (2)$$

2.3. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico con los parámetros obtenidos, basado en un diseño factorial evaluando como fuente de variabilidad el tipo y concentración de fuente peptídica (WPC o WPH), con dos réplicas cada una y con interacción. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a los parámetros utilizando el programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, EE.UU.). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una comparación múltiple de medias empleando el test de las mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se presentan imágenes representativas de los geles formulados. No se apreciaron disparidades visuales entre las distintas formulaciones. Todas las formulaciones presentaron una textura homogénea sin presencia de grumos ni separación de fases. La consistencia lograda resulta adecuada para formular distintos alimentos semi-sólidos como postres o productos untables salados (similar a un queso crema), sin la necesidad de utilizar espesantes o aditivos.

Las Tablas 2 y 3 presentan los resultados de pH y conductividad eléctrica de las dispersiones de leche, es decir las muestras antes de ser sometidas al tratamiento térmico de gelificación, y el pH de los geles. Se observó que los valores de pH de las dispersiones de leche con y sin agregado de WPC o WPH fueron más bajos cuando se utilizó cloruro de calcio, lo cual coincide con lo reportado por Acosta *et al.* (2020). La disminución del pH de la leche después de la adición de sales de calcio ha sido reportada previamente (Acosta *et al.*, 2020; Lewis, 2010; Philippe *et al.*, 2003). Este comportamiento se relaciona con: (i) la formación de compuestos tales como fosfato y citrato de calcio; (ii) cambios entre el calcio añadido y los protones presentes en la fase micelar; y (iii) la acidez de la solución de sal de calcio añadida (Philippe *et al.*, 2003). Asimismo, se observó que parte del calcio adicionado migra hacia el interior de las micelas de caseína formando fosfato de calcio coloidal y que el calcio añadido en forma de lactato entra en las micelas en mayor medida y, consecuentemente, causa una menor reducción del pH (Acosta *et al.*, 2020).

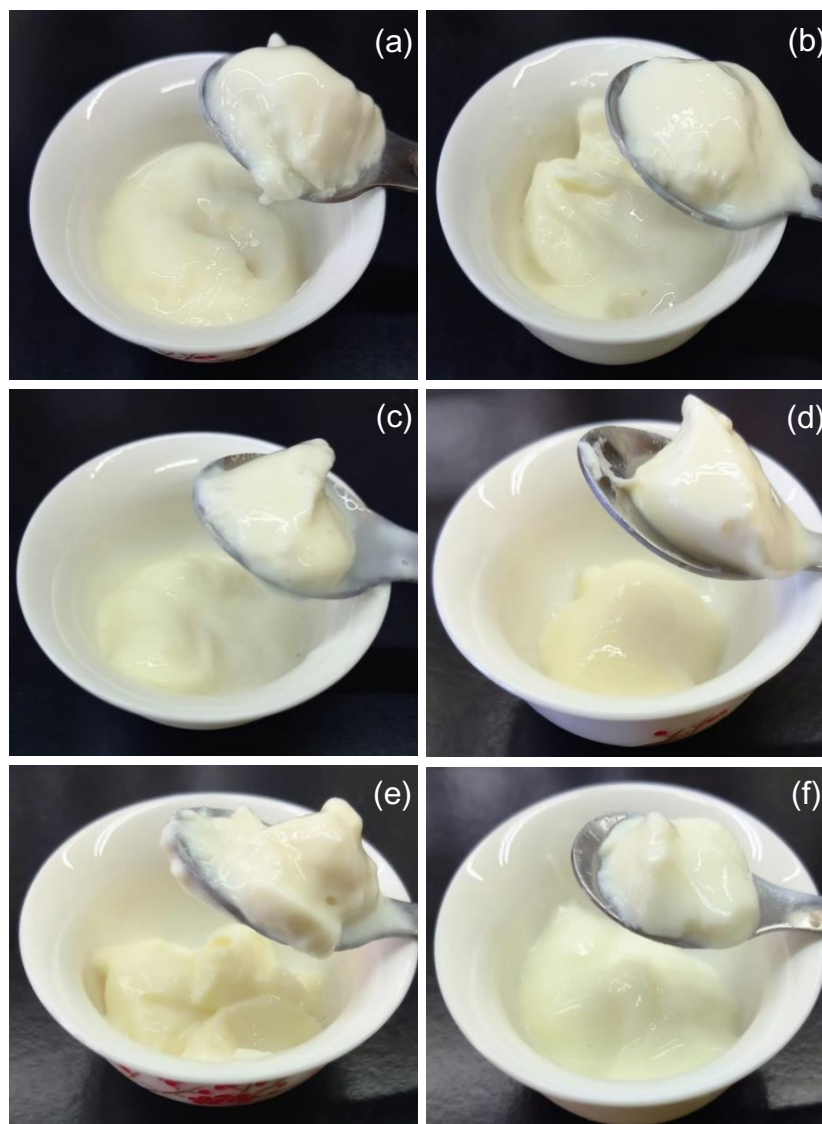


Figura 1. Imágenes de geles lácteos formulados (a) CaCl_2 ; (b) Lac; (c) CaCl_2 -WPH1; (d) Lac-WPH1; (e) CaCl_2 -WPC1; (f) Lac-WPC1.

En el caso de las dispersiones de leche con WPC (Tabla 2), si bien se evidenció una tendencia general al aumento del pH, esta no fue sostenida en todas las concentraciones evaluadas ni resultó estadísticamente significativa en todos los casos. Por otro lado, para las dispersiones de leche con agregado de WPH (Tabla 3), se observó un aumento significativo del pH a medida que se incrementó la concentración del hidrolizado. Asimismo, se observó que el aumento de pH fue mayor en las muestras con agregado de WPH. Este aumento podría estar relacionado con la metodología mediante la cual transcurre la hidrólisis enzimática, ya que la enzima Alcalasa actúa de manera óptima a pH 9 y para mantener este valor de pH durante toda la reacción se añade una solución de hidróxido de sodio (NaOH). Además, a partir del volumen y la normalidad de la solución de NaOH agregada es posible determinar el grado de hidrólisis de las proteínas nativas alcanzado durante la reacción (Eberhardt *et al.*, 2019). Una tendencia similar se observó para los valores de pH de los geles, solo que la mayoría de las muestras presentaron valores de pH ligeramente superiores a los de las dispersiones correspondientes. Esta tendencia coincide con otros resultados donde se han añadido proteínas de suero lácteo a un postre (Rodríguez-Rivera, 2017). Esto puede deberse a que durante el proceso de gelificación se produce desnaturalización proteica seguida de agregación y ruptura del equilibrio ácido-base entre la fase micelar y sérica.

La conductividad eléctrica está relacionada con la presencia de iones libres en la solución. Se observó que la misma disminuyó a medida que aumentó el porcentaje de concentrado de WPC o WPH adicionado, tendencia

que indicaría que algunas especies iónicas, fundamentalmente minerales, presentes en la leche perdieron su carga eléctrica, sugiriendo su unión a la fracción peptídica. Tanto en las dispersiones de leche con WPC como en las dispersiones con WPH se observó una menor conductividad en las muestras formuladas con lactato de calcio. Esto también se debería a que el calcio adicionado en forma de lactato ingresa en mayor medida al interior de las micelas de caseína quedando en menor cantidad en la fase sérica y ocasionando una menor conductividad eléctrica.

Tabla 2. Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes a pH y conductividad eléctrica de dispersiones de leche y pH de geles de las formulaciones con WPC.

Sal agregada	[WPC] (% m/v)	pH solución	pH geles	Conductividad (mS/cm)
Cloruro de calcio	0	5.38 ± 0.01 ^a	5.47 ± 0.03 ^a	15.85 ± 0.02 ^d
	0.1	5.54 ± 0.00 ^b	5.64 ± 0.03 ^b	15.06 ± 0.08 ^c
	1	5.59 ± 0.01 ^c	5.69 ± 0.00 ^{bc}	14.82 ± 0.01 ^b
	3	5.53 ± 0.00 ^b	5.73 ± 0.03 ^c	14.33 ± 0.04 ^a
Lactato de calcio	0	5.79 ± 0.04 ^{ab}	5.81 ± 0.06 ^a	10.67 ± 0.30 ^b
	0.1	5.80 ± 0.01 ^{ab}	5.97 ± 0.00 ^b	10.89 ± 0.01 ^b
	1	5.82 ± 0.01 ^b	6.00 ± 0.02 ^b	10.62 ± 0.03 ^b
	3	5.76 ± 0.01 ^a	5.81 ± 0.01 ^a	10.18 ± 0.01 ^a

^{a-d}: letras diferentes en una misma columna y para un mismo tipo de sal de calcio implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes a pH y conductividad eléctrica de dispersiones de leche y pH de geles de las formulaciones con WPH.

Sal agregada	[WPH] (% m/v)	pH solución	pH geles	Conductividad (mS/cm)
Cloruro de calcio	0	5.38 ± 0.01 ^a	5.47 ± 0.03 ^a	15.85 ± 0.02 ^b
	0.1	5.55 ± 0.00 ^b	5.50 ± 0.01 ^a	16.48 ± 0.33 ^c
	1	5.69 ± 0.03 ^c	5.66 ± 0.02 ^b	15.83 ± 0.03 ^b
	3	5.84 ± 0.01 ^d	5.95 ± 0.03 ^c	14.76 ± 0.01 ^a
Lactato de calcio	0	5.79 ± 0.04 ^a	5.81 ± 0.06 ^a	10.67 ± 0.30 ^b
	0.1	5.80 ± 0.00 ^a	5.84 ± 0.00 ^a	10.55 ± 0.02 ^{ab}
	1	5.93 ± 0.01 ^b	5.99 ± 0.01 ^b	10.44 ± 0.06 ^{ab}
	3	6.22 ± 0.00 ^c	6.35 ± 0.00 ^c	10.19 ± 0.04 ^a

^{a-d}: letras diferentes en una misma columna y para un mismo tipo de sal de calcio implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los valores obtenidos para los parámetros sinéresis, CRA e hidratación de las proteínas se presentan en las Tablas 4 y 5. Se destaca que las formulaciones con 3% m/v de WPH y con los dos tipos de sales de calcio utilizadas presentaron los valores más elevados de sinéresis. Esto puede deberse a que, posiblemente, la cantidad de hidrolizados adicionada provocó una mayor desestabilización de la matriz proteica, alterando la estructura de los geles y reteniendo menor cantidad de agua. Sin embargo, las formulaciones con agregado de 0.1% y 1% m/v de WPH presentaron porcentajes de sinéresis menores a 4%, siendo aceptables para una formulación base para un alimento semi-sólido.

Los geles formulados con WPC obtuvieron valores muy bajos de sinéresis, lo que se puede atribuir a que las proteínas del lactosuero retienen mayor cantidad de agua que los péptidos hidrolizados. El proceso de hidrólisis enzimática utilizado para producir WPH implica la ruptura de enlaces peptídicos en las proteínas de suero para generar péptidos más pequeños y aminoácidos libres (Eberhardt *et al.*, 2019). Esto puede resultar en una menor capacidad para formar enlaces y para retener agua en comparación con las proteínas de suero nativas presentes en el WPC. Con respecto a la CRA, la misma aumentó con la cantidad de WPH adicionada. En relación a los valores obtenidos para las muestras con WPC, estos no mostraron una tendencia lineal con el aumento de la concentración de sales. Finalmente, se obtuvieron valores similares de hidratación de las proteínas para todas las muestras, los cuales coinciden con sistemas lácteos afines (Olivares *et al.*, 2022; Tarapata *et al.*, 2020).

Tabla 4. Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes a sinéresis, capacidad de retención de agua e hidratación de las proteínas de las formulaciones con WPC.

Sal agregada	[WPC] (% m/v)	Sinéresis (%)	CRA (%)	Hidratación (g H ₂ O/g sólidos)
Cloruro de calcio	0	0.79 ± 0.28 ^{ab}	58.97 ± 0.29 ^a	1.80 ± 0.01 ^{ab}
	0.1	0.10 ± 0.15 ^a	61.17 ± 0.65 ^a	1.84 ± 0.03 ^a
	1	0.00 ± 0.00 ^a	66.55 ± 2.29 ^b	1.86 ± 0.13 ^{ab}
	3	1.78 ± 1.77 ^b	60.49 ± 5.35 ^a	2.08 ± 0.32 ^b
Lactato de calcio	0	1.44 ± 0.42 ^b	52.38 ± 2.29 ^a	1.72 ± 0.00 ^a
	0.1	0.00 ± 0.00 ^a	68.88 ± 8.94 ^b	2.05 ± 0.21 ^a
	1	0.00 ± 0.00 ^a	80.08 ± 2.67 ^c	2.83 ± 1.70 ^a
	3	0.00 ± 0.00 ^a	71.19 ± 4.31 ^b	1.86 ± 0.03 ^a

^{a-c}: letras diferentes en una misma columna y para un mismo tipo de sal de calcio implican diferencias significativas (p<0.05).

Tabla 5: Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes a sinéresis, capacidad de retención de agua e hidratación de las proteínas de las formulaciones con WPH.

Sal agregada	[WPH] (% m/v)	Sinéresis (%)	CRA (%)	Hidratación (g H ₂ O/g sólidos)
Cloruro de calcio	0	0.79 ± 0.28 ^a	58.97 ± 0.29 ^a	1.80 ± 0.01 ^b
	0.1	3.44 ± 0.88 ^b	58.82 ± 1.60 ^a	1.79 ± 0.03 ^b
	1	1.83 ± 0.84 ^a	62.51 ± 1.12 ^b	1.81 ± 0.05 ^b
	3	8.50 ± 1.28 ^c	61.96 ± 1.56 ^b	1.70 ± 0.02 ^a
Lactato de calcio	0	1.44 ± 0.42 ^a	52.38 ± 2.29 ^a	1.72 ± 0.00 ^a
	0.1	3.60 ± 1.92 ^a	54.18 ± 1.14 ^a	1.76 ± 0.03 ^b
	1	2.21 ± 1.25 ^a	56.35 ± 0.56 ^b	1.72 ± 0.01 ^a
	3	6.72 ± 1.91 ^b	61.26 ± 1.19 ^c	1.71 ± 0.02 ^a

^{a-c}: letras diferentes en una misma columna y para un mismo tipo de sal de calcio implican diferencias significativas (p<0.05).

La Fig. 2 presenta los resultados obtenidos con las curvas de fluidez de las formulaciones. Todas las muestras presentaron comportamiento típico de un fluido pseudoplástico, donde la viscosidad disminuyó a medida que aumentó la velocidad de deformación. Las muestras con agregado de lactato de calcio y WPC presentaron un menor grado de pseudoplasticidad. Sin embargo, en la zona de velocidades de corte que se correlaciona con el

comportamiento en boca (Ong *et al.*, 2018), comprendida entre 10 y 100 1/s, se observan valores de viscosidad similares. Este tipo de respuesta es característica en postres de base láctea formulados con diferentes mezclas de proteínas y polisacáridos (Tárrega *et al.*, 2004; Tárrega y Costell, 2006), para queso crema (Brighenti *et al.*, 2018). En tal sentido, se concluye que todas las formulaciones gelificadas presentan características de viscosidad similares.

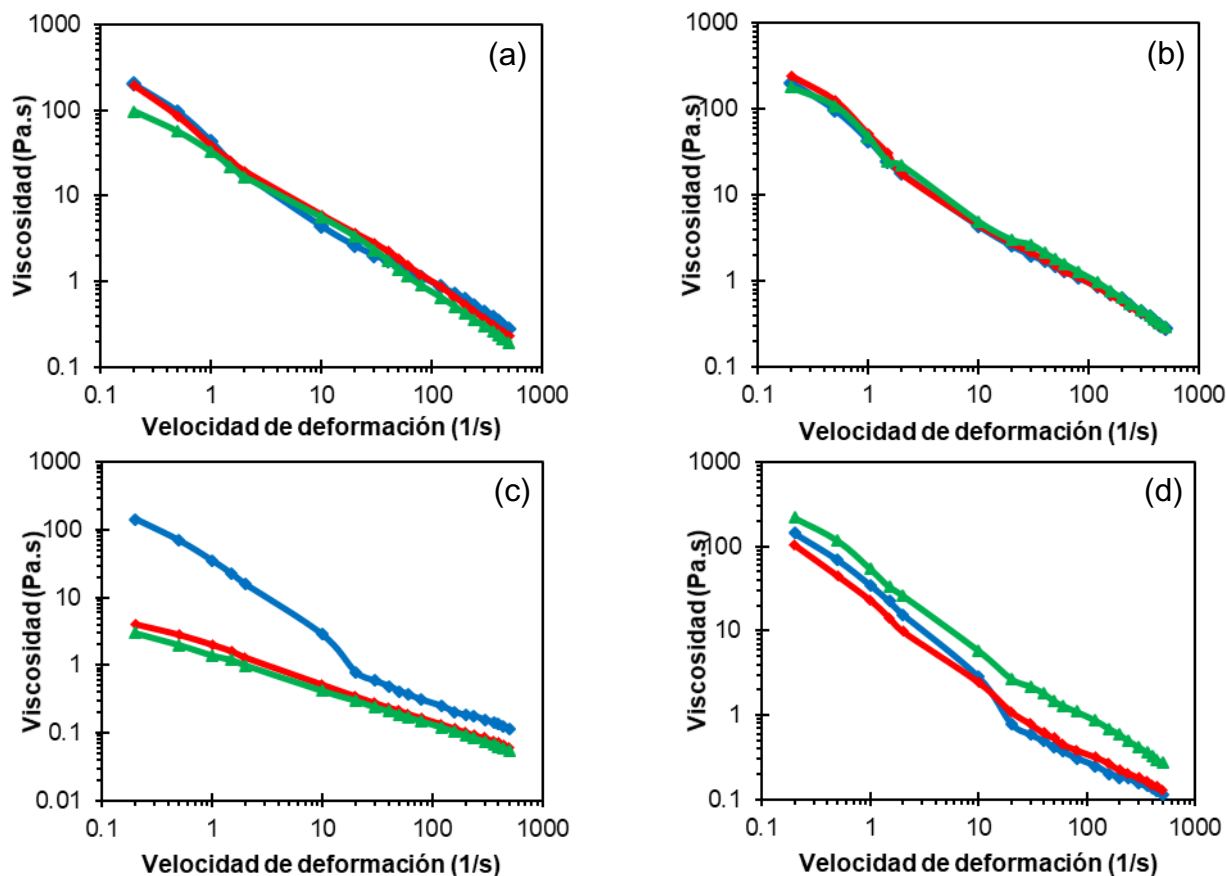


Figura 2. Curvas de fluidez de geles con agregado de: (a) Cloruro de Calcio y WPC, (b) Cloruro de Calcio y WPH, (c) Lactato de Calcio y WPC, (d) Lactato de Calcio y WPH. Las muestras con agregado 3% m/v de WPC y WPH no pudieron ser procesadas por exceder el torque permitido por el viscosímetro.

(—): Control; (—): 0.1% m/v WPC o WPH; (—): 1% m/v WPC o WPH.

La Tabla 6 presenta los valores de calcio retenido en la matriz de gel. Tanto para las formulaciones con agregado de WPC como para las formulaciones con agregado de WPH, se observó un aumento del calcio retenido con el aumento de la concentración de la matriz proteica ensayada. Por otro lado, no se observaron diferencias importantes a la hora de comparar las muestras con WPC vs. aquellas que contenían WPH (más aún, solo se observaron diferencias significativas para el caso del agregado de lactato de calcio y con las concentraciones más altas). Estos resultados mantienen concordancia con estudios previos, dado que las proteínas del lactosuero y los WPH demostraron en ensayos *in vitro* poseer capacidad para unirse al calcio (Eberhardt *et al.*, 2025). Por consiguiente, los resultados obtenidos con esta metodología sugieren, de manera indirecta, que esta capacidad de unión a calcio se mantiene cuando las proteínas del WPC y/o los péptidos del WPH forman parte de la matriz de gel. Así, el agregado de WPC y de WPH a matrices alimenticias fortificadas con calcio podría contribuir a aumentar la absorción de este mineral a nivel intestinal.

Tabla 6. Valores promedio y desviaciones estándar correspondientes a calcio retenido por g de gel de las formulaciones con WPC o WPH.

Sal agregada	[WPC] o [WPH] (% m/v)	Calcio retenido (mg/g de gel con WPC)	Calcio retenido (mg/g de gel con WPH)
Cloruro de calcio	0	6.51 ± 0.04 ^a	6.51 ± 0.04 ^a
	0.1	6.58 ± 0.00 ^{ab}	6.53 ± 0.04 ^a
	1	6.64 ± 0.06 ^{bc}	6.68 ± 0.00 ^{cd}
	3	6.76 ± 0.05 ^d	6.71 ± 0.06 ^{cd}
Lactato de calcio	0	6.33 ± 0.05 ^a	6.33 ± 0.05 ^a
	0.1	6.58 ± 0.28 ^b	6.37 ± 0.01 ^{ab}
	1	6.87 ± 0.02 ^c	6.52 ± 0.01 ^{ab}
	3	6.82 ± 0.01 ^c	6.47 ± 0.01 ^{ab}

^{a-d}: letras diferentes para un mismo tipo de sal de calcio implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos referentes a actividad antioxidante y actividad antihipertensiva. Estas caracterizaciones se llevaron a cabo para la muestra Lac-WPH1, debido a que mostró bajos niveles de sinéresis, propiedades texturales adecuadas, y altos niveles de calcio retenido. Más aún, es bien conocido que el cloruro de calcio puede generar cierto sabor metálico cuando se adiciona en distintos tipos de alimentos (Lawless *et al.*, 2003). Por consiguiente, como las formulaciones con ambas sales de calcio mostraron características similares se optó por continuar trabajando con la formulación con lactato de calcio. Además, se incluyeron las muestras Lac-WPC1 y Lac-Control para evaluar y comparar la influencia del agregado de WPH a las formulaciones. Se observaron valores similares de actividad antioxidante para las formulaciones Lac-WPH1 y Lac-WPC1. La formulación Lac-WPC1 presentó una TEAC más elevada que la obtenida para la formulación Lac-Control (sin agregado proteico). Soluciones acuosas de los hidrolizados enzimáticos de proteína de suero lácteo utilizados en este trabajo mostraron poseer una capacidad antioxidante de 4 a 6 veces mayor con respecto al WPC sin hidrolizar (Eberhardt *et al.*, 2019), por lo que estos resultados pueden deberse a que ocurrieron interacciones moleculares entre los péptidos y otros componentes presentes en la matriz alimentaria, afectando su capacidad para actuar como antioxidantes. Sin embargo, la capacidad antioxidante es un atributo complejo que puede estar influenciado por múltiples factores, si bien los ensayos colorimétricos pueden proporcionar cierta información preliminar, para una evaluación más completa y precisa de la capacidad antioxidante de una muestra, es recomendable utilizar un enfoque más amplio y diverso que incluya múltiples métodos de análisis (Pérez Jiménez y Saura Calixto, 2007).

Tabla 7. Valores promedio y desviaciones estándar de TEAC y de inhibición de ECA correspondientes a las muestras Lac-Control, Lac-WPC1 y Lac-WPH1.

Código de muestra	TEAC (mM TROLOX)*	Inhibición de la ECA (%)*
Lac-Control	6.22 ± 0.22 ^a	48.58 ± 2.21 ^a
Lac-WPC1	6.65 ± 0.25 ^b	60.59 ± 1.11 ^b
Lac-WPH1	6.24 ± 0.16 ^{ab}	83.67 ± 0.01 ^c

^{a-c}: letras diferentes en una misma columna implican diferencias significativas ($p < 0.05$).

* En todos los casos, se prepararon soluciones de 0.4 mg gel/mL de agua para realizar los ensayos.

En cuanto a la capacidad antihipertensiva, se observó una diferencia significativa en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina entre las tres formulaciones, siendo notablemente más marcada en el caso de la muestra Lac-WPH1, correspondiéndose con los efectos antihipertensivos que se han encontrado en soluciones acuosas de hidrolizados de proteína de suero lácteo obtenidos por hidrólisis enzimática (Eberhardt *et al.*, 2019).

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron geles a base de leche con agregado de calcio y WPH. Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas, reológicas y bioactivas de estos geles. Los resultados obtenidos posicionan a la formulación con lactato de calcio (90 mmol/kg) y WPH en una concentración 1% m/v con las mejores características para el desarrollo de alimentos de base láctea nutricionalmente enriquecidos, debido a que mostró poseer bajos niveles de sinéresis, propiedades texturales adecuadas, capacidad antioxidante, antihipertensiva, y para retener calcio.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado con el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Litoral (proyectos CAI + D: 50620190100043LI y 85520240100028LI) (Santa Fe, Argentina) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (proyecto CONICET: 11220200100592CO) (Argentina).

Referencias

- Acosta, N. B., Sihufe, G. A., Meza, B. E., Marino, F., Costabel, L. M., Zorrilla, S. E. y Olivares, M. L. (2020). Milk fortified with calcium: Changes in the physicochemical and rheological characteristics that affect the stability. *LWT - Food Science and Technology*, 134, 110204. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110204>
- Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., y Lucey J. A. (2018). Effects of processing conditions on the texture and rheological properties of model acid gels and cream cheese. *Journal of Dairy Science*, 101, 6762-6775. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14391>
- Chen, M., Ji, H., Zhang, Z., Zeng, X., Su, W. y Liu, S. (2019). A novel calcium-chelating peptide purified from Auxis thazard protein hydrolysate and its binding properties with calcium. *Journal of Functional Foods*, 60, 103447. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103447>
- Cian, R. E., Luggren, P. y Drago, S. R. (2011). Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine hemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 774-780. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582034>
- Dullius, A., Goettert, M. I. y de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
- Eberhardt, A., López, E., Ceruti, R., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M. y Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey proteins hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>
- Eberhardt, A., Niizawa, I., López, E., Rossi, Y., Montenegro, M., Mammarella, E. J., Manzo, R. M. y Sihufe, G. A. (2025). Production of whey protein ingredients with improved bioactivity based on single and sequential enzymatic hydrolysis reactions. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 5, 101-111. <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00318-z>
- Hayakari, M., Kondo, Y. e Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84(2), 361-369. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)
- Koutina, G., Christensen, M., Bakman M., Andersen, U. y Skibsted, L. H. (2016). Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. *Dairy Science & Technology*, 96, 79-93. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0240-7>
- Lawless, H. T., Rapacki, F., Horne, J., Hayes, A. y Wang, G. (2003). The taste of calcium chloride in mixtures with NaCl, sucrose and citric acid. *Food Quality and Preference*, 15, 83-89. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00099-5)
- Lewis, M. J. (2010). The measurement and significance of ionic calcium in milk - a review. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00639.x>
- Lin, L., Wong, M., Deeth, H. C. y Oh, H. E. (2018). Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts. *Food Chemistry*, 245, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.081>
- Lombardi, J., Spelzini, D., Folmer Corrêa, A. P., Brandelli, A., Risso, P. y Boeris, V. (2016). Milk protein suspensions enriched with three essential minerals: physicochemical characterization and aggregation induced by a novel enzymatic pool. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 452-459. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.052>
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. y Malcata, F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 437-455. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2566>

- Olivares, M. L., Achkar, N. P. y Zorrilla, S. E. (2016). Rheological behavior of concentrated skim milk dispersions as affected by physicochemical conditions: change in pH and CaCl₂ addition. *Dairy Science & Technology*, 96, 525-538. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0287-0>
- Olivares, M. L., Costabel, L. M., Zorrilla, S. E. y Vicente, J. (2022). Calcium-induced skim milk gels: Effect of milk powder concentration and pH on tribo-rheological characteristics and gel physico-chemical properties. *Food Hydrocolloids*, 124, 107335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107335>
- Ong, J. J., Steele, C. M. y Duizer, L. M. (2018). Challenges to assumptions regarding oral shear rate during oral processing and swallowing based on sensory testing with thickened liquids. *Food Hydrocolloids*, 84, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.043>
- Pérez Jiménez, J. y Saura Calixto, F. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y 491 hortalizas [ponencia]. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología postcosecha y Agroexportaciones. Tecnología, calidad y seguridad hortofrutícola*. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, Colombia. <https://doi.org/10.31428/10317/12259>
- Philippe, M., Gaucheron, F., Le Graet, Y., Michel, F. y Garem, A. (2003). Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83(1), 45-59. <https://doi.org/10.1051/lait:2002049>
- Ramasubramanian, L., D'Arcy, B. R., Deeth, H. C. y Oh, H. E. (2014). The rheological properties of calcium-induced milk gels. *Journal of Food Engineering*, 130, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.020>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Rivera, A. J. (2017). *Propiedades físico-químicas de un postre congelado elaborado con aislado de suero de leche* [Tesis de Doctorado, Universidad de Puerto Rico]. <https://hdl.handle.net/20.500.11801/1552>
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. y Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101(4), 1484-1491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021>
- Tarapata, J., Smoczynski, M., Maciejczyk, M. y Zulewska, J. (2020). Effect of calcium chloride addition on properties of acid-rennet gels. *International Dairy Journal*, 106, 104-707. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104707>
- Tárrega, A., Durán, L. y Costell, E. (2004). Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. *International Dairy Journal*, 14(4), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.12.004>
- Tárrega, A. y Costell, E. (2006). Effect of composition on the rheological behavior and sensory properties of semisolid dairy dessert. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.09.006>
- Vavrusova, M. y Skibsted, L. H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1198-1204. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034>
- Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., Li, Y., Li, J. y Chen, Z. (2018). Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination. *Food Chemistry*, 239, 416-426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.090>
- Wasserman, R. H. (2004). Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. *Journal of Nutrition*, 134(11), 3137-3139. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.3137>
- Ye, R. y Harte, F. (2013). Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 799-805. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5838>