

83/998  
7/6/94-I

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESTUDIO DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS Y DE PROTEÍNAS

SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

Memoria presentada por la licenciada

MARÍA DEL ROSARIO RODRÍGUEZ NIÑO

para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
CENTRO DE ESTUDIOS DE INVESTIGACIONES

VOLUMEN I

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Se declara aprobada esta Tesis Doctoral  
el día 7/8 de noviembre de 1996 del libro  
composición nº 15  
Sevilla, a 28-11-96  
El Jefe del Departamento de Tesis.

Depositado en DPTO. INGENIERIA QUIMICA

de la FDAD. QUIMICA

de esta Universidad donde el día 2/12/96

hasta el día 23/12/96

el día 26 de DICIEMBRE de 1996

Y EN FECHA DE

*Alvaro de la Hoz*

*CA*

## FE DE ERRATAS

En diversos puntos del texto se han detectado las siguientes erratas:

PÁGINA	DICE	DEBE DECIR
108, último párrafo	.... Agua desde un criostato ( <i>Figura 4.4.</i> ) ...	.... Agua desde un criostato ( <i>Figura 4.5.</i> ) ...
111, 1er. párrafo	... intervalo comprendido entre <i>1 y 20</i> $\mu\text{M}$ . ...	... intervalo comprendido entre <i>1 y 100</i> $\mu\text{M}$ . ...
142, Figura 5.6	... (A) 0,01, (B) 0,1 y (C) 1 mol/litro.	... (A) 0,01, (B) 0,1 y (C) <u>1% en peso</u> .
153	<i>Tabla 5.4.</i>	<i>Tabla 5.5.</i>
156, pié de página	El signo del segundo miembro de la ecuación (5.2) es positivo.	
Figuras 5.9 a 5.12	El tiempo representado en el eje de abscisa (como $\theta^{1/2}$ ) se mide en segundos.	
178, 2º párrafo	Con etanol en el medio acuoso ( <i>Figura 5.15, curvas 4, 5 y 6</i> ) .....	Con etanol en el medio acuoso ( <i>Figura 5.15, curvas 2, 3 y 4</i> )...
178, 2º párrafo	....de etanol estudiada (2M, <i>curva 6</i> ).....	....de etanol estudiada (2M, <i>curva 4</i> ).....
180, 1º párrafo	... ( <i>Figura 5.15, curvas 2 y 3</i> ) ...	... ( <i>Figura 5.15, curvas 5 y 6</i> )...
180, 2º párrafo	... ( <i>Figura 5.15, curvas 1, 4, 5 y 6</i> ) ...	... ( <i>Figura 5.15, curvas 1, 2, 3 y 4</i> ).....
196, Figura 6.7	...interfase aire-disolución acuosa de etanol 0,5 M. ...	...interfase aire-disolución <del>acuosa</del> de etanol. ....
199, Figura 6.8	...interfase aire-disoluciones acuosas de sacarosa 0,5 M. ....	...interfase aire-disoluciones acuosas de sacarosa. ....
202, 2º párrafo	.... medio acuoso del 0'1%, en <i>volumen</i> . .....	....medio acuoso del 0'1%, en <i>peso</i> . .....
207, apartado (B)	.... La actividad superficial se <i>reduce</i> .....	.... La actividad superficial <i>aumenta</i> .....
207, apartado (C): (i)	.... y <i>reduciendo</i> la actividad superficial .....	.... y <i>aumentando</i> la actividad superficial .....
220, último párrafo	.... Tensioactivos sobre <i>interfaces</i> .....	.... Tensioactivos sobre <i>interfases</i> .....
237, leyenda de figura 7.2	... 1,64 ( <i>símbolos sólidos</i> ), 8,21 ( <i>símbolos abiertos</i> ) .....	... 1'64 ( <i>símbolos abiertos</i> ), 8'21 ( <i>símbolos sólidos</i> ) .....
250, figura 7.8: A	El símbolo para el módulo dilatacional superficial de películas de monoestearina esparcidas sobre disolución acuosa de sacarosa 0'5 M (función creciente: ■ debe ser: ●).	
257, 2º párrafo	.... Cuando la sacarosa está presente en la <i>interfase</i> . .....	.... Cuando la sacarosa está presente en la <i>subfase</i> . .....
301, figura 7.32: B	símbolo $\nabla$ para $\text{tg } \theta$	símbolo $\diamond$ para $\text{tg } \theta$
312, figura 7.36: B	símbolo $\blacktriangle$ para $\eta\omega$ .	Símbolo $\blacktriangledown$ para $\eta\omega$ .
313, recuadro incluido en la figura 7.37: A	$\eta\theta$	$\eta\omega$
315, figura 7.38: B (módulo dilatacional superficial de monooleína, a los 60 minutos tras el esparcimiento)	Línea superior con símbolos ■	Línea superior con símbolo □
315, figura 7.38: C (película de BSA pura)	Símbolos □ y ■, unidos por las líneas discontinuas.	Símbolos O y ●, unidos por las líneas discontinuas.
320, 2º párrafo	.... En estado estacionario ( <i>Figura 7.41B</i> ) .....	.... En estado estacionario ( <i>Figura 7.40B</i> ) .....
339, 1er. párrafo	.... Los indicados en la <i>tabla 4.5.</i>	.... Los indicados en la <i>tabla 4.6.</i>

342, 2º párrafo	... En las figuras 8.2 y 8.3 se muestran, a título de ejemplo, las fotografías de drenaje obtenidas con películas estabilizadas por BSA (0,1%, en peso), sobre disoluciones acuosas de etanol 1M y de sacarosa 0,5 M, respectivamente. En las figuras 8.4, 8.5 y 8.6 se muestran, a título de ejemplo, las fotografías de la secuencia del drenaje obtenidas con películas estabilizadas por la mezcla de BSA y Tween 20 sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, respectivamente.	... En las figuras 8.2 a 8.6.3 se muestran, a título de ejemplo, las fotografías de drenaje obtenidas con películas estabilizadas por Tween 20, BSA y sus mezclas sobre disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa, según se indica en las tablas 8.1 a 8.3
349, leyenda de figura 8.5.2	.... y Tween 20 (2 $\mu$ M).....	.... y Tween 20 (5 $\mu$ M).....
354, tabla 8.2	Etanol 1 M. BSA: 0,1%, en peso. ... <i>Ver figura 8.2.</i>  Etanol 1 M. BSA: 1.10 <sup>-2</sup> %, en peso.  Sacarosa 0,5 M. BSA: 0,1% en peso... <i>Ver figura 8.3.</i>  Sacarosa 0,5 M. BSA: 1.10 <sup>-2</sup> % en peso...	Etanol 1 M. BSA: 0,1%, en peso. ... <i>Ver figura 8.3.1.</i>  Etanol 1 M. BSA: 1.10 <sup>-2</sup> %, en peso. Incluir en tercera columna: <i>Ver figura 8.3.2.</i>  Sacarosa 0,5 M. BSA: 0,1% en peso... <i>Ver figura 8.4.1.</i>  Sacarosa 0,5 M. BSA: 1.10 <sup>-2</sup> % en peso... Incluir en tercera columna: <i>Ver figura 8.4.2.</i>
355, tabla 8.3	Agua. Tween 20 (10 $\mu$ M). <i>Ver figura 8.4</i>	Agua. Tween 20 (10 $\mu$ M). Eliminar: <i>Ver figura 8.4</i>
362, apartado D)	.... acuosa de etanol 0'5 M es ....	.... acuosa de etanol 1 M es ....
362, apartado F)	..... en la <i>Figura 8.8</i> , .....	..... en la <i>Figura 8.11</i> , .....
370, 1º párrafo	... (tablas 8.1 a 8.3, <i>figuras 8.2 y 8.3</i> ) ...	... (tablas 8.1 a 8.3, <i>figuras 8.3.1, 8.3.2, 8.5.1 y 8.5.2</i> ) ...
370, 2º párrafo	....( <i>figuras 8.2 y 8.5</i> , y tablas 8.2 y 8.3). .....  .... de drenaje ( <i>Figuras 8.2 y 8.5</i> ), a concentraciones de Tween 20 superiores a la ....  .... (tablas 8.2 y 8.5) ...	..... ( <i>figuras 8.3.1, 8.3.2, 8.5.1 y 8.5.2</i> , y tablas 8.2 y 8.3). .....  ... de drenaje ( <i>Figuras 8.5.1 y 8.5.2</i> ), a concentraciones de Tween 20 inferiores a la ....  .... ( <i>tablas 8.2 y 8.3</i> ) ...
371, 1º párrafo	.... de segregación ( <i>Figuras 8.3 y 8.6</i> ) ....	.... de segregación ( <i>Figuras 8.6.1 y 8.6.2</i> ) ....

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESTUDIO DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS Y DE PROTEÍNAS

SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

Memoria presentada por la licenciada

**MARÍA DEL ROSARIO RODRÍGUEZ NIÑO**

para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas



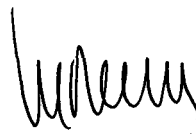
Fdo./ **MARÍA DEL ROSARIO RODRÍGUEZ NIÑO**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESTUDIO DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS Y DE PROTEÍNAS  
SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

Vº Bº el Director,



**Fdo./ Prof.Dr. D. JUAN M. RODRÍGUEZ PATINO**

**Profesor Titular de Ingeniería Química**

**Departamento de Ingeniería Química**

**Universidad de Sevilla**

D. Antonio Roselló Segado, Director del Departamento de Ingeniería  
Química de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

que el trabajo experimental de la Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> María  
del Rosario Rodríguez Niño ha sido realizado en parte en este  
Departamento, dentro del Programa de Doctorado “Ingeniería Química”.

Sevilla, 26 de Noviembre de 1996



Fdo./ Antonio Roselló Segado



**Institute of Food Research**

**Norwich Laboratory**

Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA Tel: 0603 255000 Fax: 0603 507723

13 September 1995

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

This letter is to confirm that Mrs Maria Rosario Rodriguez Nino who arrived on 5th July 1995 is working at the Institute of Food Research within my department and will be with us for 3 months.

Yours sincerely,

Dr David C Clark  
Head of Interfacial Biophysics Group and  
Head : Food Biophysics Department

---

**Institute of Food Research**

---

Norwich Laboratory  
Norwich Research Park,  
Colney, Norwich NR4 7UA  
Tel: 0603 255000 Fax: 0603 507723

Director's Offices  
Earley Gate, Whiteknights Road,  
Reading RG6 2EF  
Tel: 0734 357055 Fax: 0734 267903

Reading Laboratory  
Earley Gate, Whiteknights Road,  
Reading RG6 2EF  
Tel: 0734 357000 Fax: 0734 267917

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que me prestaron apoyo y asesoramiento durante la realización de las experiencias y elaboración de esta Memoria.

Al Prof. D. Juan M. Rodríguez Patino, por su dirección y colaboración.

Al Dr. D. Carlos Gómez Herrera por sus consejos y sugerencias sobre el manuscrito original de esta Memoria.

A los componentes del grupo *Food Biophysics* -- en especial a los Dres. David C. Clark y Peter J. Wilde, a Fiona Husband, Helen Cave y Alan R. Mackie --, así como a la Dirección y a los restantes miembros de Administración y Servicios del AFRC Institute of Food Research, Norwich Laboratory Park, Norwich (Inglaterra), por haberme brindado su amistad y consejos, y permitido realizar en su compañía una parte de la labor experimental de esta Memoria.



A D<sup>a</sup> Nieves Terceño Ordóñez y a D. José M. Álvarez Gómez por sus ayudas.

A los compañeros del grupo de Tecnología de Alimentos y a los del Departamento de Ingeniería Química en general, por la cordialidad y apoyos recibidos en todo momento, durante la realización de este trabajo.

Finalmente, expresar mi agradecimiento por las subvenciones recibidas de la DGICYT (PB93-0923, PB94-1459 y PR95-175).

A todos, muchas gracias.

Sevilla, Diciembre de 1996

**A las personas a quienes quiero  
y con las que siempre cuento.**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	9
2.1. COLOIDES ALIMENTARIOS .....	14
2.2. ESTABILIDAD COLOIDAL .....	18
2.2.1. Fuerzas de interacción entre partículas.	
Teoría DLVO .....	23
2.2.2. Limitaciones de la teoría DLVO .....	29
2.3. FORMACIÓN DE EMULSIONES Y ESPUMAS ALIMENTARIAS .....	31
2.4. ACTIVIDAD SUPERFICIAL .....	34
2.4.1. Tensión superficial e interfacial.....	35
2.4.2. Adsorción desde la disolución .....	36
2.5. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS. BSA .....	39
2.5.1. Estructura de las moléculas de proteína en un medio	
acuoso .....	39
2.5.2. ¿ Por qué las proteínas se adsorben sobre las interfases?.....	45
2.5.3. Configuración y conformación de las proteínas sobre	
las interfases .....	48
2.5.4. La albúmina del suero bovino (BSA).....	53
2.6. EMULSIONANTES DE BAJO PESO MOLECULAR.....	56
2.6.1. Mono y diglicéridos .....	56
2.6.2. Ésteres de sorbitano. Tween 20.....	61
2.6.3. Lecitina y otros fosfolípidos.....	65
2.6.4. Funciones de los agentes emulsionantes .....	67

2.6.5. Formación de películas sobre las interfases .....	67
2.7. INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA .....	77
3. OBJETIVOS .....	81
4. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	87
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS.....	87
4.2. DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES.....	88
4.2.1. Tensiometría.....	88
4.2.1.1. Método de la placa de Wilhelmy .....	90
4.2.1.2. Método de la gota pendiente.....	94
4.2.2. Viscosimetría dilatacional superficial.....	101
4.2.3. Drenaje de películas delgadas.....	107
4.2.4. Difusión superficial en películas delgadas (FRAP).....	111
5. ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	119
5.1. CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA A TIEMPOS PROLONGADOS .....	122
5.1.1. Análisis de resultados .....	122
5.1.1.1. Etapa de difusión hacia la interfase.....	127
5.1.1.2. Etapa de penetración y reordenación interfacial .....	127
5.1.2. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre agua .....	127
5.1.2.1. Efecto de la concentración de proteína .....	130

5.1.2.2. Efecto de la temperatura .....	139
5.1.3. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de etanol a 1 mol/litro.....	141
5.1.4. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de sacarosa a 0.5 mol/litro.....	147
5.1.5. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de etanol a 1 mol/litro y sacarosa a 0.5 mol/litro .....	152
5.2. CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA A TIEMPOS CORTOS.....	155
5.2.1. Difusión de BSA desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase.....	155
5.2.2. Difusión de BSA desde el seno de disoluciones acuosas de etanol.....	160
5.2.3. Difusión de BSA desde el seno de disoluciones acuosas de sacarosa.....	163
5.2.4. Difusión de BSA desde el seno de disolución acuosa de la mezcla etanol 1M y sacarosa 0,5M.....	166
5.3. CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO, EN PRESENCIA DE CONVECCIÓN.....	169
5.4. ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	174
5.4.1. Efecto de la composición del medio acuoso sobre la isoterma de adsorción de BSA.....	178

6. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	181
6.1. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS INSOLUBLES EN CONDICIONES DINÁMICAS.....	185
6.2. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS INSOLUBLES EN EL EQUILIBRIO.....	192
6.2.1. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-agua, en el equilibrio.....	193
6.2.2. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol, en el equilibrio.....	195
6.2.3. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa, en el equilibrio.....	198
6.3. INTERACCIONES DE BSA CON TWEEN 20 EN EL EQUILIBRIO.....	201
6.3.1. Características interfaciales de películas de Tween 20 adsorbidas sobre la interfase aire-medio acuoso.....	203
6.3.2. Interacciones BSA-Tween 20 sobre la interfase aire-medio acuoso.....	216
6.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	219
6.4.1. Interacciones tensioactivo-proteína en disolución.....	219
6.4.2. Interacciones tensioactivo-proteína sobre la interfase.....	220
6.4.3. Influencia del tipo de lípido y de la relación lípido-proteína.....	222
6.4.4. Influencia de la composición del medio acuoso.....	225

7. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE EMULSIONANTES ALIMENTARIOS.....	229
7.1. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS INSOLUBLES (MONOESTEARINA Y MONOOLEÍNA) ESPARCIDOS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	234
7.1.1. Características reológicas de películas de monoestearina esparcidas sobre la interfase aire-medio acuoso.....	235
7.1.1.1. Influencia de la concentración de monoestearina.....	238
7.1.2. Características reológicas de películas de monooleína esparcidas sobre la interfase aire-medio acuoso.....	241
7.1.2.1. Efecto de la concentración de monooleína.....	243
7.1.3. Efecto de la composición del medio acuoso sobre las características reológicas de películas de monoestearina y de monooleína.....	246
7.1.4. Características reológicas de películas mixtas monoestearina-monooleína esparcidas sobre la interfase aire-agua.....	252
7.2. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE UNA PROTEÍNA (BSA) ADSORBIDA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	256
7.2.1. Características reológicas de películas de BSA adsorbidas sobre disolución acuosa de etanol.....	257
7.2.1.1. Propiedades dinámicas superficiales transitorias.....	264
7.2.1.2. Efecto de la concentración de etanol.....	265
7.2.1.3. Efecto de la concentración de BSA.....	267
7.2.2. Características reológicas de películas de BSA adsorbidas sobre disolución acuosa de sacarosa.....	269
7.2.2.1. Propiedades dinámicas superficiales transitorias.....	269

7.2.2.2. Propiedades dilatacionales superficiales.....	273
7.2.3. Adsorción de BSA desde una disolución acuosa de etanol 1M y de sacarosa 0,5 M.....	276
7.3. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS MIXTAS	
LÍPIDO-PROTEÍNA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	278
7.3.1. Características reológicas de películas mixtas BSA- monoestearina sobre la interfase aire-agua.....	279
7.3.1.1. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-agua.....	279
7.3.1.2. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol.....	284
7.3.1.3. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire disolución acuosa de sacarosa.....	292
7.3.1.4. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1M y de sacarosa 0,5 M.....	297
7.3.2. Características reológicas de películas mixtas BSA- monooleína sobre la interfase aire-medio acuoso.....	299
7.3.2.1. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-agua.....	299
7.3.2.2. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol.....	305
7.3.2.3. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire disolución acuosa de sacarosa.....	312
7.3.3. Características reológicas de películas mixtas BSA- Tween 20 sobre la interfase aire-medio acuoso.....	316
7.3.3.1. Propiedades dinámicas superficiales transitorias.....	316



7.3.3.2. Propiedades reológicas dilatacionales	
superficiales.....	326
7.3.3.3. Efecto de la concentración de Tween 20.....	327
8. DRENAJE Y DIFUSIÓN SUPERFICIAL EN PELÍCULAS	
DELGADAS DE BSA Y DE TWEEN 20 SOBRE LA	
INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.....	335
8.1 DRENAJE EN PELÍCULAS DE BSA Y DE TWEEN 20.....	339
8.2. DIFUSIÓN SUPERFICIAL EN PELÍCULAS DE BSA Y DE TWEEN 20.....	357
8.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	365
8.3.1. Películas delgadas estabilizadas por Tween 20.....	367
8.3.2. Películas delgadas estabilizadas por BSA.....	368
8.3.3. Películas delgadas estabilizadas por la mezcla de	
BSA y Tween 20.....	368
8.3.4. Efecto de la composición del medio acuoso.....	369
9. CONSIDERACIONES FINALES .....	373
9.1. ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO	
ACUOSO.....	376
9.2. INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA.....	381
9.3. MECANISMOS DE ESTABILIDAD DE PELÍCULAS DELGADAS.....	389
10. CONCLUSIONES .....	393
11. BIBLIOGRAFÍA .....	401

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN.

Muchos alimentos son dispersiones complejas tales como emulsiones y espumas. El principal problema de estos sistemas es su inestabilidad. En ausencia de un emulsionante las emulsiones y espumas colapsan con el tiempo, dando como resultado una separación de las fases. Por esta razón, las emulsiones y espumas alimentarias contienen proteínas y tensioactivos de bajo peso molecular (lípidos) como emulsionantes. Individualmente, los emulsionantes pueden producir dispersiones estables, pero los alimentos contienen mezclas de ambos tipos de emulsionantes.

Los tensioactivos, debido a su carácter anfifílico, es decir, debido a su afinidad por las fases oleosa y acuosa, se adsorben y orientan en las interfases fluido-fluido con el grupo hidrofóbico orientado hacia la fase oleosa (en emulsiones) o hacia el aire (en las espumas), y el grupo hidrófilo orientado hacia la fase acuosa. Esta ordenación molecular del tensioactivo en la interfase reduce la tensión interfacial entre las fases y estabiliza las emulsiones y espumas.

Las proteínas, al ser de carácter anfifílico, actúan como tensioactivos macromoleculares en la interfase. Estas macromoléculas, además de reducir la tensión interfacial, pueden formar una película continua en la interfase por medio de complejas interacciones intermoleculares, comunicándole una deseable rigidez estructural a la interfase. El desarrollo de esta película interfacial, con elevada resistencia mecánica, puede no ser factible en el caso de tensioactivos de bajo peso molecular debido a que las interacciones intermoleculares son más débiles.

El conocimiento de cómo los diferentes emulsionantes interaccionan en las interfases aceite-agua o aire-agua, y de como se comportan bajo diferentes condiciones es de considerable interés práctico. Desde un punto de vista cuantitativo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos de las interacciones moleculares lípido-proteína en la interfase. Las propiedades superficiales de los complejos lípido-proteína -- tales como características estructurales, estabilidad y propiedades mecánicas y dinámicas de la película -- dependen de los mecanismos de interacción. Los cambios de conformación de las moléculas de proteínas, causados por la formación de complejos con los lípidos, afectan a la estructura y a la capacidad de formación de la película adsorbida alrededor de las gotitas de aceite o burbujas, que son importantes factores en la formación y estabilidad de emulsiones y espumas alimentarias.

Los objetivos del trabajo se han centrado en el estudio de las características dinámicas y estáticas de formación de una película de proteína (BSA) y de las interacciones lípido-proteína sobre la interfase entre el aire y un medio acuoso. Se ha analizado el comportamiento de lípidos soluble (Tween 20) e insolubles (monoestearina y monooleína) en agua. Como medios acuosos se han usado disoluciones acuosas de etanol, sacarosa y electrólitos, que simulan formulaciones alimentarias. La temperatura, la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa (entre  $10^{-4}\%$  y  $1\%$ , en peso), la concentración de lípido en el seno de la fase acuosa, o esparcido sobre la interfase, la relación lípido-proteína y la composición de la fase acuosa, han sido las variables estudiadas.

La cinética de adsorción de la proteína y sus interacciones con los lípidos soluble (Tween 20) e insolubles (monoestearina y monooleína) en agua, sobre la interfase aire-medio acuoso, se ha determinado a partir de la medida de la tensión superficial en función del tiempo de adsorción, así como su valor en estado

estacionario. Se ha usado el método de la placa de Wilhelmy, para la medida de las propiedades superficiales dinámicas (a tiempos prolongados de adsorción) y estáticas. Para el estudio de la etapa inicial de difusión de la proteína hacia la interfase que, dependiendo de las condiciones de operación, puede ser la controlante del proceso, se ha utilizado el método de la gota pendiente.

La existencia de interacciones lípido-lípido, proteína-proteína o lípido-proteína sobre la interfase puede tener repercusiones sobre las propiedades reológicas de la película. Es decir, las características reológicas superficiales de películas de lípidos, proteínas o de sus mezclas, pueden ser muy sensibles a la existencia de interacciones entre tales emulsionantes. El estudio de las características reológicas de las películas de los emulsionantes puros y de sus mezclas, en condiciones de dilatación-compresión -- módulo dilatacional superficial, componentes elásticas y viscosas y tangente del ángulo de pérdida -- se ha realizado a partir de los datos obtenidos en una balanza de superficie especial, que utiliza el método de amortiguación de una onda superficial.

La coalescencia; es decir, la rotura de la película interfacial que rodea a las gotitas o burbujas en una emulsión o espuma, respectivamente, depende, no solo de las características estructurales de la película interfacial, sino también del movimiento relativo de las distintas especies que forman la película interfacial, si bien ambos fenómenos están interrelacionados. El movimiento relativo de las moléculas de emulsionantes que forman la película interfacial (lípidos y proteínas) se ha determinado cualitativamente -- a partir de experiencias de drenaje en películas delgadas, mediante microscopía con epi-iluminación -- y cuantitativamente -- a partir de la determinación del coeficiente de difusión superficial, mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP).

Del análisis y discusión de los datos experimentales se concluye que:

(A) La velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua (A/W) se incrementa con la concentración de BSA en la fase acuosa y con la temperatura. Con etanol en la subfase se observa la existencia de un período de inducción que se atribuye a la existencia de interacciones BSA-etanol en la interfase y en el seno de la fase. La velocidad de adsorción de BSA se incrementa en presencia de sacarosa en la subfase.

(B) La existencia de interacciones lípido-proteína, confirmada a partir de las experiencias de tensiometría en condiciones dinámicas y en estado estacionario, depende de la concentración relativa lípido-proteína y de la composición del medio acuoso. En general, las características interfaciales de las películas mixtas están dominadas por la especie de mayor actividad superficial.

(C) Las películas de lípidos, BSA y de sus mezclas, sobre los medios acuosos estudiados, presentan un comportamiento reológico viscoelástico, prácticamente elástico. El valor del módulo dilatacional superficial depende fundamentalmente del tipo de emulsionante o emulsionantes, de su concentración sobre la interfase y de la composición del medio acuoso.

(D) El drenaje<sup>1</sup> de películas delgadas estabilizadas por lípidos es caótico y rápido, en contraste con lo que se observa con moléculas de proteínas adsorbidas. El comportamiento de drenaje de sistemas que contienen lípidos y proteínas es intermedio entre los citados anteriormente. Esto es debido a que las moléculas de lípido pueden reducir las interacciones proteína-proteína y prevenir la formación de una película

---

<sup>1</sup> En esta Memoria se define el drenaje como el proceso mediante el cual el líquido contenido entre dos películas horizontales de sustancias superficialmente activas fluye, desde el centro hasta los alrededores, por la succión ejercida por los bordes de *Plateau*, debida a fuerzas de capilaridad.

viscoelástica, como se confirma a partir de las experiencias reológicas. Las características de drenaje de películas delgadas dependen también de la composición de del medio acuoso. A partir de estos resultados se proponen dos mecanismos de estabilidad de películas delgadas que dependen de la especie que predomina sobre la interfase, el lípido o la proteína.

(E) A partir de las experiencias de difusión superficial se ha podido establecer que las películas estabilizadas por lípidos poseen una gran movilidad superficial, en contraste con las películas estabilizadas por proteínas que, debido a sus características viscoelásticas, poseen un coeficiente de difusión superficial prácticamente nulo. Los datos de difusión superficial en películas estabilizadas por mezclas lípido-proteína permiten deducir una relación superficial crítica de ambos emulsionantes que delimita las características de la película y su estabilidad. Esta relación crítica superficial de ambos emulsionantes, depende, de nuevo, de la composición del medio acuoso.

## **2. ANTECEDENTES**



## 2. ANTECEDENTES.

El desarrollo de la Ciencia de la Tecnología de Alimentos durante las últimas décadas está íntimamente relacionada con el uso de agentes de superficie, o tensioactivos, especialmente en el amplio campo de aplicación de las emulsiones y espumas alimentarias. En efecto, uno de los usos más importantes a considerar para los tensioactivos dentro del sector industrial, debido principalmente a sus propiedades emulsionantes y espumantes, es en la industria de la alimentación (Larsson y Friberg, 1990; Als y Krog, 1991; El-Nokai y Cornell, 1991; Sjöblom, 1992; Krog, 1992; Dickinson y Walstra, 1993). Las emulsiones y espumas constituyen un grupo de productos industriales cuyo volumen de producción se ha incrementado enormemente en los últimos años. A la cabeza del grupo se encuentran las emulsiones y espumas alimentarias seguida de los cosméticos. Aunque los términos emulsión y espuma no son sinónimos, en el contexto en el que se usan en esta Memoria, pueden utilizarse indistintamente.

El uso de emulsionantes naturales en la industria de la alimentación es muy antiguo. De hecho, los emulsionantes están presentes en muchos de los productos básicos naturales usados en la alimentación, tales como huevo, leche, mantequilla, etc. Es un hecho interesante que la primera emulsión alimentaria que el hombre encuentra en su vida es probablemente también la más antigua. Se hace referencia concretamente a la leche. La vida de los mamíferos comenzó varios millardos de años después del Big Bang (de la gran explosión), probablemente hace del orden de unos 100 millones de años. Y con los mamíferos llegó la leche. En la tabla 2.1 se representa una corta (y obviamente abreviada) historia de las emulsiones alimentarias. La manufactura de productos alimentarios basados en una emulsión, a escala industrial, data de hace

aproximadamente un siglo. Comienza con la producción de margarina en 1870, seguida con la comercialización, a principios de este siglo, de grasas y aceites hidrogenados (Leadbeter, 1990; Krog, 1992; Dickinson, 1992).

**Tabla 2.1.** Breve historia de las emulsiones alimentarias y de su estudio.

ALIMENTO	FECHA DE INTRODUCCIÓN
Leche de mamífero	2.4×10 <sup>6</sup> a.C.
Leche procedente de animales/mantequilla/queso	8500 a.C.
Cremas	S. XVI-XVII
Helado	1740
Mayonesa	1845
Margarina	1869
Emulsión	S. XVII
Clasificación de emulsiones (Wolfgang Ostwald)	1910
Teoría de la estabilidad coloidal (DLVO)	1948
Microemulsión (Schulman y Montagne)	1961

A pesar de su larga historia, el estudio científico de las emulsiones en general, y de las emulsiones alimentarias en particular, es un fenómeno relativamente reciente. La palabra EMULSIÓN data desde los primeros años del siglo XVII, aunque no

precisamente con la connotación actual. Sin embargo, la investigación científica en este campo no posee más de un siglo de antigüedad. Por ejemplo, la clasificación de las emulsiones como de aceite en agua o de agua en aceite data desde la publicación de Wolfgang Ostwald en 1910. Sería más correcto decir que las primeras bases teóricas sobre las emulsiones no existían hasta que, después de la Segunda Guerra Mundial, se desarrolló la teoría de la doble capa eléctrica, o teoría DLVO como se conoce, en honor a los cuatro investigadores que la desarrollaron. Incluso más recientemente, desde luego, es el concepto de microemulsión que data del trabajo de Schulman y Montagne en los Anales de la Academia de Ciencia de Nueva York en 1961. El primer Congreso Mundial sobre emulsiones se celebró en París en el año 1993.

La producción moderna de productos alimentarios es una consecuencia de los cambios del estilo de vida que han tenido lugar durante este siglo. Al comienzo del siglo XIX todos los alimentos eran preparados en casas individuales usando a menudo materias primas derivadas de la agricultura practicada a nivel familiar. La industrialización de nuestra sociedad ha creado una demanda de productos elaborados. En la actualidad es muy frecuente realizar al menos una comida al día fuera de nuestra casa. El consumo de productos semi-elaborados, "snacks" (piscolabis), etc. se ha incrementado debido a lógicas conveniencias. Con el progreso en la tecnología alimentaria y el uso de sistemas modernos de transporte y almacenamiento, hoy los alimentos pueden producirse a gran escala y distribuirse a través de grandes distancias hasta el consumidor, en el espacio de días o incluso de horas. Los requerimientos del consumidor también han cambiado. El alimento no es considerado solo como una fuente de energía para ser usada en la supervivencia diaria. En la actualidad, los aspectos nutricionales relacionados con la salud, junto a la variedad y seguridad son factores de gran importancia (Krog, 1990; El-Nokaly y Cornell, 1991; Becher, 1991).

La creciente demanda de productos con bajo contenido en grasa y la de alimentos instantáneos han proporcionado una gran demanda de emulsionantes alimentarios. Las recomendaciones nutricionales, dietéticas y sanitarias han inducido en el consumidor la necesidad de reducir los niveles de consumo de grasas en los alimentos. La reducción de grasa puede conseguirse mediante el uso de pequeños niveles de emulsionantes, sin cambiar la textura y consistencia del producto (Als y Krog, 1991).

La producción moderna de alimentos a escala industrial requiere una avanzada tecnología, incluyendo sustancias que ayuden al procesado tales como emulsionantes, estabilizadores, etc. Por lo tanto, la producción industrial de alimentos ha creado una gran demanda de estos aditivos. La función de estos ingredientes menores en los alimentos es facilitar la producción a gran escala y netamente automatizada de productos uniformes, con una vida media adecuada a las necesidades de uso, y que pueda soportar el transporte y almacenamiento, hasta que su consumo tenga lugar.

## 2.1. COLOIDES ALIMENTARIOS.

Cualquier alimento es un complejo sistema multicomponente y multifásico. Se pueden distinguir dos tipos de entidades: partículas y macromoléculas (Dickinson, 1987a, 1987b, 1988, 1992).

\* Las partículas pueden ser esféricas (burbujas de gas, gotitas de agua o aceite) o aproximadamente esféricas (glóbulos de grasa, gránulos de proteína o almidón). Pueden encontrarse en un amplio intervalo de tamaños: desde nanómetros (micelas de tensioactivo), a micrómetros (gotitas de emulsión) hasta milímetros (burbujas de espumas). Pueden existir partículas como entidades dispersas aisladas, o pueden estar aglomeradas juntas para formar agregados de varias formas, tamaños o estructuras. Las partículas no esféricas pueden ser de forma de aguja o de casi platos (cristales de hielo, grasa o azúcar), fibrosas o como hojas (filamentos, membranas), o esferas deformadas (gotitas, burbujas) distorsionadas por fuerzas mecánicas o por una alta densidad de empaquetamiento.

\* Las macromoléculas alimentarias pueden ser compactas y altamente organizadas (proteínas globulares), o como cadenas y desorganizadas (muchos polisacáridos y proteínas desnaturalizadas). El peso molecular varía entre decenas de miles de daltons (muchas proteínas) y varios millones de daltons (muchos polisacáridos). Los agregados de macromoléculas o partículas pueden ser tan grandes que se extiendan hasta dimensiones macroscópicas, produciéndose de este modo una especie de gel. Las macromoléculas (especialmente proteínas) pueden adsorberse sobre la superficie de partículas sólidas, gotitas o burbujas, o pueden producir enlaces entre estas entidades contribuyendo al estado de agregación de las partículas.

Una clasificación de los coloides alimentarios es complicada porque la mayoría de ellos son coloides múltiples complejos. El helado, por ejemplo, es una emulsión, una espuma, una suspensión, y posiblemente también un gel, ya que contiene gotitas de grasa, células de aire, cristales de hielo, todo disperso en una fase acuosa continua, y agregado en el interior de una matriz semisólida congelada con una estructura cremosa. La mayor parte de los coloides alimentarios son básicamente emulsiones, aunque otras fases dispersas (especialmente aire) pueden introducirse en el interior de la emulsión en una etapa posterior del proceso de fabricación. Incluso algunas emulsiones aparentemente simples de aceite en agua, como la leche homogeneizada o la mayonesa, contienen también partículas de proteína dispersas en la fase acuosa. En la tabla 2.2 se incluyen algunos ejemplos de emulsiones alimentarias, en cuya formulación se incluyen lípidos y proteínas, como las que se tratan en este estudio (Dickinson, 1987a, 1988, Charalambous y Doxastakis, 1989; Kinsella, 1976, 1978, 1984; Krog et al., 1985; Larsson y Friberg, 1990; Leadbeter, 1990).

Aunque el objetivo del tecnólogo de alimentos debe dirigirse a producir coloides alimentarios estables, la atención debe estar también encaminada para conseguir otras propiedades esenciales de naturaleza química, física, microbiológica, nutricional u organoléptica, sin dejar de lado su inocuidad.

La fracción en volumen de la fase dispersa puede mantenerse baja por razones de economía (emulsiones de condimentos, con sabores a, etc.), de carácter nutricional (postres con bajo contenido en grasas) o, por el contrario, alta para controlar la textura (mayonesa) o satisfacer limitaciones legislativas (cremas). Los alimentos emulsionados

**Tabla 2.2.** Ejemplos de emulsiones alimentarias.

EMULSIÓN	FASE DISPERSA	FASE CONTINUA	FACTORES DE ESTABILIZACIÓN
<i>Helado (O/W)</i>	Grasa de mantequilla o vegetal parcialmente cristalizada	Agua y cristales de hielo. Proteínas de leche. Carbohidratos	Glóbulos de grasa aglomerados formando células de aire. Mono y diglicéridos
<i>Sustituto de nata (O/W)</i>	Aceites vegetales y grasas	Disolución acuosa de caseína, sacarosa, sales e hidrocoloides	Película de proteína adsorbida. Tras aireación, glóbulos de grasa aglomerados. Monoglicéridos y ésteres de poliglicerol
<i>Blanqueadores de café (O/W)</i>	Aceites vegetales y grasas	Disolución acuosa de proteínas, sales, carbohidratos e hidrocoloides	Tensioactivos aniónicos y no iónicos. Proteínas adsorbidas
<i>Margarina (W/O)</i>	Fase acuosa con leche, sales, sabores	Grasas y aceites parcialmente hidrogenados	Gotas de agua fijas en una matriz semisólida de cristales de grasa. Mono y diglicéridos y ésteres de sorbitano
<i>Mayonesa (O/W)</i>	Aceite vegetal	Disolución acuosa de yema de huevo, sales, etc.	Proteínas de la yema de huevo y fosfátidos
<i>Salsas de ensalada (O/W)</i>	Aceite vegetal	Disolución acuosa de yema de huevo, fécula, alifios, etc.	Proteínas de yema de huevo. Hidrocoloides. Tensioactivos
<i>Masas de panadería y bollería (O/W)</i>	Partículas semisólidas de grasa	Medio acuoso de composición compleja	Mono y diglicéridos

tipo agua en aceite (margarina, productos de cubrimiento) han de poseer una textura específica y un comportamiento de flujo determinado después de su almacenamiento en el refrigerador. La fase acuosa puede contener una alta salinidad (emulsiones de carne), un bajo pH (jugos de frutas), o un alto contenido de alcohol (licores crema).

Algunas emulsiones alimentarias pueden contener otras fases dispersas presentes, tales como partículas de proteínas (leche homogeneizada), gránulos de almidón (pasteles de mantequilla), o burbujas de aire (batidos de cubrimiento). Finalmente, pueden existir requerimientos extras para el producto: turbidez controlada (bebidas no alcohólicas), la formación de una espuma sobre la dispersión (cerveza), la capacidad de resistir temperaturas extremas, bajas (helados), o altas (salsas de carne, cremas). Por lo tanto, en muchos casos ha de lograrse un compromiso entre la estabilidad coloidal del producto y sus otras propiedades esenciales (Dickinson, 1992).



## **2.2. ESTABILIDAD COLOIDAL.**

Se dice que un coloide es estable si, sobre un cierto período de tiempo, existe poca tendencia a la agregación o sedimentación de las partículas.

En muchos sistemas coloidales, un estado termodinámicamente estable solo es idealmente alcanzable cuando las partículas o gotitas están formando una única estructura homogénea de fase dispersa. Por lo tanto, cualquier estabilidad aparente del sistema debe ser considerada como un fenómeno puramente cinético. Un coloide no puede formarse espontáneamente y cuando se forma es termodinámicamente inestable, o al menos metaestable. Pero, si la velocidad de cambio es lo suficientemente lenta, sobre la escala de tiempo de interés, se puede decir que el coloide es estable. Sin embargo, el significado del término en la práctica es más bien difuso y deberá ir siempre acompañado por la descripción de la naturaleza de la estabilidad.

La estabilidad, en resumen, es un concepto cinético y no termodinámico. En este sentido, la escala de tiempo de utilización del alimento es fundamental para definir la estabilidad del mismo. Por ejemplo:

- \* algunas emulsiones alimentarias, tales como las salsas y cremas cocinadas necesitan solamente un corto período de vida, mientras que otras, tales como los licores crema (licores irlandeses) deben permanecer estables durante años. Igual puede decirse del helado y de la mayonesa.
  
- \* Las espumas, sin embargo, necesitan un período de estabilidad menor que las emulsiones alimentarias. La estabilidad de las espumas del champaña es de

varios segundos, mientras que para una buena cerveza es suficiente una estabilidad de minutos.

Uno de los objetivos, por lo tanto, del tecnólogo de alimentos es controlar la velocidad del proceso que promueve la inestabilidad, una vez conocido el mecanismo o mecanismos que la originan (Cheftel et al., 1989; Darling, 1987; Dickinson, 1987; Dobias, 1993; Halling, 1981; Kinsella y Witehead, 1989; Larsson y Friberg, 1990; Leadbeter, 1990; Paquin y Dickinson, 1990; Wan, 1990).

La agregación es el proceso mediante el cual dos o más partículas coloidales se unen mediante fuerzas de origen y magnitud inespecificadas. Cuando la estructura del agregado o la naturaleza del proceso de agregación es razonablemente clara se usan los siguientes términos (figura 2.1).

- \* **Coagulación** (del latín "cogere": caminar juntos): formación de agregados rígidos.
- \* **Floculación** (del latín "floccus": mechón de lana): formación de agregados débiles.

Los agregados producidos por coagulación poseen distancia entre partículas del orden de las dimensiones atómicas, mientras que las partículas floculadas poseen una estructura más suelta. Las fuerzas entre las partículas coaguladas son fuertes, mientras que en los agregados floculados (flóculo) son débiles. El proceso de floculación se considera normalmente como reversible (puede transformarse en un sistema disperso estable por agitación). La coagulación conduce a una separación irreversible de un coágulo. Las palabras reversible e irreversible se usan aquí con su significado termodinámico. Bajo circunstancias favorables (especialmente con

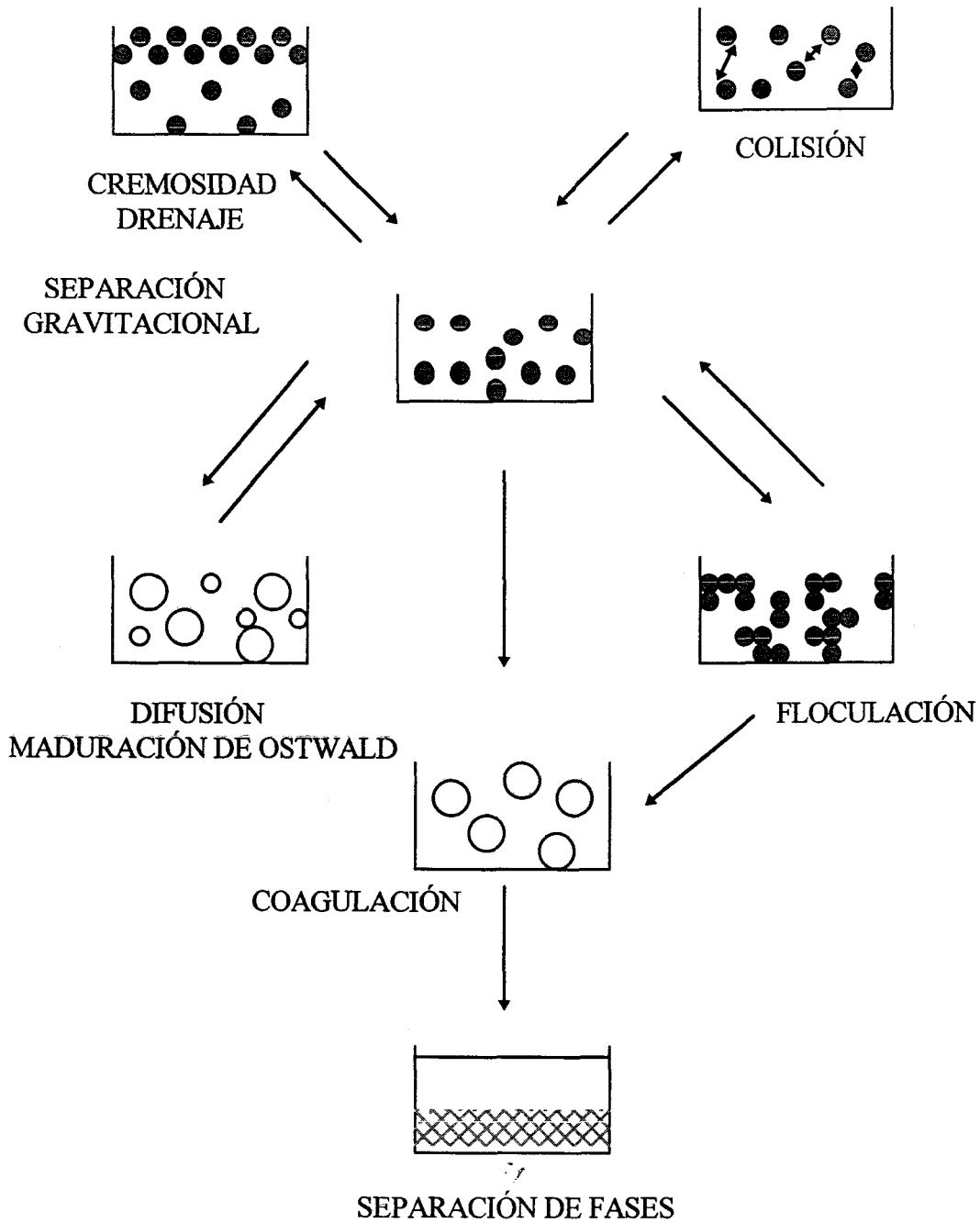


Figura 2.1. Representación esquemática de los mecanismos de desestabilización de sistemas dispersos (emulsiones y espumas).

suspensiones) tanto la floculación como la coagulación pueden cambiarse por los correspondientes procesos en la dirección opuesta. Estos procesos se denominan, respectivamente, defloculación y peptización.

En las emulsiones y espumas de interés alimentario la existencia de coagulación dará lugar a una separación irreversible del sistema. Es decir, la existencia de un grado significativo de coagulación en el sistema es incompatible con la aceptabilidad del producto, como una emulsión o espuma.

La manifestación más evidente de inestabilidad coloidal es la agregación de partículas, gotitas, o burbujas bajo la acción de la gravedad: **sedimentación o cremosidad**, dependiendo de que la fase dispersa se mueva hacia abajo o hacia arriba.

La velocidad depende del tamaño de la partícula que sedimenta y de la diferencia de densidades de las fases. Un **sedimento** es la suspensión concentrada formada por sedimentación de una suspensión diluida, y una **crema** es la emulsión concentrada formada por la cremosidad de una emulsión diluida de aceite en agua (o/w). La agregación de una emulsión de agua en aceite (w/o) se denomina cremosidad, por unos autores, o sedimentación, por otros. Algunos autores restringen el uso del término cremosidad a las emulsiones solamente (no a las espumas). Una crema puede estar floculada o ser coloidalmente estable, pero la fase dispersa no deberá poseer una extensión significativa de coalescencia<sup>1</sup>. Si la coalescencia es intensa, conduce a la formación de una macrofase, y se dice que la emulsión se rompe. En este

---

<sup>1</sup> La *coagulación* es el proceso de agregación mediante el cual dos o más partículas coloidales se unen para formar agregados rígidos. Según la convención de La Mer (Dickinson, 1992), los agregados producidos por coagulación poseen distancia entre partículas del orden de las dimensiones atómicas. La *coalescencia* es el resultado del proceso de coagulación.

caso la estabilidad termodinámica se alcanza cuando todas las gotitas de la emulsión han coalescido formando dos regiones homogéneas de aceite y agua.

Además de los procesos primarios de inestabilidad citados (cremosidad o decantación, floculación y coalescencia) se puede citar un proceso compuesto, denominado **inversión de fase**, que puede ser de importancia en el caso de emulsiones con un elevado volumen de fase dispersa. Es un proceso según el cual una emulsión de aceite en agua (o/w) se transforma en otra de agua en aceite (w/o), o viceversa. Esta transformación puede producirse por un cambio de temperatura, de concentración de la fase dispersa, etc. La inversión de fase puede buscarse durante la fabricación de la emulsión (para ahorrar energía) o durante su consumo (para realzar sabores en la boca) (Dickinson, 1992; Lehnert et al., 1994).

La cremosidad y la floculación casi siempre ocurren a un nivel limitado en casi todos los alimentos. Son tolerados por el consumidor hasta un determinado nivel, ya que son procesos generalmente reversibles. Se puede volver a la situación inicial con una simple agitación del producto. Por el contrario, la coalescencia asociada a la salida de grasa desde una emulsión de aceite en agua, es normalmente inaceptable a cualquier nivel.

En las espumas, el drenaje de la fase continua procedente de la película líquida que rodea a las burbujas gaseosas es la manifestación más evidente de la existencia de floculación y coalescencia en el proceso (Bikerman, 1973; Cheftel et al., 1989; Halling, 1981; Wan, 1990).

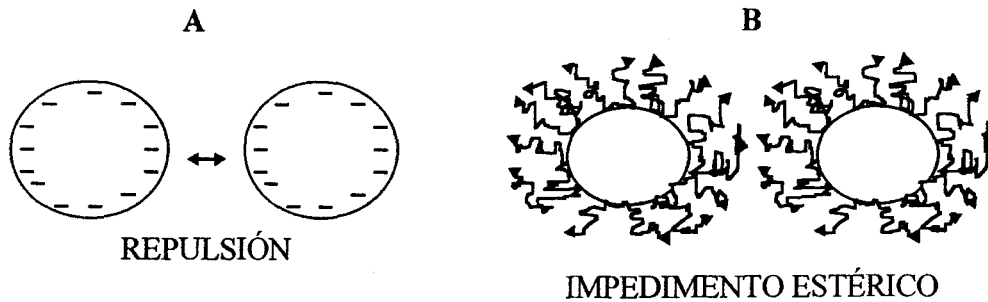
Una causa adicional (importante) de inestabilidad en las espumas es la **difusión** ("*disproportionation*"): crecimiento de las burbujas de mayor tamaño a expensas de las

pequeñas, por la difusión del gas entre ellas. El proceso equivalente en emulsiones se denomina **maduración de Ostwal** ("*Ostwal ripening*"): crecimiento de las gotitas mayores a expensas de las pequeñas, por el transporte del material de la fase dispersa soluble a través de la fase continua. En la mayoría de las emulsiones alimentarias esta causa de inestabilidad carece de importancia, debido a la baja solubilidad de los triglicéridos (fase oleosa) en agua.

### 2.2.1. Fuerzas de interacción entre partículas. Teoría DLVO.

La estabilidad de una dispersión coloidal puede ser analizada desde un punto de vista energético, según el cual, las partículas coloidales en un medio disperso están siempre sometidas al movimiento browniano, produciéndose colisiones frecuentes entre partículas. La estabilidad del sistema estaría, pues, determinada por el resultado de las interacciones entre partículas durante tales colisiones. Estas interacciones serán básicamente de dos tipos: atractivas y repulsivas. Cuando domina la atracción, las partículas pueden adherirse y la dispersión tiende a flocular o a coalescer. Cuando domina la repulsión, el sistema puede permanecer en estado de dispersión estable (Charalambous y Doxastakis, 1989; Dickinson, 1992; Dobias, 1993; Tadros y Vincent, 1983; Walstra, 1987).

En una dispersión de partículas de similar composición, las fuerzas atractivas de van der Waals están siempre presentes. Por lo tanto, una dispersión será estable únicamente cuando una fuerza repulsiva contrarreste la atracción de van der Waals. La repulsión entre partículas puede lograrse por varios caminos:



**Figura 2.2.** *Mecanismos de estabilización de una emulsión: (A) estabilización eléctrica, por repulsión de las capas eléctricas superficiales, (B) Estabilización estérica, por las moléculas de polímeros adsorbidos.*

- \* La repulsión puede producirse por interacción entre las dobles capas eléctricas (o cargas superficiales) adsorbidas sobre las partículas.
  
- \* La repulsión puede originarse por interacción entre capas adsorbidas de materiales no iónicos, generalmente polímeros, incluyendo las moléculas adsorbidas desde el medio de dispersión.

Los dos mecanismos básicos que son fundamentales para lograr la estabilidad de una dispersión coloidal se suelen denominar:

- \* **Estabilización eléctrica** o estabilización clásica.
  
- \* **Estabilización estérica**, que utiliza el efecto de moléculas de polímeros.

En determinados sistemas coloidales se utiliza una combinación de los dos métodos citados. En este caso se denomina **estabilización electro-estérica**. Este procedimiento se usa con frecuencia para estabilizar coloides alimentarios. Se han propuesto otros métodos de estabilización de dispersiones coloidales; por ejemplo: uso de efectos de solvatación, efecto hidrofóbico, etc. Pero estos fenómenos, si existen, no se han podido emplear prácticamente.

Para discutir la inestabilidad de coloides alimentarios (principalmente emulsiones) por coagulación y, especialmente, por floculación, es muy conveniente el conocimiento de la naturaleza de las fuerzas que son causa de que las partículas estén juntas o dispersas en el sistema. En este apartado se tratarán los principales aspectos de la estabilización electrostática y estérica.

Una teoría que relaciona la carga superficial de la partícula con la estabilidad de la dispersión fue establecida por Derjaguin y Landau (1941), de la Unión Soviética, y por Verwey y Overbeek (1948), de Holanda. Ambas teorías están basadas esencialmente en la misma idea y, como consecuencia, se conoce como **teoría DLVO**.

La teoría DLVO constituye las bases de la teoría coloidal de la estabilización clásica, a partir de cargas superficiales. De acuerdo con la teoría, la estabilidad de una dispersión está determinada por un balance entre la energía atractiva de van der Waals y la repulsiva de carácter eléctrico. La energía potencial total,  $V_T$ , entre las partículas es:

$$V_T = V_A + V_R \quad (2.1)$$



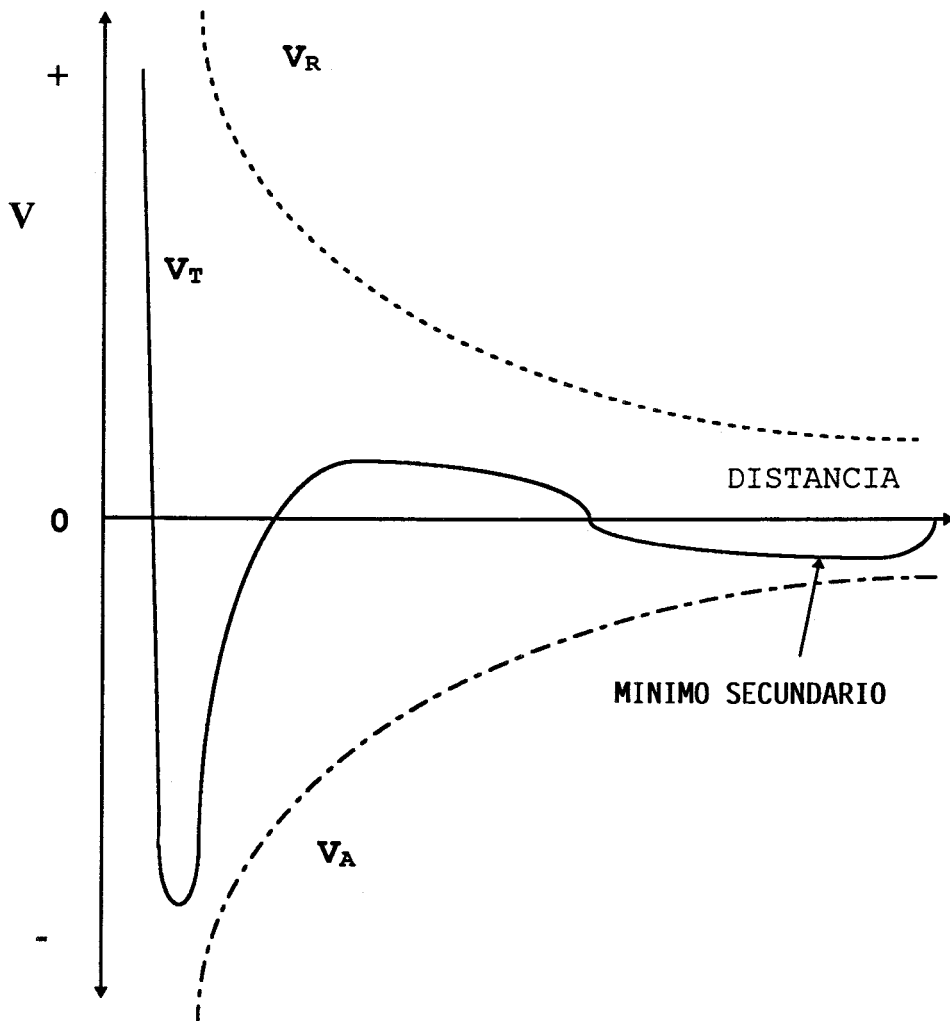
En la figura 2.2-bis se representa la variación de estas tres energías en función de la distancia de separación entre las partículas. Las consecuencias que se deducen de esta representación se resumen a continuación:

- \* La curva  $V_T$  pasa por un máximo ( $V_{m\acute{a}x}$ ), que puede asociarse con la existencia de una barrera de energía frente a la asociación de las partículas.
- \* Cuando las partículas se aproximan a distancias inferiores a la correspondiente a  $V_{m\acute{a}x}$ , la curva de energía potencial total desciende bruscamente hacia la presencia de un **mínimo primario**. En esta situación la inestabilidad del sistema es máxima, debido a la **coalescencia** de las partículas de la dispersión.
- \* A distancias mayores puede observarse la existencia de un **mínimo secundario**. Esta situación se relacionaría también con una inestabilidad del sistema. Pero a diferencia del anterior, en el mínimo secundario se produciría una asociación reversible de las partículas, que se identificaría con un proceso de **floculación**.

Las partículas de una dispersión pueden poseer, en general, una energía térmica media del orden de  $kT$ . Por lo tanto si  $V_{m\acute{a}x} \gg kT$ , existirán pocas partículas en contacto, permaneciendo la mayoría de estas dispersas en el medio.

De acuerdo con la Teoría DLVO una barrera energética del orden de 15  $kT$  es suficiente para que el sistema disperso sea estable. Sin embargo, en un sistema real las partículas poseerán una distribución de energía potencial. Por lo tanto, aunque la barrera de energía potencial sea tan alta como 15  $kT$ , es esperable que alguna

proporción de partículas posea la suficiente energía como para superar esta barrera y asociarse (coalescer).



**Figura 2.2-bis.** Variación de las energías atractiva de van der Waals ( $V_A$ ), de la repulsiva de carácter eléctrico ( $V_R$ ) y la total ( $V_T$ ), con la distancia de separación entre las partículas.

$V_{max} \gg kT$ : SISTEMA ESTABLE

$V_{max} < kT$ : COALESCENCIA

Según la Teoría DLVO la magnitud de la barrera de energía potencial depende de las dimensiones de la partícula y de su potencial superficial (ver Fig. 2.2-bis). Con partículas grandes, la curva  $V_T$  puede desarrollar un mínimo secundario. Si ese mínimo es de intensidad varias veces  $kT$ , se puede superar el efecto del movimiento browniano y conducir a una floculación en el sistema. El carácter de esta asociación es muy diferente de la que tiene lugar en el mínimo primario, ya que el flóculo es fácilmente redispersable por agitación. Este tipo de floculación no suele ser un problema en la aceptación de un sistema disperso.

Con respecto a la asociación por coagulación en el mínimo primario, puede sugerirse dos acciones para prevenir esta inestabilidad:

- \* Incrementar la barrera de energía potencial:  $V_{m\acute{a}x}$
- \* Prevenir que las partículas se aproximen unas a otras hasta una distancia a la que las fuerzas atractivas sean significativas, por ejemplo, disminuyendo la concentración de la fase dispersa.

La primera condición puede alcanzarse, en la práctica, por la formación de una barrera física alrededor de las partículas, mediante una capa de material adsorbido de carácter no iónico. Esta barrera física se conoce como **efecto estérico** o efecto de impedimento estérico y se usa ventajosamente en la estabilización de coloides alimentarios mediante macromoléculas (proteínas) adsorbidas.

Los polímeros presentes en la fase continua (usualmente acuosa) de la dispersión pueden adsorberse sobre las partículas. Si no es así, la mayor parte del polímero puede causar un incremento de la viscosidad del líquido, lo que disminuiría cualquier agregación de las partículas de la fase dispersa o, incluso, puede formar un gel que igualmente prevendría la agregación por agotamiento (*depletion*).

La teoría no se ha desarrollado hasta la fecha en una extensión suficiente como para ser útil en la mayoría de los casos (un ejemplo: las proteínas). Estos temas han sido revisados recientemente por Fler y Scheutjens (1992).

### 2.2.2. Limitaciones de la teoría DLVO./.

Los fenómenos de agregación determinan en gran medida la consistencia, la apariencia y la estabilidad física de numerosos coloides alimentarios. Sin embargo, la mayoría de los sistemas alimentarios son lo suficientemente complicados como para que su comportamiento pueda cuantificarse mediante la aplicación de las teorías de la ciencia coloidal. El uso de métodos numéricos avanzados<sup>2</sup> podrá, en un futuro, extender la aplicabilidad de la teoría coloidal a una gran proporción de los coloides alimentarios. Esto no quiere decir que los principios que hemos estudiado carezcan de interés práctico. En primer lugar, las tendencias en el comportamiento de la formulación pueden ser correctamente predichas. Por otra parte, y con gran repercusión práctica, muchas de las modernas formulaciones alimentarias que ahora conocemos han podido formularse y optimizarse gracias a las investigaciones de carácter básico (físico-química del proceso), cuyo número se ha incrementado exponencialmente en los últimos años. La principal consecuencia práctica de los estudios básicos en coloides alimentarios se puede resumir en el siguiente párrafo.

---

<sup>2</sup> El grupo de investigación, en el seno del cual se ha realizado este trabajo, participa en un proyecto de investigación (EU-CT-PL95-1216) que, bajo el título "*STRUCTURE AND RHEOLOGY OF AGGREGATED PARTICLE SYSTEMS CONTAINING DAIRY PROTEINS AND LIPIDS*", tiene como objetivo la obtención de parámetros básicos del sistema que puedan ser usados como soporte de un estudio de simulación. Será pues, una extensión de los estudios realizados en esta Memoria.

En el caso de una emulsión o espuma las interfases aceite-agua o aire-agua pueden estar cargadas eléctricamente, como consecuencia de la adsorción de diferentes especies iónicas. No obstante, la repulsión de la doble capa eléctrica en emulsiones o/w y w/o sin tensioactivos es más débil que para suspensiones de partículas sólidas. La consecuencia es que la repulsión de la doble capa entre gotitas de aceite "desnudas" no es usualmente suficiente para prevenir una rápida coalescencia. Este fenómeno justifica la necesidad de usar emulsionantes en estos sistemas.

### 2.3. FORMACIÓN DE EMULSIONES Y ESPUMAS ALIMENTARIAS.

La formación de una emulsión puede ser una etapa intermedia del proceso de fabricación, o bien puede ser la etapa final del mismo. De forma similar, en determinados productos alimentarios la formación de una espuma puede ser la etapa final del proceso precedida de la formación de una emulsión (helados).

Existen diversos dispositivos industriales capaces de formar una emulsión, como son los agitadores, molinos coloidales, homogeneizadores y mezcladores ultrasónicos. Una emulsión gruesa puede formarse por una agitación vigorosa. Las emulsiones finas normalmente se hacen mediante homogeneizadores a alta presión. Desde que se realizó el primer diseño, hace aproximadamente 90 años, el homogeneizador de válvula a alta presión es el método más usado en la actualidad para preparar emulsiones alimentarias. Por su parte, la formación de una espuma es un proceso más simple que el de emulsificación. La espuma se forma normalmente mediante burbujeo, batido, agitación o sacudida. Existe una amplia información sobre la descripción de estos procesos (Dickinson y Walstra, 1993; Dickinson, 1992; Halling, 1981) pero, por su extensión, se omitirá en este estudio.

Por su interés en el contexto de este estudio conviene decir que durante el proceso de formación de una emulsión o espuma se produce un incremento del área superficial, que depende del número y tamaño de las partículas (gotitas o burbujas) de la fase dispersa. Por ello, la fabricación de emulsiones y espumas son procesos dinámicos y consumidores de gran cantidad de energía. Si se admite que, en una primera aproximación, la energía requerida es proporcional al incremento de área interfacial y que la constante de proporcionalidad del sistema es la tensión interfacial o superficial (Dickinson, 1992; Dickinson y Walstra, 1993):

$$E = \sigma \cdot \Delta A \quad (2.2)$$

Una reducción de  $\sigma$  facilitará desde el punto de vista energético la formación de la emulsión. En este sentido, la función del emulsionante es crucial.

En el caso de las espumas formadas por burbujeo (Bikerman, 1973; Parris y Barford, 1991), un balance entre las fuerzas de flotación y las debidas a la tensión superficial, aplicado a una burbuja que emerge de un orificio, conduce a una expresión para el radio,  $r$ , de la burbuja (Bikerman, 1973):

$$r = [(3 \cdot \sigma \cdot R_o)/(2 \cdot \rho \cdot g)]^{1/3} \quad (2.3)$$

donde  $R_o$  es el radio del orificio,  $\rho$  es la densidad del líquido y  $\sigma$  es su tensión superficial. Por lo tanto, una reducción de la tensión superficial conduce a la formación de burbujas más pequeñas y, por lo tanto, más estables.

En el caso de las burbujas formadas por cavitación<sup>3</sup> del gas, como ocurre en las bebidas espumosas (cerveza, cava, refrescos, etc.), la formación de la burbuja está favorecida energéticamente si se cumple (Bikerman, 1973):

$$r \cdot \rho \cdot F > 3 \cdot \sigma \quad (2.4)$$

siendo  $F$  la energía libre de formación de un gramo de gas.

---

<sup>3</sup> La cavitación es el proceso de creación de burbujas de gas en el interior de un líquido por medio de la agitación violenta de éste.

Además, para que una burbuja crezca, según el mecanismo de cavitación, ha de cumplirse la ecuación de Laplace. Es decir, la presión del gas en el interior de la burbuja ha de ser  $2\sigma/r$  menor que la presión,  $P$ , en el líquido que la rodea:

$$2\sigma / r < P \quad (2.5)$$

De nuevo, una reducción de la tensión superficial del sistema, favorece la formación y crecimiento de burbujas, cuando estas se producen por un mecanismo de cavitación.

Además, y debido a su elevada área interfacial, las emulsiones y espumas alimentarias son sistemas termodinámicamente inestables, como se ha comentado en apartados previos. Por lo tanto, para su conservación temporal se añaden sustancias con actividad superficial que hemos denominado emulsionantes, espumantes, agentes de superficie o, simplemente, tensioactivos. Su función es proteger rápidamente a la gota o burbuja formada mediante el proceso mecánico previo, por adsorción del tensioactivo sobre la superficie interfacial recién creada, frente a la prematura floculación o coalescencia.



2.4. ACTIVIDAD SUPERFICIAL.

La superficie de un disolvente puro, que está en contacto con la fase vapor, está sometida a un estado de tensión (Adamson, 1990; Andrade, 1985; Davies y Rideal, 1963; Rosen, 1989). Esta tensión se debe a la atracción entre las moléculas del disolvente (figura 2.3). Si se considera una molécula de disolvente en el seno de la fase líquida, rodeada por todas partes de otras moléculas del disolvente, las fuerzas de atracción sobre las moléculas son iguales en todas las direcciones, dando como resultante una fuerza neta cero sobre la molécula. En contraste, si se considera una molécula en la superficie del líquido, las fuerzas atractivas ejercidas por las moléculas del seno de la fase será mayor que la atracción ejercida por las moléculas de la fase gaseosa. Debido a esta diferencia, las moléculas de la superficie de un líquido están sometidas a una fuerza neta descendente hacia el interior de la fase líquida.

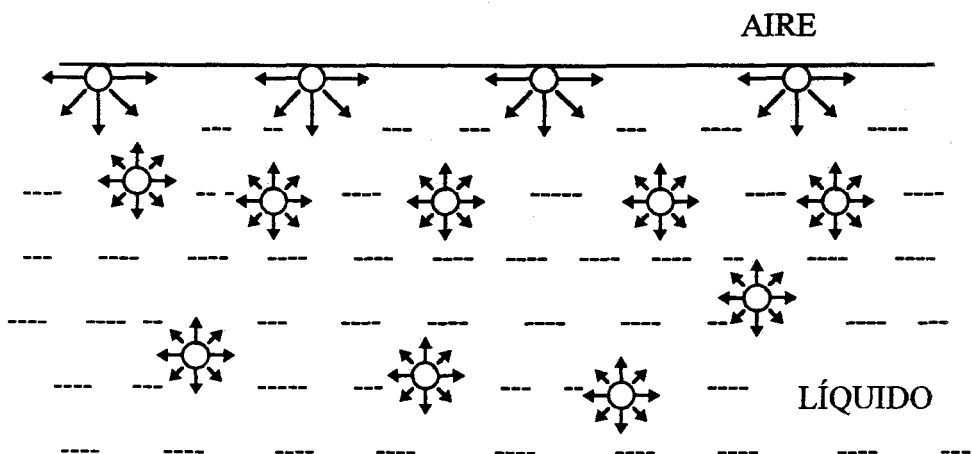


Figura 2.3. Fuerzas de atracción entre moléculas en la superficie y en el interior de un líquido.

Para minimizar esta energía libre, las moléculas de la superficie tienden a moverse hacia el interior de la fase, pero a ello se opone la fuerza de difusión que se establece por el gradiente de concentración. Sin embargo, en un corto período de tiempo, el sistema alcanza un equilibrio dinámico con la creación de una región de menor densidad superficial. Dado que la energía libre de las moléculas en la región superficial es mayor que la de las moléculas del seno de la fase, el líquido tiende a contraerse para que sea mínima el área superficial. La tendencia natural de la superficie de un líquido para contraerse y reducir su área superficial implica que la expansión del área superficial de un líquido requiere un aporte de energía.

#### 2.4.1. Tensión superficial e interfacial.

La mecánica clásica establece que la tensión superficial es el trabajo requerido para incrementar el área de la superficie en una unidad. El trabajo reversible y la energía libre son términos termodinámicos equivalentes, por lo tanto la tensión superficial ( $\sigma$ ) de un líquido puro se define por (Adamson, 1990):

$$\sigma = (\delta G / \delta A)_{P,T,n} \quad (2.6)$$

o por:

$$W = \sigma \cdot \Delta A \quad (2.7)$$

donde  $G$  es la energía libre de Gibbs del sistema,  $W$  es el trabajo requerido para incrementar el área superficial en  $\Delta A$ ,  $A$  es el área superficial,  $P$  es la presión,  $T$  es la temperatura absoluta y  $n$  es la cantidad de material en el sistema. Según estas ecuaciones, la tensión superficial tiene las unidades de energía/área, expresándose en el Sistema Internacional mediante  $N/m$  o como se adoptará en este estudio, en  $mN/m$ .

Las palabras superficie (tensión superficial) e interfase (tensión interfacial) se usan, frecuentemente, como sinónimas. Sin embargo, se prefiere el uso del último término con referencia al límite entre dos fases condensadas (e.g. aceite-agua), especialmente cuando las fases se expresan explícitamente.

#### **2.4.2. Adsorción desde la disolución.**

El proceso de adsorción juega una función fundamental y determinante del comportamiento de los coloides alimentarios. La adsorción es el fenómeno mediante el cual las moléculas (o partículas dispersas) se acumulan en la interfase en una concentración mayor que la que se podría esperar de la simple distribución al azar de las moléculas (o partículas) en el sistema. Las pequeñas moléculas de tensioactivo se considera que se adsorben reversiblemente, ya que su transporte hacia y desde la interfase ocurre sobre una escala de tiempo mucho más corto que el tiempo de observación típico. La adsorción de pequeñas moléculas de soluto puede ser descrita en términos de ecuaciones de equilibrio termodinámico. Sin embargo, con macromoléculas (proteínas) o con partículas se considera, con frecuencia, que el proceso de adsorción es irreversible, ya que la escala de tiempo para la desorción o reordenación sobre la superficie puede ser largo, en comparación con la escala de tiempo del experimento.

La ecuación más importante de la termodinámica superficial de disoluciones es la ecuación de adsorción de Gibbs (también llamada isoterma de adsorción de Gibbs), que relaciona el cambio de tensión superficial con la concentración de especies adsorbidas sobre la interfase. Si se considera un sistema bifásico (gas-líquido o líquido-

líquido), la concentración superficial en exceso del componente  $i$  se define como (Adamson, 1990):

$$\Gamma_i = n_i / A \quad (2.8)$$

donde  $A$  es el área de la interfase y  $n_i$  es la cantidad del componente  $i$  en exceso en la interfase con relación a la que está presente en el seno de la fase.

A presión y temperatura constantes, la concentración en exceso de todos los componentes del sistema se relacionan por la ecuación de Gibbs-Duhem:

$$d\sigma = -\sum \Gamma_i \cdot d\mu_i \quad (2.9)$$

donde  $\mu_i$  es el potencial químico del componente  $i$ . Para una mezcla binaria de disolvente (1) y soluto (2), la ecuación se reduce a:

$$d\sigma = -\Gamma_1 \delta\mu_1 - \Gamma_2 \delta\mu_2 \quad (2.10)$$

Si en la interfase la concentración en exceso del disolvente es pequeña en comparación con la de soluto ( $\Gamma_1 = 0$ ), entonces:

$$\Gamma_2 = -d\sigma / \delta\mu_2 = -(x_2 / RT) \cdot (d\sigma / dx_2) \quad (2.11)$$

que es la forma común de la ecuación de adsorción de Gibbs. En esta,  $x_2$  es la fracción molar de soluto en el seno de la fase y  $R$  es la constante de los gases.

La principal aplicación de la ecuación de Gibbs es calcular la cantidad adsorbida a partir de medidas de variaciones de la tensión superficial o interfacial con la composición. Para una disolución real, se tiene:

$$\Gamma_2 = - (1 / RT) d\sigma / d \ln x_2 f_2 \quad (2.12)$$

donde  $f_2$  es el coeficiente de actividad del soluto.

Las sustancias que se adsorben sobre la interfase, y por lo tanto, causan una elevada reducción de tensión superficial, se denominan tensioactivos. Para disoluciones de tensioactivos, una buena aproximación es tomar  $\Gamma$  como el valor absoluto de la concentración superficial, la cual es difícil de medir independientemente en la interfase líquida.

## 2.5. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS. BSA.

## 2.5.1. Estructura de las moléculas de proteína en un medio acuoso.

Las moléculas de proteína son copolímeros de 20-23 L-aminoácidos diferentes, unidos unos a otros mediante una cadena lineal de polipéptidos (figura 2.4) (Brash y Horbett, 1987; Cheftel et al., 1989; Damodaran, 1990; Haynes y Norde, 1994; Karel, 1973; McRitchie, 1978; Norde y Licklema, 1991). Dos de los tres enlaces en la cadena

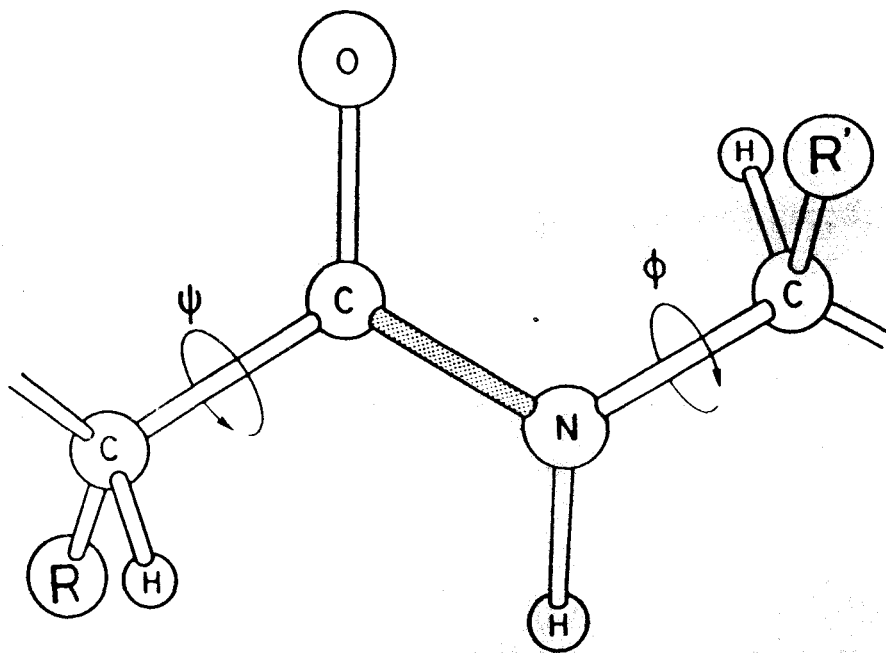
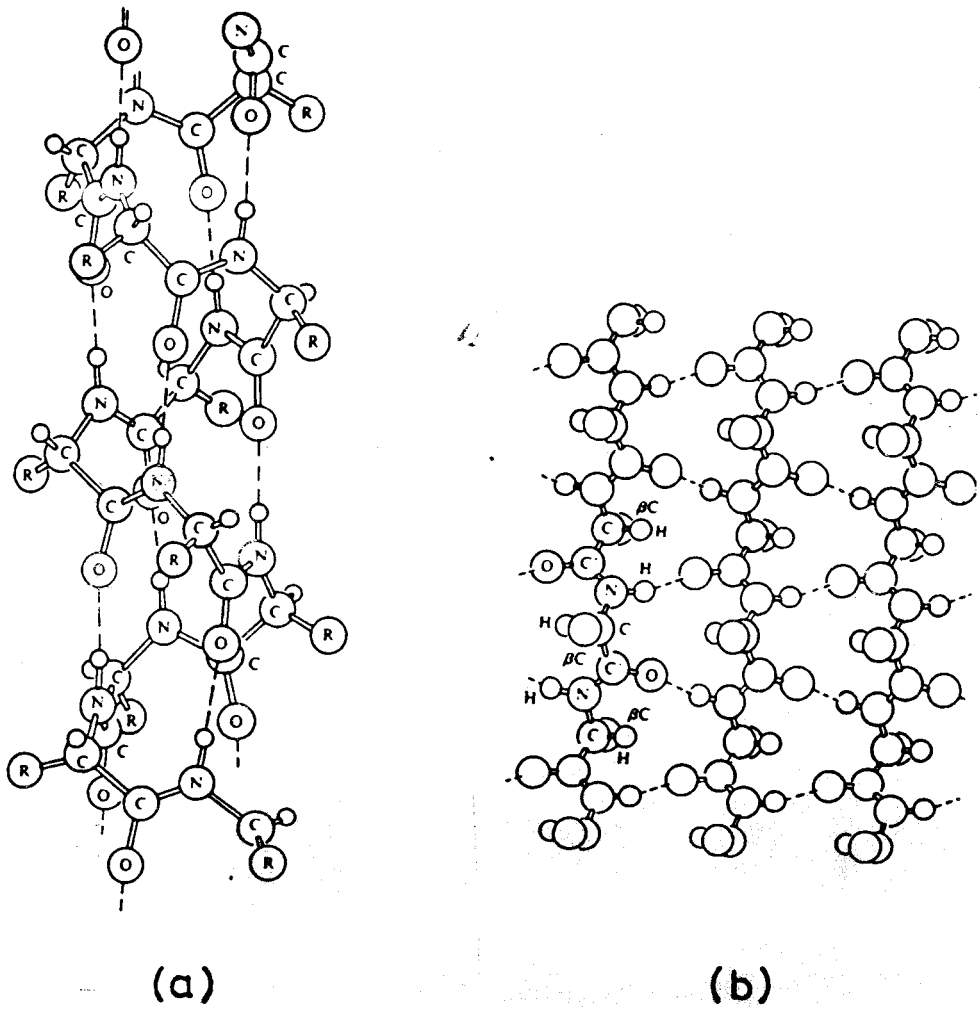


Figura 2.4. Estructura de una unidad de péptido en una cadena de polipéptido. Los enlaces  $\Psi$  y  $\phi$  pueden rotar libremente. R, R',.....representan grupos de aminoácidos.

de polipéptido ( $\Psi$  y  $\phi$ ) pueden rotar libremente; sin embargo, el enlace C-N está fijo debido a su carácter parcial de doble enlace. Los grupos laterales R, R', ... están posicionados en configuración trans para minimizar los impedimentos estéricos. Algunos de estos grupos laterales son ácidos, otros son básicos, mientras que otros poseen un carácter anfotérico. Además, los grupos laterales varían en hidrofobicidad (polaridad), por lo que la cadena de polipéptido se comporta como una sustancia anfifílica.

La estructura primaria de una molécula de proteína; es decir, la secuencia de aminoácidos en la cadena de polipéptido, determina la organización espacial de la molécula de proteína en un medio dado. De esta forma, el residuo de polipéptido puede adoptar diferentes conformaciones ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -lámina, o enrollada al azar), conocidas como estructura secundaria. La estructura terciaria hace referencia a la forma de plegamiento de los segmentos de la cadena de polipéptidos en el espacio y a la ordenación de los grupos de aminoácidos.

Con respecto a su estructura tridimensional, las moléculas de proteína pueden ser clasificadas como : (a) moléculas que están altamente solvatadas y son flexibles, dando como resultado una estructura expandida y enrollada; (b) moléculas que han adoptado una estructura regular, como de  $\alpha$ -hélice (figura 2.5a) o de lámina plisada, en el caso de las proteínas fibrosas (figura 2.5b); y (c) moléculas que pueden contener hélices, láminas plisadas y partes de estructuras ordenadas y desordenadas en el interior de una estructura compacta (las proteínas globulares). La mayoría de las proteínas de interés en cuanto a su aplicación en el campo de los coloides alimentarios, con actividad enzimática o inmunológica, con funciones de transporte, etc., pertenecen a la clase de proteínas globulares.



**Figura 2.5.** Estructuras secundarias de una proteína.

(a): Conformación en  $\alpha$ -hélice.

(b): Conformación en  $\beta$ -lámina.

Las proteínas son importantes componentes estructurales de muchos alimentos que son usadas además, como ingredientes debido a su valor nutricional y a sus propiedades físico-químicas (Kinsella, 1976, 1981, 1982; Morr, 1984). El mercado de



ingredientes funcionales ricos en proteínas está en expansión y cubierto normalmente por varios tipos de proteínas (Tabla 2.2). Los distintos constituyentes proteicos de la leche, así como su proporción y métodos de separación, se muestran en la figura 2.6. Las proteínas extraídas de productos lácteos han sido tradicionalmente una de las principales fuentes de proteínas para los humanos. Para satisfacer la creciente demanda, la industria alimentaria ha incrementado la formulación y fabricación de nuevos alimentos a partir de ingredientes básicos (Kinsella, 1984). Ello requiere el uso de ingredientes proteicos con unas propiedades funcionales controladas y compatibles con la automatización de los procesos de fabricación (Tabla 2.3).

**Tabla 2.2.** *Cantidades aproximadas de proteínas usadas como ingredientes funcionales en la fabricación de alimentos en EE.UU. (Kinsella y Whitehead, 1989).*

Origen	Cantidad usada estimada (x 10 <sup>6</sup> kg)	Componente funcional de la proteína
Leche	136	Caseína, proteínas del suero
Suero	168	Proteínas del suero
Huevo	6,8	Proteínas de la clara, lipoproteínas
Carne	--	Colágeno, miosina
Pescado	--	Colágeno, miosina
Cereales	14,0	Gluten de trigo y maíz
Aceite de semillas	145,3	Concentrados, aislados y harina de soja
Levaduras	1,4	Proteínas de células simples

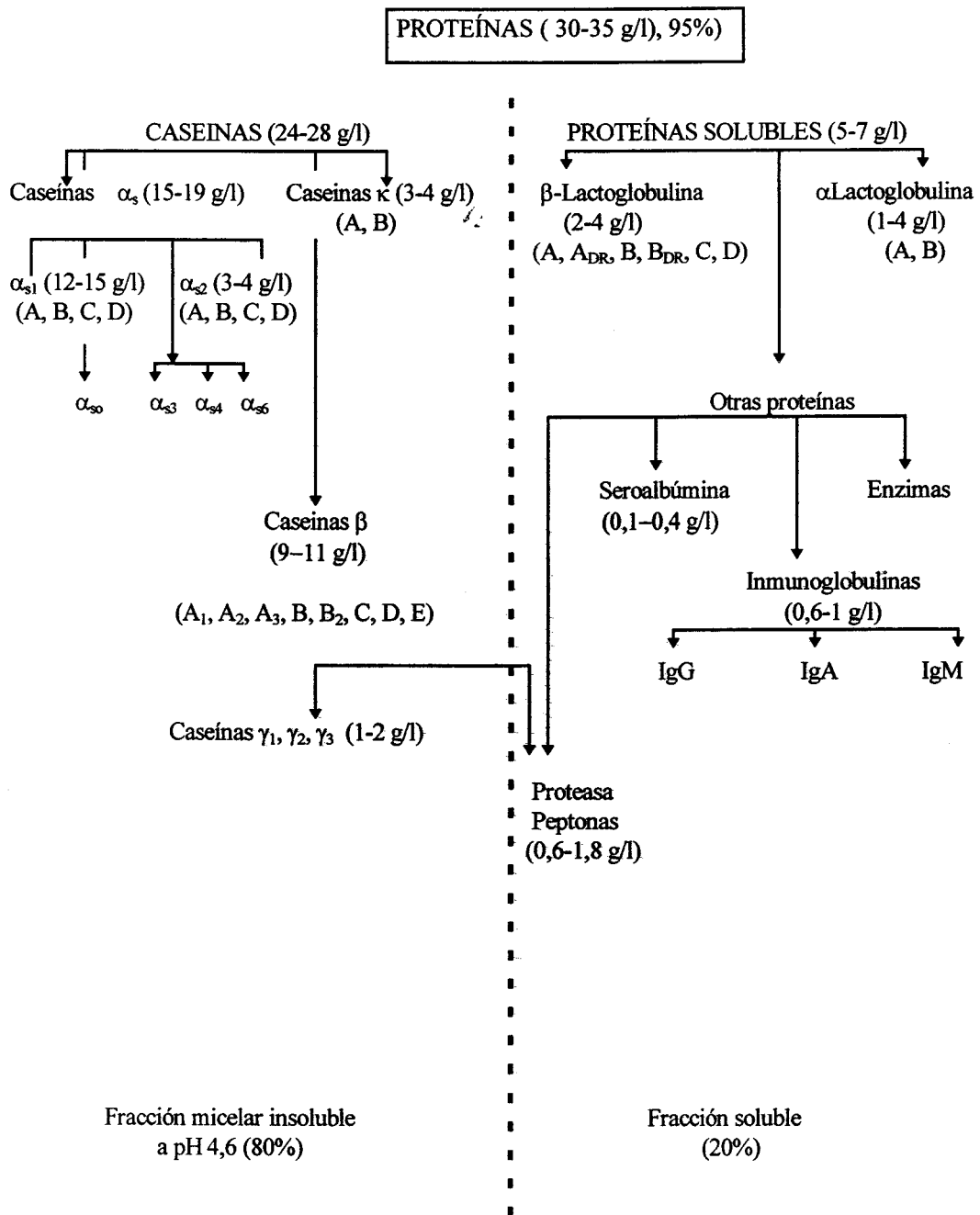


Figura 2.6. Compuestos nitrogenados de la leche (100%). Proteínas (95%).

**Tabla 2.3. Propiedades funcionales proteicas que intervienen en los diversos alimentos.**

<b>Alimento</b>	<b>Propiedades funcionales</b>
Bebidas	Solubilidad a pH diferentes, estabilidad al calor, viscosidad
Potajes, salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua
Masa de panadería	Formación de una matriz y de una película que tenga propiedades de viscoelasticidad, cohesión, desnaturalización por el calor, gelificación
Productos de panadería y de pastelería (por ej., pan)	Absorción de agua, emulsificación, espumación, pardeamiento
Productos lácteos (por ej., queso fundido, helados, postres)	Emulsificación, retención de materia grasa, viscosidad, espumados, gelificación, coagulación
Reemplazantes de huevo	Espumeo, gelificación
Productos cárnicos, (por ej., salchichas)	Emulsificación, gelificación, cohesión, absorción y retención y agua y de materia grasa
Productos similares a la carne (por ej., proteínas vegetales extrusionadas)	Absorción y retención de agua y de materia grasa, insolubilidad, firmeza, masticabilidad, cohesión, desnaturalización por el calor
Recubrimientos alimenticios	Cohesión, adhesión
Productos de confitería y chocolatería (por ej., chocolate con leche)	Dispersabilidad, emulsificación

La producción anual de suero procedente de queserías puede exceder los  $23 \times 10^9$  kg., de los que se utiliza aproximadamente el 60% (Kinsella y Whithehead, 1989). El suero de la leche representa una fuente importante de proteínas funcionales, que pueden ser utilizadas en muchas formulaciones alimentarias tradicionales o nuevas. La estructura y las propiedades fisico-químicas de las proteínas del suero determinan su comportamiento funcional en los sistemas alimentarios. Por lo tanto, para poder utilizar

estos recursos en su forma óptima es necesario determinar y poder controlar las relaciones entre estructura y funcionalidad de las proteínas que lo componen. Un elevado porcentaje del suero de la leche (aproximadamente el 60%) se procesa para alimentación y comidas para animales.

Existe una información exhaustiva sobre la composición en aminoácidos, secuencia y características estructurales de la mayoría de las proteínas del suero (Tabla 2.4) (Whitney et al., 1976; Swaisgood, 1982; Eigel et al., 1984). Las proteínas del suero son proteínas globulares con un limitado número de enlaces disulfuro (Fox y Mulvihill, 1982; Swaisgood, 1982), que confieren un cierto grado de fuerza estructural y le imparte estabilidad.

### **2.5.2. ¿Por qué las proteínas se adsorben sobre las interfases?**

El hábitat natural de la mayoría de las proteínas es un medio acuoso. No obstante, cuando una proteína en disolución se pone en contacto con otra fase (sólida, líquida o gaseosa) con la que es inmisible, las moléculas de proteína tienden a acumularse en la interfase entre las dos fases. Esta tendencia tiene un gran impacto sobre muchos procesos naturales y tecnológicos. Como consecuencia, la adsorción de proteínas ha atraído la atención en disciplinas de investigación que van desde la geofísica y la ciencia de los materiales hasta la ingeniería biomédica y la optometría. Por ejemplo, los científicos evolucionistas piensan en la actualidad que el enriquecimiento de compuestos proteicos sobre la superficie de la tierra fue de una importancia crucial para el estado prebiótico de la génesis de la vida terrestre (Fox y Dose, 1972).

Los científicos de materiales y de alimentos continúan descubriendo importantes usos de las proteínas en la estabilización de microemulsiones, cremas farmacéuticas y cosméticas, lociones, formulaciones de alimentos y espumas. En las ciencias médicas, los patólogos e ingenieros biomédicos han determinado que el desarrollo de trombosis sobre el implante de materiales cardiovasculares está íntimamente relacionado con la adsorción de proteínas contenidas en el plasma. Fenómenos similares están involucrados en la coagulación de la sangre, fracasos en el funcionamiento del riñón artificial, formación de placas sobre los dientes y prótesis dentales, o el ensuciamiento de lentes de contacto por proteínas lacrimales. Estos efectos médicos indeseables contrastan con aplicaciones recientes de la adsorción controlada de proteínas, en el desarrollo de sistemas de administración de medicamentos y de biosensores, para registrar "in vivo" los niveles de glucosa en sangre, y para inmunoensayos "in vitro" y otras pruebas serológicas.

La investigación de la adsorción de proteínas en relación a su aplicación en las ciencias de la vida deriva de la tendencia natural de las proteínas de localizarse y ejercer su función en el límite de la fase. Las lipasas pancreáticas, que controlan la digestión de alimentos grasos en el duodeno, ejercen su función en la interfase aceite-agua. Las membranas proteicas sirven como bombas, receptores, puertas, transductores de energía y enzima (Andrade, 1985; Bender, 1991; Brash, 1981).

La adsorción de proteínas es también beneficiosa para la moderna tecnología, especialmente para la biotecnología. La adsorción controlada y/o bien caracterizada de proteínas en la interfase sólido-líquido es de importancia en la investigación dirigida hacia los biorreactores de enzimas inmovilizadas y a los sistemas de purificación de proteínas. Por ejemplo, muchas separaciones cromatográficas (hidrofóbicas, de desplazamiento, o de cambio iónico) están basadas en la diferente afinidad de enlace de

las proteínas por el material soporte. Consecuencias negativas del proceso de adsorción de proteínas incluye el ensuciamiento en cambiadores de calor, membranas de ultrafiltración, unidades de desalinización de agua de mar, unidades de proceso, etc.

Un importante resultado de este diverso esfuerzo de investigación ha sido la acumulación de nuevas estrategias experimentales y teóricas para el estudio de la adsorción de proteínas. La investigación sobre la cinética de adsorción de proteínas, que es esencial para el conocimiento y control de procesos dinámicos, entre los que se incluyen las emulsiones y espumas alimentarias, ha motivado el desarrollo de un gran número de métodos para determinar las velocidades de adsorción y la cantidad adsorbida (Andrade, 1985; Brash, 1981).

Independientemente del mecanismo y de la cinética del proceso, la respuesta a la cuestión planteada puede expresarse en los siguientes términos: la adsorción de proteínas (a temperatura y presión constantes) únicamente ocurre si la energía de Gibbs,  $G$ , para el sistema disminuye:

$$\Delta^{\text{ads}}G = \Delta^{\text{ads}}H - T \cdot \Delta^{\text{ads}}S < 0 \quad (2.13)$$

donde  $H$ ,  $S$  y  $T$  son la entalpía, entropía y temperatura absoluta, respectivamente, y  $\Delta^{\text{ads}}$  indica el cambio en las funciones termodinámicas de estado, como resultado del proceso de adsorción.

Por lo tanto, la respuesta a la cuestión de por qué las proteínas prefieren las interfases puede responderse considerando las interacciones que contribuyen a  $\Delta^{\text{ads}}G$  (Norde y Likhlema, 1991; Haynes y Norde, 1994). Brevemente, la adsorción de proteínas es el resultado neto de varias interacciones entre y con los componentes del

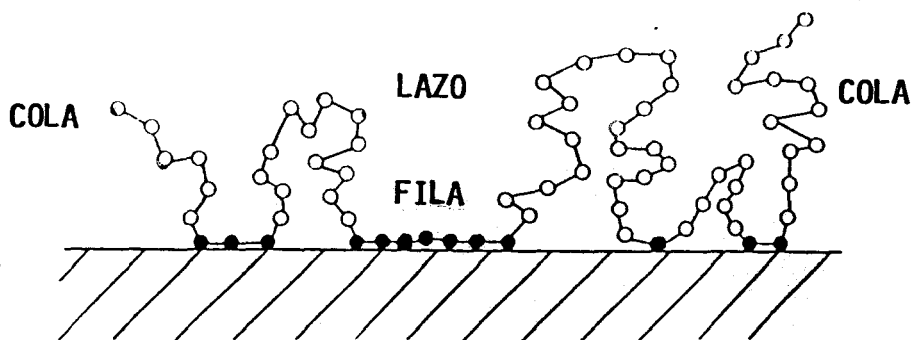
sistema, que incluye la superficie del adsorbato (gas, líquida o sólida), las moléculas de proteína, las del disolvente (agua) y cualquier otro soluto o solutos presentes, tales como etanol y azúcares, en este estudio. El origen de estas interacciones incluye a las fuerzas de London-van der Waals (fuerzas de dispersión, orientación e inducción), fuerzas ácido-base de Lewis (incluyendo las fuerzas de enlace de hidrógeno), las fuerzas electrostáticas, los efectos estéricos tales como el efecto hidrofóbico (al menos en determinadas condiciones ambientales) y las restricciones de empaquetamiento interno (estéricas y exclusión de volumen). En resumen, las interacciones intermoleculares entre proteína-superficie, disolvente-superficie o disolvente-disolvente, por ejemplo, son de importancia para la adsorción de la proteína. Además, las fuerzas intramoleculares entre los átomos y residuos en la macromolécula de proteína pueden contribuir a  $\Delta^{ads}G$ . Por lo tanto, un conocimiento completo de la fuerza impulsora para la adsorción de proteína requiere un conocimiento de la estructura y estabilidad de las proteínas globulares. Una revisión de este tema puede consultarse en un reciente artículo de Haynes y Norde (1994).

### **2.5.3. Configuración y conformación de las proteínas sobre las interfases.**

El comportamiento de las macromoléculas de proteína sobre las interfases es muy diferente al de los simples tensioactivos (Larsson y Friberg, 1990; Sjöblom, 1992). A diferencia de estos, las proteínas se adsorben con varios puntos de contacto sobre la interfase. Dado que la cadena de polipéptido puede presentar diferentes orientaciones en la interfase, el número de residuos o de segmentos en contacto con la interfase depende de la flexibilidad molecular de la cadena de polipéptido y de la afinidad de esta por el medio de disolución. Los cálculos de área molecular de una molécula de proteína

adsorbida indican que solo una fracción de la cadena de polipéptido está en contacto con la interfase (superficie).

Las configuraciones de una cadena de polipéptido flexible en la interfase pueden ser clasificadas dentro de tres grupos (figura 2.7):



**Figura 2.7.** *Diferentes conformaciones de una cadena de polipéptido sobre una interfase.*

- a) Fila (*train*): hace referencia a los segmentos que están en contacto directo con la interfase.
- b) Lazo (*loop*): se refiere a los segmentos de polipéptido entre las filas que están suspendidos en el seno de la fase.



- c) Cola (*tail*): son los segmentos terminales de la cadena de polipéptido con grupos terminales N-R y C-R. Ya que estos grupos están cargados a pH neutro, es de esperar que las colas estén presentes en el seno de la fase acuosa.

La distribución de filas, lazos y colas en un polipéptido adsorbido depende de la flexibilidad de la molécula y de la presión superficial<sup>4</sup> de la película de proteína. Se asume a menudo que para bajas presiones superficiales (con una película diluida de proteína), las moléculas alcanzan una desnaturalización completa y todos los segmentos de la proteína adquieren una configuración de fila (Davies, 1953). Sin embargo, esta es una suposición simplista debido a que la configuración de la proteína sobre la interfase es muy dependiente del tipo de proteína y de la calidad del disolvente (de Feijter y Benjamins, 1987; Fler et al., 1989, 1993; Dickinson, 1992; Dickinson y Walstra, 1993). En la figura 2.7-bis se representan imágenes de la molécula de una proteína (ribonucleasa del páncreas bovino), obtenidas por simulación con ordenador (Haynes y Norede, 1994).

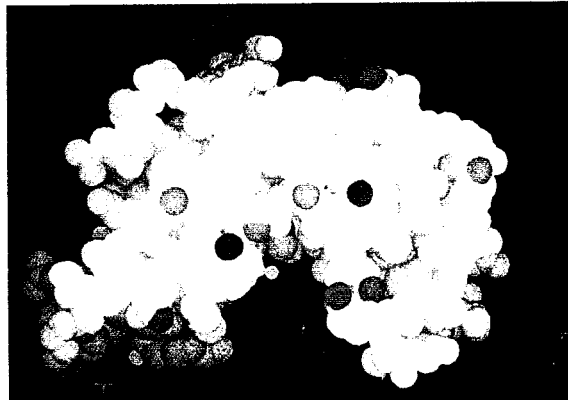
Del análisis de las isothermas  $\pi$ -A<sup>4</sup> de películas de  $\beta$ -caseína, una proteína flexible, sobre la interfase aire-agua (Graham y Phillips, 1979) se deduce que para presiones superficiales inferiores a 8 mN/m, cuando la proteína forma una película diluida<sup>4</sup>, la mayoría de los residuos de aminoácido están en contacto con la interfase y la molécula adquiere una configuración de fila sobre la interfase aire-agua (figura 2.8). Sin embargo, a presiones superiores a 8 mN/m, la compresión<sup>4</sup> de la película da como resultado el desplazamiento de ciertos segmentos desde la interfase y la formación de lazos y colas.

---

<sup>4</sup> Estos términos serán definidos en el apartado 2.6.5. de esta Memoria.



(a)



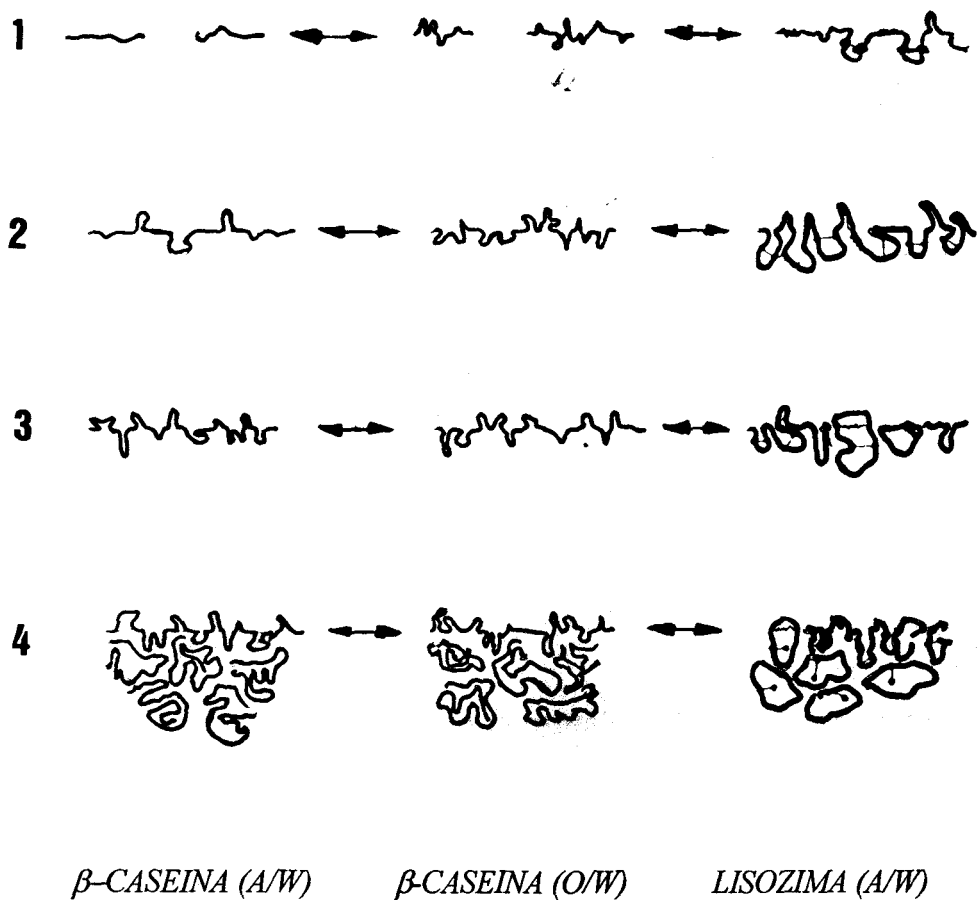
(b)



(c)

**Figura 2.7-bis.** Imágenes de la molécula de una proteína. (a) Cadena de polipeptido mostrando estructuras de  $\alpha$ -hélice (naranja),  $\beta$ -lámina (azul) y desordenada (blanco). (b) Distribución de grupos superficiales de la proteína. El color está en orden creciente con el valor del pK: rojo oscuro (grupo carboxilo terminal), rojo claro (grupos carboxilos del aspártico y glutámico), rojo-violeta (histidina), azul claro (grupo amino de la lisina), azul oscuro (grupo guanidilo de la arginina). (c) Distribución de grupos polares y apolares sobre la superficie de la proteína.

Cuando se incrementa la compresión de la película, más y más segmentos son desplazados desde la interfase. Cuando se sobrepasa la presión de colapso<sup>4</sup> ( $\pi = 24$  mN/m) o cuando la concentración superficial ( $\Gamma$ ) supera a la concentración de



**Figura 2.8.** Representación esquemática de las estructuras de  $\beta$ -caseína y lisozima sobre las interfases.

$\beta$ -CASEINA: (1)  $\Gamma < 1 \text{ mg.m}^{-2}$ ; (2)  $1 \text{ mg.m}^{-2} < \Gamma < \Gamma_{\text{sat}}$ ;

(3)  $\Gamma = \Gamma_{\text{sat}}$ , (4)  $\Gamma > \Gamma_{\text{sat}}$

LISOZIMA: (1)  $\Gamma < 2 \text{ mg.m}^{-2}$ ; (2)  $\Gamma > 3 \text{ mg.m}^{-2}$ ;

(3)  $\Gamma = \Gamma_{\text{sat}}$ ; (4)  $\Gamma > \Gamma_{\text{sat}}$ .

saturación ( $\Gamma_{\text{sat}}$ ) comienza a formarse multicapas en el seno de la fase acuosa, debajo de la capa de  $\beta$ -caseína.

En contraste con la  $\beta$ -caseína, con la lisozima y la BSA, al ser proteínas globulares, aparecen las conformaciones lazo, incluso, a bajas presiones o concentraciones superficiales. Debido a la presencia de enlaces intramoleculares disulfuro y a la gran cantidad de estructura en  $\alpha$ -hélice y láminas, tanto la lisozima como la BSA mantienen gran parte de su estructura ordenada en la interfase (figura 2.8) (Graham y Phillips, 1979a, 1979b, 1980; Phillips, 1981).

#### 2.5.4. La albúmina del suero bovino (BSA).

La albúmina del suero bovino (BSA), sobre la que se centrará este estudio, es una de las proteínas del suero (Tablas 2.4 y 2.5). La BSA ha sido extensivamente caracterizada y sus propiedades químicas y físicas son bien conocidas (Peters, 1975). La proteína consiste en una cadena simple de polipéptidos conteniendo alrededor de 580 residuos de aminoácidos con 17 enlaces disulfuro (-S-S-) y un grupo tiol libre en el residuo 34. Aunque la estructura cristalina tridimensional precisa de la BSA no es exactamente conocida, la distribución de enlaces disulfuro y la localización de los residuos específicos a lo largo de la cadena de polipéptido sugiere que la molécula de albúmina se pliega para formar tres dominios estructurales y nueve subdominios (Brown, 1977). La existencia de multidominios en la molécula de BSA es responsable de un comportamiento anómalo de la proteína bajo condiciones de desnaturalización (Pace, 1975).

La BSA tiene la capacidad de unirse a ácidos grasos libres, a otros lípidos y a otros compuestos (Damodaran y Kinsella, 1980). La temperatura de desnaturalización está comprendida entre 64 y 70°C, pero está muy afectada por el pH, la presencia de sales (especialmente calcio), los agentes quelatantes (citrato y fosfato), etc. (Kinsella y

**Tabla 2.4.** *Composición en aminoácidos de las principales proteínas del suero de la leche de bovinos.*

Aminoácido	$\beta$ - Lactoglobulina	$\alpha$ - Lactoglobulina	Albúmina del suero	Lisozima
Asp	11	9	41	13
Asn	5	12	13	10
Thr	8	7	34	8
Ser	7	7	28	8
Glu	16	8	59	10
Gin	9	5	20	4
Pro	8	2	28	9
Gly	3	6	15	11
Ala	14	3	46	5
1/2Cys	5	8	35	6
Val	10	6	36	6
Met	4	1	4	2
Ile	10	8	14	10
Leu	22	13	61	5
Tyr	4	4	19	7
Phe	4	4	27	7
Trp	2	4	2	1
Lys	15	12	59	10
His	2	3	17	7
Arg	3	1	23	15
Total	162	123	581	154

Whitehead, 1989). Existe, igualmente, una abundante información sobre sus propiedades funcionales tales como su actividad superficial, estructura y propiedades de la película de la proteína en las interfases aire-agua y aceite-agua y propiedades espumantes y emulsionantes (para una revisión puede consultarse: Kinsella y

Whitehead, 1989). La importancia de sus propiedades funcionales, así como su adecuación a aplicaciones específicas, ha dado lugar a una extensa bibliografía sobre modificaciones físicas, químicas o enzimáticas (Cheftel et al., 1989; Fox et al., 1982; Richardson y Kester, 1984; Kinsella y Whitehead, 1989). Las características

**Tabla 2.5.** *Características fisico-químicas de la albúmina del suero bovino (BSA) (Norde y Favier, 1992, Norde y Anusiem, 1992).*

Masa molecular	66.000-68.000
Punto isoelectrico (pH)	4,7-5,1
Grupos cistina	17 (1-5 H)
Dimensiones de la molecula (nm <sup>3</sup> )	11,6×2,7×2,7
Temperatura de desnaturalización (°C)	63
Estabilidad conformacional	Baja
Porcentaje de $\alpha$ -hélices (pH=7,0)	74

espumantes y emulsificantes de la BSA nativa o modificada ha dado lugar también a un elevado número de estudios, que puede consultarse gracias a diversas revisiones (Ahmed y Dickinson, 1990; Bikerman, 1973; Coke et al., 1990; Chen y Dickinson, 1993; Damodaran y Song, 1988; Damodaran, 1990; Das y Kinsella, 1990; Dickinson y Woskett, 1988; Dickinson et al., 1989; Doxastakis y Sherman, 1983; German et al., 1985; Halling, 1981; Leadbetter, 1990; Parker, 1988; Phillips et al., 1992; Phillips, 1981).

## 2.6. EMULSIONANTES DE BAJO PESO MOLECULAR.

La mayor parte de los emulsionantes sintéticos disponibles comercialmente son ésteres parciales o totales de ácidos grasos alimentarios y ácidos orgánicos, tales como acético, cítrico, láctico, tartárico y succínico, con polioles tales como glicerina, propilenglicol y sorbitol. Estos se forman normalmente por alcoholisis o esterificación directa. Además de los sintéticos, se usan también emulsionantes naturales. Los fosfolípidos y lecitinas derivadas de la leche, huevo, maíz, cacahuete y soja son los más importantes emulsionantes naturales.

Las fuentes de materias primas en la fabricación de emulsionantes alimentarios se resumen en la figura 2.9. La fotosíntesis representa el punto de partida para todos los emulsionantes alimentarios. Desde esta reacción fundamental deriva, directamente de las plantas o indirectamente de los animales, los aceites vegetales, grasas animales, carbohidratos y otros materiales que sirven como base de las materias primas (Charalambous y Doxastakis, 1989; Krog, 1992; Larsson y Friberg, 1990; Larsson, 1994; Leadbetter, 1990).

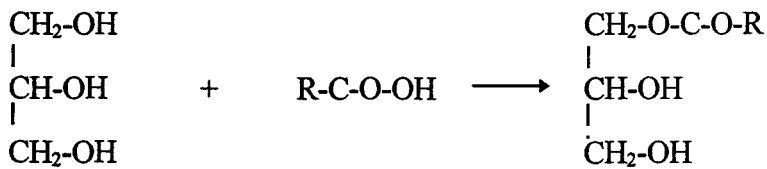
### 2.6.1. Monoglicéridos y diglicéridos.

Los monoglicéridos son los productos más usados como emulsionantes alimentarios. Los monoglicéridos y sus ésteres con ácidos orgánicos constituyen el 70-80% de la producción mundial de emulsionantes alimentarios. Fueron descritos en 1853 por Berthelot. Comúnmente se denominan como tales pero comercialmente están disponibles como mezclas en lugar de como productos puros. Sin embargo, la fracción

de monoglicéridos en la mezcla es quien confiere las principales propiedades funcionales del producto.

Comercialmente se preparan por esterificación directa de glicerina con ácidos grasos a elevadas temperaturas o por glicerólisis de las grasas. Es decir, mediante la transesterificación de la grasa con glicerina. Las grasas alimentarias o ácidos grasos usados en su fabricación, son de origen vegetal (aceites de soja, algodón, coco o palma), de origen animal (manteca de cerdo, sebo, etc.) o aceites de pescado, algunos de los cuales pueden ser hidrogenados.

*Esterificación directa de la glicerina:*

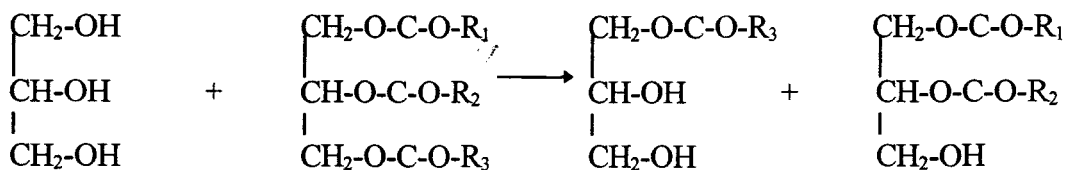


*Glicerina*

*Ácido graso*

*Monoglicérido*

*Transesterificación de las grasas con glicerina:*



*Glicerina*

*Grasa*

*Monoglicéridos*

*Diglicéridos*



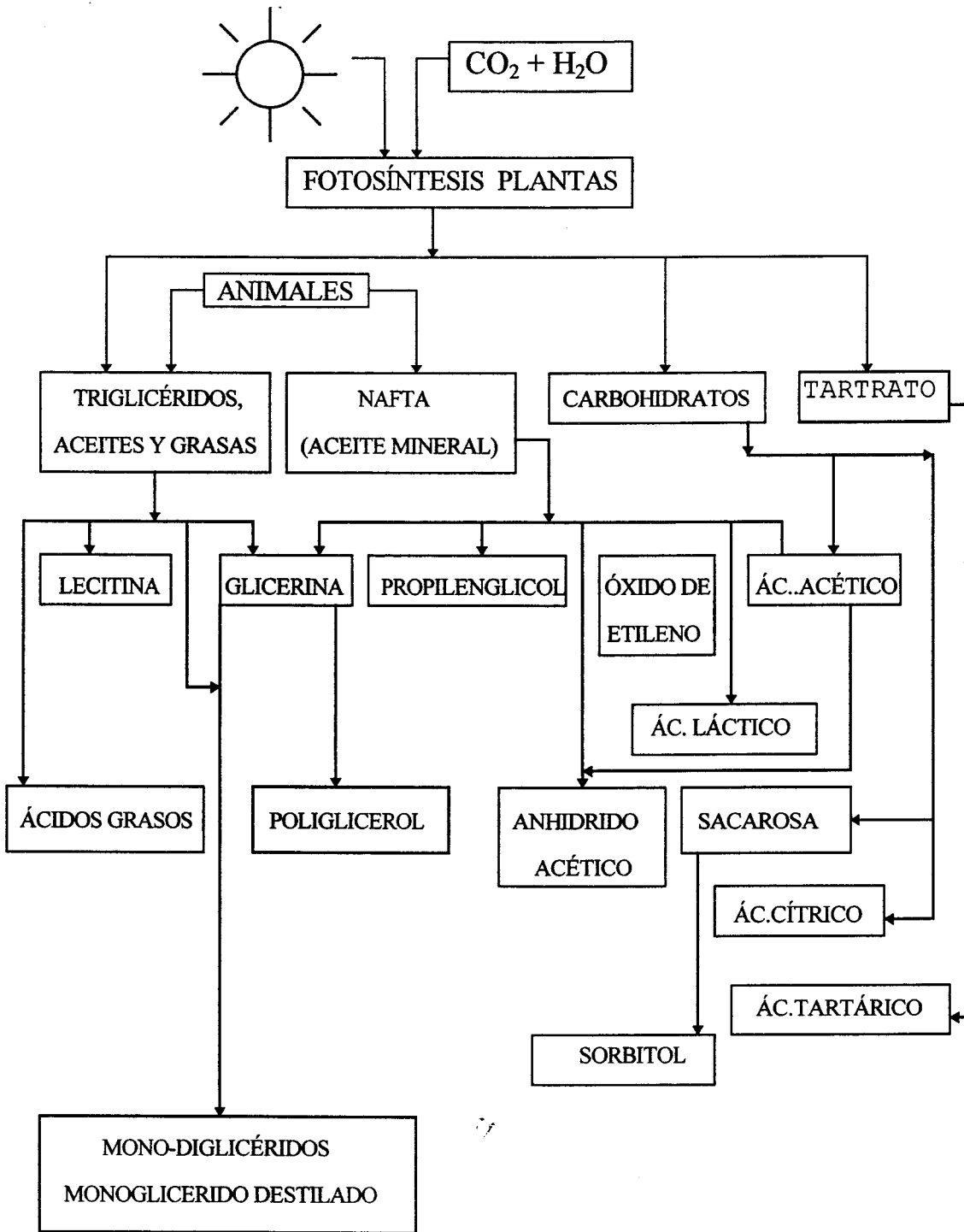
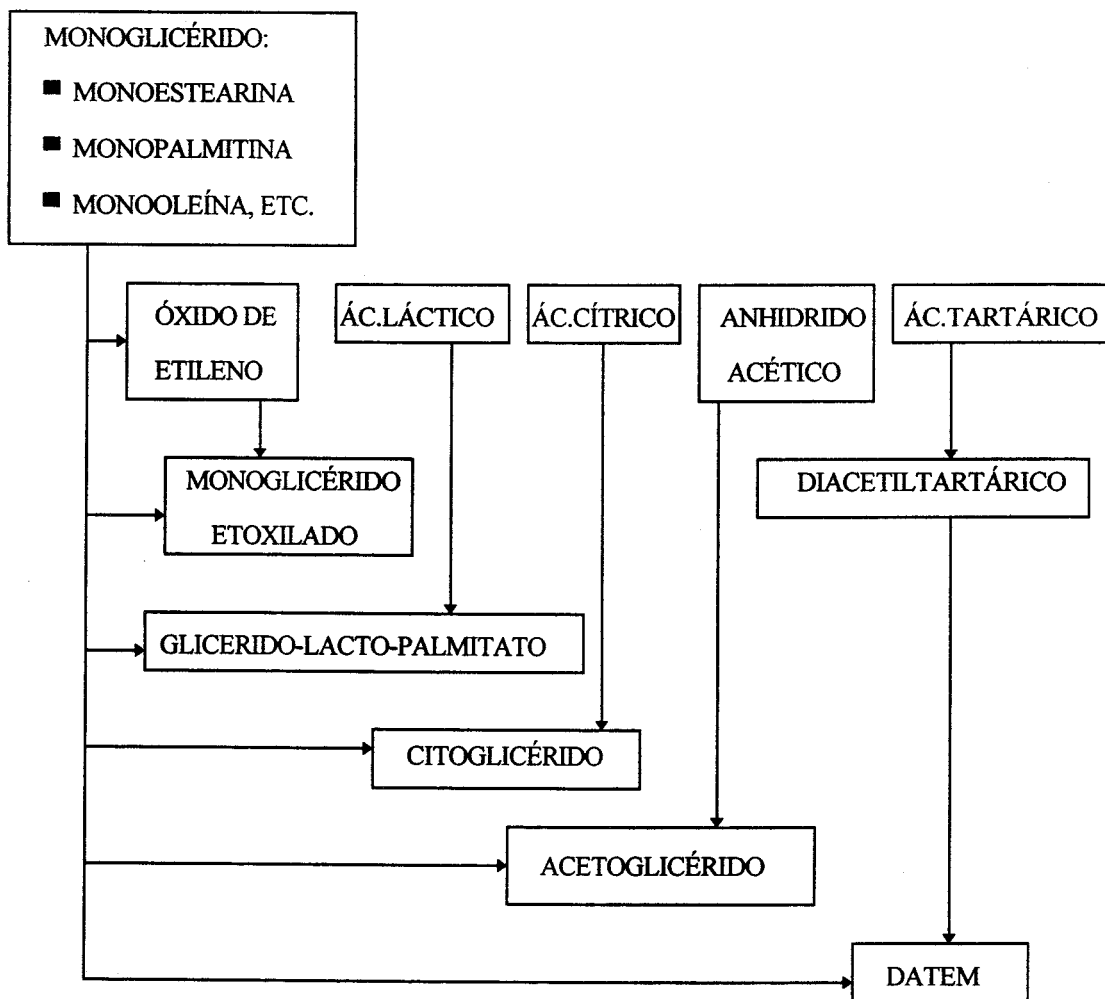


Figura 2.9. Origen de las materias primas de emulsionantes alimentarios de bajo peso molecular



**Figura 2.10.** Origen de algunos emulsionantes alimentarios de bajo peso molecular derivados de los monoglicéridos. DATEM: diacetiltartrato de monoglicérido.

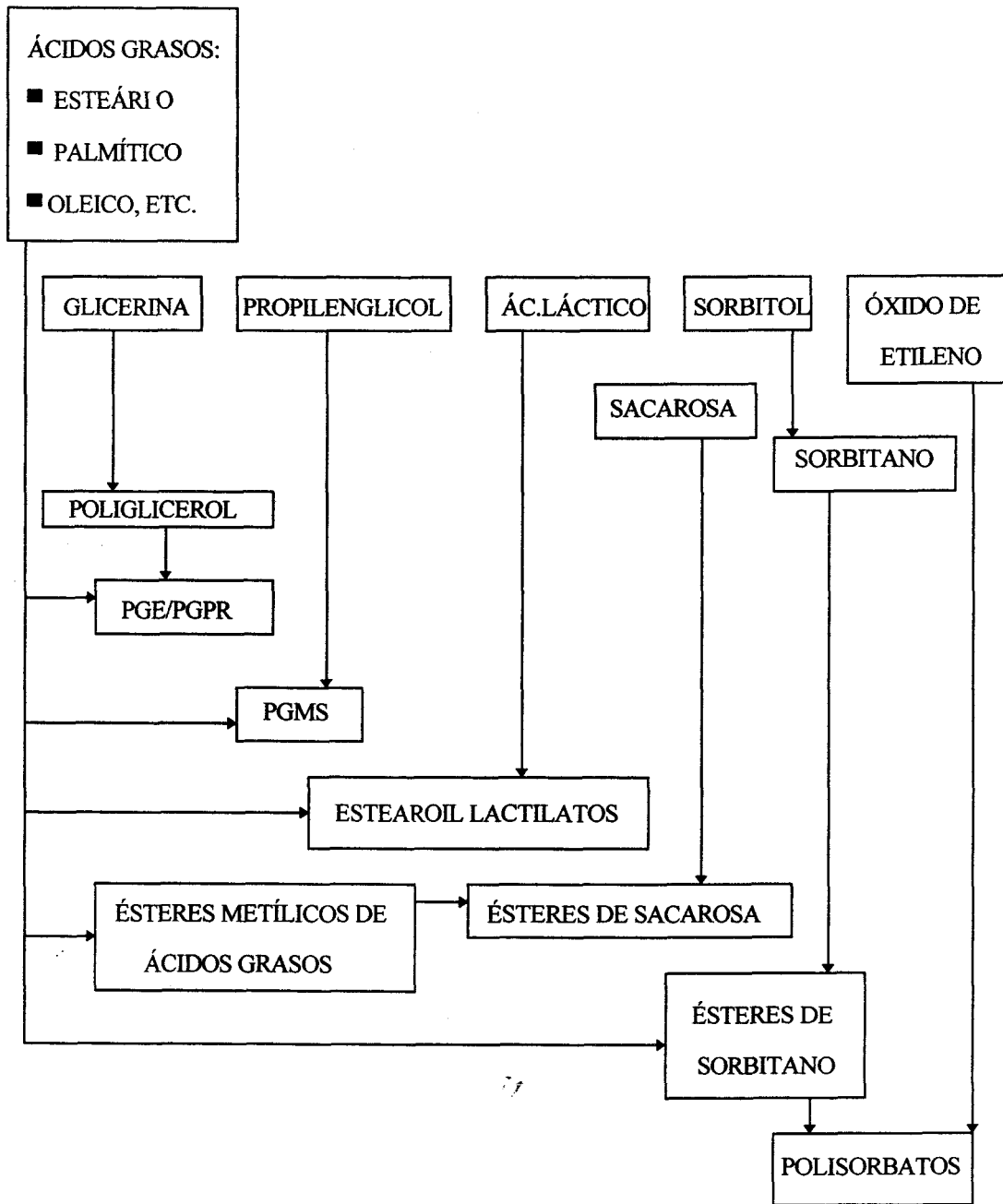


Figura 2.11. Origen de algunos emulsionantes alimentarios de bajo peso molecular derivados de ácidos grasos.

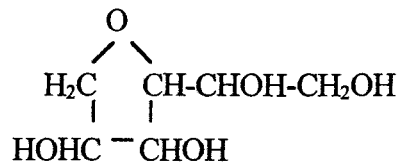
Si el monoglicérido se hace reaccionar con compuestos orgánicos tales como ácidos orgánicos o sus derivados pueden producirse numerosos compuestos utilizados como emulsionantes. Algunos de estos se muestran en la figura 2.10.

Además de los citados, existe un grupo de emulsionantes de gran importancia industrial. Son los ésteres de ácidos grasos con alcoholes distintos a la glicerina. El origen de algunos de los emulsionantes derivados de ácidos grasos se muestran en la figura 2.11.

#### **2.6.2. Ésteres de sorbitano. Tween 20.**

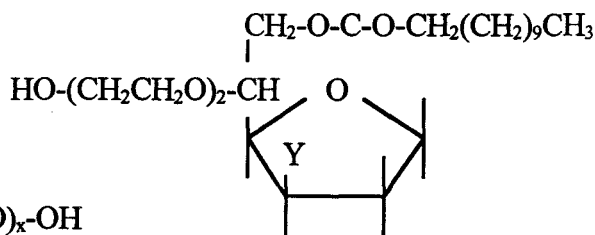
El Tween 20 (monolaurato de sorbitano y óxido de polietileno) pertenece al grupo de los ésteres de sorbitano. Estos tensioactivos se sintetizan a partir de la reacción de óxidos de olefinas con ésteres grasos de polialcoholes. El valor del HLB de estos tensioactivos puede modificarse selectivamente mediante la sustitución de los grupos oxhidrilos del sorbitano por cadenas de polióxidos de etileno, de diferentes longitudes. De hecho, en los productos comerciales se puede disponer de una amplia familia de estos productos con distintos valores de HLB y con aplicaciones muy específicas.

Para obtener el Tween 20 se parte del sorbitol ( $C_6H_8(OH)_6$ ), el cual, por medio de una reacción con ácido sulfúrico, a 140 °C durante 30 minutos, se transforma en 1,4-sorbitano:



*1,4-sorbitano*

El ataque de los grupos de óxido de etileno se produce en los hidroxilos de la molécula, uniéndose además a la misma el monolaurato de polióxido de etileno, al grupo hidroxilo terminal. La fórmula general del Tween 20 es (Mackie et al, 1996):



$$X = (\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x\text{-OH}$$

$$Y = (\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{-OH}$$

$$x + y + 2 = 20$$

*Tween 20: monolaurato de sorbitano polioxi-etileno (20)*

La molécula de Tween 20 está constituida por un anillo de sorbitano unido mediante un enlace éster a una cadena de ácido láurico. El anillo de sorbitano tiene sustituciones de cadenas de óxido de etileno. La extensión de la sustitución del anillo de sorbitano por las cadenas de óxido de polietileno es variable, siendo esta la razón de la indefinida composición química de este tipo de emulsionante.

La familia de los Tween tienen un punto de ebullición más elevado que la de otros monoésteres de polialcoholes con una mayor cantidad de grupos de ácidos

grasos. Esto se debe a la proporción relativamente alta de grupos hidroxilos, de enlaces de hidrógeno y a los radicales alquílicos relativamente altos (Benson, 1987).

Los Tween son líquidos a la temperatura ambiente. Debido a su capacidad de formar micelas en disolución, la solubilidad media no tiene el mismo significado que para los compuestos no asociados. En muchos casos, los ésteres grasos de polialcoholes dispersos en disolventes forman sistemas coloidales que presentan una apariencia turbia. En general todos estos compuestos son solubles en agua. Sin embargo, su solubilidad es nula en aceites minerales, pero ésta aumenta en el seno de hidrocarburos aromáticos. Todos estos compuestos son solubles en xileno, pero en menor medida que sus correspondientes ésteres de sorbitano. En la Tabla 2.6 se muestra algunas de las propiedades físicas de la familia de los Tween de mayor importancia industrial.

En relación con sus aplicaciones, se puede destacar su uso en emulsificación, espumación, disolventes, modificadores de la humectación, detergentes, lubricantes y plastificantes.

Por su interés en el contexto de esta memoria, se citarán algunas aplicaciones concretas dentro del campo de la tecnología de alimentos, pero hay que señalar que su uso no se restringe a este campo. Su utilización se extiende a los campos de las industrias farmacéutica, cosmética, agroquímica, textil, protectores de metal, lubricantes, detergentes, etc. Algunos ejemplos de su uso en el campo de la tecnología de alimentos son los siguientes:

Tabla 2.6. *Propiedades físicas de los ésteres de sorbitano polioxietilenados.*

Nombre químico	Nombre comercial	Solubilidad en aceite mineral	Solubilidad en xileno	Solubilidad en agua	Tensión superficial en agua (mN/m)
Monolaureato de sorbitano polioxietilenado (4)	<i>Tween 21</i>	i	s(h, 10%)	d	32
Monolaureato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 20</i>	i	s	s	36
Monopalmitato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 40</i>	i	s	s	40
Monoestearato de sorbitano polioxietilenado (4)	<i>Tween 61</i>	i	s(i, 10%)	d	38
Monoestearato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 60</i>	i	s	s	43
Triestearato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 65</i>	i	s(d, 10%)	d(g, 105)	31
Monooleato de sorbitano polioxietilenado (5) Tween 81	<i>Tween 81</i>	H(s, 10%)	s(i, 10%)	d	38
Monooleato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 80</i>	i	s(i, 10%)	s	41
Trioleato de sorbitano polioxietilenado (20)	<i>Tween 85</i>	s	s	d	42

i: insoluble; s: soluble; h: forma niebla; g: forma geles; d: dispersión.

a) En los productos batidos, los Tween emulsifican las grasas, promoviendo su distribución homogénea y ayudando a la formación de pequeñas burbujas de aire, u otro gas, durante el proceso de batido.

b) En las masas de pastelería fabricadas con grasas líquidas y semisólidas se suele utilizar las mezclas de Tween y Span (ésteres de sorbitano) como emulsionantes.

c) En la fabricación de chocolates se usan estos tensioactivos para controlar la humedad, textura, volumen y granulosidad del producto.

d) La adición de Tween a las gelatinas a base de almidón retarda el endurecimiento del producto debido a su acción sobre la cristalización del almidón.

e) Otros ejemplos de utilización de los Tween, sólo o mezclados con los Span, son los siguientes: en los helados incrementan su volumen e inhiben la difusión de la grasa hacia la superficie. En la leche en polvo controlan la dispersión. Además se usan en bebidas carbonatadas, zumos de frutas, quesos, etc. (Benson, 1987).

### **2.6.3. Lecitina y otros fosfolípidos.**

La lecitina es una mezcla de fosfolípidos incluyendo la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y otros componentes. Es un constituyente natural de origen animal o vegetal. La lecitina fue probablemente utilizada al comienzo como emulsionante en su forma de yema de huevo. Actualmente, sin embargo, la más importante fuente de lecitina es el aceite de soja. Además de en el aceite de soja, la lecitina se encuentra también presente en muchos otros aceites, tales como los de algodón, sésamo, cacahuete, girasol, etc. La lecitina puede ser modificada por varios métodos para producir una serie de lecitinas modificadas. Las lecitinas pueden ser hidrolizadas por tratamiento enzimático o por hidrólisis alcalina o ácida.



**Tabla 2.7.** *Funciones de emulsionantes de bajo peso molecular.*

1. Facilitan y estabilizan emulsiones O/W y A/W: mayonesas, salsas, mantequillas, margarinas, etc.
2. Productos de panadería y bollería:
  - \* Acondicionar la masa de partida.
  - \* Retraso de envejecimiento y endurecimiento del producto.
  - \* Aumenta el volumen del producto y lo hace más esponjoso.
3. Reacción con el almidón:
  - \* Evitar gelificación: alimentos deshidratados (puré de patatas).
  - \* Reducir viscosidad y evitar pegajosidad durante el cocido: espaguetis, macarrones, fideos, etc.
4. Dispersantes de gases en líquidos: helados, sorbetes, batidos, nata montada, etc.
5. Favorece humectación en la rehidratación y mejora la dispersión y solubilización: alimentos en polvo (leche, cacao, café, huevos, etc.).
6. Favorece la dispersión de otros aditivos: esencias aromáticas, vitaminas, antioxidantes (bebidas ligeras, carbonatadas, zumos de frutas, etc.).
7. Formación de capa fina de cristales de grasa con brillo superficial: chocolates, bombones, etc.
8. Propiedades lubricantes: preparación de gomas de mascar, caramelos blandos, etc.
9. Facilita procesado de quesos fundidos, leche condensada, flanes, mazapanes, masas de relleno y de cobertura.
10. Evita salpicado y aumenta estabilidad de aceites o grasas de fritura.
11. Propiedades plastificantes.
12. Forma películas flexibles y extensibles: preparación de envolturas y revestimiento de alimentos (pescado, carnes, embutidos, frutas, quesos, etc.).
13. Antiespumante y desemulsionante.
14. Lubricación de la maquinaria.

#### 2.6.4. Funciones de los agentes emulsionantes.

Los emulsionantes son ingredientes versátiles con un amplio margen de propiedades funcionales. Generalmente, las funciones más importantes de un emulsionante alimentario se pueden resumir en los siguientes puntos:

- \* Promover la formación y estabilidad de emulsiones y espumas.
- \* Controlar la aglomeración de los glóbulos de grasas.
- \* Modificar la textura, vida media y propiedades reológicas, por su capacidad complejante del almidón y de las proteínas.
- \* Mejorar la consistencia y textura de productos que contienen grasas, controlando el polimorfismo y estructura cristalina de las grasas.

Los emulsionantes poseen una amplia variedad de otras funciones, muchas de las cuales están interrelacionadas y que se resumen en la Tabla 2.7. Es importante indicar que en un sistema alimentario específico un emulsionante puede proporcionar una o varias de las funciones descritas. En muchos casos puede ser necesario usar dos o más emulsionantes conjuntamente para conseguir el efecto deseado. La funcionalidad puede depender también del nivel de adición. Con frecuencia un emulsionante puede conferir una función a un nivel y proporcionar una función completamente opuesta a otra concentración.

#### 2.6.5. Formación de películas en las interfases.

Las moléculas consideradas en esta sección poseen un grupo polar y una cadena hidrocarbonada. En una emulsión, se orientan hacia la fase acuosa u oleosa

según su solubilidad relativa en ambas fases. Las que son más solubles en la fase acuosa tienden a formar micelas. Las que son más solubles en la fase oleosa forman también micelas inversas, que son usualmente más pequeñas que las anteriores.

Como se observa en la figura 2.12, cuando estas sustancias se adsorben sobre la interfase, el grupo polar se orienta hacia el agua y la cadena hidrocarbonada hacia la fase oleosa. Esta orientación reduce la energía libre del sistema.

La ecuación que relaciona la cantidad de emulsionante adsorbido en la interfase ( $\Gamma$ ) desde una concentración ( $C$ ) en el seno de cualquiera de las fases se denomina isoterma de adsorción (Adamson, 1990):  $\Gamma = f(C)$

El estado termodinámico de una película adsorbida se describe mediante la ecuación superficial de estado:

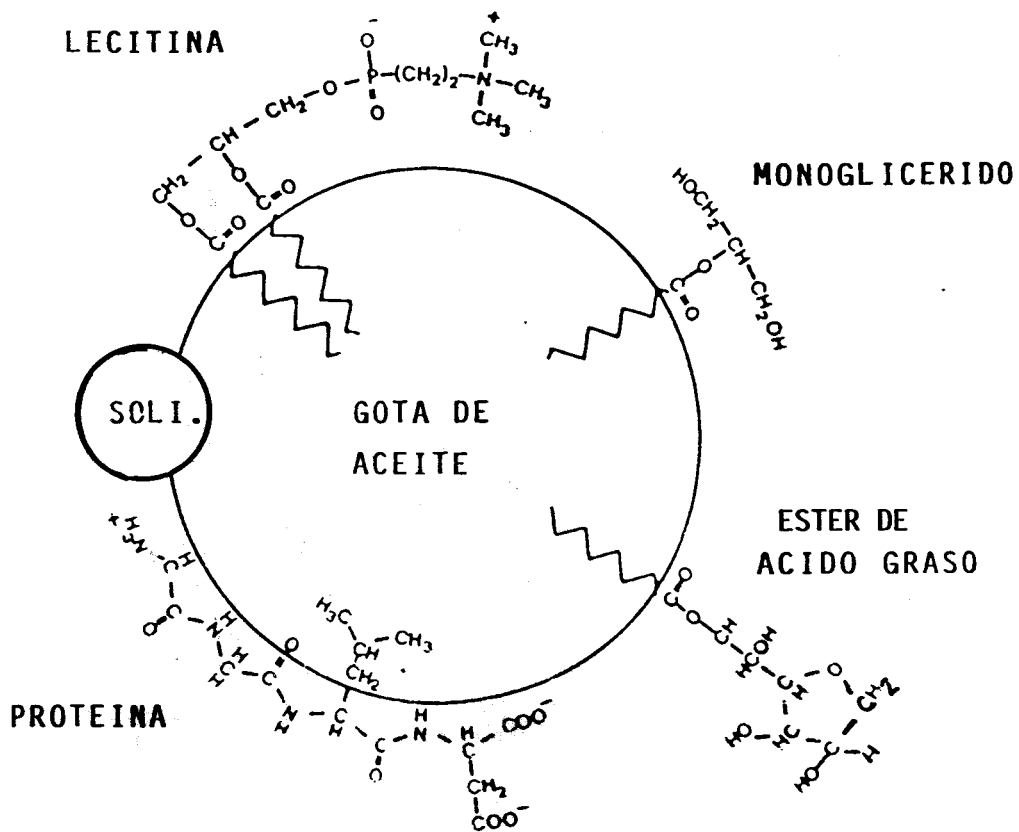
$$\pi = \sigma_0 - \sigma = f(\Gamma) \quad (2.14)$$

donde  $\pi$  es la presión superficial y  $\sigma$  y  $\sigma_0$  son las tensiones superficiales en presencia y ausencia de tensioactivo.

Esta ecuación es similar a la conocida tridimensional. Cuando las moléculas en la interfase poseen una estructura gaseosa, la ecuación anterior adopta la forma:

$$\pi \cdot A = n \cdot k \cdot T \quad \Rightarrow \quad P \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad (2.15)$$

donde  $A$  es el área de la interfase y  $n$  el número de moléculas adsorbidas.



**Figura 2.12.** Orientación de las moléculas de los emulsionantes en la interfase entre un medio acuoso y uno oleoso. Las líneas en zig-zag representan una cadena hidrocarbonada.

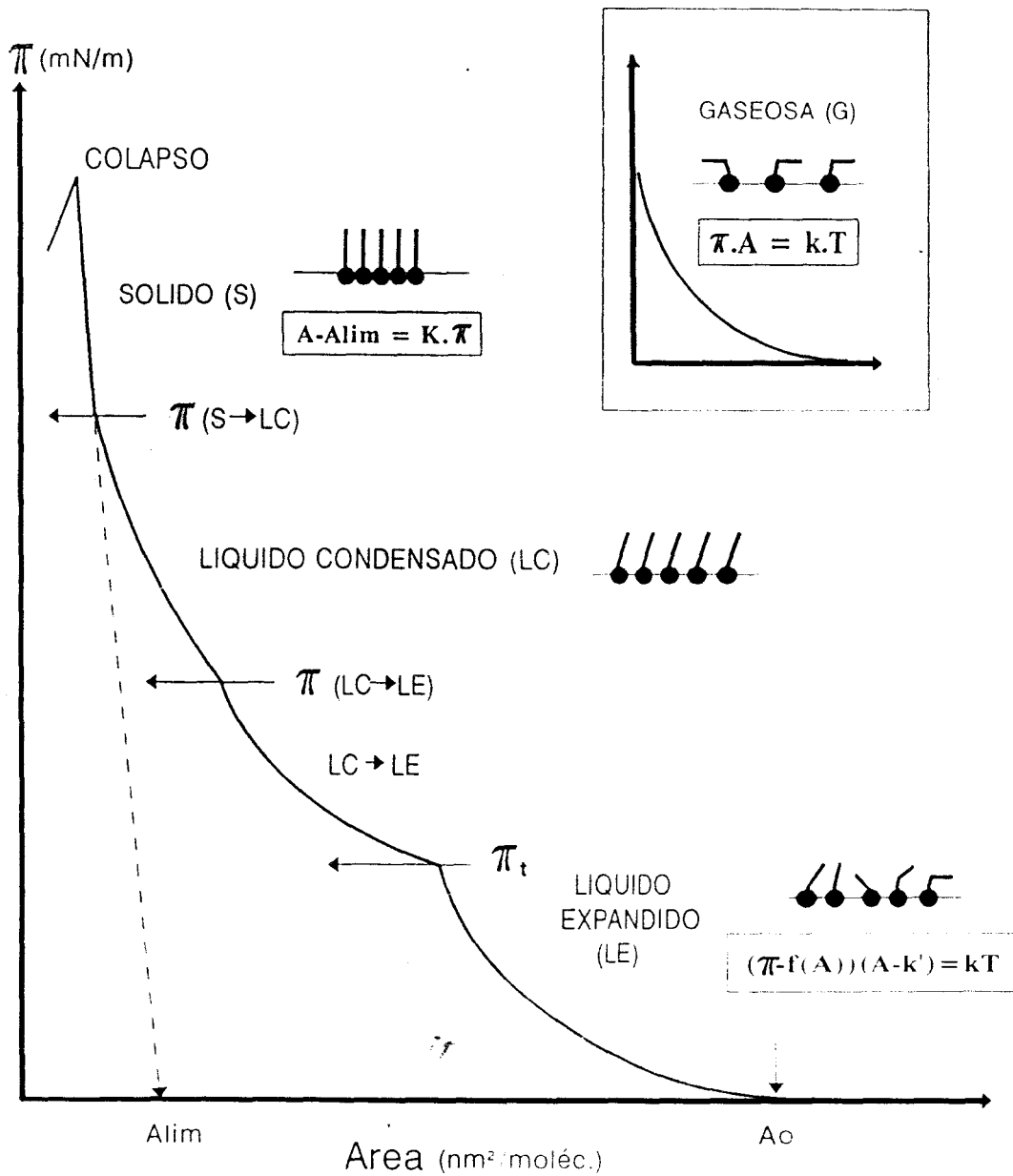
#### (A) Películas esparcidas. Monocapas.

Estas películas la forman los emulsionantes que son insolubles en el medio acuoso (como algunos lípidos), o aquéllos otros que siendo solubles en el medio acuoso, como las proteínas, forman películas estables sobre la interfase durante el tiempo de experimentación. La ecuación (2.15) no es aplicable para películas con moléculas más empaquetadas. En este aspecto resulta de gran utilidad el estudio de las

*monocapas* de estas sustancias en la interfase aire-agua, por analogía con la interfase aceite-agua. Esta experiencia se puede efectuar en una balanza de superficie (Gaines, 1966). Se pueden citar diversos estados de las monocapas relacionadas con un mayor o menor empaquetamiento de las moléculas (figura 2.13).

El diagrama de fase a temperatura constante, presión superficial-área por molécula, también denominado *isoterma  $\pi$ -A*, es de gran utilidad para obtener información acerca de las interacciones existentes entre las moléculas en la monocapa. Si dichas interacciones son tales que no limitan la libertad de movimiento de las moléculas sobre la superficie, la isoterma  $\pi$ -A presenta una variación hiperbólica ( $\pi \cdot A = k \cdot T$ ), que se denomina *monocapa gaseosa* (Gaines, 1966; Lange y Jeschke, 1987). En este tipo de monocapa se acepta la idea de que las moléculas adoptan una configuración prácticamente horizontal. El estado de máximo empaquetamiento molecular se denomina *monocapa sólida*, cuya isoterma  $\pi$ -A presenta una variación lineal ( $A - A_{lim} = K \cdot \pi$ , donde K es una constante y  $A_{lim}$  es el área límite, obtenida por extrapolación de la isoterma  $\pi$ -A). Este estado es equiparable al de un cristal bidimensional, en el que las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas adoptan una posición prácticamente vertical con respecto a la interfase, con los grupos polares inmersos en el medio acuoso y las largas cadenas estrechamente empaquetadas. Entre estos dos comportamientos extremos existe una amplia gama de estados intermedios, englobados dentro del denominado *estado líquido*, cuya nomenclatura no está sujeta a un mismo criterio según los distintos autores (Adam, 1941; Harkins, 1952; Dervichian, 1939; Albrecht, 1978, etc.). Admitiendo la nomenclatura recomendada por Adamson (1990), en el estado líquido se pueden distinguir dos tipos de monocapas: (a) *monocapa líquido-expandida*, en la que las moléculas adoptan una configuración intermedia entre las monocapas gaseosas y las monocapas sólidas (los diagramas  $\pi$ -A de estas películas presentan una gran curvatura); (b) *monocapa líquido-condensada*, en

la que las moléculas adoptan una estructura semisólida con una cierta cantidad de agua entre los grupos polares de las moléculas (la isoterma  $\pi$ -A presenta una curvatura, pero inferior a la de la monocapa líquido-expandida).



**Figura 2.13.** Isoterma  $\pi$ -A característica de un lípido esparcido sobre la interfase aire-medio acuoso con distintas estructuras (Gaines, 1966; Lange y Jeschke, 1987)

Al disminuir el área por molécula (es decir, al aumentar la densidad molecular superficial), aumentan las interacciones intermoleculares. Esto conduce, dependiendo del tipo de sustancia esparcida, de la composición del medio acuoso, de la temperatura, etc., a una transición desde el estado gaseoso a un estado más condensado (Gaines, 1966; Lange y Jeschke, 1987). A diferencia de las moléculas de grandes polímeros, como la de las proteínas, las películas de moléculas simples, como la de los lípidos, pueden presentar más de una estructura (Figura 2.13) en función de las condiciones de experimentación (Gaines, 1966). Las transiciones pueden ser de *primer orden*, como la existente entre las monocapas líquido expandida y líquido condensada, que implica una discontinuidad en el área molecular y en las propiedades termodinámicas implicadas, caracterizada por la existencia de una “meseta” en la isoterma  $\pi$ -A entre ambas estructuras; o de *segundo orden*, como la existente entre las monocapas sólida y líquido expandida, la cual se caracteriza por la existencia de un cambio brusco en la pendiente de la isoterma  $\pi$ -A.

Una cuestión de considerable interés teórico y práctico relacionada con las monocapas esparcidas es la de su estabilidad. Estas películas pueden estar sujetas a diferente grado de inestabilidad, siendo sus principales causas la formación de agregados tridimensionales sobre la interfase por *colapso de la monocapa*, o la *desorción de las moléculas* de la interfase y su paso al seno de la fase acuosa (Figura 2.14).

La transformación de una monocapa homogénea en otra heterogénea colapsada puede producirse por diversos mecanismos (Keyser, 1984; Ternes y Barnes, 1984; Smith, 1980, Pezron et al, 1990): (a) por fractura de la monocapa, (b) por formación de núcleos y posterior crecimiento, (c) por formación de multicapas y (d)

por formación de lentes líquidas sobre la interfase. Cualquiera que sea la causa del colapso, se define la *presión de colapso* como la mayor presión a la que se puede comprimir una monocapa sin que se produzca la expulsión de las moléculas para formar una nueva fase. Desde un punto de vista termodinámico, la *presión de esparcimiento en el equilibrio* (ESP) representa la máxima presión a la que se puede comprimir una monocapa esparcida sin que se produzca el colapso. Las películas de tensioactivos líquidos y de baja viscosidad colapsan a una presión igual a la ESP (Gaines, 1966; Phillips y Hauser, 1974). Las monocapas de tensioactivos sólidos o líquidos de elevada viscosidad, pueden ser comprimidas a presiones superiores a su ESP y permanecer en un estado metaestable durante ciertos periodos de tiempo antes de colapsar, pero en estos casos la película no está en equilibrio termodinámico.

A presiones superiores o inferiores a la ESP la monocapa puede ser inestable debido a la desorción de sus moléculas en el seno de la fase acuosa. Existen dos etapas implicadas en el proceso de desorción de una monocapa (Ter Minassian-Saraga, 1955; Gershfeld, 1982): (a) disolución de la monocapa desde la superficie hacia una región delgada, A, situada debajo de la misma, y (b) difusión de las moléculas disueltas a través de una capa inmóvil hacia el seno de la subfase, B, afectada por la convección (Figura 2.14).

Sin embargo las moléculas de una monocapa pueden estar sometidas a otras causas de inestabilidad, como se cita a continuación:

- (a) Evaporación.
- (b) Reología superficial.
- (c) Reacción química superficial.
- (d) Hidratación del grupo polar.



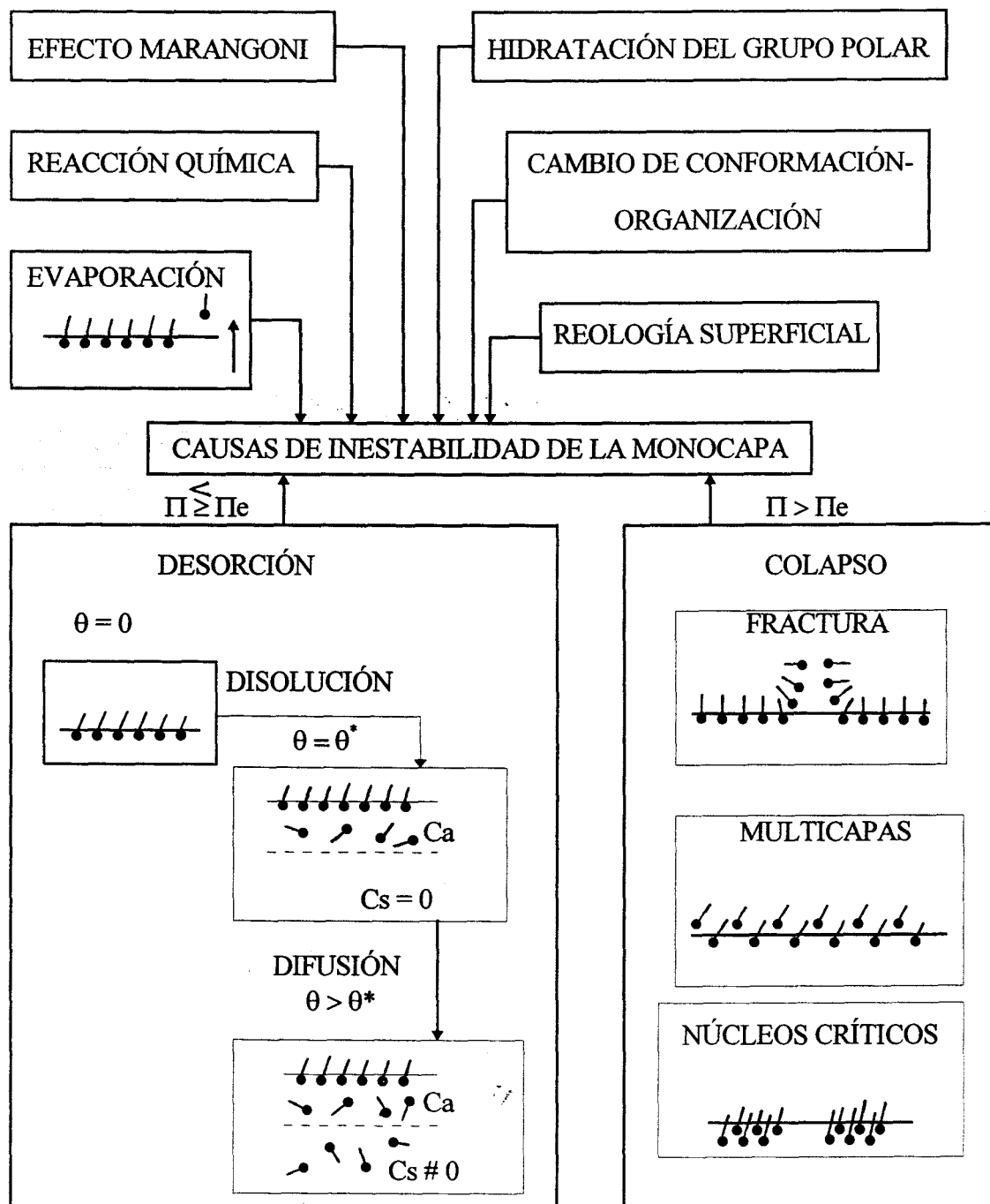


Figura 2.14. Causas de inestabilidad de una monocapa

- (e) Movimiento molecular de la monocapa y de la subfase, como resultado de un gradiente de presión superficial (efecto Marangoni).
- (f) Difusión superficial.
- (g) Cambios en la conformación molecular superficial.

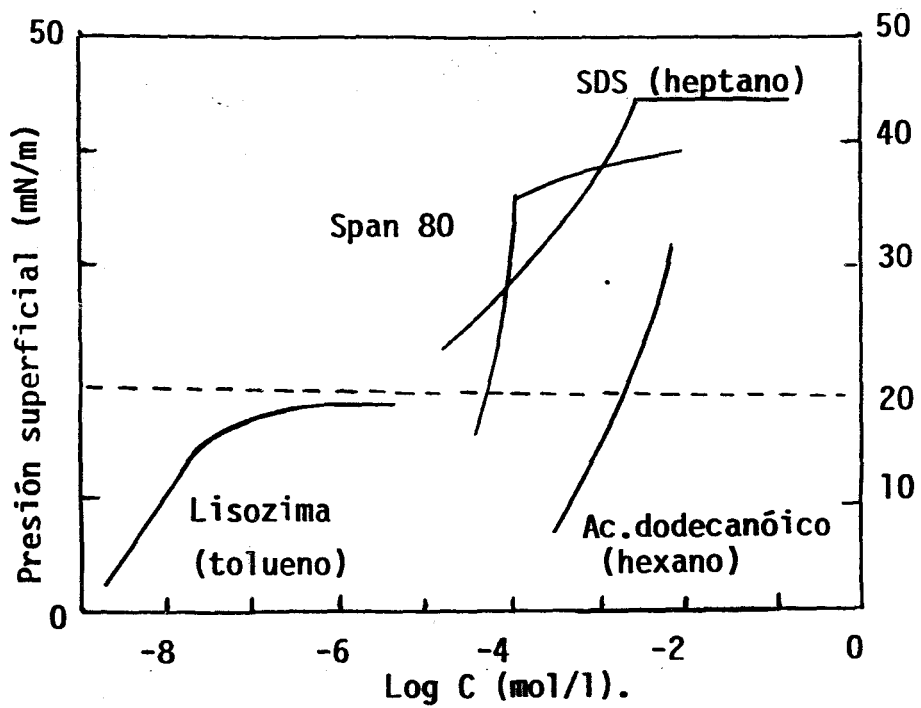


Figura 2.15. *Isotermas de adsorción de diferentes tensioactivos y proteínas.*

**(B) Películas adsorbidas.**

Estas películas la forman los emulsionantes (lípidos y proteínas) que son solubles en el medio acuoso. Aunque la cantidad de tensioactivo adsorbida sobre la interfase no es accesible normalmente por experimentación directa, resultan de gran utilidad las representaciones  $\pi = f(C)$ , como las que se muestran en la figura 2.15. Se observa la existencia de un incremento en escalón de la presión superficial a una concentración crítica, que se corresponde con la mayor concentración de monómero en el seno de la solución. Esta es, pues, una concentración crítica para la emulsificación (Krog, 1985). Sería necesario disponer de una mayor cantidad de lípido para formar una película estable en la interfase aceite/agua, y esto no es posible hasta que no se alcance un máximo en la concentración de monómero en el seno de la fase. Un principio de utilidad es que una buena medida de eficacia de adsorción es la concentración de tensioactivo en el seno de la fase necesaria para producir una presión de  $20 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ , ya que para muchos tensioactivos a esta concentración está saturada el 84% de la interfase.

### 2.7. INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA.

Las proteínas y los lípidos son los principales tensioactivos en la naturaleza. Asociados entre sí confieren las propiedades que se requieren para la regulación de la velocidad de reacción y la permeabilidad en los sistemas vivientes. Este hecho ha estimulado un gran número de estudios sobre películas mezcladas de proteínas y lípidos, con la esperanza de que tales sistemas modelos serían útiles para profundizar en el conocimiento de los componentes y de los procesos biológicos (MacRitchie, 1978; Cornell, 1982; Fidelio y Magio, 1986; Crowe et al., 1987; Kozarac et al., 1988, etc.). El estudio de las interacciones lípido-proteína es igualmente importante para la ciencia y tecnología de alimentos. Como se ha discutido en apartados previos ambos componentes constituyen la mayoría de los emulsionantes alimentarios. Además, en la mayoría de las formulaciones alimentarias coexisten conjuntamente lípido y proteínas como estabilizantes (Halling, 1981; Dickinson, 1987, 1989, 1992; Larsson, 1994; Leadbetter, 1990; Dickinson y Stainsby, 1987).

Las características físico-químicas y las interacciones de las proteínas con otros ingredientes de la formulación alimentaria determinan su utilidad y aplicaciones. Estas características, denominadas globalmente como propiedades funcionales, ejercen gran influencia sobre el procesado, preparación y atributos de calidad del alimento (Kinsella, 1978). Aunque las propiedades de un componente aislado (lípido o proteína) son importantes, es la forma en la que los distintos constituyentes del alimento interaccionan entre sí, lo que finalmente determina su funcionalidad y aplicaciones.

Las interacciones lípido-proteína de interés alimentario, en las interfases aire-agua y aceite-agua, ha originado igualmente una abundante bibliografía y técnicas de estudio (Karel, 1973; Sherman y Doxastakis, 1983; Rahman y Sherman, 1982; Kako y

Kondo, 1979; de Feijter et al., 1987; Ericsson y Hegg, 1985; Coke et al., 1990; Wilde y Clark, 1993; Chen et al., 1993; Miller et al., 1994; Rivas y Sherman, 1984; etc.). La interacción entre proteínas y lípidos polares puede producirse mediante diversos mecanismos (figura 2.15):

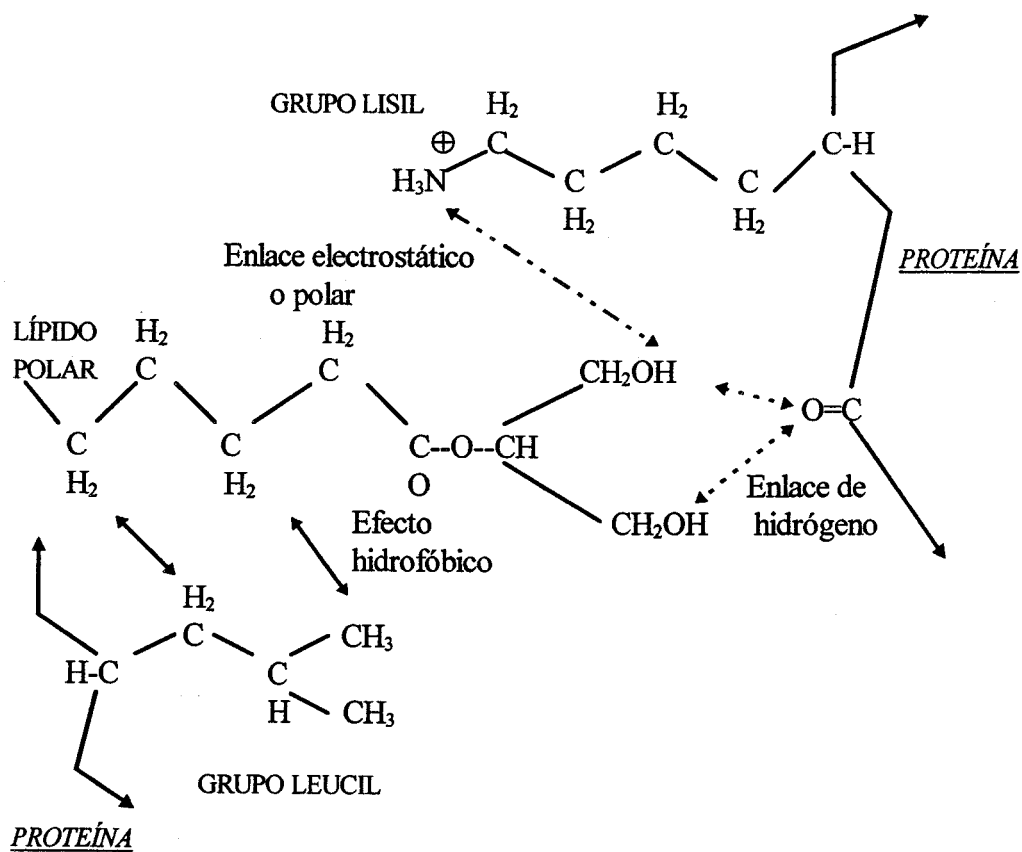


Figura 2.15. Posibilidades de enlace entre un lípido polar y una proteína.

- \* Enlaces electrostáticos entre los grupos hidroxilos cargados negativamente y los grupos de la proteína con carga positiva.

- \* Enlaces de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del lípido y el átomo de oxígeno de los grupos carboxilos de la proteína.
  
- \* Fuerzas de dispersión de carácter no polar o fuerzas de van der Waals, que adquieren importancia cuando los grupos que interaccionan están próximos. Estas fuerzas son débiles, pero en un medio acuoso, los grupos no polares de la proteína tienden a agruparse porque las interacciones de las moléculas agua-agua, debido a enlaces de hidrógeno, son más fuertes que las interacciones entre las moléculas de agua y los grupos no polares de la proteína. En consecuencia, la atracción entre los grupos no polares se incrementa significativamente, dando lugar a efectos hidrofóbicos.

A pesar del gran esfuerzo en investigación aplicado en estos estudios, aún existe un conocimiento limitado de cómo las proteínas se adsorben sobre las interfases (aire-agua, aceite-agua y sólido-agua) y de como compiten entre ellas y entre otras sustancias presentes, por la interfase. Este conocimiento es esencial para describir de una manera cuantitativa la relación entre la estructura molecular y las propiedades superficiales y emulsionantes de estos importantes constituyentes de los alimentos. El conocimiento de cómo los diferentes constituyentes de los sistemas coloidales interaccionan entre sí y de cómo se comportan bajo diferentes condiciones experimentales es de considerable interés científico y práctico (McClements, 1993). Este tipo de información es crucial para el desarrollo de nuevos productos o la mejora de los existentes.

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS.

De lo expuesto en los antecedentes bibliográficos se deduce, por su interés en el contexto de este estudio, que durante el proceso de formación de una emulsión o espuma se produce un significativo incremento del área interfacial, que depende del número y tamaño de las gotas de la fase dispersa. Por ello la fabricación de emulsiones y espumas son procesos dinámicos y consumidores de gran cantidad de energía. No obstante, debido a su elevada área interfacial, las emulsiones y espumas alimentarias son sistemas termodinámicamente inestables. Para su conservación temporal se añaden sustancias con actividad superficial denominadas emulsionantes, espumantes, agentes de superficie o, simplemente, tensioactivos. Su función es proteger rápidamente la gota o burbuja formada mediante el proceso mecánico previo, frente a la prematura coalescencia, por adsorción del tensioactivo sobre la superficie interfacial recién creada. La función que ejercen estos emulsionantes es complicada pero esencial, y depende de la naturaleza del emulsionante empleado y de la concentración del mismo, entre otros factores.

Las características que deben satisfacer los emulsionantes en el proceso de formación y estabilidad de una dispersión alimentaria (emulsión o espuma) se pueden resumir en los siguientes puntos:

- \* Reducir la tensión superficial o interfacial, porque:
  - \*\* disminuye el consumo energético del proceso.
  - \*\* reduce el tamaño de la fase dispersa (lo que es favorable para la estabilidad de la formulación).
  
- \* Formar una película protectora sobre la superficie de la fase dispersa, con una resistencia mecánica óptima.



- \* Adsorción sobre la superficie de la fase dispersa con una velocidad adecuada.

Los objetivos de este trabajo se han centrado en el estudio de las características dinámicas y estáticas de formación de una película de una proteína (BSA) y de las interacciones lípido-proteína sobre la interfase entre el aire y un medio acuoso, según se resume en los siguientes puntos:

1. Estudio de la cinética de formación de una película de proteína sobre la interfase aire-medio acuoso, en función de la temperatura y de la concentración de proteína en el medio acuoso. Como tales se ha usado disoluciones acuosas de etanol y sacarosa, que simulan formulaciones alimentarias. Para el esclarecimiento de los mecanismos que controlan la adsorción de la proteína sobre la interfase se han utilizado dos métodos experimentales diferentes:
  - 1.1. Para tiempos prolongados de adsorción, se ha usado un tensiómetro digital Krüss, utilizando el método de la placa de Wilhelmy.
  - 1.2. Para tiempos cortos de adsorción, se ha usado un tensiómetro automático basado en el método de la gota pendiente.
2. Estudio de la isoterma de adsorción de la proteína sobre la interfase aire-medio acuoso, utilizando el método de la placa de Wilhelmy.
3. Estudio de las características reológicas superficiales de lípidos insolubles (monoestearina, monooleína y sus mezclas) y solubles (Tween 20) en el medio acuoso, en función de la concentración de lípido sobre la interfase. Se ha utilizado una balanza de superficie especial que se basa en el uso de una onda superficial.

4. Estudio de las interacciones lípido-proteína sobre la interfase aire-medio acuoso. En este apartado se estudian las mismas disoluciones citadas en el primer apartado, haciendo uso de distintas técnicas experimentales.

4.1. *Tensiometría*. Se analizará la variación de la tensión superficial con el tiempo y el valor de la propiedad en el equilibrio, cuando sobre una película de proteína, previamente adsorbida sobre la interfase, se esparce un lípido insoluble en el medio acuoso (monoestearina o monooleína), o se inyecta en el seno de la fase acuosa de un lípido soluble (Tween 20)

4.2. *Reología superficial*. Se analizará las características reológicas superficiales mediante experiencias oscilatorias de compresión-expansión, haciendo uso de una balanza de superficie que utiliza el método de amortiguación de una onda superficial, sobre los sistemas citados en el apartado 4.1.

4.3. *Microscopía de epi-iluminación*. Estudio de la movilidad superficial (drenaje) en películas de Tween 20, de BSA y de sus mezclas, en función de la composición de la interfase y del medio acuoso.

4.4. *Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP)*. Mediante esta técnica experimental se determinará el coeficiente de difusión interfacial de películas de Tween 20, BSA y de sus mezclas, en función de la composición de la interfase y del medio acuoso.

## **4. MÉTODOS EXPERIMENTALES**

## 4. MÉTODOS EXPERIMENTALES.

### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS.

La proteína usada en este estudio (albúmina del suero bovino, BSA) fue adquirida de la firma Fluka y posee una pureza superior al 96%. Los lípidos insolubles en el medio acuoso, monoestearina (monooctadecanoil-rac-glicerol) y monooleína (1-mono(cis-9-octadecenoil)glicerol) fueron adquiridos de la firma Sigma y posee una pureza superior al 99%. El Tween 20 (monolaurato de sorbitano y polióxido de etileno (20)) de alta pureza fue adquirido de la firma Pierce Chemical Co. El ODAF (5-N-(octadecanoil)aminofluoresceína), número de catálogo 0-322, fue adquirido de Molecular Probes Inc. Los restantes reactivos utilizados fueron: etanol (Merck, pureza superior al 99,8%), hexano (Merck, pureza superior al 99%), sacarosa (Fluka, riqueza superior al 99,5%), fosfato monopotásico (Merck, pureza del 99,5%) y fosfato dipotásico (Merck, pureza del 99%). Todos los productos citados fueron utilizados directamente, sin someterse a purificación posterior. El agua usada fue purificada por medio de una unidad de filtración-ósmosis Millipore (Mille Q). La ausencia de contaminantes en el agua y en las disoluciones acuosas utilizadas fue comprobada mediante medida de la tensión superficial.

## 4.2. DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES.

### 4.2.1. Tensiometría.

El seguimiento de la adsorción de la BSA o de las interacciones BSA-lípido sobre la interfase aire-medio acuoso (en condiciones dinámicas o estáticas), según la tensiometría, se basa en la medida de la tensión superficial. Los métodos de medida de la tensión superficial se pueden clasificar de la siguiente forma:

- A) Procedimientos basados en la medida de una fuerza.
  - \* Método del anillo (de Nouy).
  - \* Método de la placa (Wilhelmy).
  - \* Método del marco (Lenard).
  
- B) Procedimientos basados en la medida de una presión.
  - \* Método de elevación en tubo capilar.
  - \* Método de máxima presión en burbujas gaseosas.
  
- C) Procedimientos basados en una medida geométrica.
  - \* Método de la gota pendiente.
  - \* Método de la gota sésil.
  - \* Método del volumen de la gota.
  - \* Método de la gota girante.
  
- D) Métodos de medida dinámicos.
  - \* Onda superficial.
  - \* Chorro oscilante de líquido.
  - \* Burbuja pulsante.

La selección de un cierto método depende de las condiciones experimentales, de la temperatura y del intervalo de tiempo de la investigación a realizar. Estas condiciones experimentales están controladas por la actividad superficial del tensioactivo o polímero sometido a estudio y por su concentración. Algunas de las características de los métodos disponibles para la determinación de la tensión superficial dinámica y sus intervalos de aplicación se muestran en la tabla 4.1. La sensibilidad de la mayoría de los métodos indicados, sobre el intervalo de tiempo de segundos a horas, es de  $\pm 0.1$  mN/m. Si bien se incluye en la clasificación instrumentos capaces de realizar medidas en el intervalo de tiempo de milisegundos, la sensibilidad de las medidas es mucho menor (del orden de  $\pm 1$  mN/m).

**Tabla 4.1.** Características de los métodos dinámicos recomendables para la medida de la tensión superficial o interfacial.

Método	Intervalo de tiempo	Intervalo de temperatura	Aplicabilidad a la interfase	
			L-G	L-L
Volumen de la gota	1 s - 20 min	10 - 90 °C	SI	SI
Máxima presión de burbuja	1 ms - 100 s	10 - 90 °C	SI	NO
Gota pendiente	0.1 s - 24 h	20 - 25 °C	SI	SI
Tensiómetro de anillo	30 s - 24 h	20 - 25 °C	SI	SI
Tensiómetro de placa	10 s - 24 h	20 - 25 °C	SI	SI
Crecimiento de gotas y burbujas	0.01 s - 600 s	10 - 90 °C	SI	SI
Relajación de gota	1 s - 300 s	10 - 90 °C	SI	SI
Anillo elástico	10 s - 24 h	20 - 25 °C	SI	NO
Burbuja pulsante	0.005 s - 0.2 s	20 - 25 °C	SI	NO
Chorro oscilante	0.001 s - 0.01 s	20 - 25 °C	SI	NO

A continuación se describen brevemente los métodos de medidas que se ha usado en este estudio, dependiendo del tiempo de adsorción.

#### 4.2.1.1. Método de la placa de Wilhelmy.

Este método experimental se ha utilizado para la medida de la adsorción de la proteína y de las interacciones lípido-proteína a tiempos largos (de horas o, incluso de días). La técnica considerada posee una gran importancia debido a su universalidad, precisión y simplicidad. Se fundamenta en que las moléculas de la interfase están sujetas a un esfuerzo (tensión). Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado  $L$ . Recordando su naturaleza vectorial y resolviendo la integral sobre la longitud mojada total del sólido se obtiene la fuerza resultante  $R$ :

$$R = \int_L^0 \sigma \cdot dL \quad (4.1)$$

donde  $\sigma$  es la tensión interfacial o superficial. Esta fuerza  $R$  puede medirse fácilmente y con precisión.

Una lámina de platino rectangular, suspendida verticalmente, con una geometría exactamente conocida sirve como sistema de medida. El borde inferior de la lámina se pone en contacto con el líquido y de ese modo se moja. La fuerza  $k$  con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse. Si  $L_b$  es la longitud mojada:

$$\sigma = \frac{k}{L_b \cdot \cos \theta} \quad (4.2)$$

donde  $\theta$  simboliza el ángulo de contacto; es decir, el ángulo entre la superficie de la lámina y la tangente a la línea de mojado (ver figura 4.1). Cuando el mojado es total el ángulo de contacto es cero. Este es el caso para las láminas de platino rugoso, que son los que se utilizan generalmente.

La principal ventaja de este método es que no son necesarias correcciones hidrostáticas. Una ventaja adicional es que no se tiene que producir superficies nuevas para la medida, lo cual es muy importante cuando se utilizan soluciones con impurezas.

El método, denominado también como su inventor Wilhelmy (1863), se basa en la medida de una fuerza (ecuación 4.1) como en el método del anillo. Aunque este método tiene una historia de al menos 130 años, su popularidad en Europa es reciente. En Estados Unidos es prácticamente el método más utilizado desde los años cincuenta.

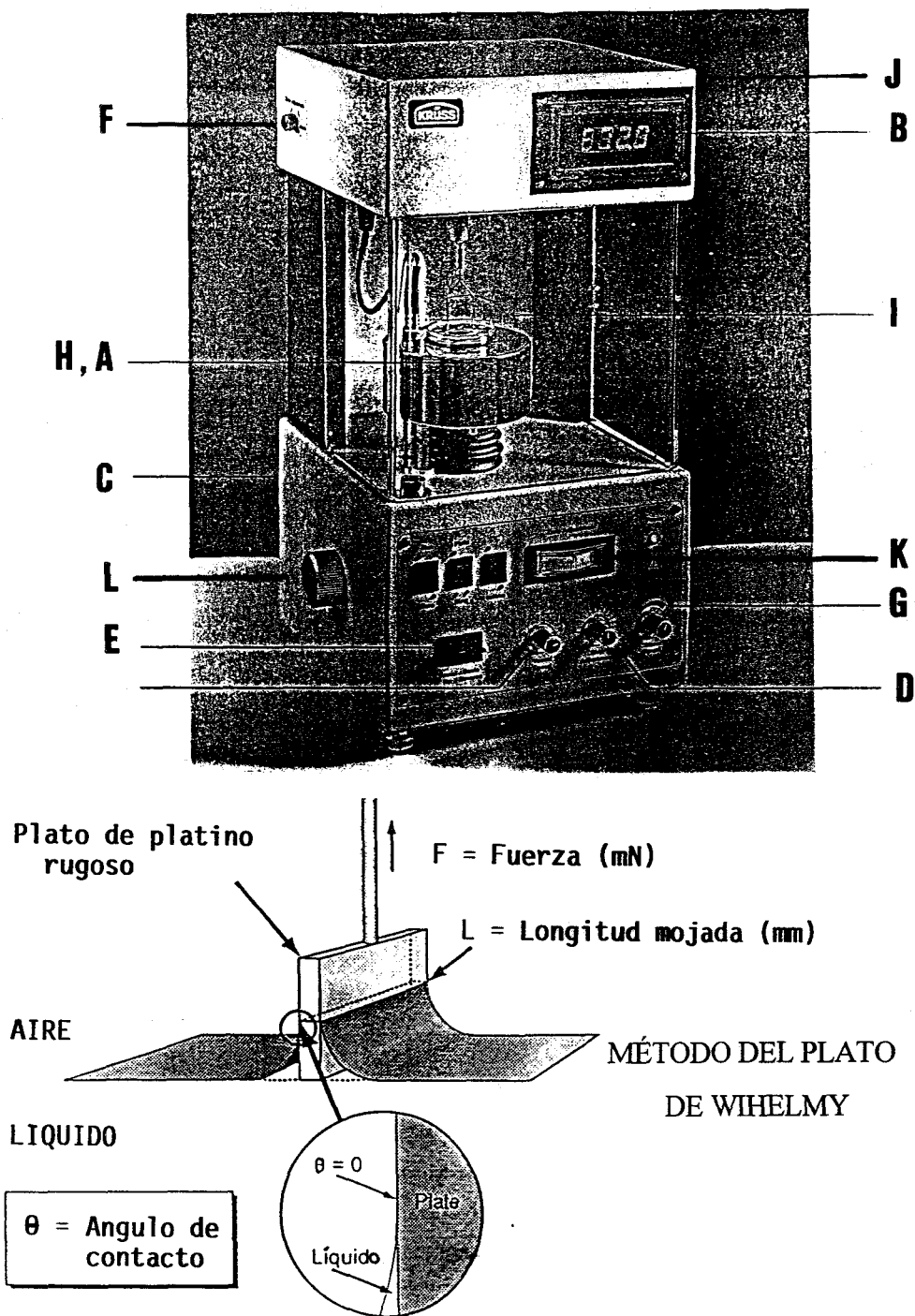
#### **A) El sistema de medida.**

El sistema de medida lo constituye una lámina de platino suspendido verticalmente, cuya superficie tiene una fina rugosidad para que se moje más fácilmente. La longitud mojada viene dada por:  $2l + 2b$ . En este estudio las dimensiones del plato son:  $l = 19,9$  mm y  $b = 0,1$  mm, por lo tanto  $L_b = 40$  mm.

#### **B) Procedimiento de medida. Interfase líquido-gas (tensión superficial).**

El sistema de medida con la lámina suspendida se calibra antes de que se ponga en contacto con la muestra. El recipiente con la muestra se eleva hacia el borde inferior del plato hasta que el líquido "salte". Es decir, cuando el plato se humedece. La fuerza resultante  $k$ , debida al mojado, se puede medir. El ajuste que se muestra en la figura 4.1





**Figura 4.1.** Dispositivo experimental (tensiómetro Krüss). (A) Camisa de circulación del agua de termostatación, (B) visualización digital de la medida, (C) compartimento cerrado de medida, (D) salida analógica de datos, (E) interruptor de repetición de la medida y de la elevación motorizada de la célula de medida, (F) ajuste de cero, (G) agitador, (H) contenedor de la muestra, (I) lámina de Wilhelmy en posición de medida, (J) interruptor de ajuste del cero, (K) control del ajuste del cero, (L) elevador manual de la célula de medida.

se puede mantener por un período de tiempo. Esto proporciona una medida continua de la tensión superficial, sin que sea necesaria la formación de nueva superficie. Ha de tenerse cuidado en que, en caso de cambio de la tensión superficial, el borde inferior del plato permanezca en su posición original. Si se cambia el líquido ha de repetirse el procedimiento.

### C) Evaluación.

La evaluación de la tensión superficial o interfacial se realiza mediante la ecuación 4.2. Debido a que, como se ha indicado anteriormente, no es necesaria la corrección hidrostática, el ángulo de mojado  $\theta$  ha de considerarse. En la realidad es correcto, para agua y soluciones acuosas con películas interfaciales libres, asumir que  $\theta = 0$ ; es decir, el mojado total es dominante. La ecuación descriptiva se reduce entonces a:  $\sigma = k/L_b$ .

### D) Precisión de las medidas.

La precisión de las medidas por el método de la lámina está teóricamente limitada solamente por la geometría de la lámina y por la precisión en la medida de la fuerza.

En la práctica es difícil mantener la superficie libre de una película durante un período dado de tiempo, por lo tanto la pureza de la superficie limita la precisión de las medidas. Medidas de precisión superior a  $\pm 0,2$  mN/m se obtienen solo por procedimientos extremadamente cuidadosos. Por ejemplo, bajo la atmósfera de un gas inerte.

#### 4.2.1.2. Método de la gota pendiente.

Para el estudio de la etapa inicial de difusión de la proteína hacia la interfase que, dependiendo de las condiciones de operación, puede ser la controlante del proceso, se ha de recurrir a métodos experimentales distintos al de la placa de Wilhelmy, utilizado en las experiencias previas. Para los estudios dinámicos de adsorción a tiempos cortos existen diferentes métodos experimentales (Tabla 4.1) (Miller et al, 1994, Miller et al 1995). A continuación se describe el método de la gota pendiente (*pendent drop technique*), que ha sido el utilizado en este estudio.

##### A) Evaluación.

El método de la gota pendiente se ha desarrollado para determinar la tensión superficial o interfacial a partir de la forma de las gotas. Los primeros dispositivos experimentales fueron diseñados para medir el diámetro característico de la gota e interpretar los datos con ayuda de diferentes tablas (Fordham, 1948; Stauffer, 1965). Posteriormente, la correlación entre las coordenadas de la forma de la gota y la ecuación de Gauss-Laplace fue utilizada para determinar la tensión interfacial y el ángulo de contacto (Maze y Burnet, 1971; Rotenberg et al, 1983; Girault et al 1984; Anastasiadis et al, 1987; Cheng , 1990; Cheng et al, 1990). Determinadas revisiones sobre la aplicación de la técnica pueden consultarse, por ejemplo, en Padday (1969), Neumann y Good (1979), Ambwami y Fort (1979) o Boucher (1987).

La descripción del menisco de un líquido mediante la ecuación de Gauss-Laplace fue descrita en detalle por Padday y Russel (1960) y Padday et al (1975). El perfil de una gota axisimétrica puede calcularse en coordenadas adimensionales a partir de las siguientes ecuaciones (Rotenberg et al 1983):

$$d\phi/dS = 2 - \beta Y - \text{sen}\theta/X$$

$$dX/dS = \cos\theta$$

$$dY/dS = \text{sen}\theta$$

donde X, Y, S se hacen adimensionales al dividir x, y, s por Ro, respectivamente, siendo x e y las coordenadas horizontal y vertical y s es la longitud del perfil del arco medido por el radio de curvatura y el eje y. El parámetro  $\beta = \Delta\rho g R^2 / \sigma$ , contiene la diferencia de densidades de las fases ( $\Delta\rho$ ) y la tensión superficial del líquido ( $\sigma$ ). La definición de todas las coordenadas y de los parámetros característicos se muestran en la figura 4.2.

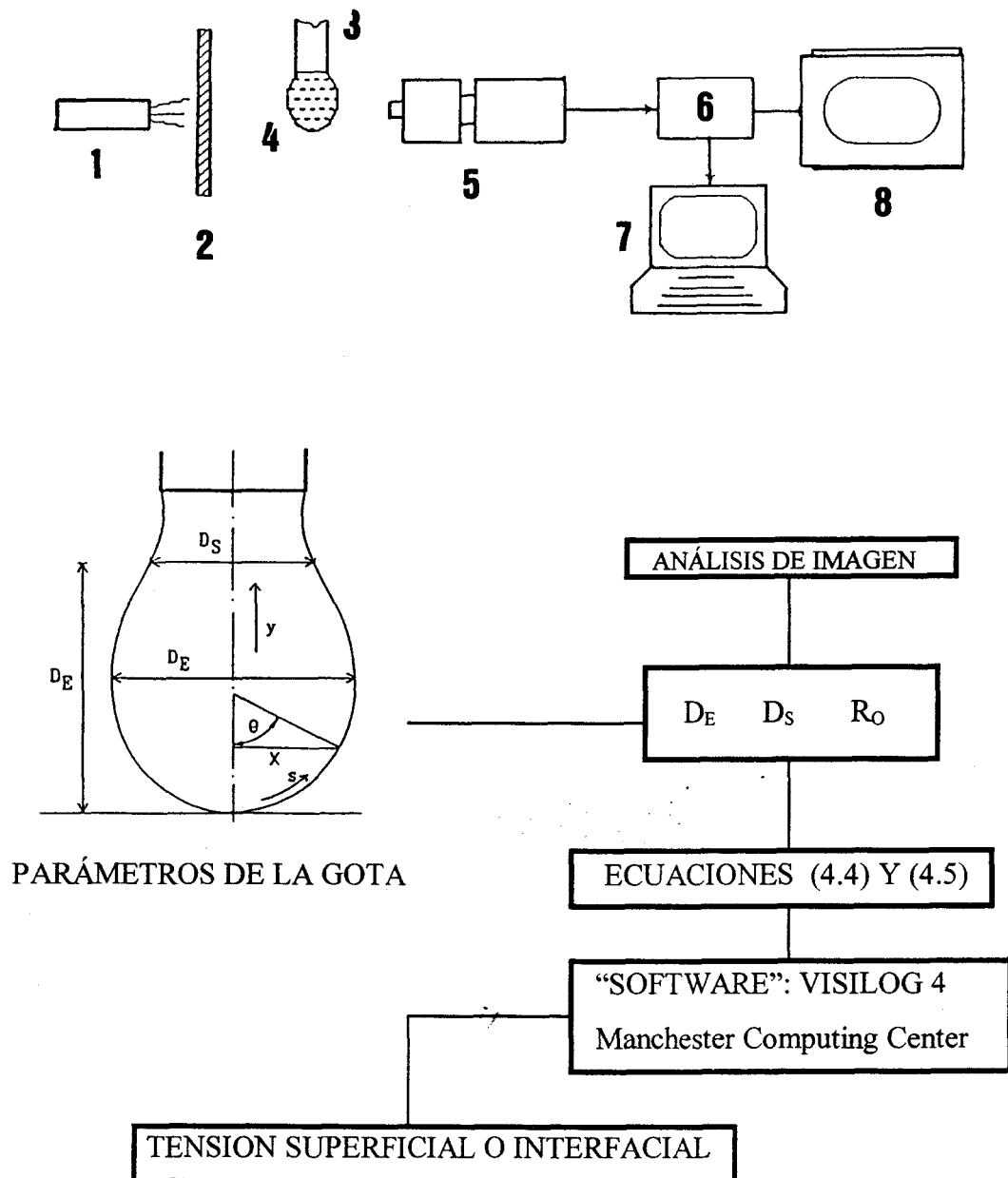
La tensión superficial puede ser calculada a partir de las dimensiones características de la gota,  $D_E$  y  $D_S$  (Andreas et al, 1938; Girault et al, 1984; Hansen y Rodsrud, 1991). Girault et al (1984) desarrolló la siguiente ecuación para calcular  $\sigma$  a partir de la razón  $D_S/D_E$ :

$$\Delta\rho g R^2 / \sigma = 0'02664 + 0'62945[(D_S/D_E)^2] \quad (4.3)$$

Hansen y Rodsrud derivaron una relación mejorada para el cálculo de  $\sigma$ :

$$\Delta\rho g R^2 / \sigma = 0'12836 - 0'7577(D_S/D_E) + 1'7713(D_S/D_E)^2 - 0'5426(D_S/D_E)^3 \quad (4.4)$$

Para la aplicación de las ecuaciones (4.3) o (4.4) se necesita conocer los diámetros  $D_E$  y  $D_S$  y el radio de curvatura  $R_0$ . Para valores de  $0.1 < \beta < 0.5$ ,



**Figura 4.2.** Esquema de un dispositivo automático para la determinación de la tensión superficial según la técnica de la gota pendiente. (1) Fuente luminosa, (2) difusor, (3) capilar, (4) gota, (5) microscopio y videocámara, (6) digitalizador, (7) ordenador, (8) monitor .

Hansen y Rodsurd (1991) proponen usar el siguiente polinomio para el cálculo de  $R_o$ ,

$$D_E / 2R_o = 0'9987 + 0'1971\beta - 0'0734\beta^2 + 0'34708\beta^3 \quad (4.5)$$

Así pues, haciendo uso de las ecuaciones (4.4) y (4.5) puede calcularse la tensión superficial, directamente a partir de las dos dimensiones características de la gota,  $D_E$  y  $D_S$ . Para correlacionar las coordenadas experimentales a la forma de la gota se han de ajustar cuatro parámetros: la localización de los vértices de la gota  $X_o$  e  $Y_o$ , el radio de curvatura  $R_o$  y el parámetro  $\beta$ . En el dispositivo experimental utilizado, y con la ayuda de un programa informático, se puede realizar automáticamente la detección de la gota, el cálculo de sus coordenadas y el ajuste de las mismas a la ecuación de Gauss-Laplace.

#### **B) Dispositivo experimental.**

Se han desarrollado diversos dispositivos experimentales para determinar la tensión superficial o interfacial a partir de la forma de la gota (Nahringbauer, 1987; Bordi et al, 1989; Cheng et al. 1990; Hansen y Rodsurd, 1991; Carla et al, 1991; MacMillan et al, 1992, 1994; Racca et al, 1992; Naidich y Grogerenko, 1992). El dispositivo experimental utilizado en este estudio (Figura 4.2) es similar al desarrollado por Cheng et al (1990).

La gota se forma en el extremo de una jeringa micrométrica, que termina en un capilar en el interior de una cubeta de cuarzo. En el interior de la cubeta se introduce una pequeña porción del líquido de medida, para saturar la atmósfera

durante el tiempo de experimentación. Una luz difusa permite la visualización de la gota que se forma en el extremo del capilar, la cual es captada mediante una cámara de vídeo conectada a un microscopio. La señal de vídeo se transmite a un procesador-digitalizador, que graba y procesa los datos geométricos de la imagen. El ordenador permite la adquisición, el análisis de la imagen y la realización de los cálculos necesarios. Para tal fin se ha usado el programa *Visilog 4* (Manchester Computing Center, UK). Tanto el ordenador como el programa utilizado permite la adquisición de imágenes de la gota cada 0'66 segundos

### **C) Procedimiento experimental.**

El procedimiento experimental consiste en la formación de una gota en el extremo de la jeringa, momento en el cual comienza la determinación dinámica de la tensión superficial. El sistema de análisis de imagen capta imágenes de la gota cada 0'66 segundos, hasta que se completan los 65 segundos iniciales de adsorción. Estos datos son almacenados en el ordenador para su posterior análisis y procesado, una vez finalizada la experiencia. Todas las medidas se realizan a la temperatura de 20 °C. Los datos que se presentan son los valores medios de al menos cuatro determinaciones. La desviación media de los datos experimentales es inferior a  $\pm 0,5$  mN/m, mayor que la sensibilidad del método de medida ( $\pm 0,1$  mN/m).

### **D) Determinación de la densidad.**

Para el cálculo de la tensión superficial por aplicación de la ecuación (4.4) se requiere el valor de la diferencia de densidades entre el líquido de medida y el aire. Puesto que las experiencias se realizan a la temperatura de 20 °C, la densidad

del aire permanece constante ( su valor es de  $1,18 \cdot 10^{-6} \text{ kg.m}^{-3}$ ). Las densidades de los sistemas estudiados fueron determinadas mediante un densímetro digital ANTON PAAR, Mod. DMA 46, a la temperatura de 20 °C. El calibrado del densímetro se realizó con aire y agua doblemente destilada. El volumen de muestra utilizada en cada medida fue de 0,7 ml. Las medidas se repitieron por triplicado, con un tiempo de espera entre medidas superior al requerido para conseguir la temperatura de equilibrio prefijada (3,5 minutos). La reproducibilidad de las medidas es del mismo orden de magnitud que la sensibilidad del método ( $\pm 0,1 \text{ kg.m}^{-3}$ ). Los valores de las densidades de los sistemas estudiados se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Densidades de disoluciones acuosas de BSA a 20 °C.

Sistema	Densidad ( $\text{kg.m}^{-3}$ ). $10^3$
BSA (1%)-agua	1,0073
BSA (0,1%)-agua	1,0051
BSA ( $1 \cdot 10^{-2}$ %)-agua	1,0050
BSA ( $1 \cdot 10^{-3}$ %)-agua	1,0047
BSA (0,1%)-etanol 0.1M	1,0038
BSA (0,1%)-etanol 0,25M	1,0022
BSA (0,1%)-etanol 0,5M	1,0003
BSA (0,1%)-etanol 1M	0,9961
BSA (0,1%)-etanol 2M	0,9902
BSA (0,1%)-sacarosa 0,1M	1,0187
BSA (0,1%)-sacarosa 0,25M	1,0373
BSA (0,1%)-sacarosa 0,5M	1,0705
BSA (0,1%)-sacarosa 1M	1,1342
BSA (0,1%)-etanol 1M/sacarosa 0,5M	1,0525



Un resumen de las experiencias de tensiometría realizadas se muestra en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Experiencias de adsorción de BSA e interacciones lípido-BSA, mediante la técnica de tensiometría.

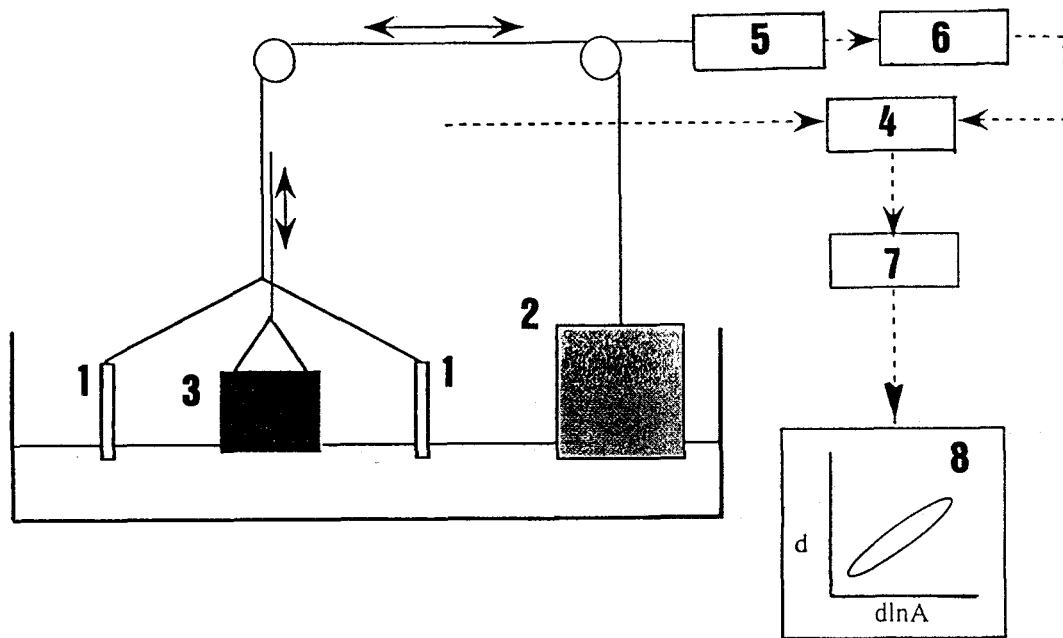
Subfase	Adsorción BSA Interacciones BSA- lípido $\theta > 10$ s	Adsorción BSA Interacciones BSA- lípido $\theta < 10$ s	Adsorción BSA. Interacciones BSA- lípido + convección
Agua	●/●●/●●●♣♠	●/●●	●/●●♣♥♦♠/♠♠
Etanol 0,1M		●	●♣
Etanol 0,25M		●	
Etanol 1M	●/●●♣♠	●	●♣♥♦♠/♠♠
Etanol 2M		●	●♣
Sacarosa 0,1M		●	
Sacarosa 0,25M		●	
Sacarosa 0,5M	●/●●♣♠	●	●♣♥♦♠/♠♠
Sacarosa 1M		●	
Etanol 1M+ sacarosa 0,5M			
<p>(●): Adsorción de BSA 0,1%.</p> <p>(●●): Efecto de la concentración de BSA.</p> <p>(●●●): Efecto de la temperatura.</p> <p>(♣): Interacciones BSA-monoestearina y BSA-monooleína.</p> <p>(♥): Interacciones BSA-Tween 20.</p> <p>(♦): Adsorción de Tween 20.</p> <p>(♠): Esparcimiento de monoestearina y monooleína.</p> <p>(♠♠): Esparcimiento de mezclas de monoestearina y monooleína.</p>			

#### 4.2.2. Viscosimetría dilatacional superficial.

Las técnicas de medida de las propiedades dilatacionales de películas de tensioactivos pueden englobarse en dos categorías: las que miden la deformación de una gota o burbuja y aquellas otras que miden las características de una onda superficial. La técnica utilizada en este estudio pertenece a la segunda categoría. Graham y Phillips (1980), en un trabajo clásico sobre las características de películas de proteínas, usaron la técnica del plato de Wilhelmy para el estudio de las propiedades mecánicas dilatacionales de estas películas, en las interfases aire-agua y aceite-agua. Una de las técnicas más prometedoras en la actualidad comprende el uso de una onda longitudinal (Lucassen y van den Temple, 1972; Graham et al., 1979; Maru y Wasan, 1979; Maru et al, 1979; Djabbarah y Wasan, 1982; Miller et al, 1991a; 1991b; Dussand y Vignes-Adler, 1994a, 1994b).

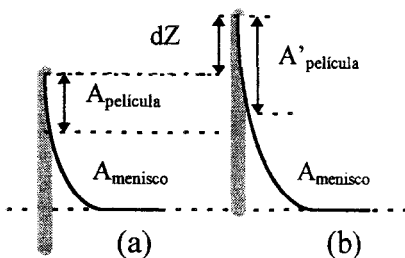
##### (A) Dispositivo experimental. Evaluación.

Para determinar el módulo dilatacional superficial se aplica una pequeña deformación dilatacional superficial y se mide el cambio sinusoidal resultante en la tensión superficial. Las experiencias se han realizado en una balanza de superficie especial, diseñada por el Prof. Prins en la Universidad de Wageningen, Holanda (Kokelaar et al., 1991). En esencia, el dispositivo experimental utilizado (Figura 4.3) consiste en una batea circular (que se mantiene a temperatura constante), conteniendo 200-250 ml del líquido de medida. La compresión-expansión sinusoidal de la película adsorbida se origina mediante el menisco formado por un anillo de vidrio de 9'5 cm de diámetro interior, que se mueve en sentido ascendente-descendente, en el seno de la disolución de medida, con una amplitud y frecuencia fijadas. El cambio de área originado por la oscilación produce una variación de la presión superficial, que se mide por medio de una placa de Wilhelmy, situada en el centro del anillo en contacto con el líquido de medida. La



$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} \quad E = |E|(\cos\theta + i.\text{sen}\theta) \quad \text{tg } \theta = \frac{\eta_s \cdot \omega}{E_d}$$

$$|E| = \sqrt{E_d^2 + (i.\eta_d \omega)^2}$$



Área superficial del menisco líquido dentro del anillo. (a) Antes y (b) después de un desplazamiento "dZ" del anillo.

**Figura 4.3.** Esquema del viscosímetro oscilatorio superficial "Ring Trough". (1) anillo de vidrio rugoso, (2) contrapeso (cilindro sólido de igual volumen al del anillo mojado), (3) plato de Wilhelmy de vidrio rugoso, (4) tensiómetro, (5) motor síncrono, (6) potenciómetro medidor del desplazamiento sinusoidal del anillo, (7) convertidor D/A, (8) ordenador-registrador

relación entre ambos parámetros proporciona el valor del módulo dilatacional dinámico o, simplemente, modulo dilatacional , E, (Lucassen y van den Temple, 1972):

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = -\frac{d\pi}{d \ln A} \quad (4.6)$$

donde A es el área disponible para las moléculas en la interfase, dA es la amplitud de la deformación y dσ y dπ son las variaciones de la tensión superficial y de la presión superficial, respectivamente, como consecuencia de la perturbación de la interfase.

El módulo dilatacional (E) es una magnitud compleja que está compuesta por una parte real y otra imaginaria:

$$E = |E|(\cos\theta + i.\text{sen}\theta) \quad (4.7)$$

donde θ es el ángulo de pérdida e  $i = (-1)^{1/2}$ . La parte real del módulo dilatacional, también denominada *componente de almacenamiento*, es la elasticidad dilatacional (Ed):

$$E_d = |E| \cos \theta \quad (4.8)$$

La componente elástica puede suponer aproximadamente el 90-95% del valor del módulo dilatacional superficial, especialmente para disoluciones acuosas de proteínas. En contraste, la parte imaginaria del módulo dilatacional, también denominada *componente de pérdida*, es la viscosidad dilatacional superficial ( $\eta_d \cdot \omega$ ), que normalmente constituye un porcentaje menor del módulo dilatacional, especialmente en el caso de proteínas y de la mayoría de los lípidos. La viscosidad dilatacional superficial se define como:

$$\eta_d \cdot \omega = E \tan \theta \quad (4.9)$$

donde  $\omega$  es la frecuencia de la deformación, medida en ciclos por segundos.

La relación entre ambas componentes del módulo dilatacional se denomina *tangente del ángulo de pérdida*:

$$\tan \theta = \frac{\eta_d \cdot \omega}{E_d} \quad (4.10)$$

Si la película se comporta como puramente elástica, la tangente del ángulo de pérdida es cero.

La viscoelasticidad de la película, como una función del tiempo de la deformación, puede ser determinada a partir de la medida de E en función de la frecuencia de la deformación superficial. Para que la interpretación de los resultados sea correcta, las medidas deben realizarse en la región lineal, de manera que los experimentos puedan ser comparables entre sí. En esta región, el módulo no depende de la deformación aplicada en el área interfacial. En las experiencias realizadas en este estudio, ello se consigue para una amplitud de aproximadamente el 5-6% de la superficie interfacial, y este valor se mantiene constante en todas las medidas.

Todas las experiencias se realizan a temperatura constante (20 °C). Un resumen de las distintas experiencias realizadas se presenta en la Tabla 4.4.

**(B) Método experimental.**

Las experiencias comienzan con el calibrado del dispositivo de medida y con la fijación de los parámetros del experimento. Excepto en las experiencias dedicadas al estudio de la frecuencia, esta se mantiene constante en un valor de  $0.81 \text{ s}^{-1}$ . El calibrado periódico del equipo se realiza con agua desionizada comprobándose, tanto el valor de la tensión superficial registrada, como el resultado de someter a la interfase al movimiento periódico de dilatación-compresión. El registro de una línea horizontal, con ausencia de histéresis, es una indicación de un correcto funcionamiento del equipo. La forma de operar depende de cuando se utiliza un emulsionante insoluble en el medio acuoso (monoestearina, monooleína, o sus mezclas), o soluble en él (BSA y Tween 20).

**Tabla 4.4.** *Experiencias realizadas de viscosimetría superficial dilatacional.*

Subfase	BSA (0.1%)	Monoestearina Monooleína	Tween 20	BSA-Monoestearina BSA-Monooleína	BSA- Tween 20
Agua	***	◆◆◆	●●●	⊗⊗⊗	□□□
Etanol 0.1 M	***			⊗⊗⊗	
Etanol 0.5 M	***			⊗⊗⊗	
Etanol 1 M	***	◆◆◆	●●●	⊗⊗⊗	□□□
Etanol 2 M	***			⊗⊗⊗	
Sacarosa 0.25 M	***			⊗⊗⊗	
Sacarosa 0.5 M	***	◆◆◆	●●●	⊗⊗⊗	□□□
Sacarosa 1 M	***			⊗⊗⊗	
EtOH 1M/Sac 0.5M	***			⊗⊗⊗	
Mezclas Monoestearina-Monooleína sobre agua.					
BSA ( $2.10^{-2}$ %), BSA ( $3.10^{-3}$ %), BSA ( $2.10^{-2}$ %)-Monoestearina, BSA ( $3.10^{-3}$ %)-Monoestearina, BSA ( $2.10^{-2}$ %)-Monooleína y BSA ( $3.10^{-3}$ %)-Monooleína, sobre disolución acuosa de etanol 1 M.					

En las experiencias realizadas con BSA o con las mezclas BSA-Tween 20 se preparan las disoluciones del emulsionante o emulsionantes en el medio acuoso adecuado y se introducen en el recipiente de medida. En este momento empieza a contar el tiempo de adsorción. Para el estudio de la influencia de la concentración de Tween 20 en presencia de BSA, la mezcla se retira de la célula de medida tras cada experiencia, se adiciona una cantidad creciente de Tween 20 y se registra de nuevo la variación de las características reológicas superficiales con el tiempo.

En las experiencias realizadas con lípidos insolubles (monoestearina, monooleína y sus mezclas) o con las mezclas BSA-lípido, el lípido se esparce disuelto en la mezcla hexano-etanol (9:1, v/v), en el interior del anillo que rodea al plato de medida, por medio de una jeringa micrométrica. Desde el momento de su adición comienza la experiencia; sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las medidas realizadas con lípidos solubles en el medio acuoso, en este caso el periodo inicial de la experiencia está afectado por la evaporación del disolvente. Por lo tanto, las medidas sobre las interacciones lípido-proteína solo tienen sentido a partir de un tiempo de 10-15 minutos, contado desde el momento de esparcir el lípido, que es el que se consume en la evaporación del disolvente. Para el estudio de la influencia de la concentración del lípido, éste se esparce continuamente en el interior del anillo, una vez transcurrido 60 minutos de la experiencia realizada con anterioridad, con una menor concentración del mismo en el sistema.

Los resultados que se presentan son los valores medios de, al menos, dos experiencias. Las diferencias entre los parámetros reológicos superficiales correspondientes al mismo sistema son, en todos los casos, inferiores al 6%.

#### 4.2.3. Drenaje de películas delgadas.

Las películas delgadas suspendidas en el seno del aire constituyen un modelo muy útil para el estudio de emulsiones y espumas. Estas películas están compuestas por una lámina plana (semejante a las laminillas en una espuma) rodeada por los bordes de Plateau, y se forman en el interior de un anillo de vidrio cuando se retira de su interior el exceso de líquido que lo rellena. Una de las principales ventajas de este sistema modelo es que cuando tiene lugar el drenaje, el líquido se retira desde el espacio interlamelar y propicia el acercamiento de las dos interfases, un fenómeno similar al que ocurre durante el proceso de drenaje de una espuma. Recientes modificaciones de la técnica han permitido extender su campo de aplicación al estudio del drenaje entre las gotitas de aceite en una emulsión (Clark y Wilde, 1992, Wilde y Clark, 1993). Por lo tanto, la observación del proceso de drenaje desde una película gruesa hasta una película delgada, en el equilibrio, puede ser muy informativo.

Las películas delgadas sobre las interfases aire-agua o aceite-agua tienen muy poco contraste y son imposibles de observar bajo las condiciones de iluminación del campo de luz de un microscopio convencional. Sin embargo, estas películas pueden ser visualizadas según la modalidad de luz reflejada, haciendo uso de la epi-iluminación. Esto es posible porque, aunque la película es virtualmente transparente, una pequeña cantidad de la luz de iluminación (rayo incidente), se refleja tanto desde la interfase superior como de la inferior. Mediante el uso de esta técnica experimental las propiedades de drenaje de las películas estabilizadas por tensioactivos pueden distinguirse fácilmente del drenaje de películas estabilizadas por proteínas. Existe un extenso número de estudios sobre películas delgadas estabilizadas por tensioactivos (Khristov et al, 1984; Kaschiev y Exerowa, 1980; Exerowa et al, 1983; de Feijter y Vrij, 1974; Exerowa et al, 1979), por proteínas (Lalchev et al, 1979; Platikanov et al, 1980; Musselwhite y Kitchener, 1967), o por la mezcla de lípidos y de proteínas (Clark et al, 1989 y 1990). La mayoría de estos

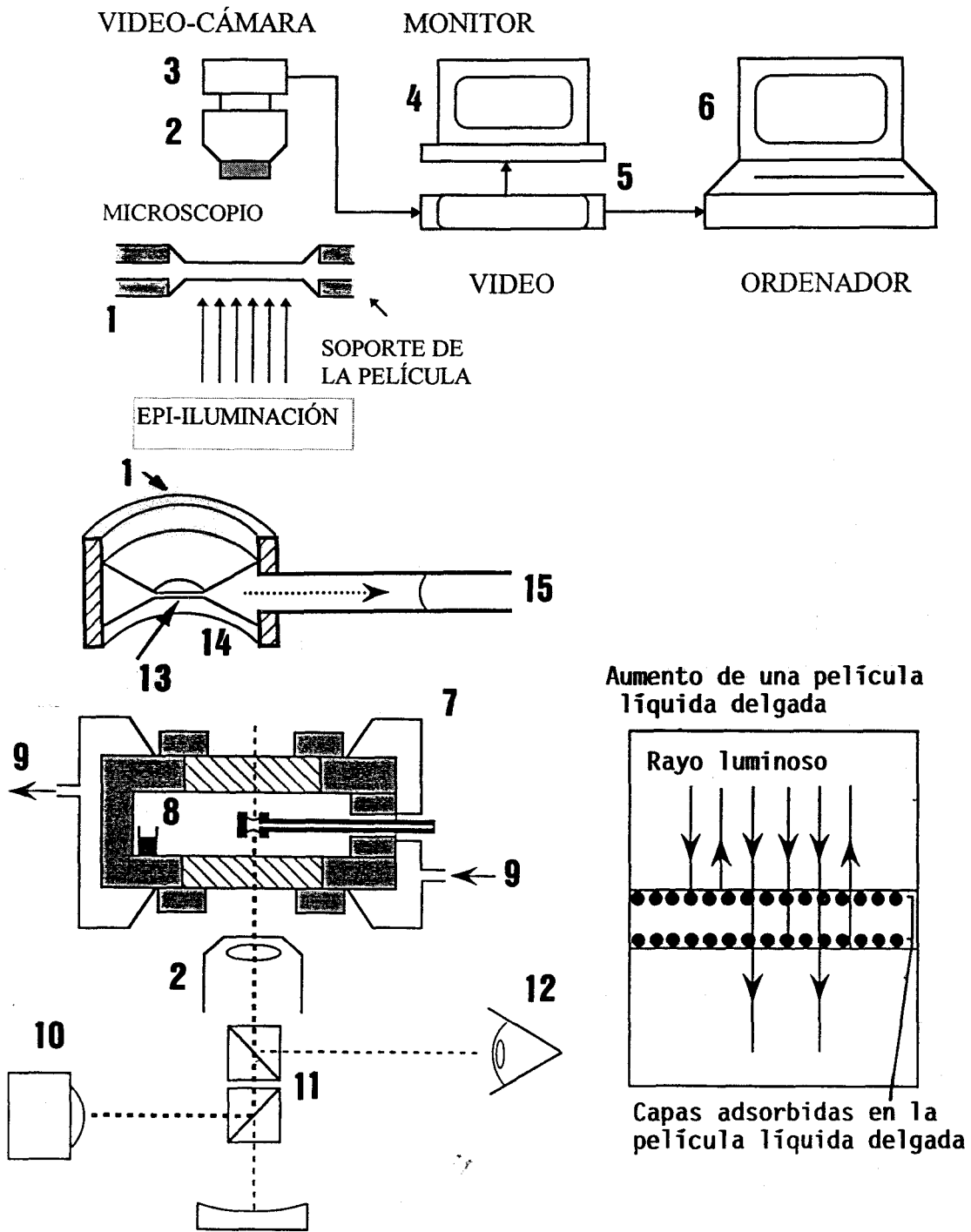


trabajos se han centrado, con algunas excepciones, en el estudio del comportamiento de las películas delgadas sobre la interfase aire-agua, en las que se ha incluido glicerina en el medio acuoso para el estudio del efecto de la viscosidad del medio sobre el comportamiento de drenaje.

El objetivo de este trabajo se ha centrado en el estudio del efecto que determinados solutos presentes en el medio acuoso (tales como etanol y sacarosa) pueden ejercer sobre el comportamiento de drenaje de películas mezcladas de lípido y de proteína, en función de la composición interfacial. Es decir, se intenta complementar los datos de los estudios realizados previamente en esta Memoria, o procedentes de experiencias realizadas o en ejecución, sobre características de películas de emulsionantes alimentarios, y su relación con la estabilidad de sistemas dispersos.

#### **(A) Dispositivo experimental.**

Los detalles de la técnica utilizada en este estudio han sido publicados recientemente (Clark et al, 1989 y 1990), por lo que en este apartado sólo se realizará una breve descripción de la misma. Las películas líquidas delgadas se formaron en un pequeño anillo de vidrio con su superficie interior rugosa (8 mm de diámetro, 3'5 mm de diámetro interior) situado en el interior de una célula cuya temperatura y humedad se controla mediante la circulación de agua desde un criostato (Figura 4.4). La muestra de interés se introduce en el interior del anillo mediante un capilar conectado a una jeringa micrométrica. La muestra se mantiene en el interior de la célula durante 15 minutos, antes de realizar la observación, con el fin de que se alcance la temperatura deseada. Pasado este tiempo se succiona el líquido contenido en el interior del anillo, por medio de la jeringa, hasta que se forma una película delgada que comienza su drenaje hasta un espesor de equilibrio. El proceso de drenaje se observa mediante un microscopio invertido con epi-



**Figura 4.5.** Equipo para la formación y observación del drenaje de películas delgadas. (1) anillo de vidrio rugoso soporte de la película, (2) microscopio, (3) video-cámara, (4) monitor, (5) video, (6) ordenador, (7) cámara de la película delgada, (8) humidificador, (9) entrada y salida de agua de termostatación, (10) lámpara de tungsteno, (11) lente del microscopio, (12) observación directa/video-cámara, (13) película delgada horizontal, (14) bordes de "Plateau", (15) jeringa de succión controlada.

**Tabla 4.6.** Experiencias realizadas de drenaje de películas delgadas.

Sistema	Tween 20 ( $\mu\text{M}$ )							
	0	1	2	5	7	10	50	100
Tween 20-agua		⊕				⊕	⊕	⊕
Tween 20-etanol 1M		⊗				⊗	⊗	⊗
Tween 20-sacarosa 0,5M		∅				∅	∅	∅
BSA ( $1.10^{-1}\%$ )-agua	♣	♣		♣		♣		
BSA ( $1.10^{-2}\%$ )-agua	♣							
BSA ( $1.10^{-3}\%$ )-agua	♣							
BSA ( $1.10^{-1}\%$ )-etanol 1M	□	□	□	□				
BSA ( $1.10^{-2}\%$ )-etanol 1M	□							
BSA ( $1.10^{-3}\%$ )-etanol 1M	□							
BSA ( $1.10^{-1}\%$ )-sacarosa 0,5M	■		■	■	■	■		
BSA ( $1.10^{-2}\%$ )-sacarosa 0,5M	■							
BSA ( $1.10^{-3}\%$ )-sacarosa 0,5M	■							
BSA ( $1.10^{-4}\%$ )-sacarosa 0,5M	■							

iluminación (Nikon Diaphot-TMD, equipado con lentes que permiten un aumento x40 o x20). Este dispositivo permite la visualización directa del proceso de drenaje en la película delgada. Alternativamente, estas imágenes pueden ser desviadas hacia el objetivo de una cámara de vídeo (Nikon FE2) conectada en serie a un vídeo y a un televisor. Por lo tanto, lo que ocurre durante el drenaje puede ser visualizado en directo y al mismo tiempo se graba en cinta magnética. A partir de la película, y con ayuda de un *video-printer* (SONY CVP-M3E) se puede disponer de las aspectos más característicos del proceso de drenaje para su posterior análisis y estudio.

Los sistemas estudiados en estas experiencias (Tabla 4.6) han sido la proteína BSA y el lípido Tween 20 puros y sus mezclas en distintas proporciones. En estas mezclas se mantiene constante la concentración de BSA en un 0'1% en peso, y se adiciona el lípido a la misma para conseguir una concentración final de Tween 20 en el intervalo comprendido entre 1 y 20  $\mu$ M. Como medios acuosos se estudiaron disoluciones acuosas a pH = 7 y fuerza iónica de 0'05 M, de etanol a 1 M y de sacarosa a 0'5 M. Las características de los productos utilizados en esta sección son análogas a las descritas en apartados anteriores.

#### 4.2.4. Difusión superficial en películas delgadas.

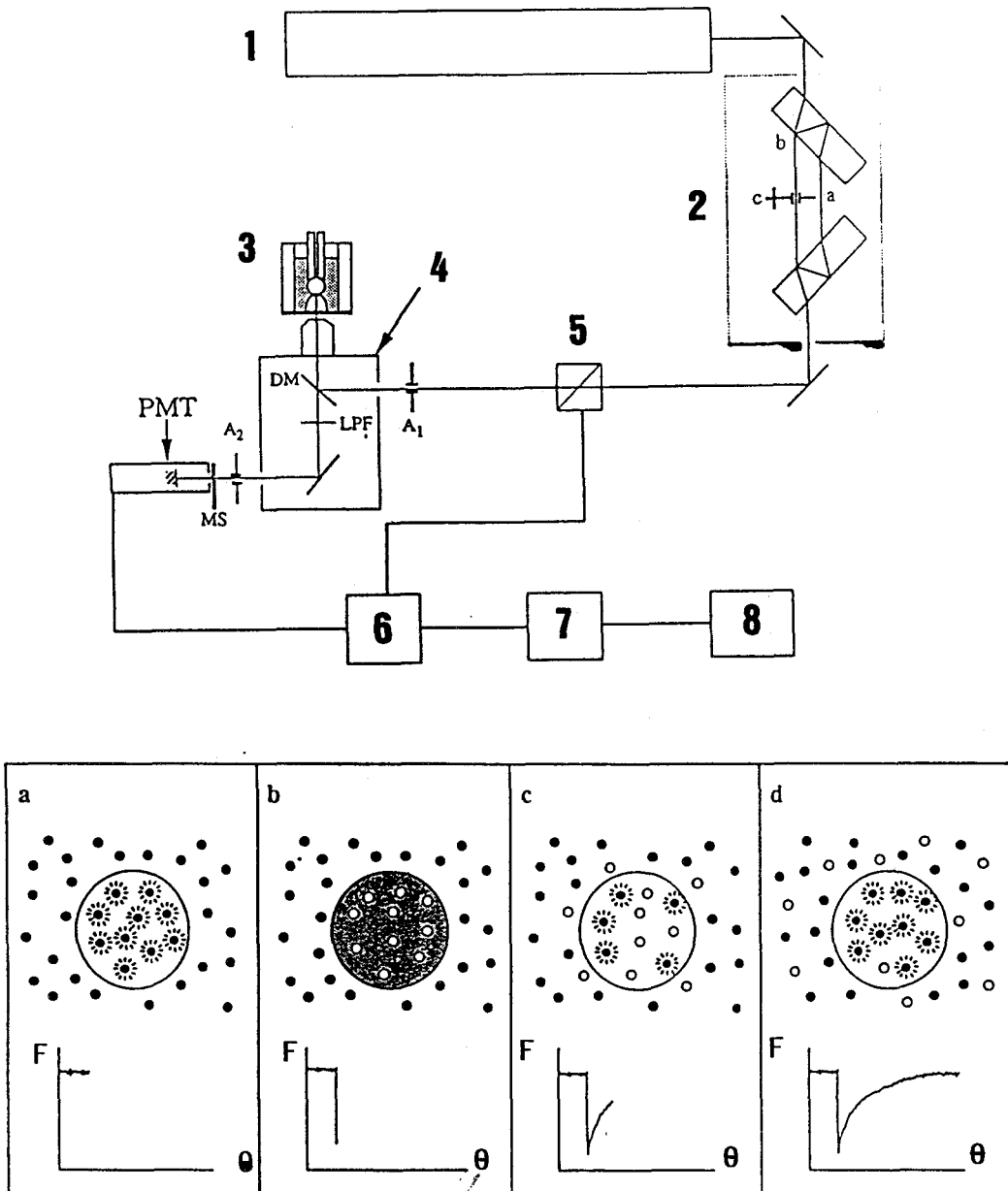
La técnica de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*), también denominada fluorescencia mediante microfotolisis o recuperación de la fluorescencia en fotoblanqueo (FPR: *fluorescence photobleaching recovery*) se ha mostrado como una técnica útil para el estudio de los procesos de difusión superficial de tensioactivos sobre las interfases fluido-fluido.

Esta técnica se desarrolló a mediados de los años 70 para el estudio de membranas celulares y del citoplasma (Axelrod et al, 1976; Peters, 1983) y ha sido revisada recientemente (Peters y Scheltz, 1990). El uso previo de la técnica en estudios interfaciales se ha limitado a la investigación de la difusión lateral de lípidos sobre la interfase aire-agua en una balanza de superficie (Beck y Peters, 1985).

### (A) Método experimental.

Existen algunas variaciones de la técnica FRAP pero la más simple se basa, a grandes rasgos, en las distintas etapas que se esquematizan en la figura 4.6. El método requiere que las especies moleculares de interés sean sensibles a la fluorescencia o, alternativamente, que se adicione una sustancia superficialmente inerte pero sensible a la fluorescencia, que se distribuya sobre la interfase de interés. En el caso de las películas delgadas, las propiedades de difusión superficial de un emulsionante dado, puede ser medida mediante la formación de una película delgada (con un espesor de 100-200  $\mu\text{m}$ ), según se ha descrito en las experiencias de drenaje (apartado 4.2.3), y en la que está presente una sustancia sensible a la fluorescencia.

Mediante la acción de un rayo láser atenuado se ilumina una pequeña mancha (con un diámetro aproximado de 5  $\mu\text{m}$ ) sobre la superficie de la película delgada, lo que excita la fluorescencia de las moléculas marcadas contenidas en la mancha. La intensidad de esta fluorescencia es registrada continuamente, en función del tiempo (Figura 4.6-a). Estas moléculas fluorescentes son con posterioridad fotodestruidas (*blanqueadas*) irreversiblemente, mediante un incremento de la intensidad del rayo de láser, en unas 1000 veces aproximadamente, durante unas pocos milisegundos (Figura 4.6-b), antes de que la intensidad del rayo se atenúe a su nivel inicial. La mancha previamente blanqueada puede recuperar la fluorescencia solamente si las moléculas que han sido blanqueadas se difunden lateralmente hacia afuera de la mancha y son, al mismo tiempo, reemplazadas por moléculas no blanqueadas desde los alrededores de la mancha, por difusión (Figuras 4.6-c y d). A partir del valor de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo y del conocimiento de las dimensiones de la zona blanqueada, es posible el cálculo del coeficiente de difusión superficial (Clark et al 1990).



**Figura 4.6.** Técnica de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP) para medida de la difusión superficial. (1) Laser de ión argón  $\lambda = 488 \text{ nm}$ , (2) modulador, (3) célula de medida, (4) microscopio, (5) monitor del rayo, (6) contador, (7) interfase, (8) ordenador.  $A_1$  y  $A_2$ : aberturas, DM: espejo dicróico, LPF: filtro, PMT: contador fotónico, MS: disparador mecánico. El esquema inferior muestra cuatro etapas típicas de un experimento de FRAP (ver texto para su explicación).

### (A) Dispositivo experimental.

El diseño y la construcción de un equipo de FRAP han sido revisadas recientemente (Wolf, 1989). El propósito de la mayoría de los componentes ópticos es el de proporcionar un rayo de luz bien definido, microscópico y de sección circular, que pueda ser modulado rápidamente sobre la muestra. Un esquema del equipo de FRAP utilizado en este estudio (instalado en los laboratorios del *Institute of Food Research*, Norwich, Inglaterra), se muestra en la Figura 4.6. La fuente luminosa utilizada es un láser de ión argón (Coherent 100-10). De los diversos métodos de modulación de la intensidad del láser (Beck y Peters, 1985; Garlan, 1981), el utilizado en este estudio se basa en la reflexión del rayo sobre placas de vidrio. Cuando se cierra rápidamente el obturador electrónico (c), sólo se registra el rayo de láser (a), que se atenúa por reflexiones múltiples antes de incidir sobre la muestra. Cuando el obturador se abre, el rayo intenso de fotoblanqueo (b) se transmite a través de dos placas de vidrio y pasa a través de la muestra. El factor más importante de este dispositivo de modulación es el conseguir que ambos rayos estén alineados, para asegurar que tanto el rayo atenuado como el de blanqueo sean coincidentes en la muestra.

El rayo procedente del modulador pasa a través de un medidor (compuesto por un separador del rayo y un fotodiodo), a la vez que la señal es electrónicamente compensada con el fin de evitar pequeñas fluctuaciones en la intensidad del rayo de láser. El rayo se propaga a través de una abertura estrecha ( $A_1$ ) localizada en el plano de imagen, en la puerta de entrada del dispositivo de epi-iluminación del microscopio de fluorescencia. El equipo usa un microscopio invertido (Nikon Diaphot TMD) por ser esta localización más conveniente para las medidas de películas delgadas.

Mediante un filtro de bloqueo se selecciona, en el dispositivo de epi-iluminación, la región del láser usada para la excitación y el pico de emisión de la

fluorescencia. Cuando se usa un láser de ión de argón se suele seleccionar normalmente una línea de 488 nm en las medidas de FRAP, porque con ella se consigue excitar a un número de diferentes fluoróscoros, entre los que se incluye el utilizado en este estudio. Es conveniente, además, el uso de un espejo dicróico (DM), montado en ángulo de 45°, para la reflexión del rayo de excitación de 488 nm, usado por los fluoróscoros de la muestra, y que incida sobre el objetivo (Nikon) de las lentes del microscopio (magnificación x40). Un filtro de largo paso (LPF) elimina la luz de excitación que es desviada hacia un contador fotónico (PTM, Thorn-EMI 9816 B) colocado a la entrada de una cámara de vídeo situada en el microscopio invertido. El PTM se protege durante la pulsación de blanqueo mediante un circuito electrónico de entrada y un disparador mecánico (MS). Antes de su entrada al detector, el rayo de luz emitida pasa a través de una segunda apertura ( $A_2$ ), posicionada igualmente en el plano de imagen. Las dos aperturas tienen idénticos diámetros (200  $\mu\text{m}$ ) y sirven para que el aparato sea confocal. El sistema de medida del tiempo, de adquisición de datos y de análisis de los mismos, se realiza mediante un microordenador (Motorola 68020). El diámetro de la mancha de láser dirigido sobre la muestra se mide electrónicamente (Bean Scan, Model 2180, Photon Inc.).

Los datos de las medidas de FRAP se analizan mediante mínimos cuadrados, según una expresión no lineal que relaciona la recuperación de la fluorescencia ( $F(t)$ ) con el tiempo (Clark et al, 1990; Axelrod et al, 1976, Axelrod, 1985). La curva obtenida de recuperación de la fluorescencia puede analizarse mediante la expresión:

$$F(t) = F_{\infty} \left\{ 1 - 2 \left( 1 - F_0 / F_{\infty} \right) \left[ 0.5 \left( \tau_D / t \right) \cdot e^{-2\tau_D / t} \left( I_0(2\tau_D / t) \right) \right. \right. \\ \left. \left. + I_2(2\tau_D) \right) + \sum_{m=0}^{100} \frac{(m+1)!(2m+2)!}{(m+2)!^2 m!^2} \cdot (-\tau_D / t)^{m+2} \right\} \quad (4.11)$$



donde  $F_0$  es la intensidad de la fluorescencia antes del fotoblanqueo,  $F_\infty$  es la intensidad de la fluorescencia recuperada, e  $I_0$  e  $I_2$  son las funciones de Bessel. El coeficiente de difusión lateral  $D$ , viene dado por:

$$D = \omega^2 / 4\tau_D \quad (4.12)$$

donde  $\omega$  es el radio de la mancha circular y  $\tau_D$  es el tiempo de difusión característico.

### **(B) Preparación de las muestras.**

Las medidas de difusión molecular en películas líquidas delgadas por el método de FRAP requiere la presencia de moléculas fluorescentes en la películas adsorbida sobre la superficie. Esto se puede conseguir mediante la modificación de la molécula del emulsionante, por inclusión de un grupo activo a la fluorescencia, o por la incorporación a la película de una sustancia que se active por la acción del láser, siendo este último procedimiento más adecuado. Por lo tanto, es preferible adulterar la película sometida a estudio por adición de cantidades traza de un tensioactivo fluorescente, análogo al estudiado (Clark et al, 1990; Coke et al, 1990; Means y Feeney, 1971). Existen una variedad de moléculas que están disponibles comercialmente (Haugland, 1992), entre las que se encuentra la utilizada en este estudio: 5-N-(octadecanoil)amino fluoresceína (ODAF), adquirida de Molecular Probes Inc. (No. 0-322).

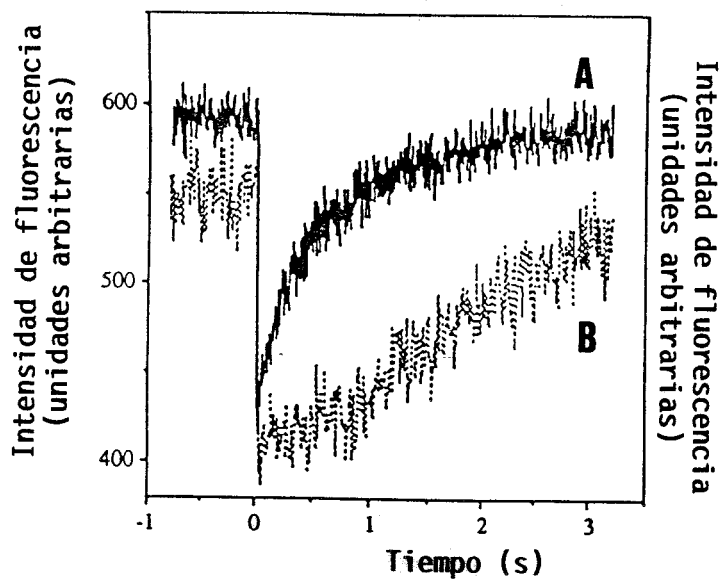
El fluoróforo se adiciona a la disolución final de Tween 20, de BSA, o de la mezcla de ambos -- preparadas según se ha descrito en el apartado 4.2.3 -- en una concentración final de 0'5  $\mu$ M. El uso de ODAF a estas bajas concentraciones asegura que el mismo no induce cambios significativos en las propiedades de la película adsorbida de proteínas, lípidos o de sus mezclas (Sarker et al, 1995).

**(C) Medida de difusión superficial mediante la técnica FRAP.**

Las mayoría de las medidas se realizan una vez que la película ha adquirido una situación de equilibrio, que se detecta por la forma de los anillos observados en el microscopio. Estas películas se forman y son similares a las descritas en el apartado 4.2.3, para los mismos sistemas. Es muy importante, pues, el asegurarse de que no existe drenaje durante el corto tiempo de la experiencia de FRAP. Es decir, se ha de tener la seguridad de que la movilidad superficial de las moléculas de ODAF es debida a la difusión lateral y no a su flujo sobre la superficie. Sin embargo, ambos fenómenos son fácilmente distinguibles en las curvas de FRAP obtenidas (véase la Figura 4.7). Desde otro punto de vista, el tiempo de fotoblanqueo se regula en función de la velocidad de difusión de las moléculas sobre la superficie. En el caso de difusión superficial rápida se usa menor tiempo de fotoblanqueo (5-10 ms), que en el caso de especies que se difunden lentamente (20 ms).

Los estudios se han centrado en el uso de disoluciones de BSA en un buffer de fosfato a  $\text{pH} = 7.0$  y con una fuerza iónica de  $0.05 \text{ M}$ , o disoluciones de etanol  $1 \text{ M}$  o de sacarosa  $0.5 \text{ M}$  de la misma proteína, a los mismos valores de  $\text{pH}$  y de fuerza iónica. Sobre estas disoluciones se realizan adiciones crecientes de Tween 20, hasta obtener las siguientes concentraciones finales del lípido:  $0$ ,  $5 \mu\text{M}$ ,  $6 \mu\text{M}$ ,  $7 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $15 \mu\text{M}$  y  $20 \mu\text{M}$ .

Para cada uno de los sistemas estudiados se realizan un total de diez disparos de láser sobre distintas zonas de la película, y los resultados se correlacionan mediante la ecuación 4.11, de la que se deduce el valor del coeficiente de difusión superficial para el emulsionante estudiado, por aplicación de la ecuación 4.12.



**Figura 4.7.** Curvas de FRAP correspondientes a un proceso de difusión superficial (A) y de drenaje (B) (Lalchev et al, 1994).

**5. ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA  
INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO**

## 5. ADSORCION DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-AGUA.

Según lo expuesto en el apartado 4.2.1 de la sección experimental no existe un equipo único de tensiometría, que permita la determinación de la cinética de adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua. La razón de ello es que la escala de tiempo de este proceso puede estar comprendida en el intervalo desde milisegundos hasta horas o días. Por ello, en este estudio se ha adoptado el criterio de utilizar, dentro de los medios experimentales disponibles, dos métodos de medida, el método de la placa de Wilhelmy (descrito en el apartado 4.2.1.1) y el método de la gota pendiente (descrito en el apartado 4.2.1.2), para la determinación de la cinética del proceso a tiempos largos (apartado 5.1) y cortos de adsorción (apartado 5.2), respectivamente. Además, se ha estudiado la isoterma de adsorción de la proteína sobre distintos medios acuosos (apartado 5.4). Estos datos son de interés práctico por sí mismos y, además, son de utilidad para el análisis de la cinética de adsorción de la proteína. Finalmente, se ha estudiado el efecto que las agitaciones de la interfase y del medio acuoso ejercen sobre la cinética del proceso (apartado 5.3). Estas experiencias se han realizado con el viscosímetro oscilatorio superficial, descrito en el apartado 4.2.2, utilizado simultáneamente para la determinación de las características reológicas superficiales de la película.

## 5.1 CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA A TIEMPOS LARGOS.

Como se ha indicado en los objetivos, en este estudio se pretende determinar la cinética de adsorción de emulsionantes alimentarios (proteínas) sobre la interfase aire-agua. Con el fin de obtener resultados reproducibles es esencial realizar las medidas según unas normas fijas.

La proteína de partida se disuelve en una disolución standard (buffer de fosfato, pH: 7, fuerza iónica: 0.05 M), o en disoluciones acuosas de etanol o sacarosa preparadas en el seno de la disolución standard. La tensión superficial del buffer a 20°C fué de  $72.6 \pm 0.5 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$ . Las disoluciones originales de proteína (con concentraciones del 1% ó 10%, en peso) se almacenan a 5°C, durante no más de una semana. Antes de su uso se diluye la disolución de proteína de partida -- utilizando como disolvente la misma disolución que se estudia como subfase -- de forma que cuando se inyecten 2 ml de la misma en 18 ml de subfase, se alcance la concentración final deseada de proteína, en el intervalo de 1 a  $10^{-4}$  % en peso. Previamente se comprueba la ausencia de contaminantes en la disolución de buffer, libre o con los solutos (etanol o sacarosa) disueltos, según el tipo de experiencia, mediante la medida de su tensión superficial. El valor de la propiedad en las condiciones de experimentación se contrasta con los de la bibliografía, que se incluyen en la Tabla 5.1. Las disoluciones acuosas de etanol o sacarosa se preparan diariamente.

Para asegurar la limpieza de la superficie se succiona repetidas veces la solución de partida mediante un capilar conectado a una trompa de agua. Un buen mojado de la lámina es un requisito fundamental para asegurar la reproducibilidad de las medidas. Esta condición se detecta a partir de la forma de la línea de contacto entre el menisco y

**Tabla 5.1.** Valores de tensión superficial ( $\sigma_0$ , mN/m) para el agua y disoluciones acuosas de etanol y azúcares a distintas temperaturas (Rodríguez Patino y Martín, 1994<sup>a</sup>).

SUBFASE	TEMPERATURA (°C)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
AGUA <sup>a</sup>	74,9	74,2	73,5	72,7	71,9	71,2	70,4	69,5
Etanol 0,1M <sup>a</sup>	73,1	72,2	71,4	70,3	69,7	68,9	68,0	67,2
Etanol 0,25M	---	---	---	67,9	---	---	---	---
Etanol 0,5M <sup>a</sup>	66,1	65,5	64,7	64,2	63,7	62,9	62,4	61,8
Etanol 1,0M <sup>a</sup>	59,4	58,8	57,8	57,2	56,5	55,6	55,1	54,3
Etanol 2,0M	---	---	---	51,0	---	---	---	---
Etanol 5,0M <sup>a</sup>	40,6	39,8	39,0	38,2	37,4	36,3	35,9	35,1
ET.1M/SAC. 0,5M	---	---	---	57,4	---	---	---	---
ET.5M/SAC. 0,5M <sup>a</sup>	38,2	37,7	37,1	36,7	36,1	35,4	34,9	34,5
Glucosa 1M <sup>a</sup>	75,5	75,0	74,1	73,6	72,7	72,1	71,3	70,6
Glucosa 0,5M <sup>a</sup>	75,7	75,0	74,3	73,5	72,8	72,0	71,1	70,4
Fructosa 0,1M <sup>a</sup>	74,9	74,3	73,9	73,1	72,4	71,5	71,0	69,9
Fructosa 0,5M <sup>a</sup>	75,9	75,3	74,5	74,0	73,0	72,3	71,6	70,8
Sacarosa 0,1M <sup>a</sup>	75,1	74,5	74,0	73,4	72,3	70,9	70,6	69,1
Sacarosa 0,25M	---	---	---	73,4	---	---	---	---
Sacarosa 0,5M <sup>a</sup>	75,8	75,0	74,1	73,5	72,8	72,0	71,2	70,4
Sacarosa 1M	---	---	---	74,1	---	---	---	---

la lámina. Un mal mojado del plato, normalmente, está asociado a una limpieza defectuosa o a la ineficacia de su activación bajo la llama del mechero Bunsen.

En los estudios de adsorción de la proteína sobre la interfase aire-agua se inyectan 2 ml de disolución de proteína sobre 18 ml de la fase acuosa, una vez que la lámina se encuentra en posición de medida, sobre la superficie de la fase acuosa. Tras la adición de la proteína se sigue la variación de la tensión superficial con el tiempo, hasta alcanzar el estado estacionario.

Se han realizado medidas a diferentes temperaturas en el intervalo de 5 °C a 40 °C. Para ello, se hace circular agua desde un criostato/termostato Heto, hasta la célula de medida. El control de la temperatura en el compartimiento de medida es de  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ . Para estudiar la influencia de la composición de la subfase se sustituye el agua por disoluciones acuosas de etanol 1 M o sacarosa 0.5 M. También se ha estudiado una disolución acuosa con una mezcla de etanol 1 M y sacarosa 0.5 M.

Las disoluciones acuosas se introducen en la célula de medida y se espera 30 minutos para que se alcance la temperatura deseada para la operación, con la lámina de medida en posición. La proteína se inyecta en la fase acuosa después de que el valor de la tensión superficial coincide con el de la literatura.

Debido a que las medidas de propiedades superficiales son muy sensibles a la presencia de impurezas, se presta un extremo cuidado para asegurar que todos los materiales e instrumentos utilizados en este estudio estén limpios. El material de vidrio se limpia con ayuda de un detergente comercial y, se enjuaga con agua y, posteriormente, con mezcla sulfocrómica. A continuación se enjuaga con abundante agua bidestilada.



### 5.1.1. Análisis de resultados.

La cinética de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua se analiza a partir de los cambios de presión superficial,  $\pi$ , con el tiempo,  $\theta$ . La presión superficial se define como  $\pi = \sigma_0 - \sigma$ , donde  $\sigma_0$  es la tensión superficial de la disolución acuosa (Tabla 5.1) y  $\sigma$  es el valor de la tensión superficial tras la adsorción de la proteína. El tiempo de adsorción comienza en el momento en que se inyecta la proteína.

Este método facilita el análisis cinético de la adsorción de proteína, cuando la medida directa de la concentración superficial,  $\Gamma$ , no es posible (Damodaran, 1990)<sup>1</sup>. La velocidad de cambio de la concentración superficial puede expresarse mediante (MacRitchie y Alexander, 1963):

$$\delta\Gamma/\delta\theta = (\delta\Gamma/\delta\pi) \cdot (\delta\pi/\delta\theta) \quad (5.1)$$

<sup>1</sup> Cuando la medida directa de la concentración superficial,  $\Gamma$ , no es posible, la cinética de adsorción puede deducirse a partir de la variación de la presión superficial con el tiempo. Sin embargo, aunque la presión superficial -- que es una medida del cambio de la energía superficial -- es una propiedad fundamental de la interfase, la velocidad de cambio de la presión superficial debe utilizarse con precaución para determinar la cinética de adsorción de una proteína porque, aunque la presión superficial depende de la concentración superficial, también depende de la conformación de la proteína sobre la interfase. En otras palabras, la velocidad de cambio de la presión superficial es una función de las velocidades de cambio de la concentración superficial y de la conformación de la proteína en el estado adsorbido. Sin embargo, este problema puede solucionarse si se conoce la variación de  $\pi$  con  $\Gamma$  obtenida, por ejemplo, en una balanza de superficie a partir del esparcimiento cuantitativo de la proteína sobre la interfase -- utilizando el método de Trurnit (1960) -- y observando la isoterma  $\pi$ - $\Gamma$ . Con estos datos, la velocidad de cambio de la concentración superficial puede expresarse como (MacRitchie y Alexander, 1963):

$$\delta\Gamma/\delta\theta = (\delta\Gamma/\delta\pi) \cdot (\delta\pi/\delta\theta) \quad (5.1)$$

Esta ecuación facilitará el análisis de la adsorción de la proteína a partir de las medidas de la velocidad de cambio de la presión superficial y de la isoterma de la película esparcida de la proteína sobre la interfase aire-medio acuoso. Estas experiencias se realizan actualmente en el grupo de investigación.

Si  $\delta\Gamma/\delta\pi$  es constante,  $\delta\pi/\delta\theta$  puede usarse para evaluar la velocidad de adsorción. Algunos investigadores han criticado el uso de la medida de la presión superficial para seguir la adsorción (MacRitchie, 1989; Joos et al., 1992). No obstante, en el caso particular de monocapas esparcidas de BSA la pendiente de la representación de  $\pi$  frente a  $\Gamma$  es prácticamente constante hasta presiones superficiales de  $17 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$  (Damodaran y Song, 1988). Además, los datos de  $\pi$  frente a  $\Gamma$  para monocapas adsorbidas (Graham y Phillips, 1979a) y esparcidas (Damodaran y Song, 1988) de BSA son similares.

En este estudio, la evaluación de la cinética de adsorción de la proteína, en función del mecanismo que controla el proceso, se realiza a partir de gráficas de la presión superficial en función del tiempo, hasta que se alcanza las condiciones estacionarias. La velocidad de incremento de la presión superficial está determinada por tres procesos consecutivos o concurrentes (MacRitchie, 1978; Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979b) (Figura 5.1):

- a) Difusión de las moléculas de proteína desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase.
- b) Esparcimiento o desnaturalización (despliegue) de las moléculas previamente adsorbidas.
- c) Reordenación molecular de las moléculas adsorbidas.

Los dos últimos mecanismos comprenden el transporte de la proteína o de segmentos de proteína sobre la interfase. La cinética de adsorción de la proteína está inicialmente controlada por la difusión, pero a mayores tiempos la penetración y la

reordenación de las proteínas en la película interfacial son los mecanismos que controlan el proceso.

#### 5.1.1.1. Etapa de difusión hacia la interfase.

Durante la primera etapa, a presiones superficiales relativamente bajas, cuando la difusión es la etapa controlante del proceso, puede usarse una modificación de la ecuación de Ward y Tordai (1946) para correlacionar el cambio de presión superficial con el tiempo:

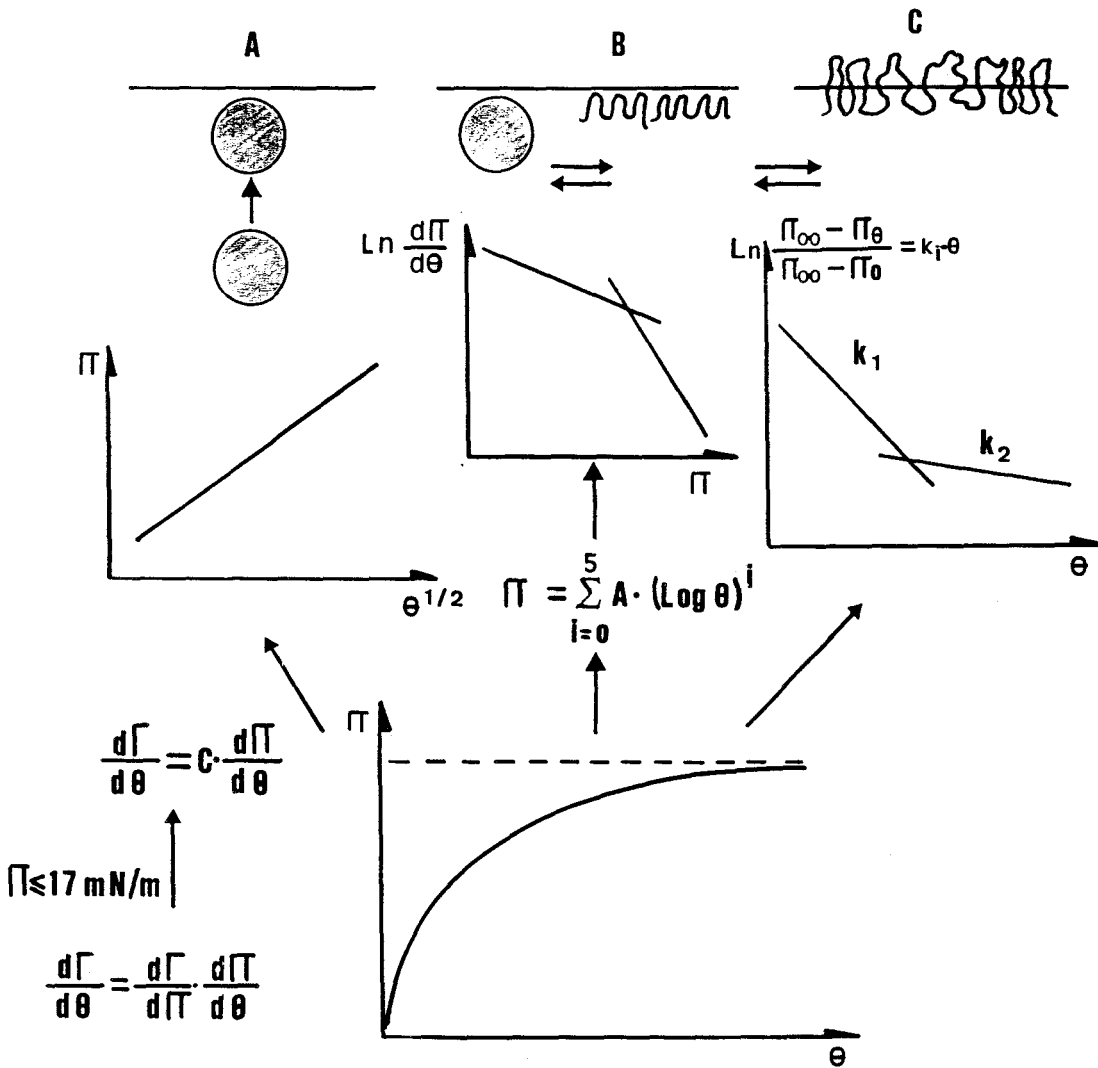
$$\pi = 2.C.k.T.(D.\theta / 3,14)^{1/2} \quad (5.2)$$

donde C es la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y D es el coeficiente de difusión.

Diversos investigadores (de Feijter et al., 1987; MacRitchie, 1978; Xu y Damodaran, 1994; Tornberg, 1978) han usado esta ecuación para describir la adsorción de moléculas de proteínas desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase. En este caso una representación de  $\pi$  frente a  $\theta^{1/2}$  deberá ser lineal.

#### 5.1.1.2. Etapas de penetración y reordenación interfacial.

Para analizar la desnaturalización en la interfase y la reordenación de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase pueden usarse dos procedimientos:



**Figura 5.1.** Mecanismos de la cinética de adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua.

- (A) Difusión de las moléculas de proteína hacia la interfase (ecuación 5.2).
- (B) Penetración o desnaturalización de las moléculas adsorbidas (ecuación 5.3 o 5.4).
- (C) Reordenación de las moléculas adsorbidas (ecuación 5.3 o 5.4).

A) La velocidad de estos procesos puede analizarse mediante una ecuación cinética de primer orden (Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979b):

$$\ln \frac{\pi_{\infty} - \pi_{\theta}}{\pi_{\infty} - \pi_0} = -k_i \cdot \theta \quad (5.3)$$

donde  $\pi_{\infty}$ ,  $\pi_0$  y  $\pi_{\theta}$  son la presión superficial en condiciones estacionarias, al tiempo  $\theta = 0$ , y a cualquier tiempo  $\theta$ , respectivamente, y  $k_i$  es la constante cinética de primer orden.

En la práctica, una representación de la ecuación normalmente proporciona dos regiones lineales. La pendiente inicial de la representación se puede asociar a la constante cinética de primer orden del proceso de desnaturalización/penetración ( $k_1$ ), mientras que la segunda pendiente se puede asociar a la constante cinética de primer orden del proceso de reordenación ( $k_2$ ), que tiene lugar en un número aproximadamente constante de moléculas previamente adsorbidas (Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979b; Suttiprasit et al., 1992). Para aplicar la ecuación ha de tenerse la precaución de elegir un intervalo de tiempo tal que el proceso no esté afectado por la difusión.

B) En muchos procesos de adsorción de proteínas se ha observado que, la velocidad de adsorción es menor que la velocidad de difusión (Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979b; de Feijter et al., 1987). Cuando existe una barrera de energía, la velocidad de penetración de la proteína en la película interfacial podría ser la etapa limitante de la velocidad. Ward y Tordai (1946) consideran que esta barrera consiste en la energía  $\pi \cdot \Delta A$ , requerida para crear un espacio de área  $\Delta A$  en la película superficial a la presión

$\pi$ , para que se adsorba la molécula. Una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai (1946) ha sido usada por Ward y Regan (1980).

$$\ln(\delta\pi/\delta\theta) = \ln(k' \times v \times C) - \pi \cdot \Delta A / kT \quad (5.4)$$

donde  $k'$  es la constante cinética de adsorción y  $v$  es el número de grupos que se adsorben por cada molécula de proteína.

La pendiente de la representación de  $\ln(\delta\pi/\delta\theta)$  vs.  $\pi$  se obtiene por diferenciación analítica, mediante una ecuación polinómica que relaciona el valor de  $\pi$  con  $\theta$ .

$$\pi_i = \sum_{n=0}^5 A_i \cdot (\log \theta)^n \quad (5.5)$$

Cuando se analiza la adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua se observan dos o más regiones lineales en la representación de  $\ln(\delta\pi/\delta\theta)$  frente a  $\pi$ . Una variación de  $\ln(\delta\pi/\delta\theta)$  independiente de  $\pi$  puede ser una indicación de que solamente tiene lugar un proceso de reordenación interfacial (Tornberg, 1978).

### 5.1.2. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre agua.

En la figura 5.2 se representa la variación de la presión superficial en función del tiempo, hasta alcanzar condiciones estacionarias. En este caso se ha elegido, como

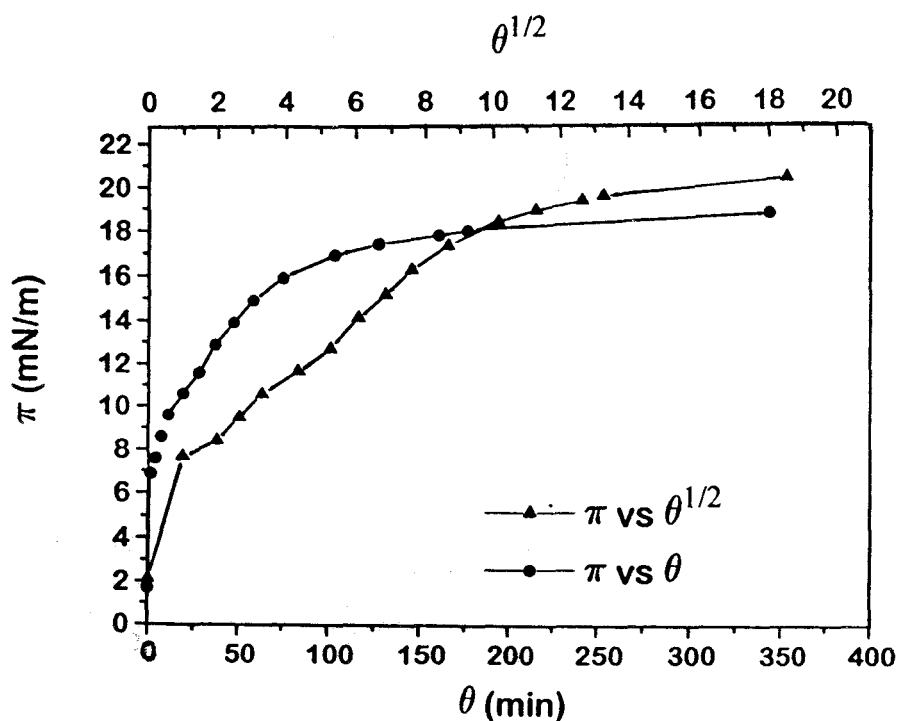
ejemplo, una concentración de proteína de  $10^{-2}$  % en peso y se ha estudiado su adsorción sobre la interfase aire-agua, a la temperatura de 20°C. Según se ha descrito en el apartado anterior, la velocidad de incremento de la presión superficial se ha asociado a tres etapas consecutivas o concurrentes, que tienen lugar durante el proceso de adsorción:

**A) Difusión de la proteína desde el seno de la fase hasta la interfase.**

Durante esta etapa sería de aplicación la ecuación 5.2. Por lo tanto, una representación de la presión superficial frente a la raíz cuadrada del tiempo debería ser lineal. Sin embargo, como se observa en la figura 5.2, esta dependencia no se cumple. La razón se debe a que esta primera etapa de difusión es lo suficientemente rápida, como para que pueda ser detectada por el método de la lámina de Wilhelmy, usado en este estudio. No obstante, la elevación de la presión superficial, al comienzo de la adsorción de proteína en la interfase, que depende en gran medida de la cinética de la etapa de difusión, es una función de las variables estudiadas -- tales como temperatura, concentración de proteína y presencia de solutos en el seno de la fase acuosa -- según se discutirá posteriormente.

**B) Penetración y reordenación de las moléculas de proteína adsorbidas.**

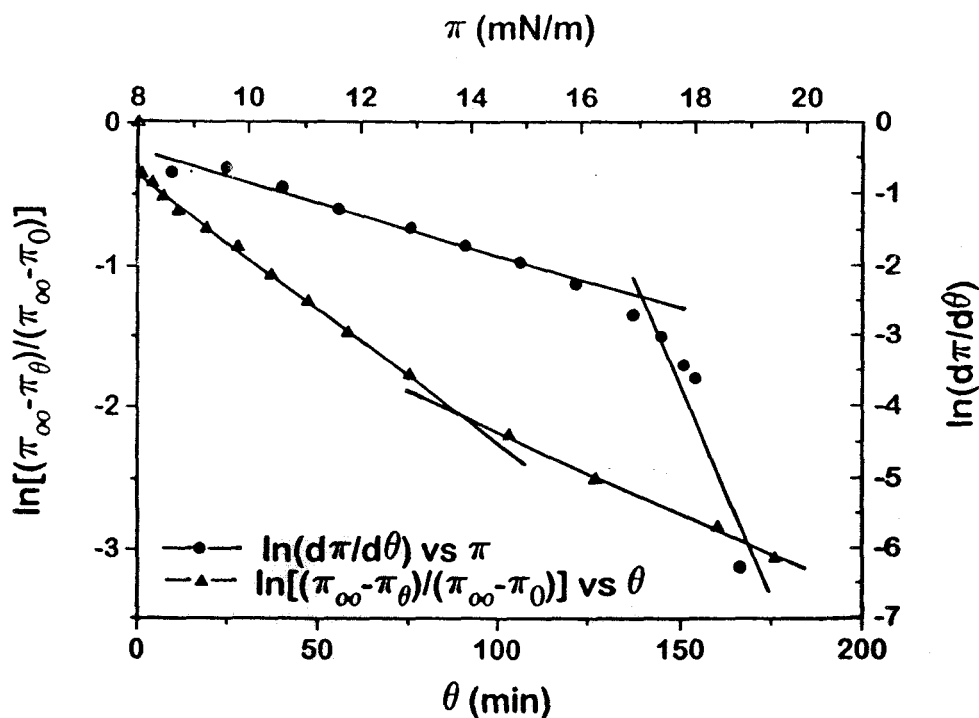
Para tiempos de adsorción superiores al correspondiente a la etapa previa de difusión, las moléculas de proteína penetran en la interfase y, al mismo tiempo, o en una etapa posterior, se reordenan en la misma. Estas dos etapas pueden ser estudiadas mediante dos métodos diferentes, que se concretan en el uso de las ecuaciones 5.3 y 5.4.



**Figura 5.2.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua a 20°C. Concentración de proteína: 10<sup>-2</sup> % en peso. Substrato: buffer fosfato (pH=7, I=0.05 M)

Por aplicación de la ecuación 5.3, una representación de  $\ln[(\pi_\infty - \pi_\theta)/(\pi_\infty - \pi_0)]$  frente a  $\theta$  debería ser lineal. Esta representación se muestra en la figura 5.3, para el caso seleccionado en este estudio. Diferentes temperaturas o concentraciones de proteína en el seno de la fase acuosa conducen a resultados similares. Puede observarse que esta representación presenta dos regiones lineales, lo cual coincide con informaciones previas desde la bibliografía (Tornberg, 1978; Graham y Phillips, 1979; Suttiprasit et al., 1992). De esta representación se obtienen las pendientes  $k_1$  y  $k_2$ , que se asocian a las constantes cinéticas de primer orden de las etapas de penetración y reordenación de las moléculas de BSA previamente adsorbidas sobre la interfase.





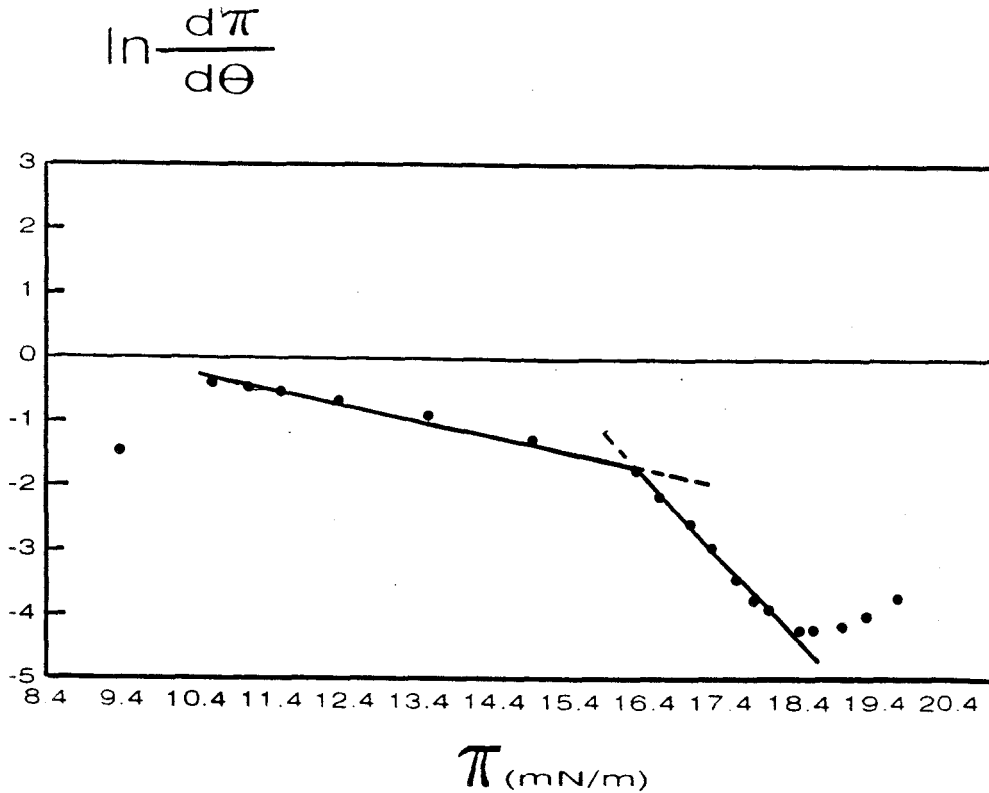
**Figura 5.3.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua a 20°C. Aplicación de las ecuaciones 5.3 (▲) y 5.4 (●) a los resultados experimentales. Concentración de proteína: 10<sup>-2</sup> % en peso. Substrato: buffer fosfato (pH=7, I=0.05 M)

La cuantificación de la velocidad de adsorción de la proteína, durante las etapas de penetración y reordenación en la interfase, puede efectuarse por un procedimiento diferente, aplicando la ecuación 5.4. Según este procedimiento, una representación de  $\ln(\delta\pi/\delta\theta)$  frente a la presión superficial debería ser lineal. Esto es lo que se observa en la figura 5.3, para el caso que se está considerando (concentración de BSA de 10<sup>-2</sup> % en peso y una temperatura de 20°C). Las pendientes ( $\delta\pi/\delta\theta$ ) en cada punto, se ha determinado analíticamente, con ayuda de la ecuación polinómica que relaciona  $\pi$  con  $\theta$

durante la adsorción (ecuación 5.5). Al aplicar esta ecuación a los casos estudiados se obtiene un coeficiente de regresión lineal mayor de 0'995 en todos los casos, y mejor que 0'998 en la mayoría de los casos (90%).

En la mayoría de las experiencias de adsorción de BSA desde agua se observa que existen dos regiones lineales en las representaciones de la ecuación 5.4, lo cual puede asociarse a las dos etapas de penetración y reordenación de la proteína en la interfase. Cuando la representación de  $\ln(\delta\pi/\delta\theta)$  frente a  $\pi$  es independiente de  $\pi$ , esto es indicativo de que únicamente tiene lugar el proceso de reordenación interfacial, que se produce sin modificación significativa del área interfacial ocupada por la proteína; o bien, que el requerimiento de área durante la etapa de penetración se compensa con la reordenación de las moléculas en la interfase. Para ello se requiere que ambas etapas sean simultáneas. Sin embargo, la discriminación de estos dos mecanismos no puede realizarse a base de los datos obtenidos con el método experimental utilizado. Este caso se ha observado cuando la BSA se adsorbe sobre agua, a una concentración de 1% en peso y a presiones superficiales superiores a  $18'5 \text{ mN}\times\text{m}^{-1}$  (figura 5.4). Esta situación se presenta a tiempos de adsorción superiores a 150 minutos tras la inyección de la proteína.

Sin embargo, lo que es más importante, en el contexto de este estudio, es que las representaciones de las ecuaciones 5.3 y 5.4, proporcionan resultados complementarios sobre la adsorción de la proteína. Es decir, que el tiempo y el valor de la presión superficial al cual la penetración o la reordenación molecular es el mecanismo que controla el proceso de adsorción de la proteína son prácticamente independientes de la representación utilizada -- la que deriva de la ecuación 5.3 o de la ecuación 5.4.

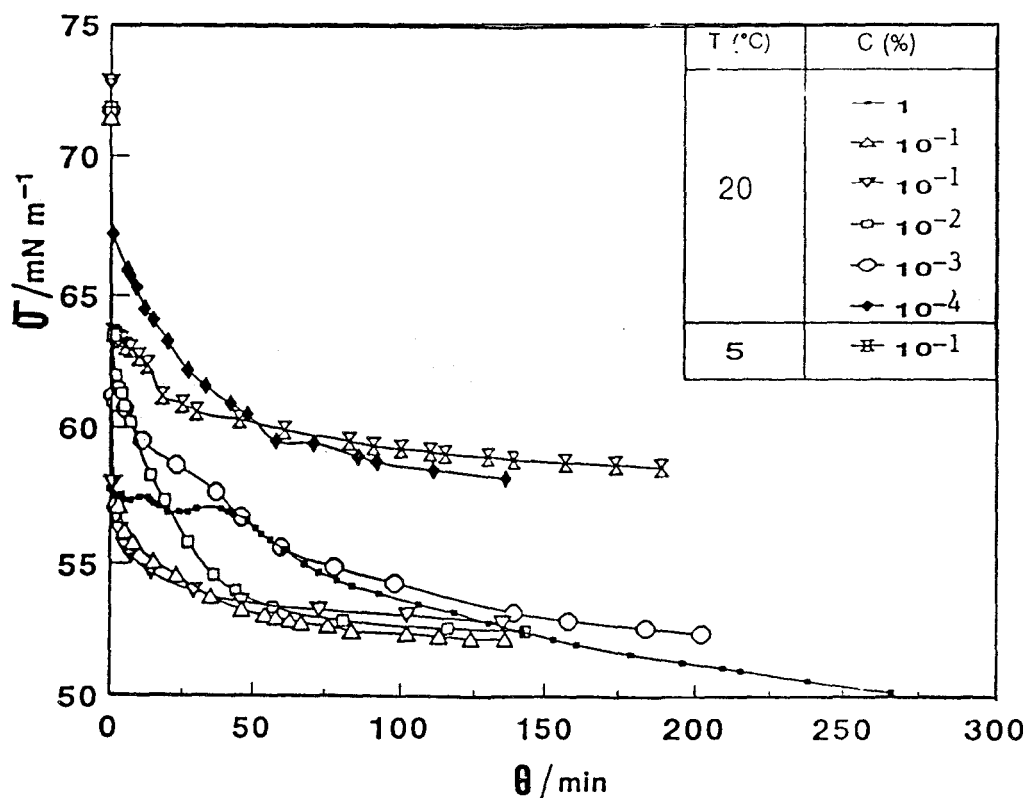


**Figura 5.4.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire- agua a 20°C. Aplicación de la ecuación 5.4 (•) a los resultados experimentales. Concentración de proteína: 1% en peso. Substrato: buffer fosfato (pH=7, I=0.05 M)

#### 5.1.2.1. Efecto de la concentración de proteína.

Los resultados experimentales (variación de  $\sigma$  con  $\theta$ ) referidos a la adsorción de BSA sobre agua se muestran en la figura 5.5. Para resumir el efecto de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa sobre la cinética de adsorción, se presenta en la tabla 5.2 los valores de las constantes cinéticas de primer orden, derivados de la aplicación de la ecuación 5.3 a lo datos experimentales. El ajuste de los datos experimentales al mecanismo cinético se realiza a intervalos de tiempo, basándose

en el mejor coeficiente de regresión lineal (LR), que se incluye en la tabla 5.2. El tiempo característico ( $\theta^*$ ), que se corresponde con el cambio de mecanismo, se ha obtenido analíticamente a partir del punto de corte de la representación lineal correspondiente a cada una de las etapas de adsorción.



**Figura 5.5.** Variación de la tensión superficial con el tiempo de adsorción de BSA, en función de la concentración de la proteína. Substrato: buffer fosfato (pH=7, I=0.05 M)

Como una regla general, se observa que la velocidad de cambio de la presión superficial con el tiempo se incrementa cuando aumenta la concentración de proteína en el seno de la fase. Es decir, a altas concentraciones la actividad superficial de la BSA es elevada, lo cual está de acuerdo con datos previos de la literatura (Tornberg, 1978; Phillips, 1981).

**Tabla 5.2.** *Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA sobre agua.*

C (%)	T (°C)	$k_1 \times 10^3$ (LR)	$k_2 \times 10^3$ (LR)	$\theta^*$ (min)
1	20	30,7 (0,999)	9,18 (0,996)	40
$10^{-1}$	5	32,4 (0,986)	19,4 (0,988)	20
$10^{-1}$	20	31,9 (0,997)	39,5 (0,979)	85
$10^{-2}$	20	18,8 (0,999)	31,6 (0,998)	90
$10^{-3}$	20	16,0 (0,998)	31,1 (0,993)	130
$10^{-4}$	20	18,3 (0,996)	37,0 (0,997)	90

Si el incremento de la presión superficial refleja un incremento en el número de unidades de proteína (moléculas o segmentos) que se adsorben, cualquiera que sea el mecanismo que gobierne el proceso, la influencia de la concentración de proteína sobre la velocidad de adsorción de BSA se podría discutir sobre la base de los datos representados en la figura 5.5 y de los parámetros cinéticos que se muestran en la tabla 5.2.

De los resultados mostrados en la figura 5.5 se deduce que el incremento de presión superficial durante la etapa inicial de adsorción de la proteína es menor cuando decrece su concentración en el seno de la fase. Por lo tanto, si durante esta etapa la velocidad de adsorción está controlada por la difusión de la proteína desde el seno de la fase, la velocidad de difusión disminuye con la concentración. Estos resultados son concordantes con los de otros autores (Tornberg, 1978; Phillips, 1981), y con lo que predice la teoría de Ward-Tordai (1946). En efecto, del cumplimiento de la ecuación

5.2 se deriva que la pendiente de la representación de  $\pi-\theta^{1/2}$  aumenta con la concentración de proteína (C), como se deduce de los resultados obtenidos en ese estudio. Este aspecto se estudiará más profundamente en el siguiente apartado.

A mayores tiempos de adsorción, cuando existe una barrera de energía para la adsorción, la capacidad de las moléculas de proteína para crear un espacio en la película, penetrar en ella y, posteriormente, reordenarse, se convierte en el mecanismo controlante del proceso. En estas condiciones, el valor de la constante  $k_1$  se incrementa con la concentración de proteína, según se muestra en los datos de la tabla 5.2<sup>2</sup>. Es decir, la penetración de la proteína en la interfase está favorecida a las más altas concentraciones de proteína en el seno de la fase. Las medidas de elipsometría o el método de trazado radioactivo, que permite la determinación directa de la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase, muestra igualmente que tanto  $\pi$  como  $\Gamma$  se incrementan durante este período (Xu y Damodran, 1992; ídem. 1994; Damodaran, 1990; Graham y Phillips, 1979). La dependencia de la constante cinética de primer orden  $k_1$  con la concentración de proteína es también consistente con la forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai, ecuación 5.4. En efecto, el número de colisiones y por lo tanto el número de grupos que se adsorben ( $\nu$ ) dependen de la concentración de proteína en el seno de la fase.

No obstante, el efecto de la concentración de proteína sobre la constante cinética de primer orden  $k_2$  es opuesta a la que se ha comentado en relación con la

---

<sup>2</sup> De los datos de la tabla 5.2 es interesante destacar que se produce un incremento significativo en los valores de  $k_1$  a concentraciones de BSA en el medio acuoso comprendidas entre el 10<sup>-1</sup> % y el 10<sup>-2</sup> % en peso. Como se discutirá en el apartado 5.4, en este mismo intervalo de composiciones de BSA tiene lugar la saturación de la interfase por la BSA, según se deduce de la isoterma de adsorción (Figura 5.14).

constante  $k_1$  (Tabla 5.2)<sup>3</sup>. De los datos de la tabla 5.2 se puede deducir que al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase se reduce la velocidad de reordenación de las moléculas adsorbidas en la interfase, con la que se asocia el valor de la constante  $k_2$ . De la medida directa de la cantidad de proteína adsorbida ( $\Gamma$ ) se ha observado por otros autores (Graham y Phillips, 1979) que el valor de  $\Gamma$  es prácticamente constante, durante esta etapa. Por lo tanto, el incremento de  $\pi$  que se observa en este estudio (figura 5.5) puede asociarse a los cambios conformacionales de la proteína adsorbida.

La influencia de la concentración de proteína durante esta etapa podría estar relacionada con la compresibilidad de la película. En efecto, se ha observado que a elevadas concentraciones de proteína tanto el espesor de la capa de BSA adsorbida como la compresibilidad de la película se incrementan (Tornberg, 1978; Phillips, 1981). Por lo tanto, cuando la película es altamente compresible los cambios conformacionales en la interfase serán relativamente lentos, que es lo que se observa a elevadas concentraciones de proteína (Graham y Phillips, 1979) y se corrobora con los datos de  $k_2$  que se muestran en la tabla 5.2.

#### 5.1.2.2. Efecto de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la adsorción de BSA sobre agua se ha estudiado para una concentración de proteína de  $10^{-1}$  % en peso (figura 5.5). Del análisis de estos resultados se pueden deducir dos consideraciones:

---

<sup>3</sup> Estos resultados podrían ser discutidos también en función de la saturación de la interfase por la BSA a concentraciones de esta proteína en el medio acuoso al  $10^{-2}$  % en peso (ver discusión en el apartado 5.4).

- A) El valor de  $\pi^\infty$  es menor a las menores temperaturas. Es decir la actividad superficial de la BSA en condiciones estacionarias decrece con la temperatura.
  
- B) La velocidad de cambio de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA, se incrementa cuando aumenta la temperatura.

Similares resultados a los mostrados en la figura 5.5, se obtuvieron recientemente con otra proteína globular (lisozima) sobre la interfase aire-agua (Xu y Damodaran, 1992). De la aplicación de la ecuación 5.3, una vez superado el período inicial de difusión, se ha obtenido los valores de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$ , que se incluyen en la tabla 5.2.

Se observa que el valor de la constante  $k_1$  es independiente de la temperatura, lo que indica que la etapa correspondiente a la penetración superficial es independiente de la temperatura. Sin embargo, el valor de  $k_2$  es menor a la menor temperatura, lo que indica que la velocidad de reorganización de las moléculas de BSA adsorbidas sobre la interfase decrece a la menor temperatura.

Un razonamiento similar al desarrollado para el estudio de la influencia de la concentración de proteína se podría aplicar aquí. Puesto que la película se hace menos fluida cuando desciende la temperatura (Rivas y Sherman, 1984; Ward y Regan, 1981), el descenso de la velocidad de reordenación molecular en la interfase puede asociarse con un descenso de la fluidez de la película<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> El estudio de la influencia de la temperatura sobre la velocidad de adsorción de la BSA sólo puede ser provisional, debido a los pocos datos disponibles. No obstante, por su interés práctico, este estudio constituirá una extensión del trabajo realizado en esta Memoria.

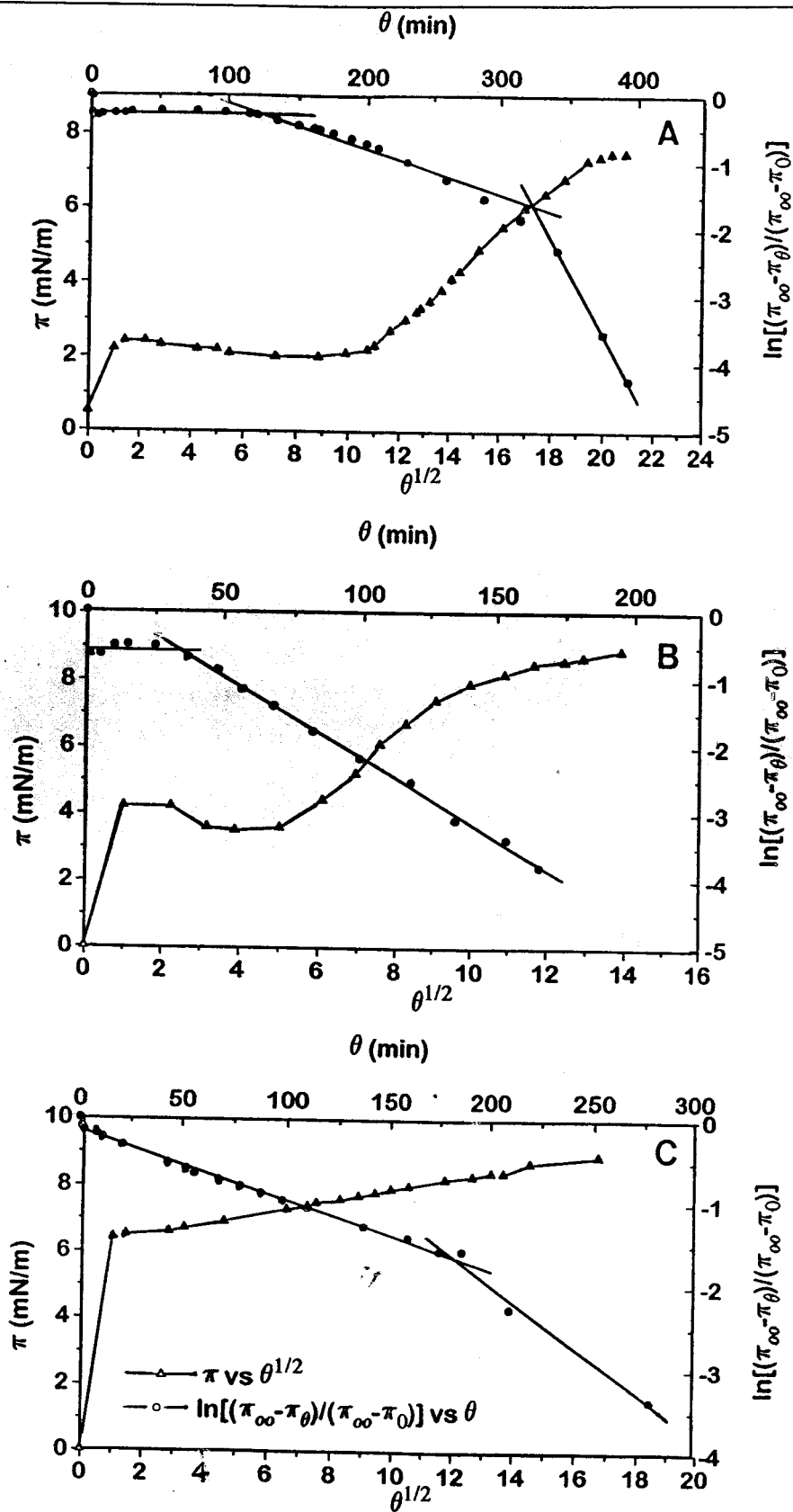


### 5.1.3. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de etanol a 1 mol/litro.

Los solutos presentes en el seno de la fase acuosa son uno de los mayores componentes de los alimentos, que ejercen además significativos efectos sobre las propiedades fisico-químicas de los mismos. En adición al estudio de los efectos individuales de las condiciones medioambientales -- tales como la temperatura o concentración de proteína, estudiada en el apartado anterior -- sobre la adsorción de la proteína y su comportamiento en la interfase, es esencial investigar los efectos combinados de estos factores con la adición de solutos en el seno de la fase acuosa (Halling, 1981; Charalambous y Doxastakis, 1989; Dickinson, 1992). El estudio de la presencia de etanol sobre la adsorción de proteínas es de importancia práctica en la fabricación de productos de panadería, bollería, pastelería etc., y de bebidas alcohólicas, tales como licores crema, cerveza, cava, etc. (Halling, 1989; Dickinson, 1992, Leadbetter, 1990, Krog et al, 1985).

El efecto de la adición de etanol sobre el incremento de presión superficial tras la inyección de BSA se muestra en las figuras 5.6. En estas experiencias la concentración de etanol en el seno de la fase (1 M) y la temperatura (20°C) se mantienen constantes. Sin embargo, la concentración de BSA en el seno de la fase acuosa es de 0,01 % (figura 5.6-A), 0,1 % (figura 5.6-B) y 1 % en peso (figura 5.6-C).

Al igual que sucedía con la adsorción de BSA sobre agua, la etapa correspondiente a la difusión de la proteína en el seno de la disolución acuosa de etanol es lo suficientemente rápida como para poder ser detectada por el dispositivo experimental utilizado en este estudio (ver la representación de  $\pi$  frente a  $\theta^{1/2}$  en las figuras 5.6). Sin embargo, como un comportamiento general, puede observarse que el



**Figura 5.6.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-disoluciones acuosas de etanol a (A) 0,01, (B) 0,1 y (C) 1 mol/litro. Aplicación de las ecuaciones 5.2 ( $\blacktriangle$ ) y 5.3 ( $\bullet$ ) a los resultados experimentales. Concentración de proteína: 10<sup>-2</sup>% en peso. Temperatura: 20°C.

valor inicial de  $\pi$  se incrementa con la concentración de proteína. El valor de  $\pi$  se incrementa hasta un valor del 25%, del 39% o del 75% durante los primeros 5 minutos tras la adición de BSA, cuando la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa es del 0,01 %, del 0,1 % o el 1 % en peso, respectivamente. Es decir, la velocidad de difusión de las moléculas de proteína desde el seno de la fase se incrementa con la concentración de proteína.

Para cuantificar la velocidad de penetración en la interfase y la reordenación de las moléculas de BSA adsorbidas, se contrastan los resultados experimentales con la ecuación 5.3. Puede observarse (figuras 5.6) que existe un período de inducción, tras la primera etapa asociada a la difusión de la proteína, para concentraciones de la misma inferiores al 0,1 % en peso. El período de inducción disminuye cuando la concentración de proteína se incrementa. El período de inducción es de 36 y 130 minutos a concentraciones de BSA en el seno de la fase de 0,1 % y 0,01 % en peso, respectivamente. A la mayor concentración de proteína estudiada (1 % en peso) no se observa período de inducción.

Tras el período de inducción, dos líneas rectas correlacionan los datos experimentales de acuerdo con la ecuación 5.3. Los parámetros característicos correspondientes a la cinética de adsorción de BSA sobre disolución acuosa de etanol a 1 mol/l se incluyen en la tabla 5.3. Se observa que, cuando existe un período de inducción (a concentraciones de BSA de 0,1 y 0,01 % en peso), la constante cinética de primer orden  $k_1$  se incrementa con la concentración de proteína, mientras que un efecto opuesto se desprende de los valores de la constante cinética de primer orden  $k_2$ . Como una regla general, se deduce que la velocidad de adsorción de BSA se incrementa con la concentración de proteína.

La explicación de los fenómenos observados debe asociarse con las interacciones proteína-etanol, en la interfase o en el seno de la fase. Existen diversos mecanismos según los cuales el etanol puede actuar como un agente estabilizante o desestabilizante de la proteína nativa, y es difícil decidir que tipo de interacción o interacciones es más importante bajo unas determinadas condiciones experimentales. Se ha observado con frecuencia que el etanol actúa como un potente agente desnaturizante para la mayoría de las proteínas (Tanford, 1962). Esto ha dado lugar a la opinión generalizada de que el etanol desnaturiza a las proteínas por debilitamiento de los enlaces hidrofóbicos. El efecto desnaturizante del etanol se manifiesta fundamentalmente por una disminución de la solubilidad de la proteína (Aoki et al., 1981). Esta proteína agregada en el seno de la fase acuosa puede difundirse hacia la interfase para formar una película delgada con una elevada viscosidad superficial (Dickinson y Woskett, 1988).

**Tabla 5.3.** *Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA sobre disoluciones acuosa de etanol a 1 mol/litro. Temperatura: 20°C.*

Concentración de BSA (%):	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1
k <sub>0</sub> × 10 <sup>3</sup> (min <sup>-1</sup> ), LR	0	0	---
k <sub>1</sub> × 10 <sup>3</sup> (min <sup>-1</sup> ), LR	6.74 (0.979)	24.0 (0.999)	8.26 (0.998)
θ <sup>*</sup> <sub>1</sub> (min)	130	36	
k <sub>2</sub> × 10 <sup>3</sup> (min <sup>-1</sup> ), LR	37.5 (0.999)	23.8 (0.994)	18.1(0.991)
θ <sup>*</sup> <sub>2</sub> (min)	325	---	185

Sin embargo, existen otros estudios que muestran que el etanol puede actuar como un agente estabilizante de la proteína nativa, al menos a bajas temperaturas (Brands y Hunt, 1967). Las medidas cinéticas, durante el intervalo de segundos a minutos, indican que la velocidad de desnaturalización reversible de la proteína depende de la temperatura y de la concentración de etanol (Pohl, 1968).

Desde otro punto de vista, el efecto del etanol en reducir la tensión superficial del agua (Rodríguez Patino y Martín, 1994) refleja el hecho de que las moléculas de etanol presentes en la fase acuosa tienen la capacidad de adsorberse sobre la interfase. Por lo tanto, durante la adsorción de BSA desde el seno de la disolución acuosa de etanol, las moléculas de BSA y de etanol compiten por la interfase y puede quedar inhibida la formación de una película de proteína adsorbida con una elevada viscoelasticidad superficial (Dickinson y Woskett, 1988).

El efecto de la concentración de proteína sobre la velocidad de cambio de la presión superficial con el tiempo tras la adición de BSA (figuras 5.6) -- como consecuencia de la difusión de la proteína hacia la interfase -- es similar a la observada con agua (figura 5.5). Por lo tanto, la misma explicación se aplicaría aquí. Sin embargo, si el etanol causa una agregación de la proteína en el seno de la fase acuosa, la velocidad de difusión de la proteína podría disminuir (Ahmed y Dickinson, 1990), como se observa globalmente con la adsorción de BSA desde una disolución acuosa de etanol en este estudio (figuras 5.6), en comparación con lo observado sobre agua pura.

La existencia de un período de inducción puede asociarse con la adsorción competitiva de BSA sobre una película de etanol previamente adsorbida. La proteína tiene una mayor afinidad que el etanol por la interfase debido a su mayor hidrofobicidad. Esto quiere decir que el etanol podría ser desplazado de la interfase por

la BSA, especialmente a las mayores concentraciones de proteína en el seno de la fase acuosa, lo que está de acuerdo con los datos representados en las figuras 5.6 y los mostrados en la tabla 5.3.

En efecto, cuando  $\ln [(\pi_{\infty}-\pi_0)/(\pi_{\infty}-\pi_o)]$  es independiente de  $\theta$ , esto no puede ser una indicación de que no se crean nuevas áreas en la película, sino que la cobertura interfacial puede mejorar como consecuencia de los segmentos de proteína, o de agregados de proteína, que se adsorben en la interfase ocupando la superficie de las moléculas de etanol adsorbidas previamente, y que son desplazadas por la proteína. Es posible también que durante este período tenga lugar un proceso de reordenación en la interfase, como consecuencia de las interacciones BSA-etanol.

El hecho de que el período de inducción disminuya o desaparezca, a partir de una cierta concentración de proteína en el seno de la fase, no significa que el efecto del etanol desaparezca en estas condiciones, sino que puede reflejar, más bien, el punto en el cual el efecto de la concentración de proteína sobre la difusión se hace predominante.

Los valores de las constantes cinéticas de primer orden, tras el período de inducción, podrían asociarse con la penetración y reordenación de las moléculas de proteína adsorbidas. El efecto de la concentración de proteína sobre los valores de las constantes  $k_1$  y  $k_2$  -- a concentraciones de proteína en el seno de la fase inferiores a 0'1 % en peso -- está cualitativamente de acuerdo con lo observado previamente sobre agua. Sin embargo, la contribución relativa de los efectos de la desnaturalización de la proteína (Tanford, 1962), de la agregación de la proteína (Aoki et al., 1981) y de la viscoelasticidad de la película (Dickinson y Woskett, 1988) en presencia de etanol sobre las constantes cinéticas mostradas en la tabla 5.3, es difícil de establecer. Además, es posible que las interacciones hidrofóbicas o electrostáticas entre proteína y etanol

conduzcan a la formación de un complejo entre ambos componentes en la interfase, con diferentes estructura y propiedades que las de una película de proteína pura.

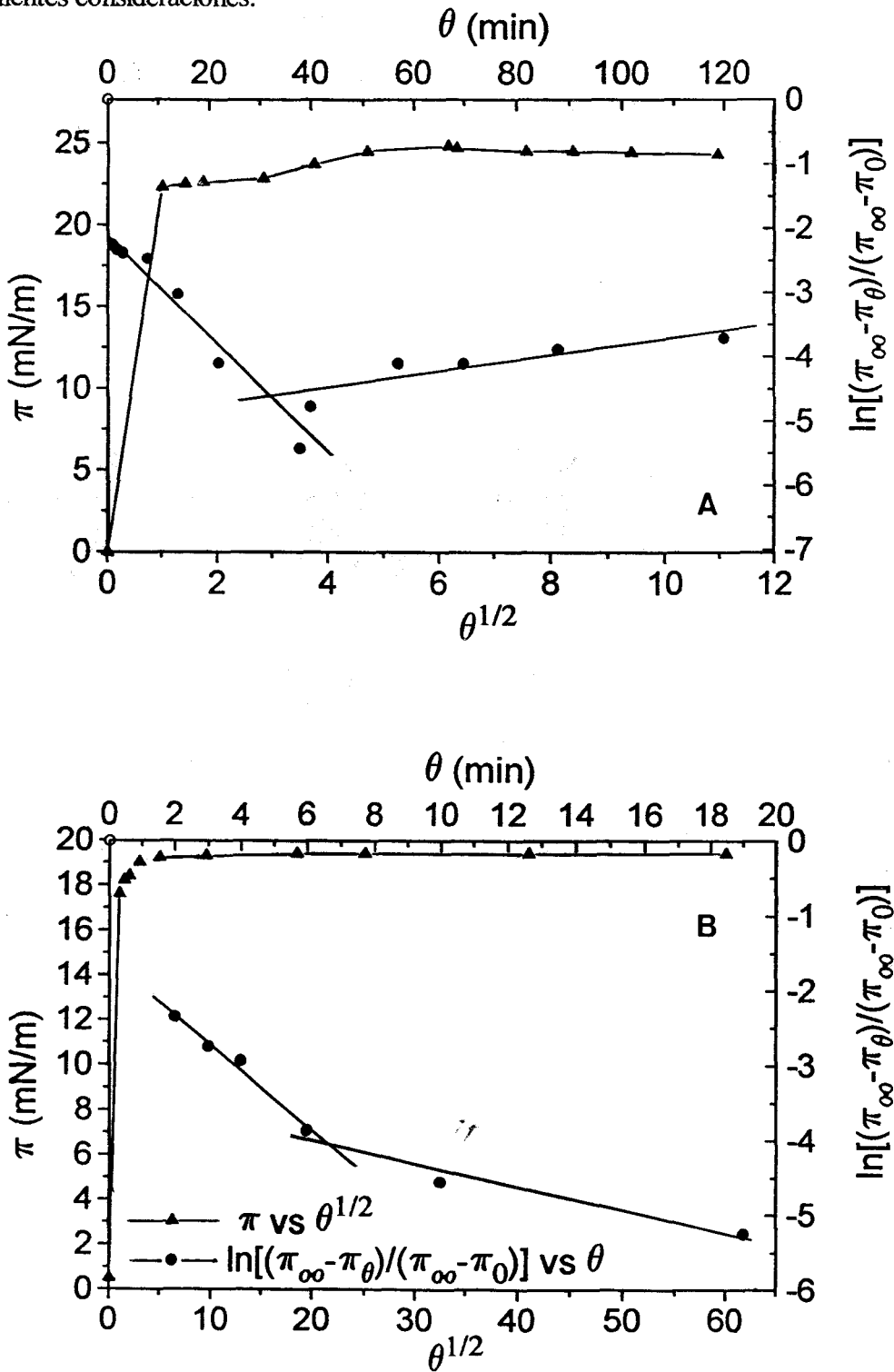
A partir de los datos de la tabla 5.3 se puede admitir que la importancia relativa de todos los fenómenos previamente discutidos sobre la adsorción de proteína depende de la relación proteína/etanol. Sin embargo, se requieren más estudios experimentales sobre la adsorción de proteínas en sistemas que contienen etanol para comprobar las hipótesis expuestas sobre el efecto del etanol.

#### **5.1.4. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de sacarosa a 0'5 mol/litro.**

El estudio de los efectos de la sacarosa sobre la adsorción de proteínas es relevante para ciertos procesos tecnológicos en los cuales espumas y emulsiones alimentarias están estabilizadas por proteínas en presencia de azúcares (Charalambous y Doxastakis, 1989; Dickinson, 1992). El efecto de la adición de sacarosa sobre el incremento de presión superficial tras la inyección de BSA es diferente del observado en presencia de etanol en el seno de la fase acuosa. En la figura 5.7 se muestra la variación de  $\pi$  con  $\theta$  tras la adición de BSA -- para concentraciones de proteína en el seno de la fase de 0'1 % y 1 % en peso -- sobre disoluciones acuosas de sacarosa a 0'5 mol/litro, y a una temperatura de 20°C.

La adecuación de los datos experimentales a las etapas de difusión (según la ecuación 5.2) y de penetración y reorganización (de acuerdo con la ecuación 5.3) se muestra en las figuras 5.7 (A y B), para las dos concentraciones estudiadas de BSA. Los parámetros cinéticos característicos para la adsorción de BSA en disolución acuosa

de sacarosa se muestran en la tabla 5.4. De estos resultados se pueden extraer las siguientes consideraciones:



**Figura 5.7.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire- disolución acuosa de sacarosa a 0.5 mol/litro. Aplicación de las ecuaciones 5.2 ( $\blacktriangle$ ) y 5.3 ( $\bullet$ ) a los resultados experimentales. Temperatura: 20°C. Concentración de proteína: (A) 0.1% y (B) 1% en peso.



**Tabla 5.4.** *Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA sobre disoluciones acuosas de sacarosa a 0.5 mol/litro. Temperatura: 20°C.*

Concentración de BSA (%)	10 <sup>-1</sup>	1
$k_1 \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> ), LR	36.7 (0.990)	77.1 (0.976)
$k_2 \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> ), LR	-10.2 (0.976)	11.7 (0.890)
$\theta_1$ (min)	32	7

- A) La presión superficial se incrementa drásticamente tras la adición de BSA. Es decir, a los 5 minutos el valor de  $\pi$  es de aproximadamente el 95% del correspondiente a las condiciones estacionarias ( $\pi^\infty$ ), independientemente de la concentración de proteína en el seno de la fase.
- B) La velocidad de incremento de  $\pi$  aumenta con la concentración de proteína.
- C) Tras la difusión hacia la interfase, dos etapas de acuerdo con la ecuación 5.3 correlacionan los cambios de la presión superficial con el tiempo (figuras 5.7-A y B).
- D) A diferencia de lo que ocurría en presencia de etanol en el seno de la fase (figuras 5.6), no se observa la existencia de un periodo de inducción.
- E) Al igual de lo que se observaba sobre agua o disolución acuosa de etanol, el valor de la constante cinética de primer orden se incrementa con la concentración de proteína.

Sin embargo, se observan algunas diferencias según sea el tipo de soluto presente en la fase acuosa. Comparando la adsorción de BSA sobre agua o disolución acuosa de etanol, en presencia de sacarosa:

- (i) el valor de  $k_1$  es mayor,
- (ii) el tiempo característico ( $\theta^*$ ) disminuye, y
- (iii) el valor de  $k_2$  es menor o, incluso, negativo.

A la luz de estos resultados se puede concluir, pues, que la velocidad global de adsorción de BSA sobre la disolución de sacarosa a 0'5 mol/litro es mayor que sobre agua o sobre la disolución acuosa de etanol a 1 mol/litro, en este orden.

Un incremento en la velocidad de adsorción de proteína en presencia de sacarosa ha sido observado previamente por otros investigadores (MacRitchie y Alexander, 1961). Además, se han sugerido algunas razones para explicar este comportamiento. La sacarosa podría desnaturalizar las moléculas de proteína en la interfase o en el seno de la fase (MacRitchie y Alexander, 1961). En los estudios preliminares de adsorción, parecía evidente que las proteínas que se habían desnaturalizado durante la mezcla de las disoluciones se adsorbían rápidamente. Aunque las moléculas alargadas y desplegadas podrían tener un menor coeficiente de difusión que la forma globular de la misma proteína, el factor más importante aquí podría ser la exposición de las porciones hidrofóbicas de la cadena, que promoverían una rápida adsorción. Sin embargo, parece ser que este efecto no es significativamente importante, y parece ser más probable que la sacarosa actúe como un agente estabilizante de la proteína.

La posibilidad de que la sacarosa incremente la barrera para la transformación entre los estados nativo y desnaturalizado de las proteínas ha sido examinada usando diferentes técnicas experimentales (Crowe et al., 1987). De estos estudios se deduce que un gran número de compuestos, con una gran variedad de estructuras químicas, son excluidos de los dominios inmediatos de las moléculas de proteína en disolución. Es decir, cuando estos compuestos están presentes, las proteínas están preferentemente hidratadas (Crowe et al., 1987; Lee y Timasheff, 1981). La diversidad en las propiedades físicas y químicas de estos compuestos sugiere que debe existir una variedad de mecanismos que conducen a la hidratación preferencial de la proteína en su presencia. Para algunos, como los azúcares, el principal factor puede estar relacionado con las fuerzas cohesivas del agua (Crowe et al., 1987).

Se ha observado experimentalmente que la tensión superficial del agua se incrementa por la adición de sacarosa (Rodríguez Patino y Martín, 1994), lo cual es indicativo de la existencia de una mayor estructuración de las moléculas del agua en su presencia. Por lo tanto, se puede sugerir que -- si la sacarosa limita la desnaturalización de la proteína y las interacciones proteína-proteína -- la reducción de la agregación de la proteína hace posible que una mayor cantidad de proteína pueda estar implicada en la formación de la película. Como una consecuencia de este efecto, la velocidad de incremento de  $\pi$  aumentaría drásticamente, como se observa en las figuras 5.7-A y B.

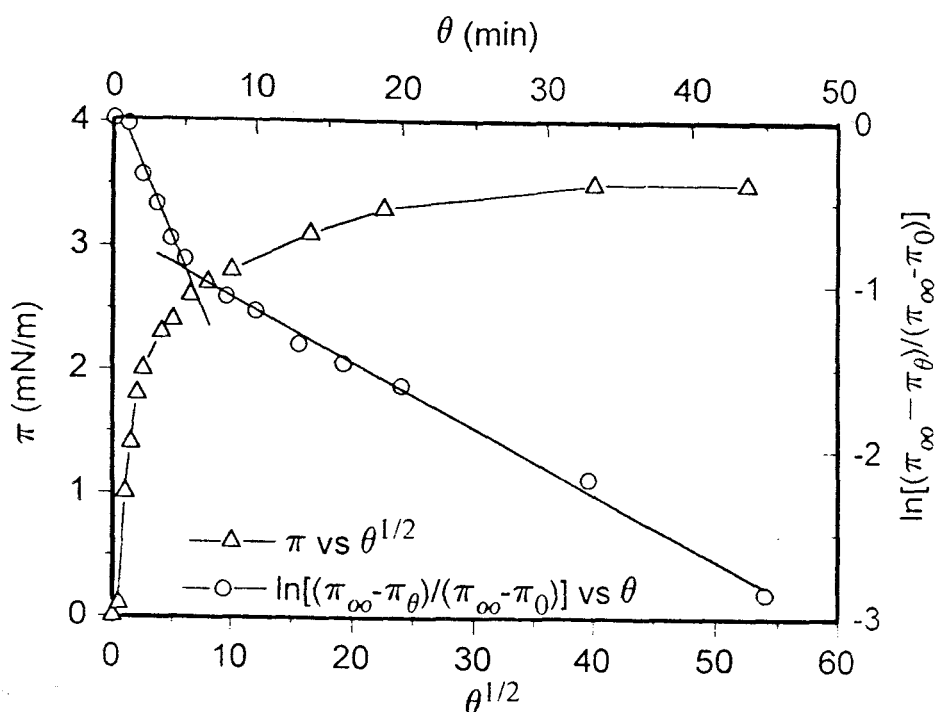
El mismo fenómeno podría estar relacionado con el hecho de que el valor de  $k_2$  sea bajo o negativo (tabla 5.4). Puesto que la sacarosa estabiliza a las proteínas frente a la desnaturalización y a la agregación, la integridad de una estructura cerrada puede constituir una barrera para la reorganización de las moléculas de proteína previamente adsorbidas sobre la interfase.

La sacarosa puede afectar también a la estructura macromolecular a través de la interacción directa con la macromolécula, mediante una acción indirecta a través de la estructura y propiedades del disolvente, o por una combinación de ambos efectos (Timasheff et al., 1976). Por lo tanto, un cambio en la conformación de la proteína, tras la adsorción, podría afectar al valor y al signo de la constante cinética de primer orden  $k_2$ , como se ha observado en este estudio (tabla 5.4).

#### **5.1.5. Variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre disolución acuosa de una mezcla de etanol a 1 mol/litro y sacarosa a 0'5 mol/litro.**

La elección de esta disolución en este estudio se justifica por el hecho de que su composición coincide con la de algunas cremas alcohólicas (Dickinson et al., 1989; Banks et al., 1981, 1982, 1985), una de las emulsiones cuya producción se ha incrementado más en los últimos tiempos (Dickinson y Stainsby, 1987).

La dependencia con el tiempo de la presión superficial, durante la adsorción de BSA en presencia de una disolución acuosa que contiene etanol (1 mol/litro) y sacarosa (0'5 mol/litro), se muestra en la figura 5.8. Se puede observar que este comportamiento está cualitativamente a medio camino entre los discutidos previamente con etanol (figuras 5.6) o sacarosa (figuras 5.7) en el seno de la fase. Como se comentó con la sacarosa, no se detecta la existencia de un período de inducción, pero el incremento inicial de la presión superficial es menor que cuando en el seno de la fase acuosa estaba presente solamente la sacarosa.



**Figura 5.8.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire disolución acuosa de etanol a 1 mol/litro y de sacarosa a 0'5 mol/litro. Aplicación de las ecuaciones 5.2 ( $\Delta$ ) y 5.3 (O) a los resultados experimentales. Concentración de proteína:  $10^{-2}\%$ . Temperatura:  $20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 5.4.** Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA sobre disolución acuosa de la mezcla de etanol a 1 mol/litro y sacarosa a 0.5 mol/litro. Temperatura:  $20^{\circ}\text{C}$ . Concentración de BSA:  $10^{-2}\%$ .

$k_1 \times 10^3$ (min), LR	$k_2 \times 10^3$ (min), LR	$\theta^*_1$ (min)
202 (0.989)	47.8 (0.997)	5

Tras la etapa inicial de difusión hacia la interfase, dos constantes cinéticas de primer orden,  $k_1$  y  $k_2$ , deducidas por aplicación de la ecuación 5.3, correlacionan la dependencia entre la presión superficial y el tiempo. Los valores de las constantes  $k_1$  y

$k_2$ , que se incluyen en la tabla 5.5, son superiores a los que se obtienen sobre agua (tabla 5.2) o sobre cualquiera de los otros solutos aislados, etanol (tabla 5.3) o sacarosa (5.4). Sin embargo, el tiempo que transcurre hasta alcanzarse condiciones estacionarias aumenta, en función de la composición de la fase acuosa, desde sacarosa hasta una mezcla etanol-sacarosa, hasta agua y hasta etanol. Es decir, la velocidad de adsorción se incrementa en presencia de sacarosa en el seno de la fase acuosa, mientras que se observa el efecto opuesto con etanol en disolución.

## 5.2. CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA A TIEMPOS CORTOS

Para el estudio de la etapa inicial de difusión de la proteína hacia la interfase se ha utilizado el método de la gota pendiente, según el dispositivo y el procedimiento experimental que se describe en el apartado 4.2.1.2. Las experiencias realizadas son las que se indican en la tabla 4.3. Las medidas se realizan generalmente en el intervalo de tiempo comprendido entre 0,66 s, tiempo mínimo necesario para la adquisición de la imagen de la gota, y 65 s.

### 5.2.1. Difusión de BSA desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase.

En la figura 5.9 se representa, a título de ejemplo, los resultados de la aplicación de la ecuación de Ward y Tordai (ecuación 5.2) a los datos experimentales obtenidos durante la adsorción de BSA sobre agua, en función de la concentración de proteína. Como puede comprobarse, en el intervalo inicial de tiempo, existe un ajuste satisfactorio de los resultados experimentales, de acuerdo con la ecuación 5.2. Es decir, se certifica que durante la etapa inicial de adsorción de la BSA sobre la interfase aire-agua, la cinética<sup>5</sup> del proceso está controlada por un mecanismo de difusión de la

<sup>5</sup> Ward y Tordai (1946) dedujeron por primera vez una ecuación general que describe la velocidad de llegada de una proteína (y de otras sustancias anfífilas) a la interfase. Asumiendo que el flujo de moléculas de proteína hacia la interfase es el resultado neto de la difusión desde el seno de la fase hacia la interfase y desde esta hacia el seno de la subfase, la velocidad de llegada de la proteína a la interfase puede ser expresada (asumiendo que el coeficiente de difusión, D, es independiente de la concentración de proteína en el seno de la fase) mediante la ecuación:

$$d\Gamma / d\theta = (D / 3'1416)^{1/2} \left\{ C_0 \theta^{-1/2} - 0'5 \int_0^{\theta} \left[ C_s(\tau) / (t - \tau)^{3/2} \right] d\tau \right\} \quad (5.6)$$

la integración de esta ecuación conduce a:

$$\Gamma / \theta = 2(D / 3'1416)^{1/2} \left\{ C_0 \theta^{-1/2} - \int_0^{\theta^{1/2}} \left[ C_s(\tau) d(t - \tau)^{1/2} \right] \right\} \quad (5.7)$$

proteína desde el seno de la fase hasta la interfase. La discrepancia entre los datos experimentales y el modelo cinético utilizado, a los mayores tiempos de experimentación, es indicativa de la existencia de una barrera de energía para la adsorción que, como se ha discutido en el apartado anterior puede estar relacionada con la etapa de adsorción y penetración de la proteína en la interfase. A partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 5.2 puede obtenerse, de la pendiente de la representación, el coeficiente de difusión de la BSA en el seno de la fase acuosa. Este parámetro puede ser de utilidad para cuantificar el efecto de las variables estudiadas (concentración de proteína y composición del medio acuoso) sobre la adsorción de BSA. En la tabla 5.6 se muestra los valores de la pendiente de la representación de  $\pi$  vs  $\theta^{1/2}$ , junto con el coeficiente de regresión, obtenido por aplicación de la ecuación 5.2.

donde  $C_0$  es la concentración de la proteína en el seno de la fase,  $C_s(\tau)$  es su concentración en la sub-interfase, y  $\tau$  es un tiempo característico. En la ecuación (5.7), el primer término representa la transferencia de masa desde el seno de la fase hasta la interfase y el segundo la transferencia de masa en sentido inverso. En la deducción de la ecuación (5.7) se ha asumido también que no existe barrera de energía para la adsorción y para la desorción, y que la difusión es la fuerza impulsora que controla la adsorción. Aunque en teoría la ecuación (5.7) es adecuada para relacionar la concentración superficial en el tiempo  $\theta$  con otros parámetros del sistema y permite el cálculo de  $\Gamma$  (si es conocido  $D$ ) o de  $D$  (si es conocido  $\Gamma$ ), en la práctica no es posible utilizar esta ecuación porque el término  $C_s(\tau)$  no es posible determinarlo experimentalmente. Sin embargo, si se asume que  $C_s$  es muy pequeño en comparación con  $C_0$  (lo que significa que una vez que la proteína llega a la subsuperficie se adsorbe instantáneamente) o que la adsorción es un proceso irreversible, lo cual parece que es cierto para la adsorción de proteínas (MacRitchie y Alexander, 1963, Graham y Phillips, 1979a, 1979b, González y MacRitchie, 1979), la ecuación (5.6) se reduce a:

$$d\Gamma/d\theta = C_0(D/3 \cdot 1416\theta)^{1/2} \quad (5.8)$$

y

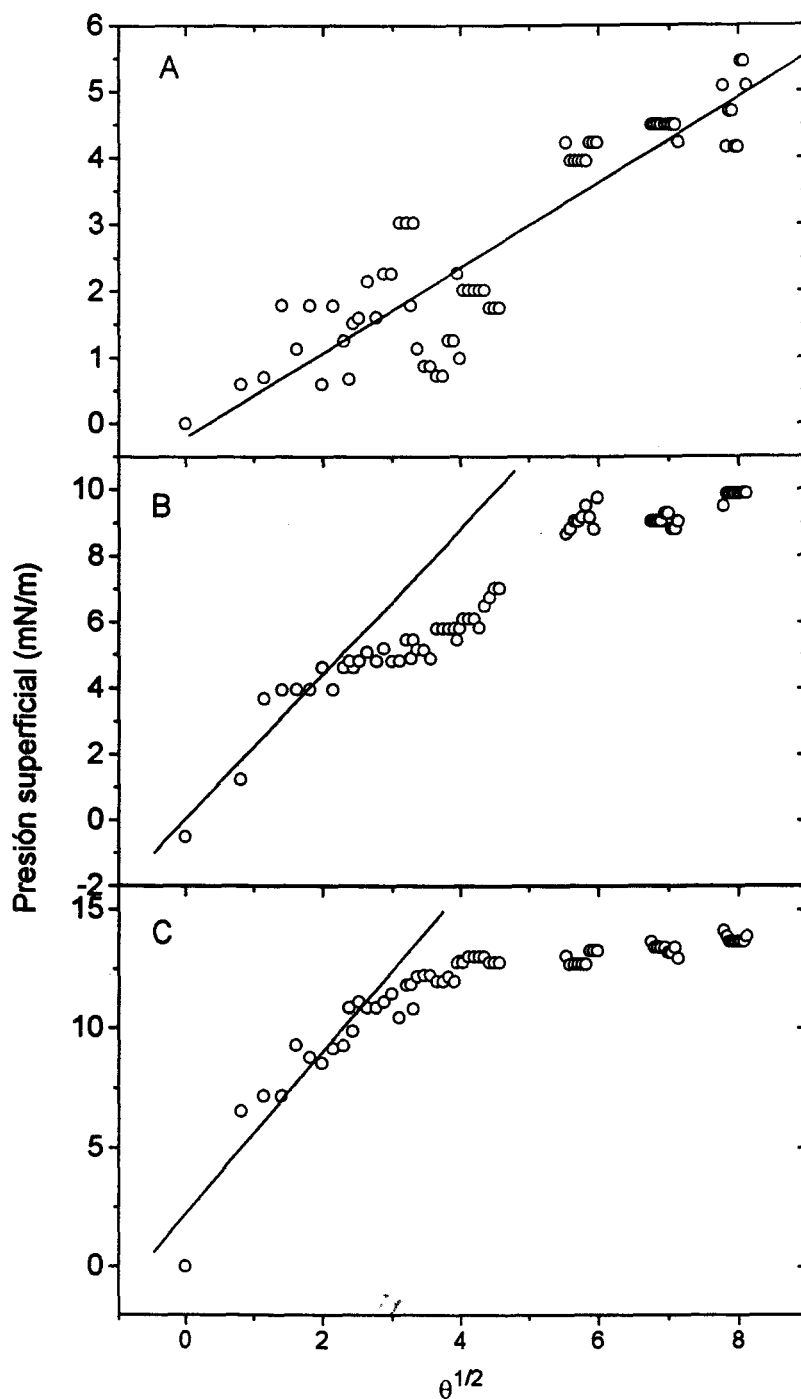
$$\Gamma = 2C_0(D/3,1416)^{1/2} \cdot \theta^{1/2} \quad (5.9)$$

que es esencialmente similar a la ecuación (5.2). En efecto, cuando la ecuación (5.9) se combina con la clásica ecuación de estado (Davies, 1953):  $\pi/n = kT/v$ , que se cumple en la región de bajas presiones superficiales, cuando la difusión es la etapa controlante del proceso de adsorción, se obtiene la ecuación (5.2):

$$\pi = -2C \cdot k \cdot T(D/3 \cdot 1416) \cdot \theta^{1/2} \quad (5.2)$$

donde  $v$  es el número de grupos activos por molécula y  $n$  el número de moléculas por unidad de área.





**Figura 5.9.** Difusión de BSA hasta la interfase aire-agua, en función de la concentración de proteína en el medio acuoso: (A)  $1 \cdot 10^{-2} \%$ , (B) 0,1 % y (C) 1 %. Temperatura: 20 °C.

De los resultados representados en la tabla 5.5 se deduce que la pendiente de la representación de  $\pi$  frente a  $\theta^{1/2}$  se incrementa con la concentración de proteína en el seno del agua. Un aumento similar de la pendiente de la representación  $\pi-\theta^{1/2}$  con la concentración de la proteína en disolución ha sido observada por otros investigadores (Tomberg, 1977, 1978b, Tomberg et al. 1982). Estos resultados están de acuerdo con las opiniones expuestas en el apartado 5.1. Es decir, la concentración de BSA en el medio acuoso actúa como una fuerza impulsora de la difusión de la proteína desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase. Por lo tanto, un aumento de la concentración de BSA en el medio acuoso facilita la difusión de la proteína hacia la interfase.

El coeficiente de difusión de la BSA en el seno de la disolución puede calcularse a partir de los datos experimentales de  $\pi$  en función de  $\theta$  y de la pendiente de la isoterma  $\pi-\Gamma$  de la monocapa esparcida de la proteína sobre el mismo medio acuoso. En el caso de la BSA sobre agua, en el intervalo de concentraciones estudiado, se conoce que la representación  $\pi-\Gamma$  es lineal para presiones inferiores a 17 mN/m (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979a). El coeficiente de difusión determinado a partir de los datos de  $\pi-\theta$  (Figura 5.9) y de  $\pi-\Gamma$  (Graham y Phillips, 1979a) es de  $1.32 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , y es prácticamente independiente de la concentración de la BSA en el medio acuoso. Este valor de  $D$  es del mismo orden de magnitud que los valores que se presentan en la bibliografía para la misma proteína (MacRitchie y Alexander, 1963) y para otras proteínas, globulares o no, determinado a partir de un procedimiento similar al utilizado en este estudio (MacRitchie y Alexander, 1963; Tanford, 1961), o a partir de medidas con trazadores radioactivos o de elipsometría (Benjamins et al, 1975; Graham y Phillips, 1979a, Mitchell et al. 1970; Tanford, 1961).

Estos resultados confirman, de nuevo, que durante la etapa inicial de adsorción de la BSA desde el seno de una disolución acuosa, la cinética está gobernada por el

proceso de difusión de la proteína hacia la interfase y que no existe una barrera de energía asociada a la penetración de la proteína en la interfase (Benjamins et al., 1975; de Feijter y Benjamins, 1987; Graham y Phillips, 1979a).

**Tabla 5.6.** *Parámetros característicos de la cinética de adsorción de BSA sobre la interfase aire-medio acuoso, por aplicación de la ecuación de Ward y Torday (ecuación 5.2).*

Sistema	Pendiente	LR
BSA (1.10 <sup>-3</sup> %)-agua	0,38	0,907
BSA (1.10 <sup>-2</sup> %)-agua	0,64	0,897
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-agua	2,19	0,922
BSA (1 %)-agua	3,40	0,935
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 0,1M	1,02	0,947
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 0,25M	1,06	0,909
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 0,5M	0,90	0,899
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 1M	0,31	0,901
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 2M	0,36	0,939
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-sacarosa 0,1M	1,26	0,946
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-sacarosa 0,25M	2,14	0,952
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-sacarosa 0,5	1,36	0,940
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-sacarosa 1M	1,61	0,893
BSA (1.10 <sup>-1</sup> %)-etanol 1M/ sacarosa 0,5M	0,86	0,909

Desafortunadamente, la falta de información sobre la isoterma  $\pi$ - $\Gamma$  de la BSA sobre los restantes medios acuoso estudiados en esta sección (disoluciones acuosas de

etanol y de sacarosa) no hace posible, por el momento<sup>6</sup>, la utilización del mismo procedimiento para la determinación del coeficiente de difusión de la proteína,  $D$ , en función de la composición de la fase acuosa. Como se sabe, la isoterma  $\pi$ - $\Gamma$  es muy dependiente del tipo de proteína y de la composición del medio acuoso (Alexander y Teorell, 1939; Bull, 1945; Damodaran y Song, 1990; de Feijter y Benjamins, 1987; Douillard et al., 1994; Graham y Phillips, 1979a; Loeb, 1969; Mitchell et al., 1970; Rahman y Sherman, 1982; Song y Damodaran, 1991; Xu y Damodaran, 1994, etc.)

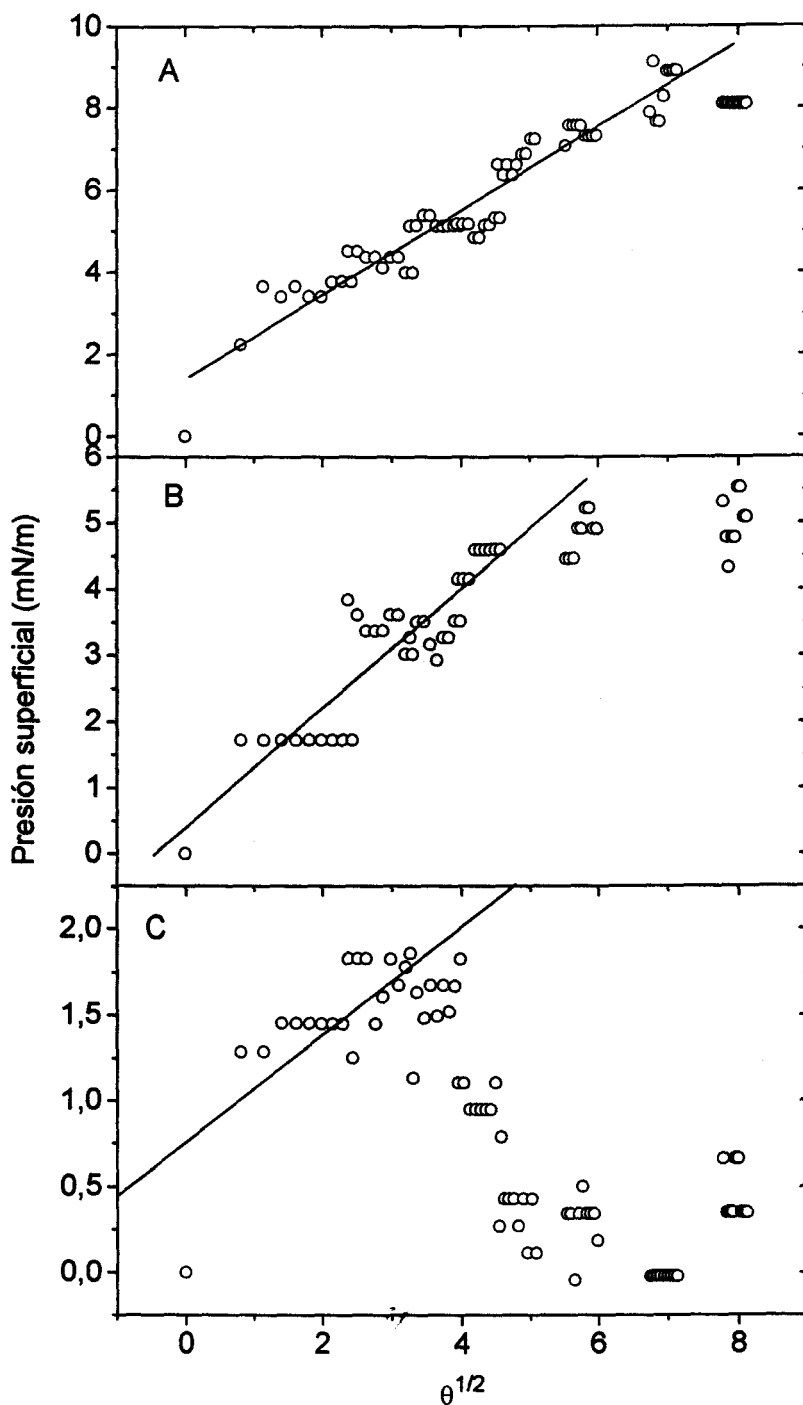
### 5.2.2. Difusión de BSA desde el seno de disoluciones acuosas de etanol.

El efecto de la concentración de etanol en el seno de la fase acuosa sobre la difusión de BSA hasta la interfase se muestra en los resultados que se representan en la figura 5.10, referidos a tres concentraciones de etanol a título de ejemplo. Los valores de los parámetros obtenidos, como resultado de la aplicación de la ecuación 5.2 a los resultados experimentales, se incluyen en la tabla 5.6. Del análisis de estos resultados se pueden deducir las siguientes consideraciones:

- (i) los resultados experimentales, obtenidos durante el intervalo inicial de adsorción de BSA en la interfase, se ajustan satisfactoriamente a un mecanismo de difusión.

---

<sup>6</sup> Las experiencias relativas a la determinación de las isotermas adsorbidas y esparcidas de proteínas (BSA,  $\beta$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina, etc.) sobre disoluciones acuosas de etanol y azúcares (en función de la temperatura, pH, fuerza iónica, etc) se realizan actualmente, de acuerdo con la programación de la investigación en el seno del grupo.



**Figura 5.10.** Difusión de BSA hasta la interfase aire-disolución acuosa de etanol, en función de la concentración de etanol en el medio acuoso: (A) 0,1M, (B) 0,5M y (C) 1M. Concentración de BSA: 0,1 %. Temperatura: 20 °C.

(ii) la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase (cuantificada por el valor de la pendiente de la representación  $\pi-\theta^{1/2}$ ) es más lenta en presencia de etanol en el medio acuoso, que en el seno del agua.

(iii) al aumentar el tiempo de adsorción existe una barrera de energía para la adsorción de la proteína, como se deduce del incumplimiento de la ecuación de Ward y Tordai (ecuación 5.2).

(iv) una vez superada la etapa de difusión de la proteína, a las mayores concentraciones de etanol, se aprecia la existencia de un periodo de inducción, que hace descender el valor de la presión superficial hasta valores próximos a los de la subfase pura.

De los resultados obtenidos (figura 5.10), por aplicación de la tensiometría a tiempos cortos de adsorción, se deduce que durante la etapa inicial de adsorción de la BSA desde disoluciones acuosas de etanol hasta la interfase, etapa que se ajusta satisfactoriamente a un mecanismo de difusión, la presencia de etanol en el medio acuoso (y en una mayor concentración en la interfase, debido a su carácter tensioactivo (tabla 5.1)) actúa como una barrera para la difusión de la proteína. Es decir, la BSA se puede difundir hacia la interfase desde las disoluciones acuosas de etanol, pero para ello ha de competir por su presencia en la interfase con las moléculas de etanol, previamente adsorbidas. Si, además, el etanol causa una agregación de la proteína en el seno de la fase acuosa (Ahmed y Dickinson, 1990), su velocidad de difusión hacia la interfase podría quedar disminuída. Estos resultados están de acuerdo con los analizados previamente (sección 5.1.3.) con relación al proceso global de adsorción de la BSA,

desde una disolución acuosa de etanol 1M. Por lo tanto, las mismas explicaciones allí expresadas se aplicarían aquí.

### 5.2.3. Difusión de BSA desde el seno de disoluciones acuosas de sacarosa.

El efecto de la concentración de sacarosa en el seno de la fase acuosa sobre la difusión de BSA hasta la interfase se muestra en los resultados que se representan en la figura 5.11, referidos a tres concentraciones de sacarosa a título de ejemplo. Los valores de los parámetros obtenidos, como resultado de la aplicación de la ecuación 5.2 a los resultados experimentales, se incluyen en la tabla 5.6. Del análisis de estos resultados se pueden extraer las siguientes consideraciones:

- (i) los resultados experimentales, obtenidos durante el intervalo inicial de adsorción de la BSA en la interfase, se ajustan satisfactoriamente a un mecanismo de difusión.
- (ii) la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase (cuantificada por el valor de la pendiente de la representación  $\pi-\theta^{1/2}$ ) no está afectada o es más lenta en presencia de sacarosa en el medio acuoso, que en el seno del agua.
- (iii) al aumentar el tiempo de adsorción existe una barrera de energía para la adsorción de la proteína, como se deduce del incumplimiento de la ecuación de Ward y Tordai (ecuación 5.2).

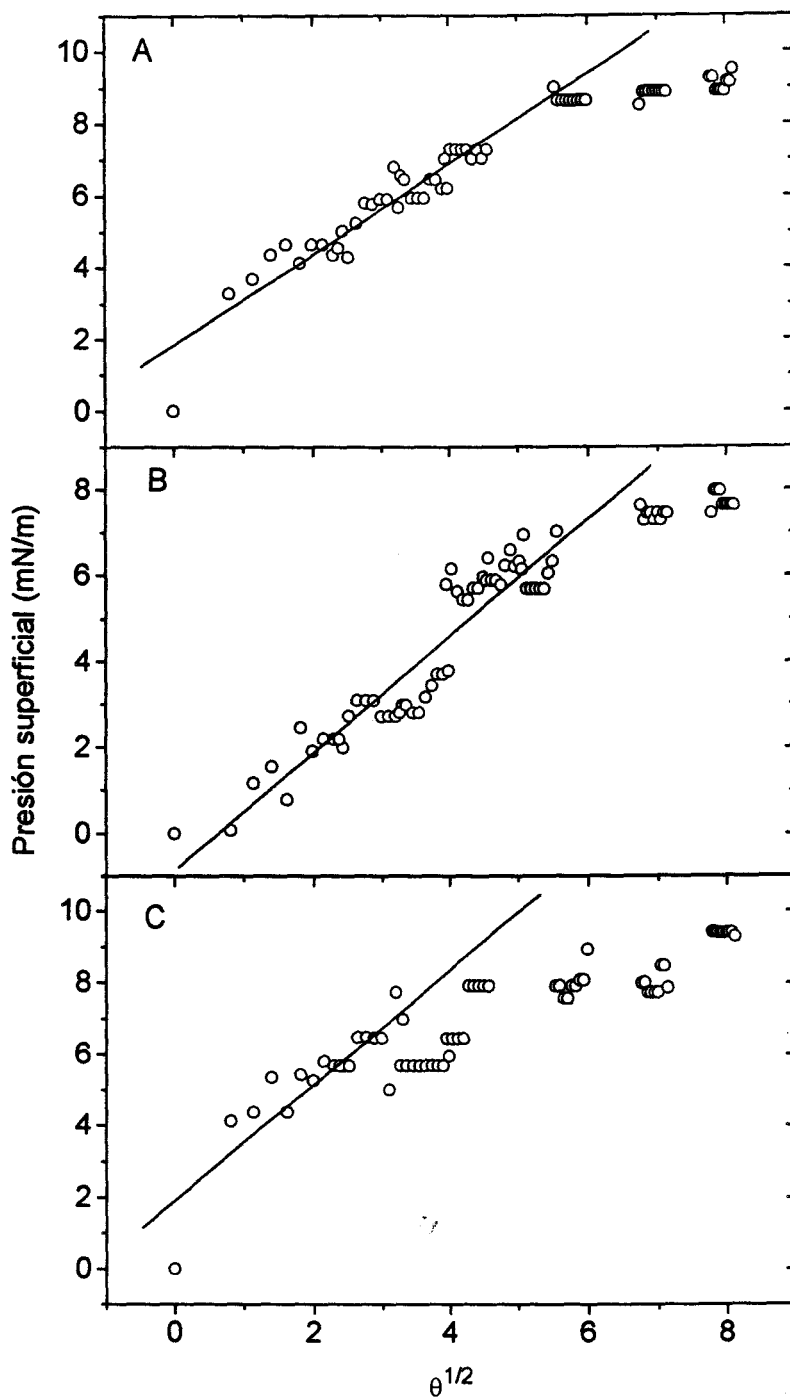


Figura 5.11. Difusión de BSA hasta la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa, en función de la concentración de sacarosa en el medio acuoso: (A) 0,1M, (B) 0,5M y (C) 1M. Concentración de BSA: 0,1 %. Temperatura: 20 °C.



De los resultados obtenidos, por aplicación de la tensiometría a tiempos cortos de adsorción (figura 5.11), se deduce que durante la etapa inicial de adsorción de la BSA desde disoluciones acuosas de sacarosa hacia la interfase, etapa que se ajusta satisfactoriamente a un mecanismo de difusión, la presencia de sacarosa en el medio acuoso actúa como una barrera para la difusión de la proteína. El dato relativo a una concentración de sacarosa 0,25 M constituye una excepción (tabla 5.6). El efecto ejercido por la sacarosa en el medio acuoso, en estas experiencias, es similar al observado con la adsorción de la misma proteína desde disoluciones acuosa de etanol -- si bien, la reducción de la pendiente de la representación  $\pi-\theta^{1/2}$ , y por lo tanto de la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase, debida a la presencia del etanol en el medio acuoso, es significativamente superior que el efecto causado por la sacarosa. No obstante, como se deduce de los datos de la tensión superficial (tabla 5.1), la sacarosa no tiene afinidad por la interfase (véase que los valores de  $\sigma$  de las disoluciones acuosas de sacarosa son superiores a los del agua). Por lo tanto, la razón por la cual la presencia de sacarosa en el medio acuoso reduce la velocidad de difusión de la proteína ha de ser diferente al efecto competitivo entre el etanol y la proteína, analizado en el apartado 5.2.2. Otra diferencia sustancial entre los efectos producidos por ambos tipos de reactivos en el medio acuoso se ha discutido en las secciones 5.1.3. y 5.1.4., en las que se analizaba el proceso global de adsorción de la BSA en presencia de etanol y de sacarosa, respectivamente. Como se recuerda, la presencia de sacarosa incrementaba la velocidad global de adsorción de la proteína hacia la interfase, unos resultados que son opuestos al efecto ejercido por el mismo reactivo sobre la etapa inicial de difusión (tabla 5.6).

Una explicación de los resultados, relativos a la reducción de la velocidad de difusión de la BSA desde disoluciones acuosas de sacarosa (tabla 5.6), podría estar relacionada con el incremento de la viscosidad del medio acuoso producida por la

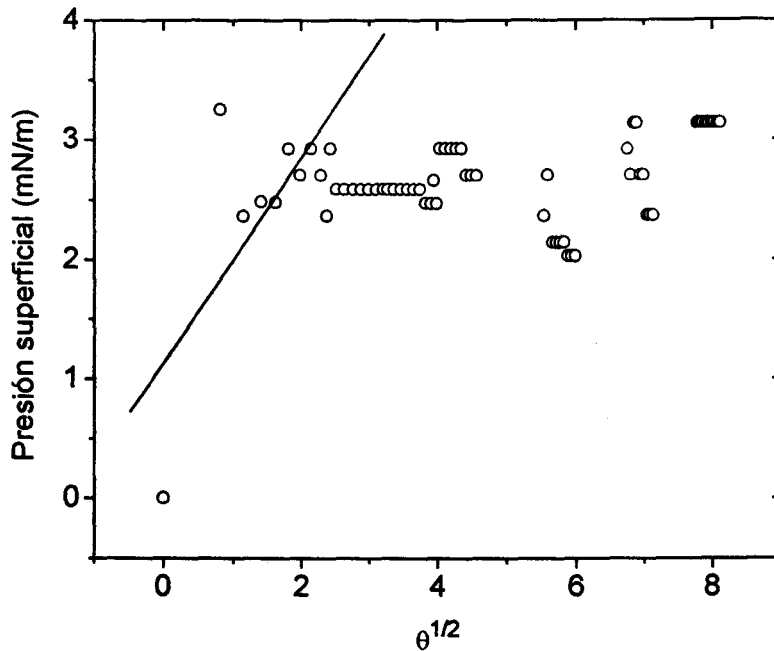
presencia de sacarosa (Weast, 1986), mayor cuanto mayor es la concentración de sacarosa en el medio acuoso.

#### **5.2.4. Difusión de BSA desde el seno de una disolución acuosa de etanol 1M y de sacarosa 0,5M.**

Los resultados referidos a la difusión de BSA hasta la interfase, desde una disolución acuosa compuesta por una mezcla de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, se muestra en la figura 5.12. Los valores de los parámetros obtenidos, como resultado de la aplicación de la ecuación 5.2 a los resultados experimentales, se incluyen en la tabla 5.6. Estos resultados son esencialmente similares a los obtenidos con la misma proteína adsorbida sobre disoluciones acuosas de etanol (figura 5.10) y de sacarosa (figura 5.11). De ellos se pueden extraer las siguientes consideraciones:

- (i) los resultados experimentales, obtenidos durante el intervalo inicial de adsorción de BSA en la interfase, se ajustan satisfactoriamente a un mecanismo de difusión.
  
- (ii) la difusión de la proteína hacia la interfase es más lenta en presencia de la mezcla de etanol y de sacarosa en el medio acuoso, que en el seno del agua.
  
- (iii) al aumentar el tiempo de adsorción existe una barrera de energía para la adsorción de la proteína, como se deduce del incumplimiento de la ecuación de Ward y Torday (ecuación 5.2).

(iv) una vez superada la etapa de difusión de la proteína hacia la interfase se aprecia la existencia de un periodo de inducción, un fenómeno similar al observado sobre disoluciones acuosas de etanol.



**Figura 5.12.** Difusión de BSA hasta la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1M y sacarosa 0,5M. Concentración de BSA: 0,1 %. Temperatura: 20 °C.

De los resultados obtenidos, por aplicación de la tensiometría a tiempos cortos de adsorción (figura 5.12), se deduce que durante la etapa inicial de adsorción de la BSA desde disoluciones acuosas de una mezcla de etanol 1M y de sacarosa 0,5M hacia la interfase, etapa que se ajusta a un mecanismo de difusión, la presencia de ambos reactivos en el medio acuoso actúa como una barrera para la difusión de la proteína. En este sentido, la mezcla de ambos reactivos en disolución ejerce un efecto, sobre la etapa de difusión de la BSA hacia la interfase, que es similar el que produce cada una de los reactivos (etanol y sacarosa) por separado. Sin embargo, el hecho de que el valor de la pendiente de la representación de  $\pi-\theta^{1/2}$  sea similar para la adsorción de BSA sobre una disolución de etanol 1M y de su mezcla con sacarosa 0,5M (tabla 5.6), y la

presencia de un período de inducción en ambos casos --un fenómeno no observado durante la adsorción de BSA desde disoluciones acuosas de sacarosa (Figura 5.11) --, hace pensar que el efecto producido por el etanol en el medio acuoso supere al de la sacarosa.

### 5.3 CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO EN PRESENCIA DE CONVECCIÓN.

El efecto de la agitación de la interfase y del medio acuoso sobre la cinética de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua, puede estudiarse a partir de las experiencias realizadas con el viscosímetro oscilatorio superficial, descrito en el apartado 4.2.2. Para la determinación de las características reológicas de la película se requiere el valor de la tensión superficial. Por lo tanto, este método proporciona, simultáneamente con las propiedades reológicas superficiales, la variación de la tensión superficial con el tiempo durante la adsorción de la proteína sobre la interfase. Las experiencias realizadas son las que se indican en la tabla 4.3, donde se incluye como variables la composición de la fase acuosa y la concentración de proteína en el medio acuoso.

En la figura 5.13 se muestra, a título de ejemplo la variación de la presión superficial con el tiempo durante la adsorción de BSA sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1M y sacarosa 1M.

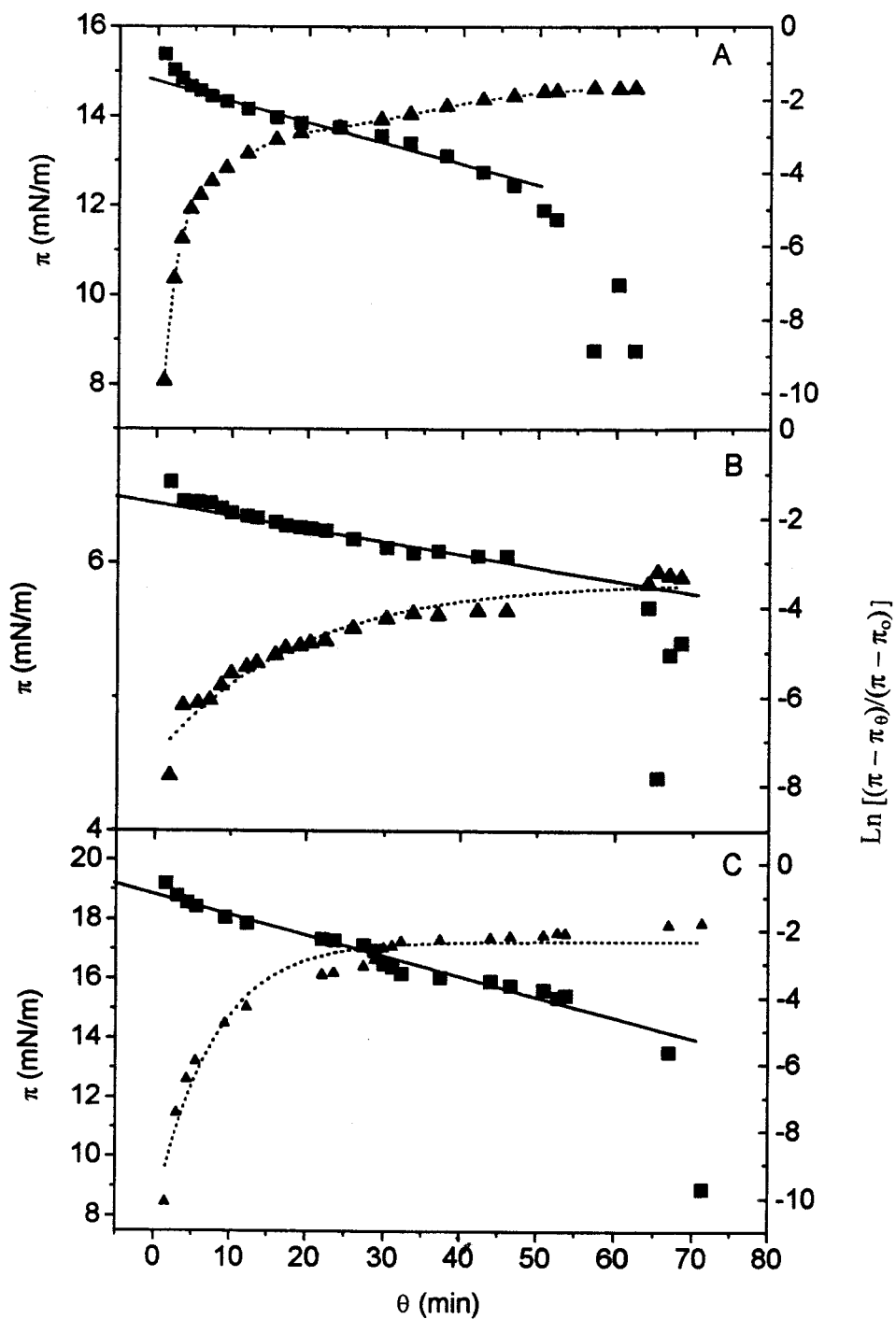
Los valores de la constante cinética de primer orden, derivados de la aplicación de la ecuación 5.3<sup>7</sup> a los resultados experimentales, junto con el coeficiente de regresión lineal y el tiempo característico ( $\theta^*$ ) al cual se produce el cambio de mecanismo, se presentan en la tabla 5.7.

---

<sup>7</sup> En este apartado se utiliza una forma modificada de la ecuación (5.3), según el intervalo de tiempo de la experiencia:

$$\text{Ln} [(\pi - \pi_{\theta})/(\pi - \pi_0)]$$

donde  $\pi$ ,  $\pi_{\theta}$  y  $\pi_0$ , son las presiones superficiales al final de la experiencia, a cualquier tiempo y al tiempo  $\theta = 0$ , respectivamente.



**Figura 5.13.** Velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-medio acuoso en presencia de convección. Subfase: (A) agua, (B) etanol 1M y (C) sacarosa 1M. Concentración de proteína 0,1 % en peso. Temperatura: 20 °C. (▲):  $\pi$ , (■):  $\text{Ln}[(\pi - \pi_\theta)/(\pi - \pi_0)]$ .

**Tabla 5.7.** *Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase aire-medio acuoso, en presencia de convección.*

Sistema	$k_1 \cdot 10^3$	LR	$\theta^*$ (min)
BSA 0,1%-agua	56,7	0,989	50
BSA (0,1%)-etanol 0,1M	16,8	0,975	60
BSA (0,1%)-etanol 0,5M	26,9	0,979	84
BSA (0,1%)-etanol 1M	29,3	0,973	63
BSA (2.10 <sup>-2</sup> %)-etanol 1M	22,3	0,995	60
BSA (3.10 <sup>-3</sup> %)-etanol 1M	9,55	0,919	51
BSA (0,1%)-sacarosa 0,25M	47,6	0,998	56
BSA (0,1%)-sacarosa 0,5M	33,6	0,973	80
BSA (0,1%)-sacarosa 1M	72,0	0,980	62

Del análisis de estos resultados se pueden extraer las siguientes consideraciones:

(a) La presión superficial se incrementa cuando se adiciona la BSA al seno de la fase acuosa, cualquiera que sea su composición.

(b) La etapa de difusión de la BSA desde el seno de la fase hacia la interfase es lo suficientemente rápida como para que pueda ser detectada por el dispositivo experimental utilizado.

(c) Tras la primera etapa de difusión de la proteína hacia la interfase, los resultados experimentales se correlacionan satisfactoriamente por medio de la ecuación

(5.3.), derivada para un mecanismo coincidente con una cinética de primer orden. Como se ha discutido en el apartado 5.1, de la aplicación de la ecuación 5.3 se obtienen dos representaciones lineales, que se pueden asociar a los mecanismos de penetración y de reordenación de las moléculas de BSA adsorbidas sobre la interfase. Los valores de las constantes cinéticas de primer orden,  $k_1$ , asociadas al mecanismo de penetración de la proteína en la interfase se muestran en la tabla 5.7, en función de la composición del medio acuoso. En la misma tabla se incluye el coeficiente de regresión lineal (LR) correspondiente a la aplicación de la ecuación (5.3) a los datos experimentales, junto con el tiempo característico,  $\theta^*$ , al cual se produce el cambio de mecanismo (deducido a partir la representación de la ecuación 5.3).

(d) La velocidad de penetración de la proteína en la interfase (cuantificada mediante el valor de la constante cinética de primer orden  $k_1$ , depende de la composición del medio acuoso. El valor de esta constante cinética es superior sobre agua que sobre disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa, a concentraciones de este reactivo igual o inferiores a 0,5M. A la máxima concentración de sacarosa estudiada (1M) el valor de  $k_1$  supera a los que se deducen para la penetración de la BSA desde agua y desde demás disoluciones acuosas.

(e) La velocidad de penetración de la proteína en presencia de convección (tabla 5.7) es superior a la que se observa en su ausencia, según los datos obtenidos en el apartado 5.1 (tablas 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5).

En resumen, se puede concluir que la existencia de convección -- originada por el movimiento sinusoidal del anillo de vidrio sobre la interfase y el seno de la fase acuosa (ver apartado 4.2.2) -- facilita la velocidad de absorción de la BSA sobre la interfase. No obstante, la presencia de reactivos en el medio acuoso tiene un efecto



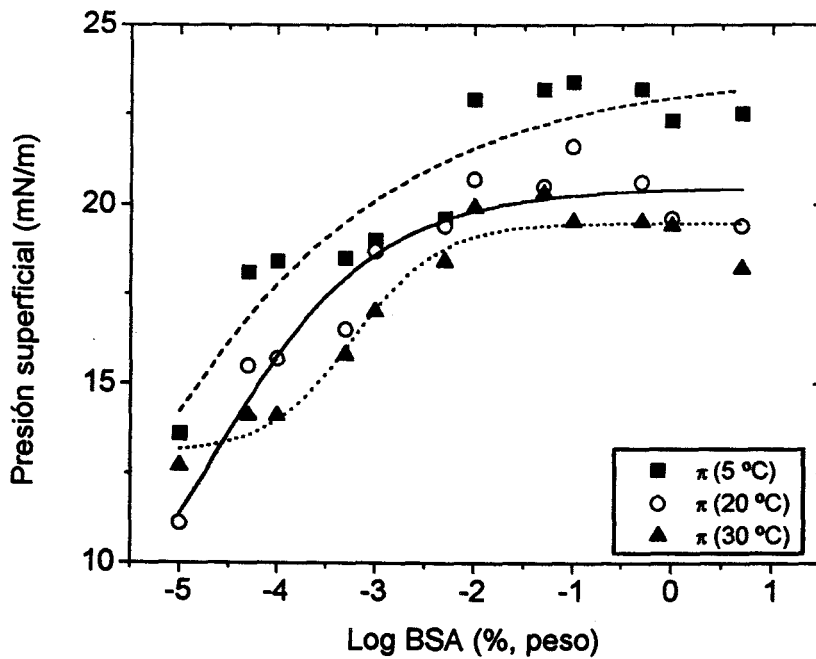
negativo sobre la cinética del proceso. El comportamiento de la BSA en el seno de una disolución de sacarosa 1M constituye una excepción.

#### 5.4 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE BSA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.

La isoterma de adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua representa una medida de la variación de la presión superficial en el equilibrio con la concentración de proteína en el medio acuoso. En este estudio, la isoterma de adsorción de la BSA en función de la temperatura y de la composición del medio acuoso se ha determinado mediante el método de la placa de Wilhelmy, descrito en el apartado 4.2.1.1. de la sección de experimental. Las experiencias realizadas son las indicadas en la tabla 4.3.

El procedimiento experimental utilizado consiste en seguir la variación de la tensión superficial con el tiempo, con cada una de las disoluciones estudiadas, hasta que se alcance un valor constante de la propiedad. En las experiencias previas con agua a distintas temperaturas se comprueba que los valores de la tensión superficial tras la adsorción de BSA a las 24, 48 y 72 horas, desde el comienzo de la adsorción, no difieren significativamente (las diferencias entre sí son iguales o inferiores a la sensibilidad del método experimental). Por lo tanto, en las experiencias que se describen a continuación, la isoterma de adsorción se basa en los valores de la tensión superficial a las 24 horas de adsorción.

Las isotermas de adsorción de BSA en el seno de agua, en función de la temperatura, se representan en la figura 5.14. Las formas de estas representaciones son similares a la obtenida por otros autores, a la temperatura de 20°C (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979; Suttiprasit et al., 1992; Phillips, 1981, Tornberg, 1978)). Se observa que la presión superficial en el estado estacionario ( $\pi^\infty$ ) se incrementa con la concentración de proteína en el seno de la fase, hasta que se alcanza



**Figura 5.14.** *Isoterma de adsorción de BSA, en función de la temperatura.*

*Substrato: tampón fosfato (pH=7, Y=0,05 M).*

un valor constante. Los valores de  $\pi^\infty$  frente a C y el de  $\Gamma$  frente a C -- obtenida esta última mediante elipsometría (Graham y Phillips, 1979) o marcaje radioactivo (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979) -- proporcionan una evidencia adicional para relacionar el valor de  $\pi^\infty$  con la presencia de proteína en la interfase. Para

concentraciones de BSA inferiores a  $10^{-3}$  % en peso, a 20 °C, la adsorción de la proteína en condiciones estacionarias forma una película que consiste en una monocapa de moléculas adsorbidas irreversiblemente. Cuando el valor de  $\pi^{\infty}$  se incrementa, la proteína adquiere un empaquetamiento más compacto en la monocapa, conduciendo a una mayor concentración de proteína en la interfase y a un mayor espesor de la película, para un valor constante de  $\pi^{\infty}$ . A concentraciones de proteína superiores a las que se requiere para formar una monocapa estable, sus moléculas pueden formar multicapas que se sitúan en el interior de la fase acuosa, debajo de la monocapa original, pero sin contribuir significativamente al valor de  $\pi^{\infty}$  (Graham y Phillips, 1979).

En resumen, a altas concentraciones de BSA, como ocurre con la mayoría de las proteínas, la presión superficial (actividad superficial) es elevada, mientras que a bajas concentraciones de BSA se reduce la presión superficial (y disminuye su actividad superficial). Las concentraciones estudiadas (Figura 5.14) están comprendidas en el intervalo de las utilizadas en formulaciones alimentarias típicas, en las cuales la cantidad de proteína usada está comprendida entre el 0,1% y el 10% en peso (Kinsella, 1987). Se ha informado que cuanto mayor es la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa tanto mayor es su concentración en la interfase y en la zona sub-superficial y menor la probabilidad de la coalescencia de la emulsión (Dickinson, 1988a y 1988b). Además, aunque existen ciertas diferencias entre los sistemas modelos estudiados en esta sección y las emulsiones y espumas reales estabilizadas por proteínas -- debido a que en estas pueden utilizarse mayores concentraciones de proteína -- las concentraciones de estas sobre la interfase que rodea a las gotas o burbujas (en las emulsiones y espumas, respectivamente) son similares a las que se pueden deducir de la aplicación de la ecuación de Gibbs (ecuación 2.11) a los datos representados en la figura 5.14. Por lo tanto, se puede afirmar que los resultados obtenidos en esta sección son de importancia práctica.

**Tabla 5.8.** Valor de la presión superficial en estado estacionario ( $\pi^{\infty}$ ) a la máxima concentración de proteína en la subfase ( $|BSA|$ ), en función de la temperatura y de la composición del medio acuoso.

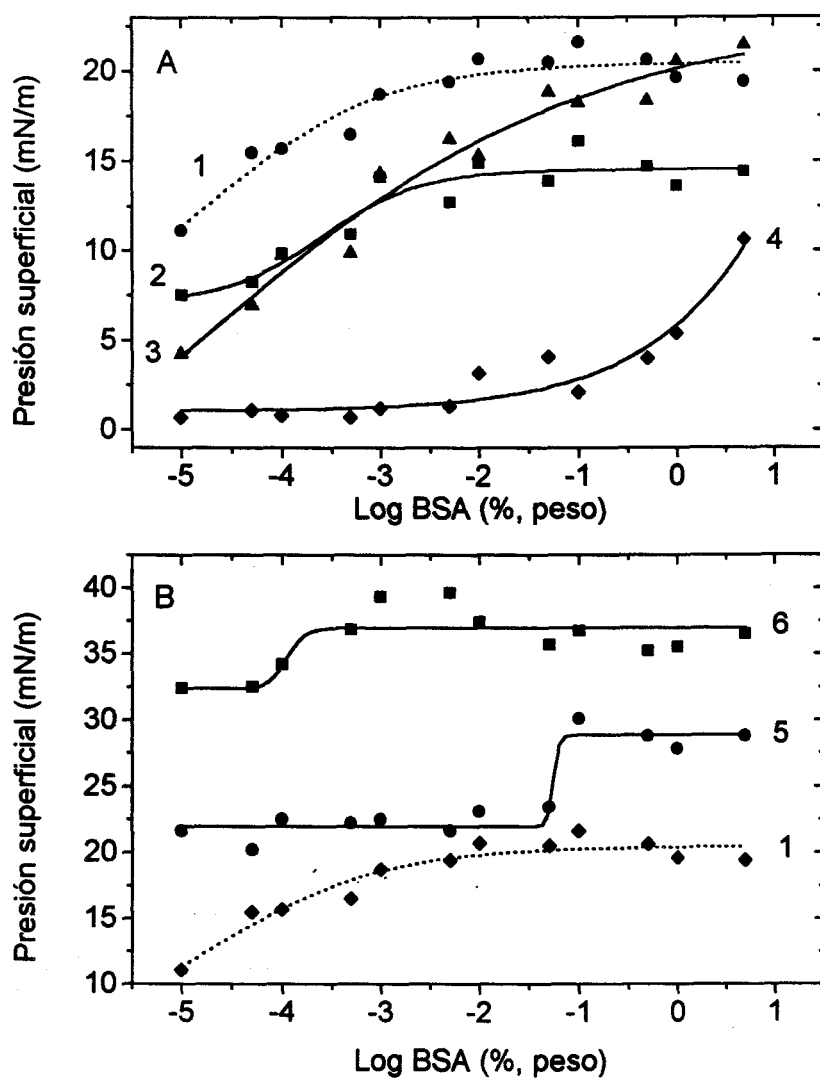
Sistema	Temperatura (°C)	$\pi^{\infty}$ a $ BSA  = 5\%$ en peso (mN/m)
Agua	5	23,0
Agua	20	20,5
Agua	30	19,5
Etanol 0,5M	20	21,0
Etanol 1M	20	14,5
Etanol 2M	20	10,4
Sacarosa 0,5M	20	28,7
Sacarosa 1M	20	37,0

El efecto de la temperatura sobre la isoterma de adsorción de BSA sobre agua se muestra en la Figura 5.14. El valor de  $\pi^{\infty}$ , en función de la temperatura, a la mayor concentración de BSA en el medio acuoso se muestra en la Tabla 5.8. Se observa que al aumentar la temperatura disminuye el valor de  $\pi^{\infty}$  y el de la concentración de BSA que se requiere para la saturación de la monocapa. Por lo tanto, la formación de una monocapa saturada de BSA sobre la interfase aire-agua se favorece con el aumento de la temperatura, si bien la actividad superficial de la proteína disminuye en el mismo sentido.

#### 5.4.1. Efecto de la composición del medio acuoso sobre la isoterma de adsorción de BSA.

El efecto de la presencia de solutos en el medio acuoso (etanol y sacarosa), con distintas concentraciones, sobre la isoterma de adsorción se concreta en los datos experimentales que se representan en la Figura 5.15. Los resultados obtenidos muestran que la adsorción de la BSA en estado estacionario es muy dependiente de la presencia de solutos en el medio acuoso.

Con etanol en el medio acuoso (Figura 5.15, curvas 4, 5 y 6), disminuye la presión superficial (actividad superficial) de la BSA y se requiere una mayor concentración de la misma para que la interfase se sature con la proteína. De hecho, a la mayor concentración de etanol estudiada (2M, curva 6) se requieren concentraciones de BSA superiores al 5% en peso (que constituye la concentración límite en este estudio) para que la interfase esté saturada por una película de BSA. Sin embargo, los resultados obtenidos por Dickinson (1988) con disoluciones alcohólicas de caseína en la interfase aceite-agua no muestran diferencias significativas en la tensión superficial, en las regiones de bajas y altas concentraciones de caseína, cuando la concentración de etanol en el medio acuoso es del 10% en peso (0,25M).



**Figura 5.15.** *Isoterma de adsorción de BSA sobre la interfase aire-medio acuoso. (A) Disoluciones acuosas de etanol. (B) Disoluciones acuosas de sacarosa. Composición del medio acuoso (pH=7, I=0.05): (1) agua (2) etanol 0,5M, (3) etanol 1M, (4) etanol 2M, (5) sacarosa 0,5M y (6) sacarosa 1M. Temperatura: 20 °C.*

Por el contrario, la presencia de sacarosa en el medio acuoso (Figura 5.15, curvas 2 y 3), favorece la formación de una película saturada de BSA en estado estacionario y se incrementa la presión superficial, como se deduce a partir del desplazamiento hacia menores concentraciones de BSA, de la concentración requerida de la misma para que se sature la película.

Los resultados obtenidos en este apartado pueden tener una explicación similar a los analizados en los apartados 5.13 y 5.14, con relación al proceso de adsorción de la BSA desde el seno del medio acuoso. Brevemente, si existe una competencia entre el etanol y la BSA por la interfase, no estaría favorecida la formación de una película de BSA en presencia de etanol, tanto más desfavorecida cuanto mayor es la concentración de etanol en el medio acuoso (Figura 5.15, curvas 1, 4, 5 y 6). De hecho, el desplazamiento de la proteína desde la interfase en presencia de etanol puede ser prácticamente completo a elevadas concentraciones de este reactivo en el medio acuoso (Dussaud et al, 1994). En presencia de sacarosa, por el contrario, se confirma que la posible reducción de la agregación de la proteína facilita la formación de una película interfacial, con una mayor presión superficial, incluso a bajas concentraciones de BSA. De acuerdo con Tornberg et al (1982) el incremento de la presión superficial en presencia de sacarosa, cualquiera que sea la concentración de proteína en el medio acuoso, puede atribuirse también a la mayor energía interfacial de las disoluciones acuosas de sacarosa ( $\sigma$ : 73,4 (0,5M), 74,1 (1M) mN/m), comparada con las interfases del agua ( $\sigma$ : 72,7 mN/m) y de disoluciones acuosas de etanol ( $\sigma$ : 64,2 (0,5M), 57,2 (1M), 51,0 (2M) mN/m).



**6. INTERACCIONES DE BSA CON  
LÍPIDOS SOBRE LA INTERFASE  
AIRE-MEDIO ACUOSO**

## 6. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.

La mayoría de las emulsiones y espumas alimentarias son más complejas que las correspondientes a las tradicionales definiciones de estos sistemas dispersos: una dispersión coloidal de burbujas de gas en un líquido y de las gotitas de un líquido en otro líquido, respectivamente. Sin embargo, estos sistemas tienen algo en común: su estabilidad. Ambos sistemas son termodinámicamente inestables y tienden a su heterogeneidad por sedimentación, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald y/o difusión gaseosa (Dickinson, 1988 y 1992; Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson y Walstra, 1993; Larsson y Friberg, 1990). Es decir, lo que se encuentra en un equilibrio termodinámico son las fases gaseosa y líquida, y las líquida-líquida en las espumas y emulsiones, respectivamente.

La estabilidad de estas dispersiones se fundamenta en las propiedades de los agentes tensioactivos (emulsionantes) presentes en el sistema. Según lo expuesto con más detalle en los antecedentes (apartado 2), los coloides alimentarios contienen muchos emulsionantes (Krog et al, 1985; Krog, 1990 y 1992, Leadbetter, 1990), siendo los más importantes las proteínas y los tensioactivos de bajo peso molecular (mono y diglicéridos, fosfolípidos, sorbatos y polisorbatos, etc.). Los complejos mecanismos involucrados en la formación y estabilización/desestabilización de los sistemas dispersos dificulta la realización de estudios fundamentales sobre sistemas reales. Esto es especialmente cierto en el caso de las complicadas formulaciones alimentarias (Becher, 1991). Una aproximación útil consiste en estudiar las bases químicas y físicas de estas dispersiones, referidas a sistemas modelos simples. El comportamiento interfacial de una emulsión simple ha proporcionado información sobre la actividad superficial, cantidad adsorbida, cinética, conformación y reología superficial de las especies presentes en la interfase, encargadas de estabilizar la

formulación. Por ello los trabajos más recientes se han centrado en el estudio de la adsorción competitiva de proteínas y de lípidos de bajo peso molecular (Bos et al, 1996; Chen y Dickinson, 1995a-c; Heertje et al, 1990). Las conclusiones que de estos se derivan han proporcionado una información detallada sobre la adsorción competitiva, la formación y desplazamiento de complejos, etc., que pueden ser finalmente relacionadas con la estabilidad de la emulsión o espuma. Por lo tanto, la existencia de interacciones entre los distintos componentes sobre la interfase o en el seno de la fase continua y su relación con las propiedades de las dispersiones coloidales alimentarias son de importancia práctica.

Las características interfaciales de los complejos tensioactivo-proteína, así como su adsorción a las interfases fluido-fluido depende de los mecanismos de interacción entre ambos (Teneva et al., 1984). Además, los cambios conformacionales en las moléculas de las proteínas, causados por la formación de estos complejos (Wüstneck et al., 1988), afectan a la estructura de la película y a la velocidad de su formación.

Los experiencias realizadas en este apartado se han centrado en la aplicación de la tensiometría, para el estudio de las interacciones entre una proteína (BSA) y lípidos insolubles en el medio acuoso (monoestearina y/o monooleína), en condiciones dinámicas (apartado 6.1) y en el equilibrio (apartado 6.2). Estos estudios se han completado con el análisis de las interacciones entre la misma proteína (BSA) y un lípido soluble en el medio acuoso (Tween 20), en el equilibrio (apartado 6.3). El procedimiento experimental utilizado depende de si el lípido es soluble en el seno de la fase acuosa -- en cuyo caso éste se introduce en el seno de la fase acuosa junto a la proteína -- o insoluble en la misma -- en este caso el lípido se esparce sobre la película de proteína previamente adsorbida sobre la interfase.

### 6.1. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS INSOLUBLES EN CONDICIONES DINÁMICAS

Las interacciones BSA-monoestearina se han estudiado a partir del esparcimiento de la monoestearina sobre una película de proteína previamente adsorbida. El lípido (monoestearina, con una concentración de  $5,2 \cdot 10^{-4}$  M) disuelto en una mezcla etanol-hexano, 9:1 en volumen, se esparce sobre la interfase (con una superficie de  $13,2 \text{ cm}^2$ ) con ayuda de una jeringa micrométrica. La cantidad y el número de adiciones sucesivas depende del tipo de experiencia. Tras la adición del lípido se sigue la variación de la tensión superficial con el tiempo, hasta que el valor de esta propiedad tiende a hacerse constante.

En la figura 6.1 se muestra los resultados obtenidos cuando se esparcen  $1,30 \cdot 10^{-8}$  moles de monoestearina sobre películas de BSA adsorbidas sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, a la temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . Independientemente de la composición de la fase acuosa, la adición de monoestearina causa una rápida, casi instantánea, reducción de la tensión superficial. Tras este período inicial el valor de  $\sigma$  se incrementa con el tiempo, hasta que se alcanza un valor de  $\sigma$  en condiciones estacionarias. Estos resultados sugieren que la proteína puede ser desplazada de la interfase por la monoestearina, debido a que se obtienen curvas  $\sigma-\theta$  similares cuando la monoestearina se esparce sobre estas disoluciones acuosas en ausencia de BSA (figura 6.2).

La velocidad a la que  $\sigma$  se incrementa y el valor de  $\sigma^\infty$  son mayores en presencia de etanol en la subfase. El mismo razonamiento usado previamente para estudiar el efecto de solutos en la fase acuosa sobre la velocidad de adsorción de BSA podría ser aplicable aquí. En efecto, puesto que el etanol es un agente rompedor de estructura, favorece aquellas estructuras de la proteína que implican un aumento del área superficial y tiende a estabilizar el estado desnaturalizado. Por lo tanto, la readsorción de BSA tras el desplazamiento inicial por la monoestearina y/o la

formación de complejos lípido-proteína podrían ser más fáciles en presencia de etanol. Sin embargo, la sacarosa, al ser un agente estructurante, favorece la estabilidad de conformaciones con una reducida área superficial y tiende a estabilizar el estado nativo de la proteína. Estos fenómenos están cualitativamente de acuerdo con los datos presentados en la figura 6.1.

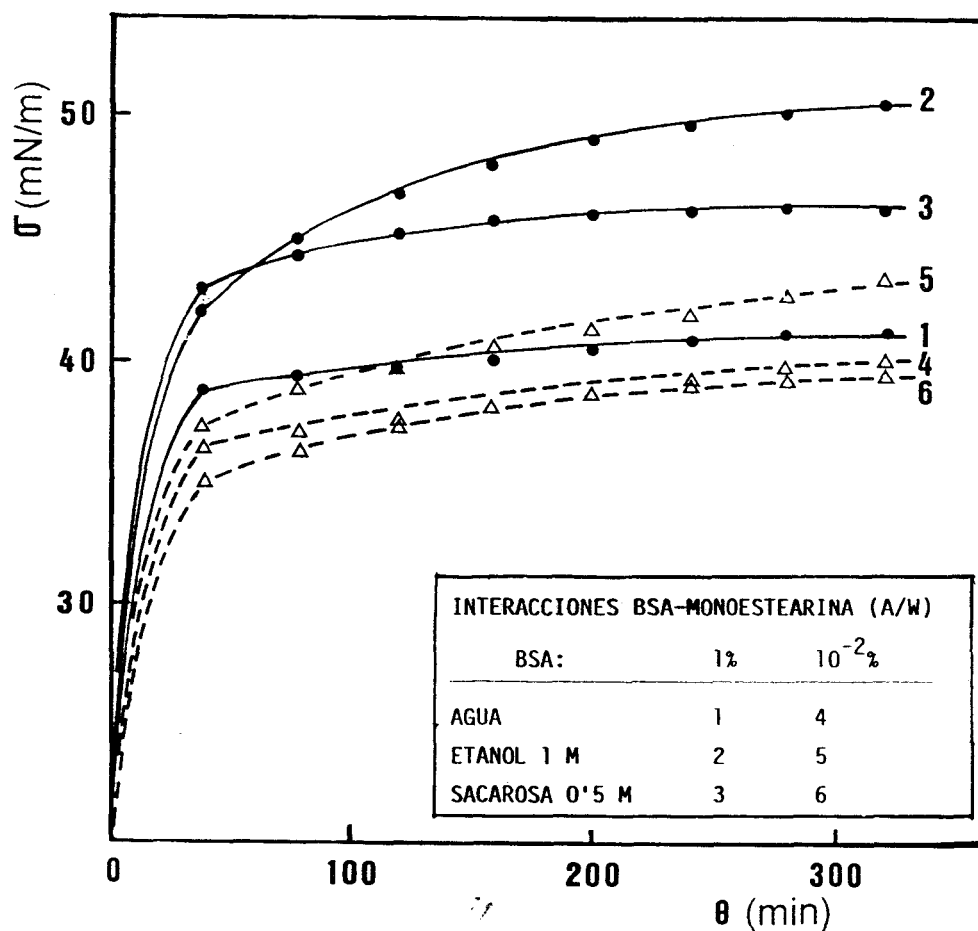
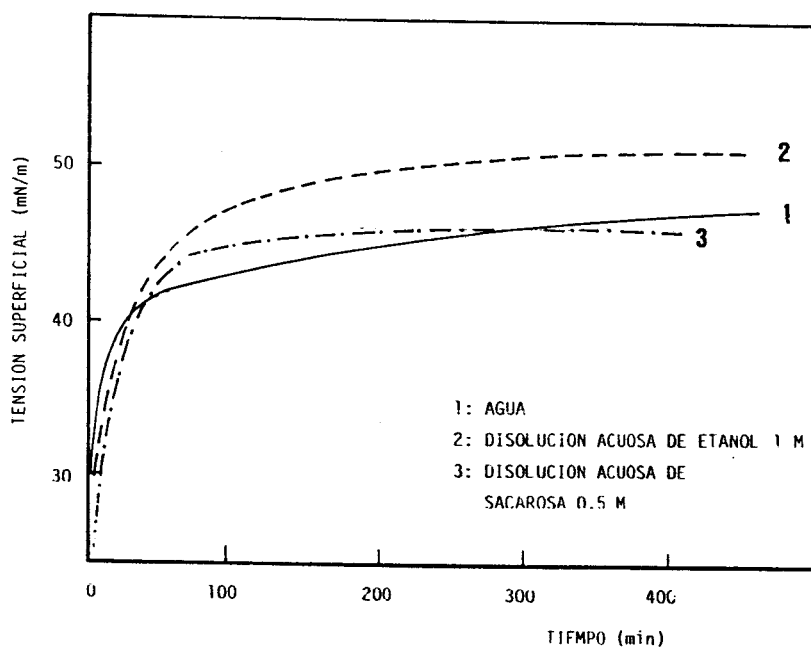


Figura 6.1. Variación de la tensión superficial con el tiempo tras la adición de monoestearina ( $1'30 \times 10^8$  moles) sobre una película de  $13,2 \text{ cm}^2$  de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-medio acuoso, a  $20^\circ\text{C}$ .



**Figura 6.2.** Variación de la tensión superficial con el tiempo tras la adición de monoestearina ( $1.30 \times 10^{-8}$  moles) sobre la interfase aire-medio acuoso de  $13,2 \text{ cm}^2$ , a  $20^\circ\text{C}$ .

Las interacciones BSA-monoestearina en la interfase y en el seno de la fase se incrementan cuando aumenta la cantidad de monoestearina que se esparce sobre la interfase (figuras 6.3 a 6.5). En estas figuras se representa la variación de la tensión superficial con el tiempo, tras la adición de sucesivas cantidades de monoestearina sobre una película previa de BSA-monoestearina, sobre agua (figura 6.3) y disoluciones acuosas de etanol 1 M (figura 6.4) y sacarosa 0.5 M (figura 6.5), a  $20^\circ\text{C}$ .

Puede observarse que, tras la adición de monoestearina sobre una película de BSA-monoestearina, las curvas  $\sigma-\theta$  son similares a las mostradas previamente en la figura 6.1, cualquiera que sea la composición de la fase acuosa. Es decir, las sucesivas adiciones de monoestearina no afectan a las características interfaciales de la película.

Puesto que la cantidad de monoestearina correspondiente a la primera adición es mayor que la requerida para que la monocapa colapse (Rodríguez Patino et al., 1992 y 1993), la película de monoestearina presenta una estructura líquido-condensada en estado estacionario (Rodríguez Patino y Martín, 1994). Esta podría ser la razón de por qué las curvas  $\sigma$ - $\theta$  son similares tras sucesivas adiciones de monoestearina (figuras 6.3 a 6.5). Estos datos sugieren, por lo tanto, que el exceso de lípido podría formar cristales en la interfase o podría participar en la formación de complejos BSA-monoestearina en la interfase y en el seno de la fase.

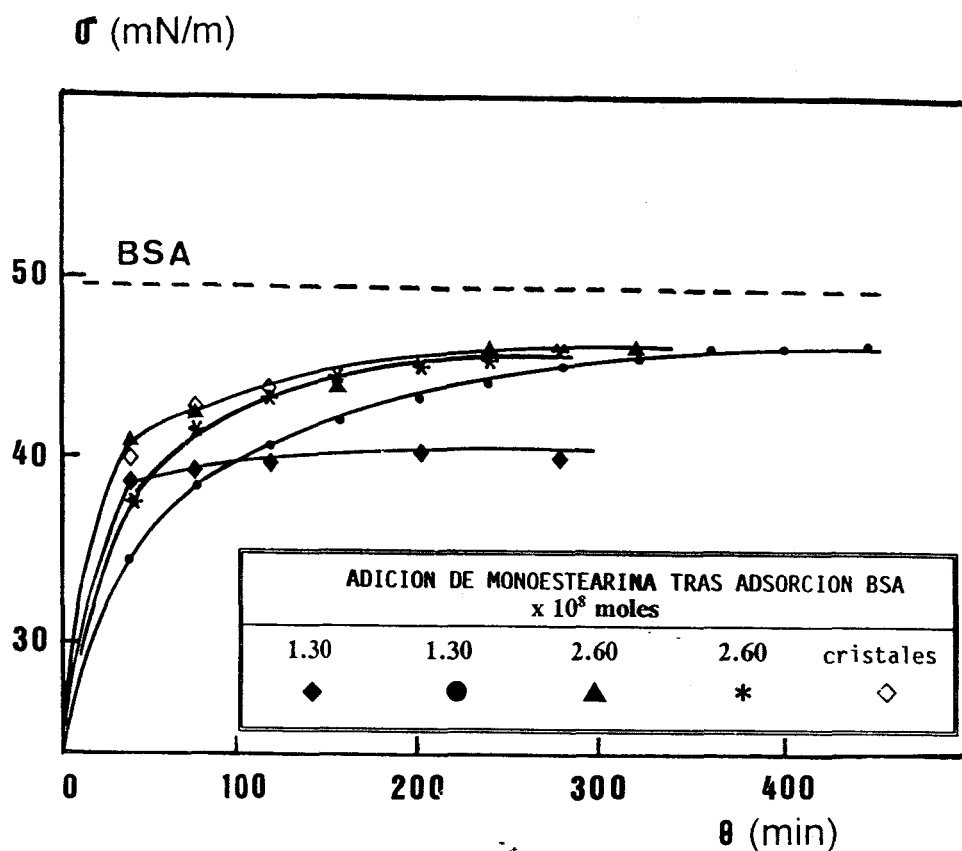
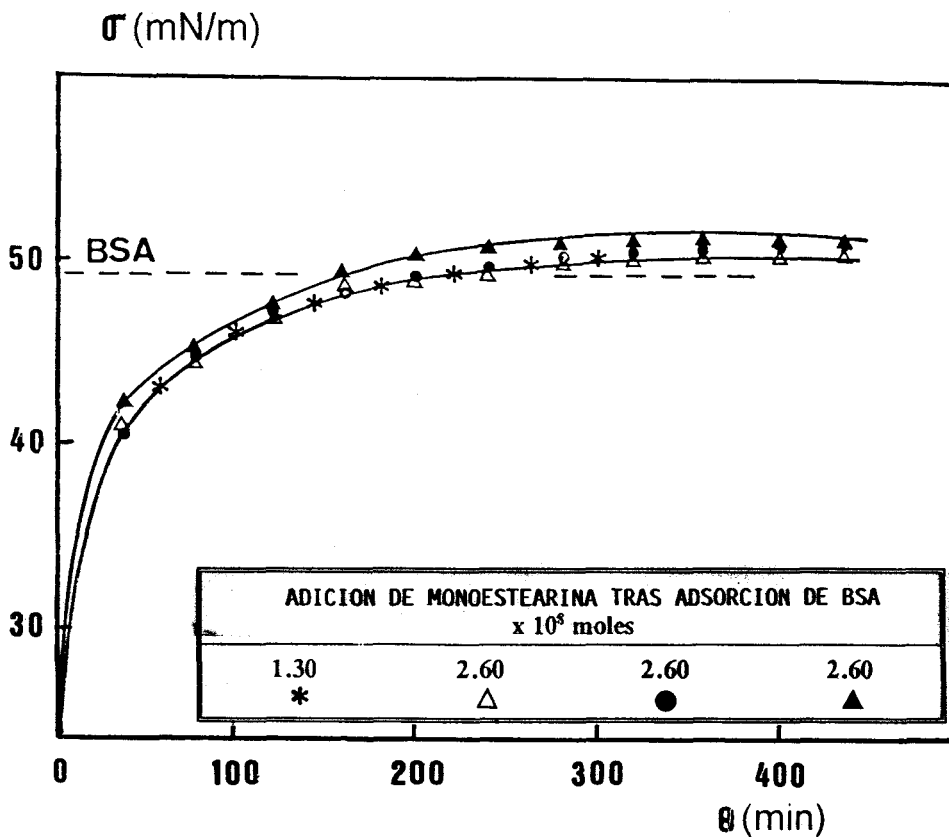


Figura 6.3. Variación de la tensión superficial con el tiempo tras la adición de sucesivas cantidades de monoestearina sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-agua de 13,2 cm<sup>2</sup>, a 20°C. Concentración de proteína: 1% en peso. Substrato: buffer fosfato (pH=7, I=0'05). Tensión superficial en estado estacionario tras la adsorción de BSA (línea discontinua).



**Figura 6.4.** Variación de la tensión superficial con el tiempo tras la adición de sucesivas cantidades de monoestearina sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1M, de 13,2 cm<sup>2</sup>. Concentración de proteína: 1% en peso. Temperatura: 20°C. Tensión superficial en estado estacionario tras la adsorción de BSA (línea discontinua).

La segunda explicación se puede justificar a partir de la observación visual del incremento de la turbidez de la disolución acuosa de proteína tras las sucesivas adiciones de lípido. Conviene recordar que la monoestearina, a las cantidades añadidas en estas experiencias, es insoluble en el seno de la fase acuosa (Fuente y Rodríguez Patino, 1994, 1995). La cuantificación de la turbidez se ha realizado mediante medidas de transmitancia, usando un espectrofotómetro UV/V Hitachi, modelo U-1100. Las medidas de transmitancia se realiza en una cubeta de 1 cm de camino óptico. Las medidas de transmitancia, a una longitud de onda de 540 nm, se realizan a temperatura ambiente, a intervalos de 5 minutos tras la adición de monoestearina sobre una película de BSA previamente adsorbida, y hasta que se alcanza un valor constante. De los datos



mostrados en la tabla 6.1, referidos a las medidas realizadas en el seno de agua, se certifica que la turbidez se incrementa con la concentración de monoestearina añadida. Por lo tanto, el exceso de monoestearina puede quedar solubilizado en el seno del medio acuoso, debido a la posible existencia de interacciones BSA-monoestearina.

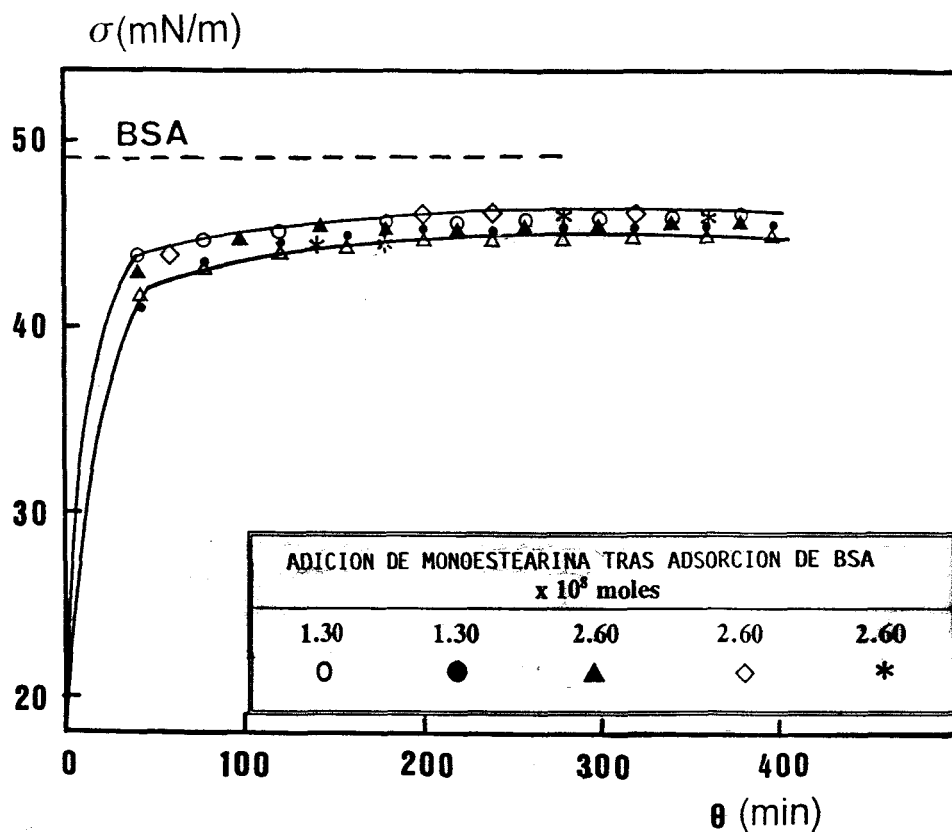


Figura 6.5. Variación de la tensión superficial con el tiempo tras la adición de sucesivas cantidades de monoestearina sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa 0'5 M, de 13,2 cm<sup>2</sup>. Concentración de proteína: 1% en peso. Temperatura: 20°C. Tensión superficial en estado estacionario tras la adsorción de BSA (línea discontinua).

**Tabla 6.1.** Medida de la turbidez de una disolución acuosa de BSA al 0.1% de 10 ml, en función de la cantidad de monoestearina añadida, a temperatura ambiente.

<b>Monoestearina añadida x 10<sup>8</sup> moles</b>	<b>Turbidez (%)</b>
0	0.050
1.30	0.105
2.60	0.165
5.20	0.190
7.80	0.220
Cristales	0.475

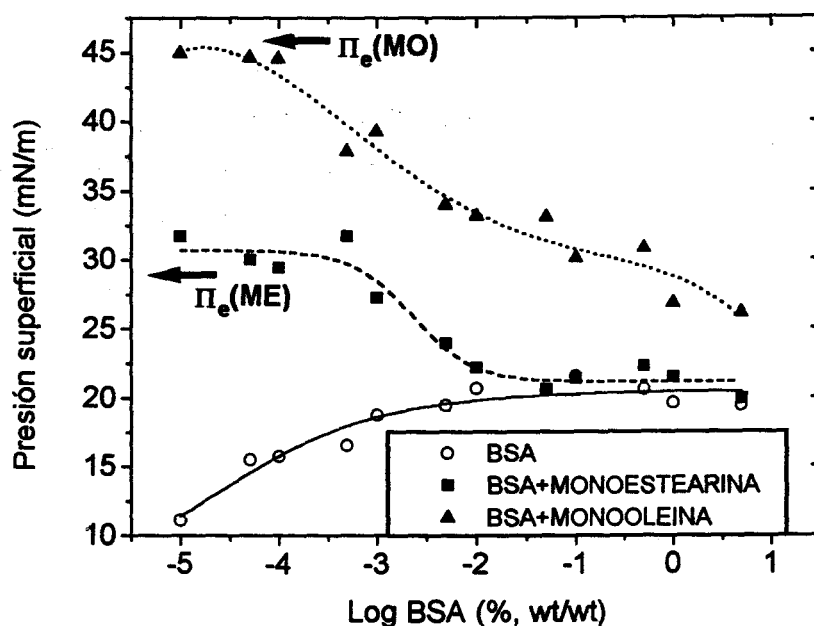
La existencia de complejos BSA-monoestearina sobre la interfase puede ser también comprobada por la comparación de los valores de  $\sigma^\infty$  tras la adsorción de BSA (figuras 6.3 a 6.5), con los valores de  $\sigma^\infty$  después de las sucesivas adiciones de monoestearina (figuras 6.3 a 6.5) y los valores de la tensión superficial en el equilibrio de la monoestearina (Rodríguez Patino y Martín, 1994), a las mismas condiciones experimentales. Interacciones similares entre monoglicérido-caseína, en el seno de la fase acuosa, han podido demostrarse por aplicación de un método de agotamiento, analizando la fracción que sobrenada cuando una emulsión se somete a centrifugación (Dickinson et al., 1989).

## 6.2. INTERACCIONES DE BSA CON LÍPIDOS INSOLUBLES EN EL EQUILIBRIO

En este apartado las interacciones BSA-monoestearina y BSA-monooleína se han estudiado a partir del esparcimiento de los lípidos sobre una película de proteína previamente adsorbida. En estas experiencias se utilizan las mismas disoluciones de proteína sobre las que se ha determinado previamente la isoterma de adsorción (estudiada en el apartado 5.4). Es decir, el lípido se esparce sobre una película de proteína previamente adsorbida y en el equilibrio, tras un periodo de espera de 24 horas. El lípido (monoestearina con una concentración de  $5,2 \cdot 10^{-4}$  M, o monooleína con una concentración de  $3,9 \cdot 10^{-4}$  M) disuelto en una mezcla etanol-hexano, 9:1 en volumen, se esparce sobre la interfase con ayuda de una jeringa micrométrica. El volumen de disolución de lípido que se esparce es de 50  $\mu\text{L}$ , y se mantiene constante en todas las mezclas. Este volumen de lípido esparcido sobre cada cápsula, con una sección circular de  $1,32 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ , se corresponde con unas densidades superficiales de monoestearina y de monooleína en las mezclas de 11,9 moléculas. $\text{nm}^{-2}$  y 8,9 moléculas. $\text{nm}^{-2}$ , respectivamente. Por lo tanto, la variación de la relación lípido esparcido sobre la interfase-concentración de proteína en el seno de la fase, se debe a la variación de la concentración de BSA en cada sistema estudiado. Tras la adición del lípido, las cápsulas de medida se mantienen a una temperatura constante de 20 °C, durante 24 horas, en un recipiente cerrado, para evitar la evaporación. En las experiencias previas se ha seguido la variación de la tensión superficial con el tiempo, tras el esparcimiento del lípido, hasta que el valor de esta propiedad se hace constante. Se ha comprobado que los valores de la tensión superficial de estas películas mixtas a las 24, 48 y 72 horas tras el esparcimiento del lípido no difieren significativamente entre sí.

### 6.2.1. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-agua, en el equilibrio.

En la figura 6.6 se muestra el efecto de la adición de monoestearina y de monooleína sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-agua y en el equilibrio, a la temperatura de 20 °C, en función de la concentración de BSA en el medio acuoso (% en peso). Se incluye, para su comparación, la isoterma de adsorción de la proteína pura sobre el mismo medio acuoso.



**Figura 6.6.** Efecto del esparcimiento de monoestearina o de monooleína sobre la isoterma de adsorción de BSA sobre la interfase aire-agua. Temperatura: 20 °C. Densidad superficial del lípido (moléculas.nm<sup>-2</sup>): monoestearina (11,9), monooleína (8,9). Se indica mediante flechas las ESP de monoestearina ( $\Pi_e$  (ME) = 27,2 mN/m) y de monooleína ( $\Pi_e$  (MO) = 45,4 mN/m).

Puede observarse que la forma de las representaciones depende del tipo de lípido que se esparce sobre la interfase y de la relación lípido-proteína en el sistema. En general, se puede afirmar que las representaciones  $\pi$  vs Log [BSA] de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína tienen una forma sigmoidal,

aproximándose los valores de  $\pi$  a los de la película de BSA pura, a las mayores concentraciones relativas de BSA, y tendiendo a un valor constante, diferente al de la proteína pura, a las menores concentraciones relativas de ésta en el sistema. Este valor máximo de la presión superficial, a las menores relaciones BSA-lípido, está muy próximo al valor de la presión de esparcimiento en el equilibrio (ESP) del lípido puro -- que se incluye en las figuras mediante una flecha --, sobre el mismo medio acuoso (Rodríguez Patino y Martín, 1994). Por lo tanto se puede concluir que:

(A) Las presiones superficiales de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína son superiores a las de la película adsorbida de la proteína pura, a las menores concentraciones relativas de ésta en la mezcla de ambos emulsionantes. Sin embargo, a las mayores concentraciones relativas de BSA en la mezcla, la presión superficial de las películas mixtas tiende a aproximarse a la de la proteína pura.

(B) Las presiones superficiales de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, a las menores concentraciones de proteína en la mezcla de ambos emulsionantes, son similares a las de los lípidos puros esparcidos sobre el mismo medio acuoso.

(C) A concentraciones relativas intermedias lípido-proteína, la presión superficial de las películas mixtas se diferencia de las de cualquiera de los dos emulsionantes puros. Es decir, la presión superficial de las películas mixtas en este intervalo de concentraciones lípido-proteína, es diferente de la correspondiente al lípido puro (monoestearina o monooleína) o de la proteína. La diferencia entre ambos comportamientos se produce a una concentración de BSA en el medio acuoso próxima a la correspondiente a la saturación de la monocapa por la proteína ( $1.10^{-3}$  -  $1.10^{-2}$  %, en peso), deducida de su isoterma de adsorción.

Como consecuencia de estos resultados se puede proponer que, a las más elevadas concentraciones de proteína en la mezcla -- superiores a la de saturación de la

monocapa por la proteína --, las características interfaciales de las películas mixtas están determinadas por la presencia de la proteína en la mezcla. Sin embargo, a las menores concentraciones de BSA en la mezcla de ambos emulsionantes, el comportamiento interfacial parece estar regido por la presencia del lípido (monoestearina o monooleína). En el intervalo intermedio de concentraciones, el comportamiento de las películas mixtas difiere del de los componentes puros, no pudiéndose descartar que tal comportamiento sea debido a la existencia de interacciones entre ambos emulsionantes sobre la interfase. Por lo tanto, se puede especular que (i) a las mayores concentraciones de proteína en la mezcla, es ésta la especie que predomina sobre la interfase, (ii) que a las más bajas concentraciones de proteína, es el lípido el que confiere sus propiedades a la interfase y (iii) que a concentraciones intermedias la presión superficial de la interfase puede estar gobernada por la presencia de complejos lípido-proteína.

#### **6.2.2. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol, en el equilibrio.**

En la figura 6.7 se muestra el efecto de la adición de 11,9 moléculas.nm<sup>-2</sup> de monoestearina y de 8,9 moléculas.nm<sup>-2</sup> de monooleína sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol, en el equilibrio, a la temperatura de 20 °C. Las variables estudiadas son las concentraciones de etanol (M) -- 0,5 M (Figura 6.7A), 1 M (Figura 6.7B) y 2 M (Figura 6.7C) -- y de BSA en el medio acuoso (% en peso). Se incluye, para su comparación, la isoterma de adsorción de la proteína pura sobre el mismo medio acuoso. A partir de estas representaciones se pueden proponer las siguientes consideraciones:

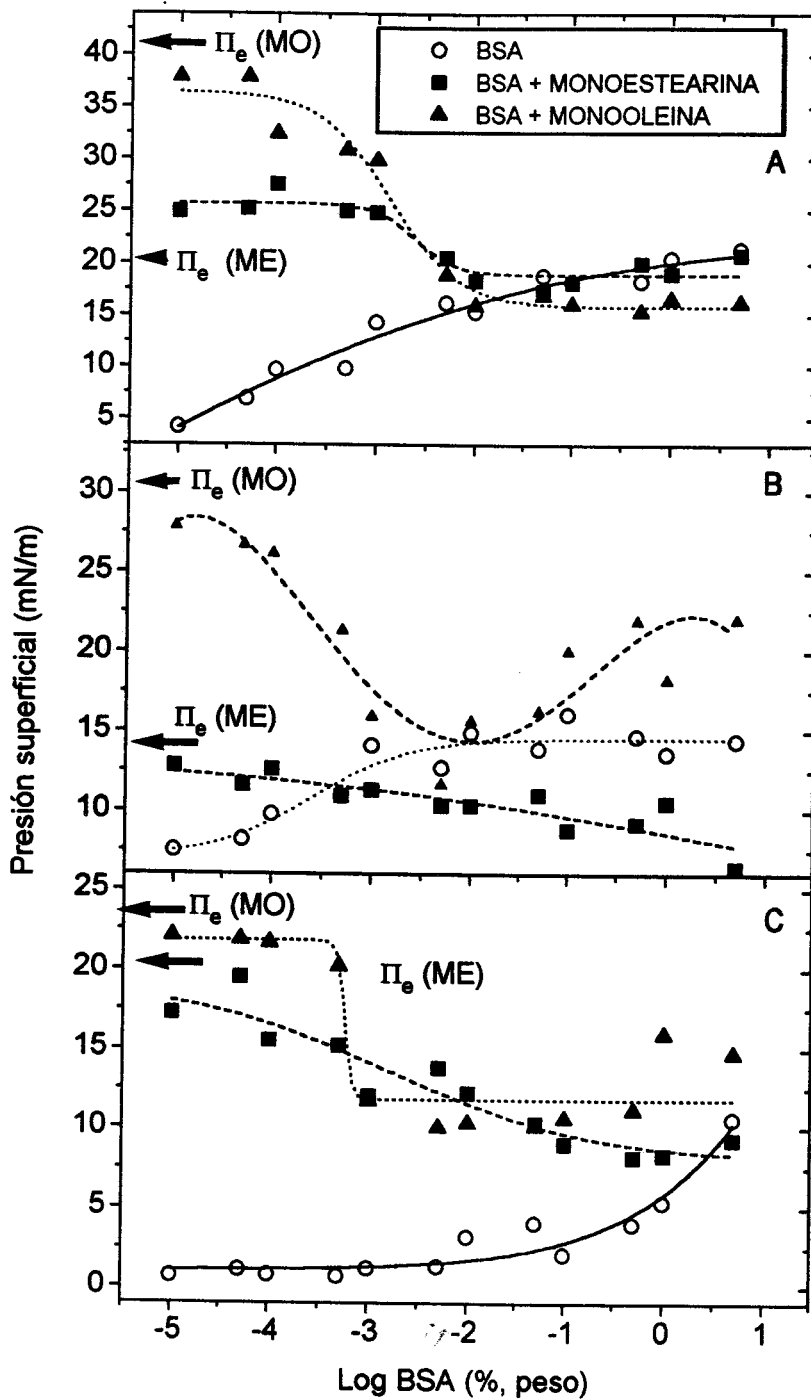


Figura 6.7. Efecto del esparcimiento de monoestearina o de monooleína sobre la isoterma de adsorción de BSA sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 0,5 M. Temperatura: 20 °C. Densidad superficial del lípido (moléculas.nm<sup>-2</sup>): monoestearina (11,9), monooleína (8,9). Concentración de etanol (M): (A) 0,5; (B) 1; (C) 2. Se indica mediante flechas las ESP de monoestearina ( $\Pi_e(ME)$ ) y de monooleína ( $\Pi_e(MO)$ ).

(A) Las presiones superficiales de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína sobre disoluciones acuosas de etanol, son superiores a las de la película adsorbida de la proteína pura. Sin embargo, a las mayores concentraciones relativas de BSA en la mezcla de ambos emulsionantes, las presiones superficiales de las películas mixtas tienden a aproximarse a las de la proteína pura. La concentración de BSA en la fase acuosa, a la cual prevalece el comportamiento superficial de la proteína, se incrementa con la concentración de etanol en el medio acuoso. Puede comprobarse que en el mismo sentido lo hace la concentración de saturación de la monocapa por la proteína, como se analizó en el apartado 5.4.1. de esta Memoria.

(B) Las presiones superficiales de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, a las menores concentraciones de proteína en la mezcla de ambos emulsionantes, son similares a las de los lípidos puros esparcidos sobre los mismos medios acuosos. En estos sistemas, los valores a los que tienden asintóticamente las presiones superficiales de las películas mixtas son prácticamente similares a los de la ESP de los lípidos puros (Rodríguez Patino y Martín, 1994).

(C) A concentraciones relativas intermedias lípido-proteína, la actividad superficial de las películas mixtas se diferencia de las de cualquiera de los dos emulsionantes puros.

(D) Sobre disoluciones acuosas de etanol, y en todo el intervalo estudiado de concentraciones de BSA en el medio acuoso, las presiones superficiales de las películas de proteína pura y la de sus mezclas con monoestearina y monooleína, son inferiores a las de los mismos sistemas sobre la interfase aire-agua. Además, la presión superficial se reduce al aumentar la concentración de etanol en el medio acuoso

El análisis de estos resultados permite proponer, para las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, sobre disoluciones acuosas de etanol, un comportamiento interfacial similar al de las mismas mezclas de emulsionantes sobre

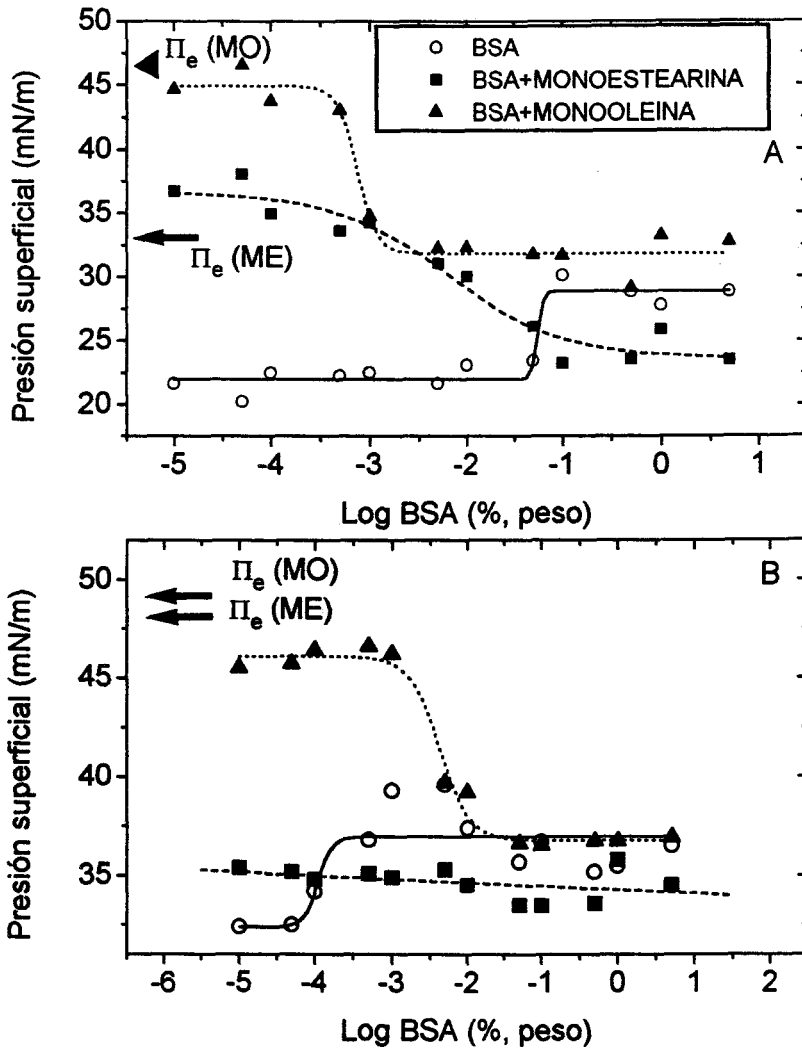


agua. Es decir, a las mayores concentraciones de proteína en la mezcla, predomina el comportamiento de ésta sobre la presión superficial de la película mixta. A las más bajas concentraciones de proteína, es el lípido el que confiere sus propiedades a la interfase. A concentraciones intermedias, la presión superficial de la interfase podría estar gobernada por la presencia de complejos lípido-proteína. Sin embargo, globalmente considerada, la presión superficial de estas películas sobre disoluciones acuosas de etanol es inferior a la observada sobre agua, y es tanto menor cuanto mayor es la concentración de etanol en el medio acuoso.

### **6.2.3. Interacciones de BSA con monoestearina y monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa, en el equilibrio.**

En las figura 6.8 se muestra el efecto de la adición de monoestearina y de monooleína sobre una película de BSA, previamente adsorbida sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa, en el equilibrio, a la temperatura de 20 °C, en función de las concentraciones de sacarosa (M) -- 0,5 M (Figura 6.8A) y 1 M (Figura 6.8B) -- y de BSA en el medio acuoso (% en peso). Se incluye, para su comparación, la isoterma de adsorción de la proteína pura sobre el mismo medio acuoso.

El análisis de estos resultados permite proponer, para las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, sobre disoluciones acuosas de sacarosa, un comportamiento interfacial similar al de las mismas mezclas de emulsionantes sobre agua o disoluciones acuosas de etanol. Es decir, a las mayores concentraciones de proteína en la mezcla, predomina el comportamiento de ésta sobre la presión superficial de la película mixta. A las más bajas concentraciones de proteína, y sobre una disolución de sacarosa 0,5 M, es el lípido el emulsionante que confiere sus propiedades a la interfase. Esto mismo comportamiento no se observa a la mayor concentración de sacarosa en el medio acuoso (Figura 6.8B), especialmente en las películas mixtas BSA-monoestearina. A concentraciones intermedias, la actividad superficial de la interfase



**Figura 6.8.** Efecto del esparcimiento de monoestearina o de monooleína sobre la isoterma de adsorción de BSA sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura: 20 °C. Densidad superficial del lípido ( $\text{moléculas.nm}^{-2}$ ): monoestearina (11,9), monooleína (8,9). Concentración de sacarosa (M): (A) 0,5; (B) 1. Se indica mediante flechas las ESP de monoestearina ( $\Pi_e$  (ME)) y de monooleína ( $\Pi_e$  (MO)).

podría estar gobernada por la presencia de complejos lípido-proteína. Sin embargo, globalmente considerada, la presión superficial de estas películas sobre disoluciones acuosas de sacarosa es superior a la observada sobre agua y sobre disoluciones acuosas

de etanol, tanto mayor cuanto mayor es la concentración de sacarosa en el medio acuoso.

### 6.3. INTERACCIONES DE BSA CON TWEEN 20 EN EL EQUILIBRIO

En este apartado, las interacciones BSA-Tween 20 se han estudiado a partir de la inyección de la proteína en el interior de la subfase, sobre una película de lípido previamente adsorbido sobre la interfase. Tras su introducción en el seno de la fase acuosa la proteína tiene tendencia a difundirse y a adsorberse sobre la interfase -- según se ha discutido en el apartado 5 de esta Memoria -- sobre la cual puede interaccionar con el lípido adsorbido con anterioridad. Una de las variables estudiadas es la composición del medio acuoso. Como tal se utiliza agua o disoluciones acuosas de etanol, sacarosa y ClNa, con distintas concentraciones de soluto. En las medidas con solutos en el medio acuoso, las disoluciones que constituyen la subfase se prepararon a la temperatura ambiente, con agitación durante 30 minutos, antes de introducir el Tween 20. En estas experiencias se utilizan las mismas disoluciones de Tween 20 sobre las que se ha determinado previamente su isoterma de adsorción, que servirá como base de comparación para las películas mixtas BSA-Tween 20. Para ello las disoluciones con distintas composiciones de Tween 20 se introducen en el interior de las cápsulas de medida y a continuación estas se sitúan en el interior de un recipiente cerrado, para evitar la evaporación. Estas disoluciones se mantienen a la temperatura de 20 °C durante 24 horas, con el fin de alcanzar el deseado equilibrio en la adsorción del lípido sobre la interfase. A partir de experiencias previas se sabe que este tiempo de reposo es suficiente para asegurar la constancia en la medida de la tensión superficial de las disoluciones de lípido.

La concentración micelar crítica (CMC) es un parámetro de gran utilidad para el estudio del comportamiento interfacial de sustancias tensioactivas solubles en el medio acuoso, y que se adsorben sobre la interfase. El valor de la CMC del Tween 20 en cada uno de los distintos medios acuosos estudiados se determinó a partir de la medida de la tensión superficial. Dicho valor se corresponde con el punto de corte de las líneas resultantes de correlacionar los datos de la tensión superficial en función de la concentración de Tween 20, en el medio acuoso, en coordenadas semilogarítmicas. A

las más elevadas concentraciones de lípido en el seno de la disolución, la relación  $\sigma$ -Log[Tween 20] es lineal, con una pendiente prácticamente nula. Este comportamiento es una indicación del estado de pureza de la interfase (Dukhin et al, 1995). Es decir, se puede tener la certeza de que sobre la interfase no se encuentra, en cantidad apreciable, especie superficialmente activa distinta al lípido. Sin embargo, a las más bajas concentraciones de Tween 20 se produce un brusco descenso de la tensión superficial, al aumentar la concentración del lípido. En este intervalo de concentraciones de Tween 20, los mejores ajustes de los datos experimentales -- referidos a la variación de  $\sigma$  con el logaritmo de la concentración de Tween 20 -- se consiguen con correlaciones lineales o polinómicas de segundo orden (ecuación 6.1), dependiendo de la composición del medio acuoso. El coeficiente de regresión lineal es superior a 0,99 en todos los casos estudiados (ecuación 6.1).

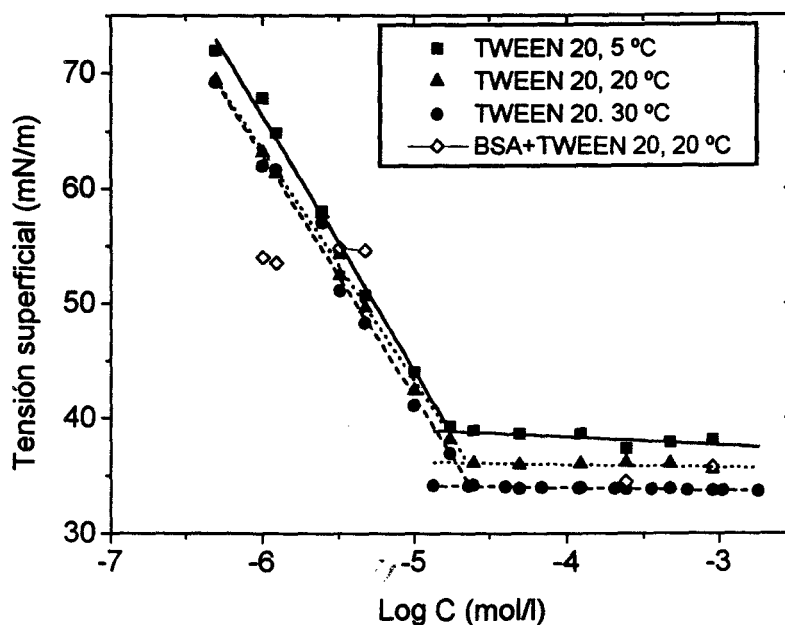
$$\sigma = \sum_0^n a_i \cdot (\text{Log}C)^i \quad (6.1)$$

Una vez conocido el comportamiento interfacial del Tween 20, las interacciones BSA-Tween 20 se deducen a partir de la modificación que resulta en el valor de la tensión superficial de la película formada por el lípido, cuando en el interior de la subfase se inyecta la cantidad de BSA suficiente para conseguir una concentración final de la misma en el medio acuoso del 0,1 %, en volumen. Tras la adición de la disolución original de proteína (1%, en peso, pH= 7, fuerza iónica 0,05 M), se espera durante 48 horas, antes de realizar la medida de la tensión superficial, para asegurar la llegada al equilibrio, una vez producidas las posibles interacciones BSA-Tween 20. Por lo tanto, la variación de la relación lípido-proteína en el seno de la fase, se debe a la variación de la concentración de Tween 20 en cada sistema estudiado.

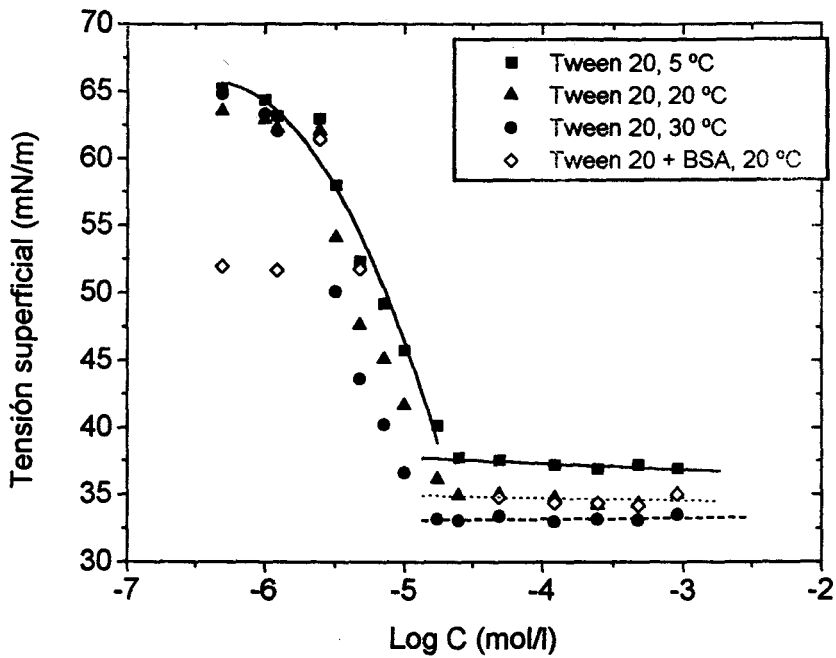
Las experiencias se realizan a las temperaturas de 5, 20 y 30 °C. La temperatura seleccionada en cada experiencia se mantiene constante, con una desviación de  $\pm 0,5$  °C, haciendo circular agua desde un criostato Heto.

### 6.3.1. Características interfaciales de películas de Tween 20 adsorbidas sobre la interfase aire-medio acuoso

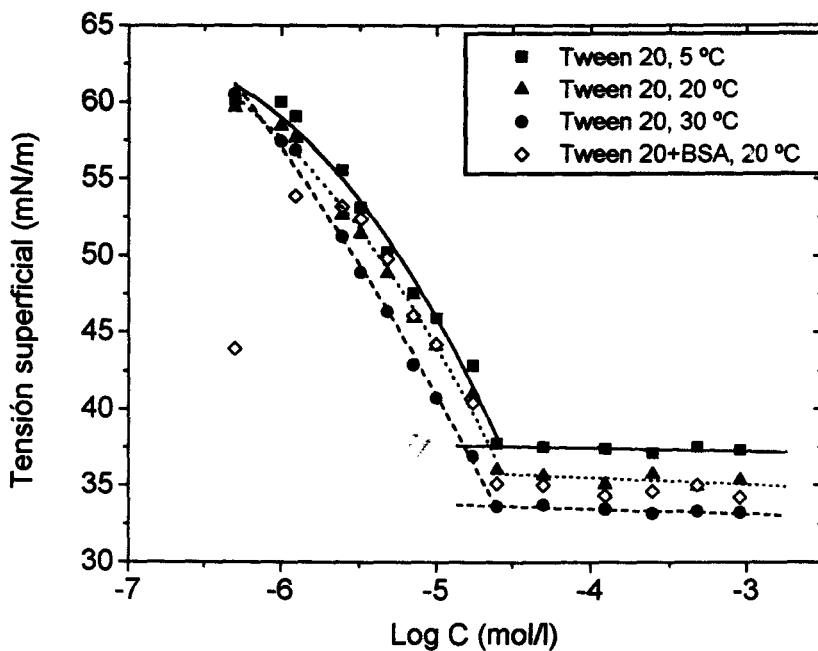
Los resultados experimentales sobre la variación de la tensión superficial con la concentración de Tween 20, en presencia o en ausencia de BSA, a las temperaturas de 5, 20 y 30 °C, se muestran en las figuras 6.9 a 6.15. Se incluyen en estas representaciones el efecto de la composición del medio acuoso, sea éste agua (Figura 6.9), o disoluciones acuosas de etanol -- a concentraciones 0,5 M (Figura 6.10), 1 M (Figura 6.11) y 2,5 M (Figura 6.12) --, de sacarosa -- a una concentración 0,5 M (Figura 6.13) -- o de ClNa -- a concentraciones 0,1 M (Figura 6.14) y 0,5 M (Figura 6.15).



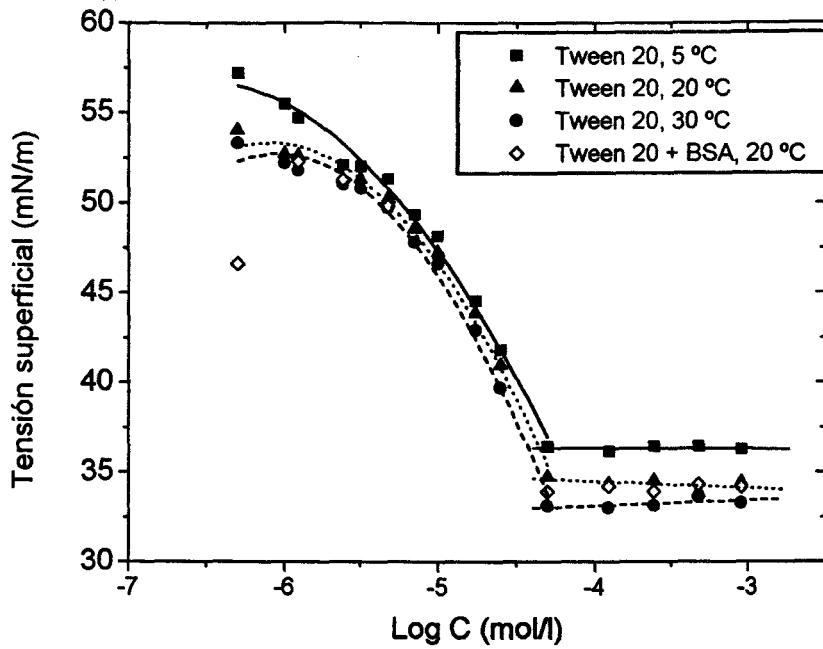
**Figura 6.9.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de agua, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.



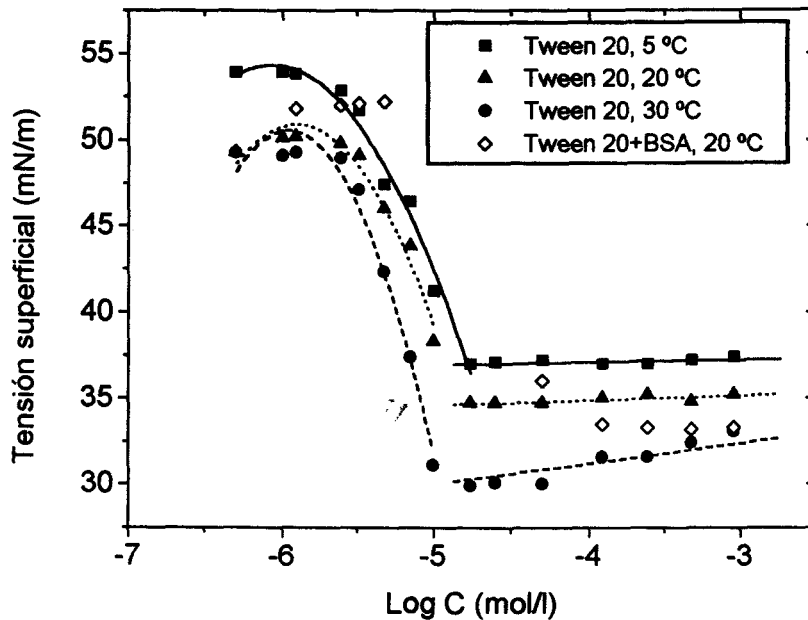
**Figura 6.10.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de etanol 0,5 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.



**Figura 6.11.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de etanol 1 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.

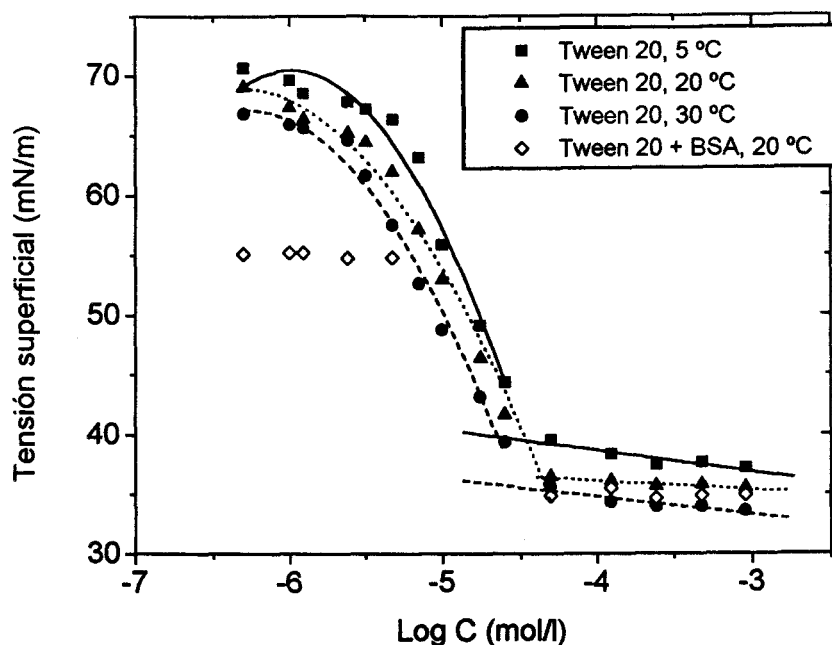


**Figura 6.12.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de etanol 2,5 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.

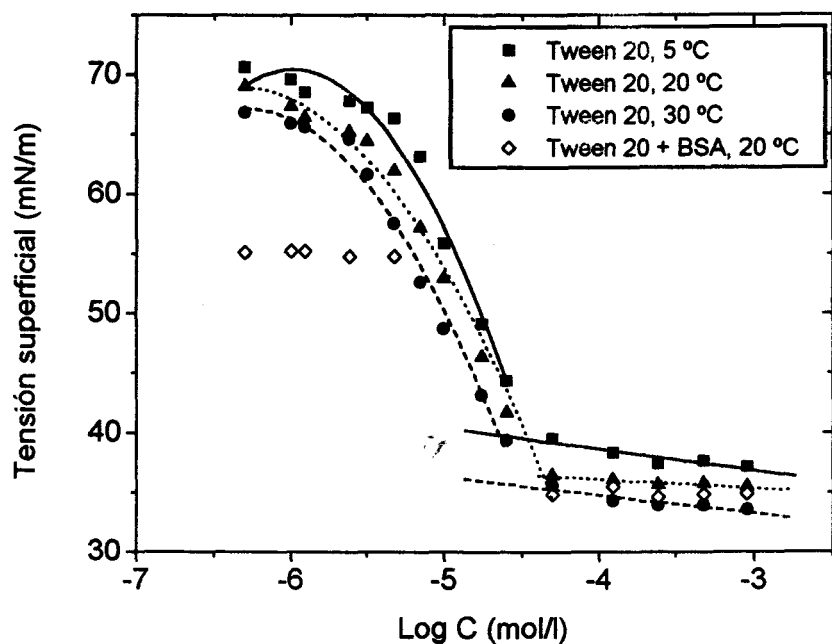


**Figura 6.13.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de sacarosa 0,5 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.





**Figura 6.14.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de ClNa 0,1 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.



**Figura 6.15.** Variación de la tensión superficial con el logaritmo de la concentración de Tween 20 en el seno de una disolución acuosa de ClNa 0,5 M, en presencia (Tween 20 + BSA) y en ausencia (Tween 20) de BSA al 0,1 % en peso, en función de la temperatura.

A partir del punto de corte de los dos tramos, que correlacionan la variación de la tensión superficial del sistema con el logaritmo de la concentración de Tween 20 se deducen los valores de la CMC y de la tensión superficial a la CMC de los sistemas estudiados (Tabla 6.2). El valor calculado de la CMC del Tween 20 sobre agua a 20 °C es del mismo orden de magnitud , pero inferior al valor que se ha publicado (Coke et al., 1990) para el mismo lípido, sobre una disolución acuosa de menor fuerza iónica ( $I = 0,01$ ,  $CMC = 3,5 \cdot 10^{-5}$  M). De estos datos se pueden extraer las siguientes consideraciones:

(A) El Tween 20 es capaz de formar micelas en agua y en disoluciones acuosas de etanol, sacarosa y CNa.

(B) Los valores de la CMC y de  $\sigma$ , disminuyen cuando aumenta la temperatura. Es decir, la formación de micelas se facilita y la actividad superficial se reduce cuando la temperatura se incrementa.

(C) Los valores de CMC y de  $\sigma$  dependen de la presencia de solutos en el medio acuoso:

(i) La adición de etanol produce un incremento del valor de la CMC, mayor cuanto mayor es su concentración en el medio acuoso. Sin embargo, el valor de  $\sigma$  disminuye en el mismo sentido, aunque sólo ligeramente. Por lo tanto, la presencia de etanol en el medio acuoso ejerce un efecto rompedor de estructura, impidiendo la formación de micelas y reduciendo la actividad superficial del Tween 20.

(ii) La adición de sacarosa produce, por el contrario, una reducción del valor de la CMC. Pero no afecta significativamente al valor de  $\sigma$ , especialmente a temperaturas inferiores a 20 °C.

(iii) El efecto producido por la presencia de ClNa en el medio acuoso es más complejo. La adición de ClNa produce un aumento del valor de la CMC a una concentración de sal 0,1 M, pero produce una reducción de la CMC a una concentración de sal de 0,5 M. Los valores de  $\sigma$  son superiores, con relación a las películas de Tween 20 adsorbidas sobre agua, independientemente de la concentración de la sal en el medio acuoso

**Tabla 6.2.** Concentración micelar crítica (CMC, M) y tensión superficial ( $\sigma$ ) a la CMC, de disoluciones acuosas de Tween 20, en función de la temperatura.

Temperatura	5 °C		20 °C		30 °C	
	CMC (M) $\times 10^5$	$\sigma$ (mN/m)	CMC (M) $\times 10^5$	$\sigma$ (mN/m)	CMC (M) $\times 10^5$	$\sigma$ (mN/m)
Agua	1,95	37,7	1,69	35,0	1,08	33,0
Etanol 0,5M	1,95	37,7	1,69	35,0	1,08	33,1
Etanol 1M	2,47	37,7	2,59	35,9	2,41	33,6
Etanol 2,5M	5,19	36,3	5,10	34,7	5,10	32,9
Sacarosa 0,5M	1,65	37,0	1,32	34,7	1,10	30,2
ClNa 0,1M	2,93	39,6	4,32	36,3	2,88	35,6
ClNa 0,5M	1,01	38,8	0,95	36,4	0,90	33,9

La concentración en exceso de Tween 20 adsorbido sobre la interfase ( $\Gamma$ ) puede determinarse a partir de la isoterma de adsorción, por aplicación de la ecuación de Gibbs (ecuación 6.2). Hasta el momento, la isoterma de adsorción de Gibbs representa el modelo mejor fundamentado teóricamente para el cálculo de la densidad superficial en exceso de un tensioactivo adsorbido (Dukhin et al, 1995).

$$\Gamma = - \frac{1}{zRT} \bullet \frac{d\sigma}{d \ln C} \quad (6.2)$$

donde la actividad del componente superficialmente activo en el seno de la fase se ha sustituido por su concentración,  $z = 1$  para tensioactivos no iónicos (el Tween 20, en este estudio) y  $z = 2$  para tensioactivos iónicos (Adamson, 1990, Dukhin et al, 1995; Rosen, 1989).

El término  $d\sigma/d(\ln C)$  puede obtenerse por diferenciación numérica o gráfica, a partir de la isoterma de adsorción, en el punto correspondiente a la CMC. No obstante, esta diferenciación puede introducir importantes errores, que pueden ser minimizados si se correlacionan los datos de  $\sigma$  en función  $\ln(C)$  mediante ecuaciones empíricas, semiempíricas o teóricas, que puedan ser fácilmente diferenciables. Entre estas ecuaciones se puede citar:

⊗ *Isoterma de adsorción de Langmuir* (Langmuir, 1917 y 1918; Volmer, 1925):

$$\Gamma = \Gamma_{\infty} \cdot C_0 / (a_L + C_0) \quad (6.3)$$

donde  $a_L (= k_{des}/k_{ads})$  es una constante relacionada con los flujos de adsorción ( $k_{ads}$ ) y de desorción ( $k_{des}$ ) del tensioactivo y  $C_0$  es su concentración inicial en el seno de la fase.

⊗ *Isoterma de Szyszkowski* (Szyszkowski, 1908, Volmer, 1925):

$$\sigma = \sigma_0 + B \ln(C_0/a_L + 1) \quad (6.4)$$

haciendo  $B = RT\Gamma_{\infty}$  la ecuación (6.3) se transforma en la ecuación (6.4).

⊗ *Ecuación de Traube* (1891):

$$\sigma = \sigma_0 - RT\Gamma_{\infty} \cdot (1 - \Gamma_0/\Gamma_{\infty}) \quad (6.5)$$

que es equivalente a las ecuaciones (6.3) y (6.4).

⊗ *Isoterma de Hückel-Cassel* (Hükel, 1932; Cassel, 1944):

$$C = K' \cdot [\Theta / (1 - \Theta)] \cdot e^{\Theta / (1 - \Theta)} \cdot e^{-2\alpha\Gamma / RT} \quad (6.6)$$

donde  $K'$ ,  $\Gamma_0$  y  $\alpha$  son constantes, y  $\Theta = \Gamma / \Gamma_0$ . La ecuación (6.6) se transforma en la isoterma de adsorción de Langmuir (ecuación 6.3) para grandes moléculas ( $A \gg 100$  Å<sup>2</sup>/molécula) (Dukhin et al, 1995).

⊗ *Isoterma de Frumkin* (1925):

$$\Delta\sigma = \sigma_0 \{ a_1 \ln(C/a_2 + 1) - a_3 [C/a(a_2 - 1)]^2 \} \quad (6.7)$$

⊗ *Isoterma de Temkin* (Prochaska y Szymanowski, 1989):

$$\text{Log}C + a_2 = a_1 / (RT) \cdot \Delta\sigma^{0.5} \quad (6.8)$$

⊗ *Isoterma de Volmer* (1925):

$$C = \frac{1}{b} \cdot \frac{\Theta}{1 - \Theta} \cdot \exp\left(\frac{\Theta}{1 - \Theta}\right) \quad (6.9)$$

Esta ecuación se transforma en la isoterma de adsorción de Langmuir (ecuación 6.2), para grandes áreas por molécula.

⊗ *Ecuación polinómica*. Es esencialmente la misma ecuación semilogarítmica utilizada para correlacionar los datos experimentales de  $\sigma$  vs  $C$ , en el intervalo de concentraciones de Tween 20 inferiores a la CMC (ecuación 6.10).

$$\sigma = \sum_0^n a_i \cdot (\text{Ln}C)^i \quad (6.10)$$

En las ecuaciones anteriores los símbolos  $a$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3, \dots$  son constantes empíricas o semiempíricas.

En resumen, la isoterma de adsorción de Langmuir derivada en 1918 semiempíricamente, sobre la base de experiencias de adsorción de gases sobre superficies sólidas, fue fundamentada físicamente por Volmer (1925) con modelos cinéticos. De Boer (1953) ha proporcionado una interpretación general de la isoterma de Langmuir, que es idéntica en un limitado intervalo de condiciones a la ecuación análoga de van der Waals. Las isotermas de Langmuir y de von Szyszkowski son consistentes con la ecuación de adsorción de Gibbs (Davies & Rideal, 1961). Cuando el área que las moléculas ocupan en la interfase y las fuerzas de interacción entre ellas han de ser tenidas en cuenta, ambas se transforman en la ecuación publicada, en un principio, por Frumkin (1925) y de uso muy común en la actualidad.

En el estudio que sigue se ha usado la misma ecuación polinómica (ecuación 6.1) que ha permitido el cálculo de la CMC. Los ejemplos sobre el uso de esta ecuación son muy frecuentes en la bibliografía (Prochaska et al, 1989 y 1994; Dussaud et al, 1994a; Razafindralambo et al, 1995, por citar sólo a algunas de las publicaciones más recientes).

El máximo exceso superficial ( $\Gamma_{\text{máx}}$ ) y el área molecular en estas condiciones de máxima adsorción ( $A_{\text{CMC}}$ ) pueden calcularse, en el caso de una sola especie superficialmente activa, mediante las ecuaciones 6.11 y 6.12.

$$\Gamma_{\text{máx}} = -\frac{1}{zRT} \cdot \left( \frac{d\sigma}{d\text{Ln}C} \right)_{\text{CMC}} \quad (6.11)$$

con  $z = 1$ , para el Tween 20.

$$A_{CMC} = \frac{1}{\Gamma_{máx} \cdot N} \quad (6.12)$$

donde N es el número de Avogadro.

**Tabla 6.3.** *Propiedades superficiales de Tween 20 adsorbido sobre la interfase aire-medio acuoso, en función de la temperatura.*

Subfase	Temperatura (°C)	$\Gamma_{máx}$ (mol.m <sup>-2</sup> ).10 <sup>6</sup>	$A_{máx}$ (nm <sup>2</sup> .moléc <sup>-1</sup> )	K (m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )
Agua	5	4,19	0,396	-----
Agua	20	3,56	0,466	-----
Agua	30	3,57	0,465	-----
Etanol 0,5M	5	3,15	0,527	2482
Etanol 0,5M	20	3,89	0,427	1228
Etanol 0,5M	30	4,58	0,362	1129
Etanol 1M	5	4,01	0,414	380
Etanol 1M	20	3,55	0,468	413
Etanol 1M	30	3,30	0,503	546
Etanol 2,5M	5	3,33	0,498	68,3
Etanol 2,5M	20	3,61	0,460	68,3
Etanol 2,5M	30	3,80	0,437	57,6
Sacarosa 0,5M	5	5,05	0,329	-----
Sacarosa 0,5M	20	4,56	0,364	-----
Sacarosa 0,5M	30	4,98,	0,333	-----
ClNa 0,1M	5	5,96	0,279	-----
ClNa 0,1M	20	5,85	0,284	-----
ClNa 0,1M	30	2,71	0,613	-----
ClNa 0,5M	5	9,01	0,184	-----
ClNa 0,5M	20	8,70	0,191	-----
ClNa 0,5M	30	8,78	0,189	-----

Los valores de la máxima cantidad de Tween 20 adsorbido sobre la interfase y del área máxima ocupada por las moléculas se incluyen en la tabla 6.3.

En el caso de se tengan dos componentes interfacialmente activos, como ocurre con los sistemas de Tween 20 en el seno de disoluciones acuosas de etanol, la ecuación de Gibbs (ecuación 6.2) se transforma en (Clint, 1992):

$$-\frac{d\sigma}{d\ln C} = RT \cdot \sum_i \Gamma_i \quad (6.13)$$

Para una mezcla de tensioactivos no iónicos ( $z = 1$ ), como es el caso de la mezcla de Tween 20 y etanol:

$$-\frac{d\sigma}{d\ln C} = RT(\Gamma_1 + \Gamma_2) \quad (6.14)$$

si se definen las cantidades fraccionales adsorbidas de cada especie como  $X_1 = \Gamma_1/\Gamma_m$  y  $X_2 = \Gamma_2/\Gamma_m$ , siendo  $\Gamma_m = \Gamma_1 + \Gamma_2$ , se puede escribir (Motomura y Arotano, 1993):

$$d\sigma = -RT\Gamma_m \cdot \frac{dC}{C} - RT\Gamma_m \frac{X_2 - \alpha_2}{\alpha_1 \alpha_2} \cdot d\alpha_2 \quad (6.15)$$

donde  $C$  es la concentración total de los dos componentes interfacialmente activos y  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son las fracciones molares de cada componente en la mezcla.

Una vez calculado el valor de  $\Gamma$  a partir de la isoterma de adsorción de Gibbs, se puede obtener las cantidades fraccionales adsorbidas, como  $\Gamma_i / \Gamma_{\text{máx}}$ . Por otra parte, la combinación de las ecuaciones de Langmuir y de Gibbs conduce a una forma de la ecuación de Szyskowski para multicomponentes, que puede ser utilizada si es conocida la tensión superficial de la mezcla (Hassan et al, 1995):

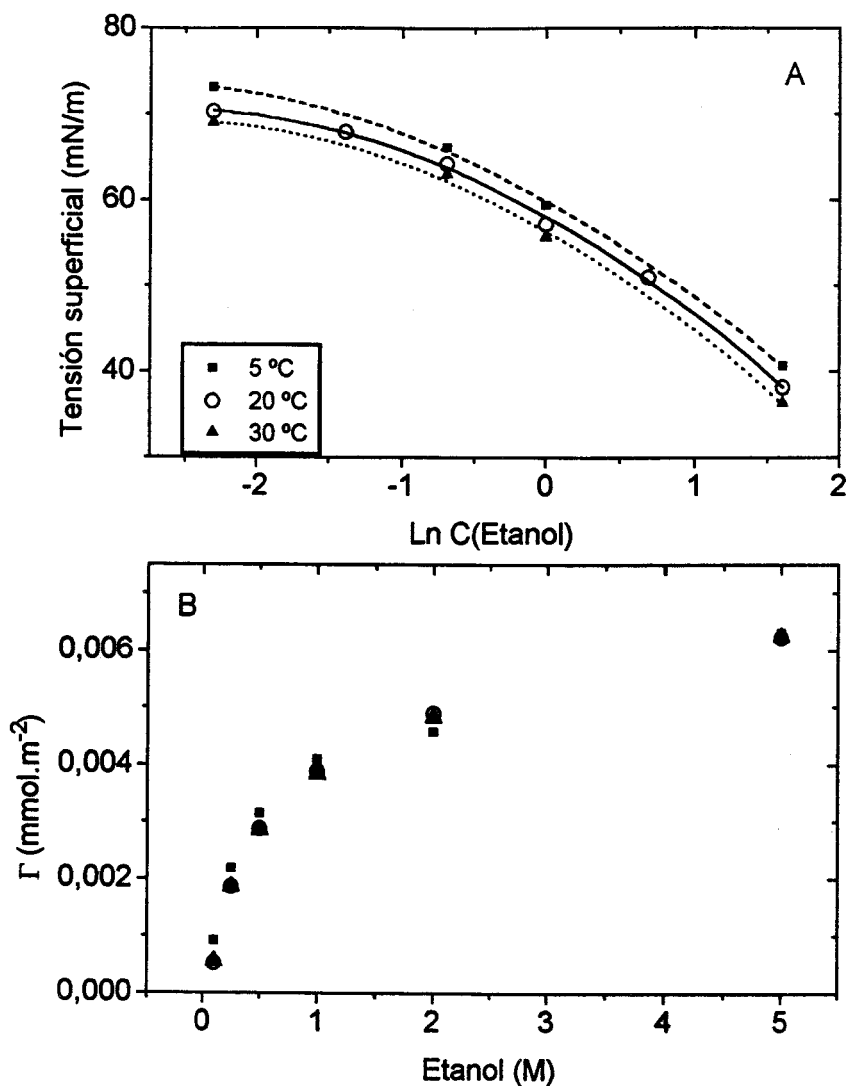


$$\Pi = \sigma_o - \sigma = RT\Gamma_{\text{máx}} \cdot \text{Ln}(1 + KC) \quad (6.16)$$

donde  $K = K_1 \cdot \alpha_1 + K_2 \cdot \alpha_2$ , para una mezcla ideal sobre la interfase, y  $K_1$  y  $K_2$  son los coeficientes de adsorción de los componentes 1 y 2, respectivamente.

La máxima cantidad adsorbida de la mezcla de Tween 20 + etanol se ha calculado a partir de la aplicación de la ecuación de adsorción de Gibbs para las mezclas (ecuación 6.14) a los datos experimentales (Figuras 6.10 a 6.12). Puesto que el etanol se encuentra en un gran exceso en el seno de la fase, en comparación con el Tween 20, su concentración permanecerá prácticamente constante y no estará afectada por la presencia del lípido. El coeficiente de adsorción de la mezcla,  $K$ , se ha calculado mediante la ecuación (6.16). Los valores de ambos parámetros, además de los del área máxima ocupada por las moléculas adsorbidas (ecuación 6.12), se incluyen en la tabla 6.3.

De los datos mostrados en la tabla 6.3 no se deduce una influencia simple de la temperatura sobre la máxima cantidad de Tween 20 adsorbido sobre la interfase, en el intervalo estudiado. La adsorción de Tween 20 se incrementa en presencia de sacarosa o de ClNa en el medio acuoso (constituyendo la concentración de ClNa 0,1 M, a 30 °C una excepción), mientras que el etanol, aparentemente, no afecta significativamente al valor de la máxima cantidad adsorbida. Sin embargo, los resultados obtenidos con disoluciones de etanol también pueden indicar que, para una gran concentración de etanol, la adsorción de una molécula de Tween 20 va acompañada de la desorción de una molécula del alcohol. Esta misma conclusión parece derivarse de los datos que, sobre el coeficiente de adsorción ( $K$ ), se incluyen en la tabla 6.3. En efecto, el coeficiente de adsorción es mayor a la menor concentración de etanol, lo que puede ser una indicación de que el desplazamiento del etanol por el Tween 20 se facilita en estas condiciones.



**Figura 6.16.** Adsorción de etanol en exceso sobre la interfase aire-agua. (A) Variación de la tensión superficial con la concentración de etanol en el seno de la fase. (B) Concentración en exceso de etanol en función de su concentración en el seno de la fase acuosa.

El desplazamiento del etanol por el Tween 20 puede deducirse también a partir de la representación de la figura 6.16. En esta figura se representa la concentración en exceso de etanol en la interfase en función de la concentración de etanol en el seno de la fase y de la temperatura, por aplicación de la ecuación de Gibbs a los datos de variación de la tensión superficial con la concentración de etanol en el seno de la fase.

Puede comprobarse que la interfase se encuentra prácticamente saturada por el etanol a una concentración próxima a la mayor concentración estudiada (5 M). Además, la máxima cantidad de etanol adsorbida supera a la calculada para la mezcla Tween 20 + etanol (tabla 6.3).

### 6.3.2. Interacciones BSA-Tween 20 sobre la interfase aire-medio acuoso

Cuando tanto el Tween 20 como la BSA están presentes en el medio acuoso, ambos emulsionantes pueden formar películas adsorbidas sobre la interfase aire-medio acuoso. La existencia de interacciones entre BSA y Tween 20 puede deducirse a partir de las variaciones de la tensión superficial con la concentración de Tween 20, representadas en las figuras 6.9 a 6.15, en función de la composición del medio acuoso y de la temperatura. Puede observarse que la existencia de interacciones lípido-proteína depende de las concentraciones de Tween 20 -- y, por lo tanto, de la concentración relativa BSA-Tween 20 -- y de las de los solutos presentes en el medio acuoso.

(A) A las menores concentraciones de Tween 20 -- que coinciden con las mayores concentraciones relativas BSA-Tween 20 -- las actividades superficiales de las películas mixtas BSA-Tween 20 mixtas son superiores, en general, a las de las películas adsorbidas del lípido puro. Puede observarse que los valores de  $\sigma$  son inferiores para las películas mixtas, en este intervalo de composiciones, independientemente de la composición del medio acuoso.

(B) A valores de la concentración de Tween 20 del mismo orden de magnitud y superiores al de la CMC, en el medio acuoso considerado, las actividades superficiales de las películas mixtas son similares a las del lípido puro. Las películas mixtas adsorbidas sobre disoluciones acuosas de etanol se apartan de este comportamiento general. En estos sistemas se observa una actividad superficial semejante a la del lípido puro, incluso, a concentración de éste de un orden de

magnitud inferior al valor de la CMC, especialmente a las mayores concentraciones estudiadas de etanol en el medio acuoso. Por el contrario, se requieren concentraciones de Tween 20 de al menos un orden de magnitud superiores a la CMC para que prevalezca su actividad superficial, en el caso de las películas mixtas adsorbidas sobre disolución acuosa de ClNa 0,5M.

( C ) Las actividades superficiales de las películas mixtas BSA-Tween 20, para concentraciones del lípido (C, M) inferiores a la CMC, son superiores sobre disoluciones acuosas de etanol que para disoluciones acuosas de sacarosa, agua y disoluciones acuosas de ClNa, en este orden (Tabla 6.4). Sin embargo, las actividades superficiales de las películas mixtas, para concentraciones del lípido iguales o superiores a la CMC, son prácticamente independientes de la composición del medio acuoso.

Como consecuencia de estos resultados se puede proponer que, como un comportamiento general, en la actividad superficial de las películas mixtas BSA-Tween 20, el comportamiento del Tween 20 prevalece sobre el de la BSA, en prácticamente todo el intervalo estudiado de composiciones relativas de ambos emulsionantes en el seno de la fase acuosa. Es únicamente a las menores concentraciones relativas de Tween 20 en las mezclas de ambos emulsionantes -- inferiores al valor de la CMC, incluso en un orden de magnitud --, cuando la actividad superficial se aparta de la correspondiente al lípido. Incluso en este intervalo de concentraciones relativas BSA-Tween 20, no se puede afirmar que predomine el efecto producido por la presencia de proteína sobre el valor de la tensión superficial de la mezcla de emulsionantes. En efecto, puede comprobarse de los datos de la tensión superficial de las disoluciones de BSA pura incluidos en la tabla 6.4, sobre algunos de los medios acuosos estudiados en esta sección, que la tensión superficial de las películas mixtas, a las mayores concentraciones relativas de proteína en la mezcla de ambos emulsionantes (es decir, para  $C \ll CMC$ ), es superior al de la BSA pura, sobre el mismo medio acuoso. Por lo tanto, no se puede descartar que, en este intervalo de concentraciones relativas altas de

BSA en la mezcla BSA-Tween 20, se forme una película mixta de ambos emulsionantes, interaccionando sobre la interfase.

**Tabla 6.4.** Tensión superficial de BSA pura(0,1%, peso) y de películas mixtas BSA (0,1%, peso)-Tween 20 adsorbidas sobre la interfase aire-medio acuoso, a concentraciones de Tween 20 (C, M) inferiores y superiores a la CMC (M), en función de la composición del medio acuoso. Temperatura: 20 °C.

Subfase	BSA-Tween 20 $\sigma$ (mN/m) C << CMC	BSA-Tween 20 $\sigma$ (mN/m) C > CMC	$\sigma$ (mN/m) BSA (0,1%, peso)
Agua	53,5-54,8	34,5-35,8	51,1
Etanol 0,5M	50,0-51,4	34,2-35,0	46,0
Etanol 1M	43,9	34,2-35,1	41,1
Etanol 2,5M	46,6	33,9-34,2	---
Sacarosa 0,5M	51,8-52,2	33,3-33,5	43,2
ClNa 0,1M	54,8-55,1	34,8-35,5	---
ClNa 0,5M	54,0-54,3	34,6-35,1	---

#### 6.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existe una extensa información bibliográfica sobre datos experimentales de enlaces entre proteínas y tensioactivos (Cornell, 1982; MacRitchie, 1978; Teneva et al., 1984; Cornell y Carroll, 1985; Ivanova et al, 1984; Tanford, 1962; Wüstneck et al., 1988). Sin embargo, para sistematizar la discusión conviene distinguir entre las interacciones que pueden producirse entre ambas especies en el seno de la fase acuosa o sobre la interfase -- si bien, estas últimas son muy dependientes de la existencia de las primeras.

##### 6.4.1. Interacciones tensioactivo-proteína en disolución.

Las proteínas y los tensioactivos, en general, pueden interaccionar en disolución para formar complejos tensioactivo-proteína, con propiedades muy diferentes a las de cada una de las especies puras (Tanford, 1980; Ananthapadmanabhan, 1993). Se sabe que los tensioactivos iónicos interaccionan con las proteínas en disolución, y que estas interacciones son generalmente más fuertes para el dodecilsulfato sódico (SDS) que para los tensioactivos catiónicos (Nozaki et al, 1974; Subramanian et al, 1986; Ananthapadmanabhan, 1993). También es conocido que los tensioactivos no iónicos interaccionan poco con las proteínas solubles (Tanford, 1980), aunque en estas existen zonas para enlaces de tipo hidrofóbico. Los tipos de interacciones observados entre tensioactivos y proteínas se pueden incluir en las siguientes categorías:

A) Enlaces de tensioactivos de carácter hidrofóbico o electrostático en zonas específicas de las proteínas, tales como se ha observado con la  $\beta$ -lactoglobulina (Tanford, 1980; Jones y Wilkinson, 1976; Coke et al, 1990; Frapin et al, 1990; O'Neill y Kinsella, 1987; Kresheck et al, 1977; Clark et al, 1992; Creamer, 1995), sero albuminas (Tanford, 1980, Nozaki et al, 1974; Brown, 1984; Erickson y Hegg, 1985), etc.

B) Adsorción cooperativa del tensioactivo sobre la proteína sin cambios conformacionales importantes.

C) Enlace cooperativo a la proteína seguido de cambios conformacionales (Few et al, 1955; Subramanian et al, 1986; Nelson, 1971).

Los tres tipos de interacciones antes citados (A-C) pueden ocurrir en el mismo sistema cuando se modifica la relación tensioactivo-proteína. Los cambios conformacionales que ocurren en el caso C pueden implicar modificaciones en la estructura secundaria de la proteína (Nozati et al, 1974; Subramanian et al, 1986; Su y Jurgensons, 1977). Además, se ha sugerido diversos modelos para los complejos tensioactivo-proteína (Reynolds y Tanford, 1970; Shirahama et al, 1974; Lundahl, 1986). En la región de interacciones de carácter cooperativo, por encima de una *concentración de asociación crítica (cac)* -- es decir, una concentración de tensioactivo por encima de la cual la formación de complejos entre el tensioactivo y la proteína está regida por un mecanismo de sustitución de la proteína de la interfase -- la interacción es principalmente de carácter hidrofóbico (Tanford, 1980; Subramanian et al, 1986; Nelson, 1970).

#### 6.4.2. Interacciones tensioactivo-proteína sobre la interfase.

El efecto de la formación de complejos lípido-proteína sobre la interfase aire-agua puede detectarse por los cambios producidos en las curvas de tensión superficial en función de la concentración de la proteína o del lípido, tras la adición de la otra especie, el lípido o la proteína, respectivamente.

La adsorción desde mezclas lípido-proteína es, en términos generales, análoga para las interfase sólido-líquido y fluido-fluido (Corthaudon et al, 1991a, 1991b; Clark et al, 1994). La adsorción cooperativa entre proteínas y tensioactivos sobre interfaces

fluido-fluido ha sido revisada recientemente por Dickinson y Woskett (1989). Estos autores concluyen que, como se ha observado en los resultados analizados en esta sección con lípidos insolubles (monoestearina y monooleína) y soluble (Tween 20), el comportamiento interfacial de los tensioactivos, a concentraciones superiores a una cierta concentración crítica, domina al de las proteínas, debido a que aquéllos poseen generalmente una mayor actividad superficial sobre la misma base en peso -- es decir, poseen una mayor capacidad de reducir la tensión superficial o interfacial.

Según los resultados experimentales obtenidos y el análisis de la bibliografía, se puede concluir que los tensioactivos en general, y los lípidos en particular, pueden interaccionar con las interfases a través de mecanismos de solubilización o de desplazamiento, dependiendo de las interacciones del tensioactivo sobre la interfase y de los enlaces tensioactivo-proteína. La solubilización requiere la formación de complejos entre la proteína y el tensioactivo y el desplazamiento requiere la adsorción del tensioactivo sobre la interfase.

Los estudios referentes a la BSA conducen a resultados complejos, indicando la existencia de diversas regiones con diferentes grados de afinidad por los tensioactivos:

- A) Existen alrededor de 10 u 11 puntos específicos para su enlace con compuestos anfifílicos aniónicos.
- B) Existen diversos puentes de enlace de carácter cooperativo, sin cambio apreciable de conformación.
- C) Existen diversos puntos de enlace de carácter cooperativo, con cambios apreciables de conformación.

Se ha informado frecuentemente que, en las interacciones lípido-proteína, tienen lugar los enlaces de carácter electrostático en conjunción con los efectos



hidrofóbicos, con el convencimiento generalizado de que las interacciones electrostáticas preceden a las de carácter hidrofóbico. Los lípidos estudiados en esta sección (monoestearina, monooleína y Tween 20), como lípidos polares que son, poseen un grupo hidrofílico final mientras que la mayor parte de la molécula es hidrofóbica. Por lo tanto, sería esta parte hidrofóbica de la molécula la que podría asociarse con la proteína sobre la interfase. Sin embargo, esta asociación puede ser diferente para un lípido soluble o insoluble, y dependerá también de la relación lípido-proteína, entre otros factores.

#### 6.4.3. Influencia del tipo de lípido y de la relación lípido-proteína.

El comportamiento general analizado previamente depende de si el lípido es insoluble en el medio acuoso y se esparce sobre la interfase cubierta por la proteína (apartado 6.2), o de si es la proteína la que se adiciona a una disolución acuosa que contiene al lípido previamente adsorbido sobre la interfase (apartado 6.3).

En el primer caso, como se observa con los sistemas BSA-monoestearina y BSA-monooleína (Figuras 6.6 a 6.8), las curvas de  $\sigma$  se asemejan a las de la proteína, para las mayores concentraciones de ésta en el sistema y tienden al valor de la ESP del lípido, cuando es ésta la especie que se encuentra en una mayor proporción en la mezcla de ambos tipos de emulsionantes. Este fenómeno proporciona una evidencia poderosa de que la formación de complejos lípido-proteína puede quedar restringida, en estos sistemas, a la zona de composiciones intermedias deducida a partir de las curvas de  $\sigma$  en función de la composición relativa de la mezcla lípido-proteína (como las representadas en las figuras 6.6 a 6.8).

El comportamiento de las mezclas BSA-Tween 20 es característico (Bos et al, 1996; Dickinson y Woskett, 1986). En ausencia de proteína (apartado 6.3.1), la tensión superficial se reduce gradualmente cuando se incrementa la concentración de Tween

20. El gradiente de reducción de la tensión superficial se reduce y la línea  $\sigma$ -LogC se hace horizontal a las más altas concentraciones de Tween 20, cuando se sobrepasa el valor de la CMC. El cambio brusco en la pendiente de la representación de la tensión superficial en función de la concentración de Tween 20, en las proximidades de la CMC (Figuras 6.9 a 6.15), se corresponde con un incremento pronunciado de la cantidad adsorbida (datos no mostrados). En contraste, la curva  $\sigma$ -LogC en presencia de proteína permanece en un valor relativamente constante a bajas concentraciones de Tween 20, cuando el valor de  $\sigma$  es de alrededor de 50-55 mN/m, debido a la adsorción de la proteína sobre la interfase.

Desde otro punto de vista, debido a las diferentes formas de las isothermas de adsorción de lípidos y de proteínas, la interacción con la interfase depende, en gran medida, de la concentración relativa de ambos componentes. Por lo tanto, se puede proponer, de acuerdo con los resultados obtenidos, distintos grados de asociación lípido-proteína, en función de la concentración de aquel (C).

A) A  $C \gg CMC$  la curva  $\sigma$ -LogC se asemeja a la del lípido puro, debido a que la cantidad adsorbida se corresponde con una capa de lípido puro.

B) A las menores concentraciones de lípido, puede admitirse que este no se adsorbe, aunque algunas moléculas del mismo se unan a la proteína, con una mayor afinidad que por la interfase. Es decir, la interfase estará ocupada fundamentalmente por la proteína, mientras que el lípido presente se unirá fuertemente a la proteína -- por interacciones electrostáticas<sup>1</sup> o polares en primer lugar, pero complementadas por interacciones hidrofóbicas -- en el seno de la disolución y sobre la interfase. En esta situación se daría la máxima cantidad de proteína adsorbida, mayor incluso que la correspondiente a su adsorción desde una disolución de proteína pura. Este efecto

---

<sup>1</sup> Los tres lípidos polares estudiados son no iónicos, por lo tanto las interacciones electrostáticas serán débiles.

sinergista positivo se explicaría si se producen enlaces lípido-proteína en disolución que facilitarían la adsorción de la proteína (Bos et al, 1996).

C) A concentraciones intermedias de lípido, se produce un cruce entre las curvas  $\sigma$ -C correspondientes al lípido puro y a la mezcla BSA-Tween 20. Este fenómeno proporciona una evidencia suficiente de la formación de complejos entre ambos emulsionantes. En efecto, el cruce de las curvas es debido a la reducción de la concentración de Tween 20 libre en disolución, debido a que este lípido interactúa con la proteína para formar complejos. Es decir, la composición interfacial depende en gran medida del balance entre el lípido adsorbido sobre la interfase y el que se une a la proteína, como se ha observado sobre la interfase aceite-agua (Dickinson y Woskett, 1989). Para algunos sistemas (figuras 6.9 y 6.13), y en algunos puntos a lo largo de esta sección de la curva  $\sigma$ -LogC, la tensión superficial de la mezcla lípido-proteína se hace mayor que la del Tween 20, aunque en el primer caso existe una mayor cantidad de emulsionantes. Este hecho podría ser debido a que las moléculas de lípido se unan cooperativamente a la proteína y produzca el desplazamiento de segmentos hidrofóbicos de la proteína previamente adsorbidos sobre la interfase.

Por otra parte, la principal fuerza impulsora para la asociación de moléculas anfífilas en el seno del agua es la reducción del área de contacto cadena hidrocarbonada-agua. Esta misma fuerza impulsora podría favorecer el enlace de las moléculas de Tween 20 con la región hidrofóbica de la proteína en disolución. Esto podría explicar que el cruce de líneas se produzca precisamente a concentraciones de Tween 20 inferiores pero cercanas al valor de la CMC. Las proteínas contienen una mezcla de grupos hidrofóbicos y otros cargados eléctricamente, por lo tanto no es sorprendente que se produzcan enlaces entre las moléculas del lípido y de la proteína (Dickinson y Woskett, 1989; Goddard, 1986; Goddard y Pethica, 1951).

Una observación interesante es la posibilidad de que la forma micelar del lípido (de carácter hidrofílico) no interactúe con la proteína. Esto se deduce de la forma de

las curvas  $\sigma$ -LogC: a concentraciones de lípido superiores a la CMC, la isoterma de adsorción de la mezcla BSA-Tween 20 se corresponde con la del Tween 20. Recuérdese que es en las proximidades de la CMC cuando se produce el cruce de las isotermas, en presencia de la proteína. Este fenómeno puede ser la consecuencia de la existencia de enlaces lípido-proteína de tipo cooperativo, ya que tiene lugar en un intervalo limitado de concentraciones.

Esta región de concentraciones de la mezcla BSA-Tween 20, en la que coexisten las dos especies en la interfase, es de gran importancia ya que es en estas concentraciones relativas de la mezcla de emulsionantes cuando la estabilidad del sistema disperso (emulsión o espuma), frente a la coalescencia, se encuentra fuertemente afectada (Bos et al, 1996). El incremento de las interacciones lípido-proteína en esta región intermedia coincide también con el intervalo de concentraciones de lípido en el que tiene lugar el desplazamiento de la proteína en emulsiones, como se ha determinado por el método de agotamiento (depleción) para mezclas de  $\beta$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina con distintos tensioactivos iónicos (de Feijter et al, 1987). Estos datos indujeron a los autores a especular que los enlaces proteína-tensioactivo en disolución podrían constituir la fuerza impulsora para la desorción de la proteína, puesto que cuando se incrementa la concentración de tensioactivo se produce un desplazamiento del equilibrio desde la proteína adsorbida sobre la interfase hacia la proteína interaccionando con el lípido.

#### 6.4.4. Influencia de la composición del medio acuoso.

El desplazamiento superficial de la proteína por el lípido depende no solamente del tipo de lípido y de su concentración relativa en la mezcla lípido-proteína, como se ha discutido previamente, sino también de la composición del medio acuoso. En efecto, la presencia de solutos en el medio acuoso puede favorecer la existencia de cambios conformacionales en la proteína o, por el contrario, puede incrementar su estabilidad

estructural, fenómenos ambos que pueden incidir sobre la existencia de interacciones lípido-proteína.

Los complejos BSA-monoestearina y BSA-monooleína deben diferir, en función de la presencia de etanol o de sacarosa en el seno de la fase continua, como puede deducirse de las diferencias que se observan entre los valores de  $\sigma^\infty$  correspondientes a las películas de BSA y BSA-monoestearina o BSA-monooleína, sobre disoluciones acuosas de etanol (figura 6.4) y de sacarosa (figura 6.5). Puede afirmarse pues, que los solutos presentes en la fase acuosa pueden alterar las interacciones lípido-proteína y, además, pueden competir con el lípido por los puntos de enlace con la proteína. De nuevo, en este caso el etanol y la sacarosa en la fase acuosa se comportan de forma diferente. Si una región hidrofóbica de la proteína es la principal zona de enlace con el lípido, el resto hidrofóbico del etanol podría ocupar el área hidrofóbica de la proteína, mientras que el grupo polar hidrofílico del soluto podría conferir solubilidad en el seno de la disolución al complejo resultante.

Finalmente, llegados a este punto puede plantearse una cuestión típica: ¿puede servir la simple medida de la tensión superficial o interfacial para establecer el comportamiento de emulsiones o de espumas, que contienen mezclas de lípidos y de proteínas?. Los resultados obtenidos en esta sección -- sobre interacciones de BSA con lípidos insolubles en condiciones dinámicas (apartado 6.1) y en el equilibrio (apartado 6.2), o de BSA con un lípido soluble en el medio acuoso (apartado 6.3) -- proporcionan una fuerte evidencia de que pueden producirse interacciones lípido-proteína sobre la interfase aire-medio acuoso, además de en el seno de la fase acuosa, y de que estas interacciones, si existen, dependen del tipo de lípido -- fundamentalmente de si este es soluble (y se adsorbe) o es insoluble (y se esparce) en el medio acuoso --, de la relación lípido-proteína y de la composición del medio acuoso. Sin embargo estos resultados, obtenidos mediante experiencias de tensiometría, no son totalmente concluyentes por sí mismos, siendo conveniente el uso de otras técnicas experimentales complementarias, que permitan profundizar en el conocimiento de las características interfaciales de las

películas mixtas lípido-proteína.

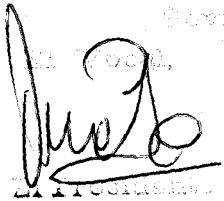
El comportamiento interfacial analizado en esta sección con mezcla lípido-proteína es esencialmente similar al observado por otros autores con los sistemas  $C_{12}E_6$  + BSA y  $C_{12}E_6$  + lisozima (Nishikido et al, 1982), 1-monocaproin + ovalbúmina (Erickson y Hegg, 1985), monoestearina + caseína ( Paquin et al, 1987), con mezclas de mono y diglicéridos con caseína, con  $\alpha$ - y  $\beta$ -lactoglobulina (Rahman y Sherman, 1982), etc. La existencia de interacciones entre emulsionantes puede repercutir sobre las características reológicas de la película (Wüstneck y Müller, 1986; Wüstneck et al, 1984, Doxastakis y Sherman, 1986) y , en último término, sobre la estabilidad de la emulsión (Doxastakis y Sherman, 1984, ) o de la espuma (Clark et al., 1992, Coke et al., 1990, Sarker et al., 1995).

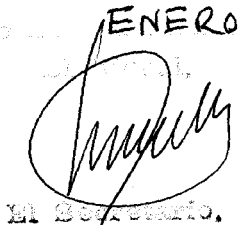
Debido a su importancia teórica y práctica, precisamente por su relación con la estabilidad de emulsiones y espumas alimentarias, la transición en la estructura de la capa adsorbida sobre la interfase aire-agua de las películas mixtas, que se deriva de las medidas de tensión superficial, causada por una adsorción competitiva entre lípidos y proteínas, requiere un estudio más detallado. Las interacciones lípido-proteína serán tratadas también en los capítulos siguientes, con ayuda de técnicas experimentales diferentes. En estas experiencias se analizarán las características reológicas superficiales (capítulo 7), y el drenaje en películas delgadas y la difusión superficial (capítulo 8), de los mismos sistemas, en función de la composición del medio acuoso (presencia de etanol y de sacarosa) y de la relación lípido-proteína.

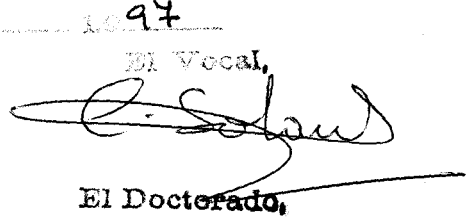
# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Donado el Doctorado a D. ROSARIO RODRIGUEZ NIÑO  
en el día de la fecha, por el Consejo Doctoral de  
D. ROSARIO RODRIGUEZ NIÑO  
ESTUDIO DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS Y DE  
PROTEÍNAS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO  
ACUOSO  
APTO CON LAUDE POR  
UNANIMIDAD

Sevilla, 24 de ENERO de 1997

El Vocal,  


El Secretario,  


El Doctorado,  










500831998