

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
INTERFACIAL DE PELÍCULAS DE PROTEÍNAS  
DE INTERÉS ALIMENTARIO: ADSORCIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.**

Sevilla, Junio de 2007

**M<sup>a</sup> LUISA LÓPEZ CASTEJÓN**



**DPTO. DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
INTERFACIAL DE PELÍCULAS DE PROTEÍNAS  
DE INTERÉS ALIMENTARIO: ADSORCIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.**

Memoria que presenta M<sup>a</sup> Luisa López Castejón, Licenciada en Ciencias Químicas, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Junio de 2007

Fdo.: M<sup>a</sup> Luisa López Castejón

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, siendo dirigida por las profesoras Dra. D<sup>a</sup>. Julia de la Fuente Feria y Dra. D<sup>a</sup>. Manuela Ruiz Domínguez.

Sevilla, Junio de 2007

Fdo.: Julia de la Fuente Feria

Fdo.: Manuela Ruiz Domínguez

D. Francisco Carrillo de la Fuente, Director del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Luisa López Castejón ha sido realizada dentro del Programa de doctorado Estudios Avanzados en Ingeniería Química.

Sevilla, Junio de 2007

Fdo.: Francisco Carrillo de la Fuente

D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Alfaro Rodríguez, Profesora Titular del Dpto. de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla y Tutora de D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa López Castejón.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Luisa López Castejón ha sido realizada en EL Departamento de Ingeniería Química.

Sevilla, Junio de 2007

Fdo.: M<sup>a</sup> del Carmen Alfaro Rodríguez

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
2.1 FORMULACIONES ALIMENTARIAS.....	5
2.1.1 INTRODUCCCIÓN.....	5
2.1.2 EMULSIONES Y ESPUMAS ALIMENTARIAS DE INTERÉS.....	9
2.2 SUPERFICIES E INTERFASES.....	12
2.2.1 TENSIÓN SUPERFICIAL E INTERFACIAL.....	12
2.2.2 FORMACIÓN DE PELÍCULAS SUPERFICIALES.....	14
2.3 REOLOGÍA. CONCEPTOS BÁSICOS.....	16
2.3.1 CLASIFICACIÓN REOLÓGICA DE LOS MATERIALES.....	17
2.3.2 FLUIDOS NEWTONIANOS.....	18
2.3.3 FLUIDOS NO NEWTONIANOS.....	20
2.3.4 VISCOELASTICIDAD LINEAL. MODELOS ANALÓGICOS.....	24
2.3.4.1 ENSAYOS VISCOELÁSTICOS DINÁMICOS.....	24
2.3.5 VISCOELASTICIDAD NO LINEAL.....	34
2.3.6 REOLOGÍA INTERFACIAL.....	35
2.4 ESTABILIDAD DE EMULSIONES.....	41
2.4.1 PROCESOS DE DESESTABILIZACIÓN.....	43
2.4.2 ESTABILIDAD CINÉTICA.....	45
2.5. AGENTES DE SUPERFICIE Y ESTABILIZANTES.....	49
2.5.1 CLASIFICACIÓN DE AGENTES EMULSIONANTES Y ESTABILIZANTES.....	51
2.5.1.1 EMULSIONANTES DE BAJO PESO MOLECULAR.....	51
2.5.1.1.1 MONOGLICÉRIDOS Y DIGLICÉRIDOS.....	51
2.5.1.1.2 DERIVADOS DE MONOGLICÉRIDOS.....	53
2.5.1.1.3 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS.....	53
2.5.1.1.4 FOSFOLÍPIDOS.....	54
2.5.1.2 PROTEÍNAS.....	54

2.5.1.2.1 ESTRUCTURA.....	55
2.5.1.2.2 ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
2.5.1.2.3 PROTEÍNAS LÁCTEAS: $\beta$ -LACTOGLOBULINA.....	62
2.5.1.2.4 PROTEÍNAS DE CEREALES: GLUTEN.....	68
2.5.1.2.5 PROTEÍNAS DE LEGUMINOSAS: SOJA.....	72
2.5.1.2.6 PROTEÍNAS DE HUEVO: OVOALBÚMINA.....	75
2.5.2 MEZCLAS DE EMULSIONANTES.....	79
3. OBJETIVOS.....	83
4. EXPERIMENTAL.....	85
4.1 TENSIÓMETRO.....	85
4.2 REÓMETRO.....	90
4.3 DESCRIPCIÓN DE LOS PRODUCTOS EMPLEADOS.....	96
4.4 VARIABLES ESTUDIADAS.....	100
4.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	100
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	101
5.1 MEDIDAS DE TENSIÓN.....	101
5.1.1 EXPERIENCIAS PREVIAS.....	101
5.1.2 PELÍCULAS DE PROTEÍNAS Y SUS MEZCLAS CON MONOESTEARINA.....	107
5.1.2.1 GLUTEN .....	107
5.1.2.2 SOJA .....	111
5.1.2.3 OVOALBÚMINA .....	115
5.1.2.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS .....	118
5.1.3 INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA .....	120
5.2 CINÉTICAS DE ADSORCIÓN.....	124
5.2.1 GLUTEN.....	128
5.2.2 SOJA.....	135
5.2.3 COMPARACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS .....	139
5.3 REOLOGÍA INTERFACIAL.....	141
5.3.1 GLUTEN.....	147
5.3.2 SOJA.....	158
5.3.3 COMPARACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS .....	162
6. CONCLUSIONES.....	165

7. BIBLIOGRAFÍA.....169



# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

La industrialización en la producción de alimentos ha creado una gran demanda de alimentos procesados, en los cuales es necesaria la incorporación de ingredientes que faciliten su producción a gran escala y su conservación, tanto durante la distribución del mismo a grandes distancias como durante el período de almacenamiento hasta su consumo. Muchos de estos alimentos, como los que se presentan en forma de emulsión o espuma, son sistemas polifásicos constituidos por pequeñas partículas dispersas en un medio continuo y, por tanto, inestables desde el punto de vista termodinámico debido a su elevada área interfacial. En estos casos se requiere la adición de productos anfílicos o tensioactivos para su estabilización temporal.

Aunque la estabilidad de una emulsión está limitada por la degradación química y el crecimiento microbiano, el factor determinante es su estabilidad física, gobernada por las interacciones entre las partículas coloidales que forman la emulsión. La estabilidad de una emulsión o una espuma se puede mantener mediante la adsorción en la interfase de emulsionantes de bajo peso molecular, moléculas de proteína o mezclas de ambos. También las propiedades reológicas de las fases presentes pueden incidir significativamente sobre la estabilidad y las propiedades sensoriales del sistema final.

Un buen conocimiento de las propiedades físico-químicas del emulsionante puede ayudar a una elección correcta del mismo. La obtención de valores de tensión superficial e interfacial en sistemas que simulan emulsiones alimentarias, permite establecer conclusiones importantes acerca del comportamiento físico-químico de los emulsionantes y, por tanto, de las posibles interacciones con otros ingredientes presentes en la formulación y de los factores de estabilización de la misma.

El creciente interés desarrollado en la población mundial por una alimentación más saludable y nutritiva, hace que aumente la demanda de emulsiones con bajo contenido en grasa y que además incorporen aditivos “naturales”, siendo ésta una de las líneas de investigación prioritarias en el campo de emulsiones alimentarios.

Estas emulsiones con bajo contenido graso, denominadas legalmente “salsas finas”, deben reproducir, en lo posible, las características macroscópicas de emulsiones con un contenido graso estándar, en cuanto a consistencia, estabilidad durante la vida comercial del producto, textura y procesabilidad. La optimación de las propiedades de formulaciones de este tipo de emulsiones constituye, por tanto, un reto importante dentro de la industria alimentaria.

En emulsiones alimentarias con bajo contenido en aceite, se suelen emplear almidones modificados como ingredientes sustitutivos de la grasa ya que son capaces de simular en gran medida las propiedades organolépticas y físicoquímicas de las grasas. Sin embargo, pueden conseguirse mejores resultados si se emplean mezclas de distintos hidrocoloides como estabilizantes, debido a la posible existencia de efectos sinérgicos. Ya que en estos alimentos tenemos varios componentes implicados en la estabilización del mismo, es conveniente estudiar cómo se distribuyen éstos entre la interfase y las fases implicadas, así como las interacciones que pueden existir entre los mismos, a fin de poder establecer conclusiones acerca de la funcionalidad y mecanismos de estabilización en el sistema final.

Las proteínas, que se encuentran de forma natural o son añadidas, juegan un papel muy importante en las formulaciones alimentarias como estabilizadores de emulsiones y espumas, que constituyen la clase más importante de emulsiones alimentarios. Estas dispersiones coloidales son termodinámicamente inestables e inmediatamente se separan en dos fases a menos que esté presente en la interfase un emulsificador. Incluso en presencia de un emulsificador adsorbido en la interfase estos sistemas son sólo cinéticamente estables, flocculan, coalescen e incluso pueden separarse en dos fases después de un periodo de tiempo.

Las propiedades funcionales de las proteínas en alimentos están relacionadas con su estructura y con otras características físico-químicas. Así, un entendimiento fundamental de las propiedades físico-químicas es importante para las formulaciones alimentarias.

Aunque se conoce mucho sobre las propiedades físico-químicas de las proteínas y sus propiedades funcionales en sistemas modelos, las predicciones de su

comportamiento no han dado buenos resultados en sistemas reales. Una combinación de factores como el pH, la temperatura e interacciones de otros constituyentes alimentarios (lípidos, hidratos de carbono, azúcares, sales,...) con las proteínas pueden causar importantes cambios estructurales y así afectar a sus propiedades funcionales, ya que muchas de las propiedades funcionales que presentan las proteínas derivan de la estructura que adoptan en la interfase.

En esta memoria se presenta el estudio, mediante medidas de tensiometría, del comportamiento en diferentes interfases, de películas de monoestearina, de  $\beta$ -lactoglobulina, gluten, soja y albúmina y de sus mezclas, en función de la concentración de proteína, la temperatura y el pH de la fase acuosa. El papel de las sustancias que son superficialmente activas, así como las características que le confieren al producto final, están íntimamente relacionados con la forma en que se disponen en la interfase.



ANTECEDENTES  
BIBLIOGRÁFICOS

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.**

### **2.1 FORMULACIONES ALIMENTARIAS.**

#### **2.1.1 INTRODUCCIÓN.**

Un alimento es cualquier sustancia procesada, semiprocada o natural, con propiedades para consumo humano, incluyendo bebidas, golosinas, o cualquier otro constituyente que haya sido usado en la elaboración, preparación o tratamiento del alimento, pero excluyendo cosméticos, tabaco o sustancias usadas sólo como medicamentos. El alimento no siempre es usado con fin nutricional (Codex Alimentarius Comission, 1966).

Los alimentos son sistemas heterogéneos, formados por más de una fase. Presentan una amplia variedad de características físico-químicas y organolépticas, tales como apariencia, textura, sabor, aroma y tiempo de estabilidad. Esta diversidad de propiedades se debe a los distintos ingredientes y condiciones de procesado utilizados para cada tipo de producto.

La fabricación de un alimento con unas características y calidad específicas, depende de la selección de materias primas más apropiadas y de las condiciones de procesado. Debido a las variaciones que se producen con el tiempo en la estabilidad y en las características del alimento se necesitan aditivos cuyo fin es transformar las propiedades de los mismos.

Los alimentos se pueden clasificar atendiendo a las fases presentes. Dentro de aquellos en los que la fase continua es una fase líquida destacan las emulsiones y espumas.

No existe una única forma de definir emulsión. Becher recopiló (Becher, 1957) las definiciones dadas por diversos autores previos y estableció una definición general: "Una emulsión es un sistema heterogéneo consistente en, al menos, un líquido íntimamente disperso, en forma de gotas, en el seno de otro,

inmiscible con él"(Artz 1990, St. Angelo 1989). Las gotas dispersas suelen presentar un tamaño comprendido ente 0,1 y 100  $\mu\text{m}$ .

En una emulsión, las gotas suspendidas constituyen la fase dispersa, mientras que el líquido en el que están suspendidas forma la fase continua. De forma general, la emulsión asume las propiedades de la fase continua.

Las emulsiones se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios:

a).- Atendiendo a la naturaleza de las fases (Adamson, 1990; Ostwald, 1910):

- Emulsiones aceite-en-agua (O/W), aquellas en las que la fase dispersa es un aceite en un medio acuoso continuo.

- Emulsiones agua-en-aceite (W/O), la fase dispersa es de naturaleza acuosa en un medio continuo oleoso.

b).- Atendiendo a la estructura básica del sistema (Tadros y Vincent, 1985):

- Macroemulsiones, que se forman cuando se ponen en contacto dos líquidos inmiscibles y se somete el sistema a una agitación vigorosa. Al cesar la agitación, la separación de fases ocurre tan rápidamente que es cuestionable si el término emulsión se puede aplicar realmente al sistema, por lo que se requiere la adición de un agente tensioactivo que se coloque en la interfase de forma que impida la unión de las gotas de la fase dispersa (Adamson, 1990).

- Microemulsiones o emulsiones micelares, son dispersiones de gotas diminutas de un líquido en otro, estabilizadas por una gran cantidad de surfactantes o mezclas de surfactantes. Representan el punto de unión entre la solución micelar y una emulsión ordinaria o macroscópica (Dickinson y Stainsby,



1982). A diferencia de las macroemulsiones, una microemulsión se presenta como un sistema transparente y generalmente monodisperso.

Las microemulsiones presentan ventajas frente a las emulsiones, como son su estabilidad y sus características de solubilización de especies tanto lipófilas como hidrófilas. Esta última, permite que una amplia variedad de agentes colorantes y exaltadores del sabor sean introducidos en el sistema. Pero también presentan desventajas como la gran cantidad de tensioactivo que hay que usar para conferirle estabilidad termodinámica. El coste de estos productos es a menudo más elevado que el de los otros componentes, por lo que a veces, es más económico utilizar una emulsión con una estabilidad limitada en el tiempo. Otra desventaja, es la necesidad de emplear como cosurfactantes alcoholes de longitud de cadena media, los cuales poseen una cierta toxicidad, por lo que su uso en alimentos está muy limitado (Osborne y col., 1991).

c).- En función del número de fases:

- Emulsiones bifásicas: descritas anteriormente.
  
- Emulsiones múltiples, de aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) o agua-en-aceite-en-agua (W/O/W).
  
- Emulsiones trifásicas, contienen más de dos fases, especialmente utilizadas en el campo de productos farmacéuticos, cosmética y alimentación (Friberg, 1992).

La tercera fase puede ser sólida, líquida o líquido-cristalina:

- Si la tercera fase es sólida, como la estabilidad depende fundamentalmente de la capacidad de mojado del sólido por las dos fases, se estabilizará cuando el sólido esté situado en la interfase actuando de barrera mecánica para prevenir la coalescencia de las gotas de la fase dispersa. La protección de la emulsión se produce como consecuencia de

la energía que las partículas situadas en la interfase confieren a las gotas dispersas (Friberg, 1992).

- Si la tercera fase es líquida, normalmente se requiere el empleo de surfactantes aniónicos. Estas sustancias son muy solubles en agua a bajas temperaturas, mientras que a altas temperaturas se disuelven bien en la fase lipídica. Se puede buscar una temperatura intermedia a la cual forman una tercera fase entre el aceite y el agua (Friberg, 1992).

- Si la tercera fase es líquido-cristalina, se forma una multicapa de cristal líquido alrededor de las gotas por interacciones débiles de las fases oleosa y acuosa y el tensioactivo (Krog, 1990). La importancia de su uso es que confiere estabilidad a las emulsiones, debido a que limita la movilidad de las gotas de la fase dispersa como si se tratase de una fase continua rígida (Barry, 1975).

Una espuma es una dispersión de burbujas de gas en una fase líquida o semisólida. Puede considerarse como un tipo de emulsión en la cual la fase interna es un gas (Adamson, 1990). Las burbujas están separadas entre sí por paredes líquidas denominadas películas o lamelas. Según el tamaño de la burbuja y el espesor de la pared, una espuma puede ser casi tan densa como la fase continua líquida o casi tan ligera como la fase gaseosa dispersa (Fenema, 1985).

Las espumas y emulsiones se estudian casi indistintamente, ya que en ambos casos se tienen dos fluidos parcialmente inmiscibles. Estos sistemas son generalmente inestables respecto a la separación en dos fases fluidas, hacia la rotura en el caso de emulsiones y colapso en el de espumas, y su grado de inestabilidad está íntimamente relacionado con las características interfaciales. Un parámetro general en la descripción de una emulsión o espuma, junto con la composición química de las fases que la constituyen es la fracción en volumen de fase dispersa ( $\phi$ ). Un valor general de  $\phi$  es 0,74 (Adamson, 1990).

### 2.1.2 EMULSIONES Y ESPUMAS ALIMENTARIAS DE INTERÉS.

Como se ha indicado anteriormente, cualquier alimento es un sistema multifásico y multicomponente. Las emulsiones alimentarias son sistemas que contienen otras fases además de aceite y agua, como celdas de gases, cristales de grasas, micelas o agregados de proteínas, sales o carbohidratos disueltos y gránulos de almidón o geles (Krog y col., 1985).

La formación de una emulsión puede constituir una etapa intermedia en el proceso de fabricación o bien ser la etapa final del mismo. Todo esto hace que sea muy difícil establecer una clasificación de las emulsiones alimentarias.

A continuación se describen algunas de las emulsiones alimentarias más relevantes (Dickinson y Stainsby, 1982; Krog y col., 1985):

➤ **Leche:** Desde el punto de vista técnico es considerada una emulsión de aceite en agua, donde la fase dispersa son partículas líquidas por un lado y sólidas por otro (proteínas en suspensión). La fase continua es una disolución acuosa de azúcares, sales y vitaminas hidrosolubles.

La grasa está formada principalmente por triglicéridos (98%) que pueden ser tanto de ácidos grasos saturados como insaturados. Además hay fosfolípidos, esteroides, vitaminas liposolubles y carotenoides repartidos entre la fase oleosa y la interfase O/W.

La leche coagula a pH 4,6. Precipitan las caseínas, mientras en disolución acuosa quedan disueltas otras proteínas que tienen estructura globular y se desnaturalizan al someterse a tratamientos térmicos.

➤ **Nata montada o sustituto de la nata para aireación:** Son emulsiones de aceite en agua en las que están dispersos aceites vegetales y grasas, con un tamaño de gota entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  y una fracción en volumen del 10-30 %, en una solución acuosa continua de proteínas (caseína), sacarosa, sales e hidrocoloides.

Durante el proceso de formación de la nata montada se requiere batir incorporando aire en forma de espuma. La espuma es estabilizada por agregados de glóbulos de grasa que se mantienen unidos debido a la grasa líquida que se libera en la rotura de algunos de estos glóbulos. Los factores estabilizadores de la nata son la película de proteína adsorbida, monoglicéridos y ésteres de poliglicerol.

➤ **Helados:** es una emulsión, una espuma, una suspensión y, posiblemente, también un gel. De forma general, se puede calificar como una emulsión O/W en la que la fase dispersa está constituida por grasa de mantequilla o grasa vegetal parcialmente cristalizada y una fase aérea que ocupa el 50% aproximadamente en volumen, mientras que la fase continua la forman agua y cristales de hielo, proteínas de la leche y carbohidratos.

Los factores de estabilización del helado son los glóbulos de grasa aglomerados, formando células de aire, mono y diglicéridos.

➤ **Margarina:** Es una emulsión W/O hecha de leche desnatada como fase acuosa dispersa en una mezcla de aceites y grasas comestibles parcialmente hidrogenadas de origen animal. La fase dispersa tiene un tamaño de gota entre 1 y 20  $\mu\text{m}$  y ocupa una fracción en volumen del 16-50%. Los requerimientos establecidos por la ley limitan el contenido de grasa, así como la naturaleza de otros ingredientes (estabilizantes, sales, vitaminas, colorantes y exaltadores del sabor).

La estabilidad de la margarina se debe a que las gotas de agua están fijadas en una matriz semisólida de cristales de grasa, a los monoglicéridos, diglicéridos y a los ésteres de sorbitano.

➤ **Mantequilla:** Se produce a partir de una emulsión ya existente tipo O/W, la nata de la leche, que debe convertirse en un sólido con una fase grasa continua. La manufactura tradicional de la mantequilla implica dos estados; en el primero, la nata es agitada intensamente con aire (batido) a 10-15°C hasta que los granos de manteca sólida se separan de la fase acuosa (leche). En el segundo, los

granos más ligeros son escurridos y trabajados (amasados) hasta que se obtiene una masa sólida de una consistencia adecuada.

➤ **Cremas para ensalada:** Son emulsiones O/W que contienen aceite vegetal disperso en una solución acuosa de yema de huevo (estabilizante), sal, azúcar, vinagre y espesante, junto con material colorante y exaltadores del sabor. El tamaño de gota de la fase dispersa es de 1-5  $\mu\text{m}$ , y ocupa una fracción en volumen de al menos el 30%. Lo que estabiliza esta emulsión son las proteínas de la yema de huevo, hidrocoloides y tensioactivos.

➤ **Mayonesa:** Se diferencia de las cremas para ensaladas en que contiene mayor porcentaje de aceite (mínimo 65% (v/v)). Los factores estabilizantes son la proteína de la yema de huevo y los fosfátidos.

➤ **Masas para productos al horno:** Es uno de los alimentos de mayor complejidad coloidal, al mismo tiempo es una emulsión, una espuma y una dispersión coloidal. El consumidor, sin embargo, no visualiza el producto final como una emulsión. De los cuatro ingredientes principales necesarios para hacer un pastel (huevo, grasa, harina y azúcar), todos, menos el azúcar, proporcionan especies de dispersiones coloidales en el batido. Como normalmente son horneadas pronto, después de su preparación necesitan sólo una estabilidad limitada.

A temperatura ambiente, se trata de una emulsión O/W en la cual las partículas de grasa son irregulares y la fase acuosa contiene azúcar disuelta y proteínas del huevo. La fase dispersa la componen las partículas semisólidas de grasa, mientras que la fase continua es un medio acuoso de composición compleja. Los factores que estabilizan la emulsión son los mono y diglicéridos.

➤ **Emulsiones cárnicas:** En tecnología alimentaria se define una emulsión cárnica como una dispersión de grasa animal en una matriz acuosa derivada así mismo de la carne. Esta matriz contiene carne que ha sido finamente picada y cortada en lonchas, y puede contener también colorantes, conservantes, sales, exaltadores del sabor, vitamina C, productos cereales y proteínas adicionales. La

capacidad de la matriz de incorporar agua proporciona a la emulsión cárnica una textura semisólida. La emulsión puede ser vendida como materia prima para cocinar o puede ser procesada para destruir microorganismos y añadir sabor extra.

➤ **Blanqueadores de café:** Se trata de una emulsión O/W, donde los aceites vegetales y grasas (fase dispersas) ocupan el 10-15% (v/v) del volumen de la emulsión. Las gotas dispersas tienen un tamaño de 1-5  $\mu\text{m}$ . Por su parte, la solución acuosa de proteínas, sales, carbohidratos e hidrocoloides componen la fase continua. La estabilización de la emulsión se debe a los tensioactivos aniónicos y no iónicos junto con las proteínas adsorbidas.

## 2.2 SUPERFICIES E INTERFASES.

### 2.2.1 TENSIÓN SUPERFICIAL E INTERFACIAL.

El límite entre un líquido y un gas se denomina superficie, mientras que para el límite entre dos líquidos se usa el término interfase.

Las moléculas presentes en el seno de la fase líquida están sometidas a atracciones entre sí casi simétricas; las de la superficie, por el contrario, se encuentran parcialmente rodeadas, y sólo experimentan atracción desde el seno del líquido. Esta atracción tiende a arrastrar a las moléculas de la superficie hacia el interior y provoca una reducción del área entre las fases. Esta fuerza se denomina **tensión superficial** y es el efecto responsable de la resistencia que un líquido presenta a la penetración superficial (Fennema, 1985; Adamson, 1990). Estas fuerzas de interacción se representan en la figura siguiente:

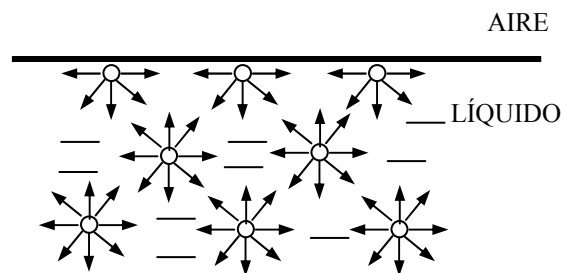


Fig 2. 1: Fuerzas de interacción entre las moléculas de un líquido.

La región tridimensional de contacto entre fases fluidas, en la que las moléculas interaccionan con moléculas de ambas fases, se llama capa interfacial, capa superficial o interfase. Esta región tiene un espesor de unas cuantas moléculas.

Las moléculas de la interfase tienen una energía molecular media distinta a la de las moléculas que se encuentran en el seno de una de las fases, debido a las interacciones intermoleculares. Un cambio en el área de la interfase modificará la energía interna del sistema. Los sistemas tienden a adoptar una disposición de mínima superficie debido a que se requiere la aportación de un trabajo para aumentar el área interfacial. A la fuerza atractiva neta que se dirige hacia el interior de la fase en la que se encuentra y que provoca una reducción del área entre las fases, se denomina **tensión interfacial**, también se puede definir como el trabajo requerido para aumentar el área interfacial en una unidad (Dickinson y Stainsby, 1985). Esta fuerza tiene unidades de trabajo por superficie, en el sistema internacional N/m.

Una reducción de la tensión interfacial favorece la formación de la emulsión desde el punto de vista energético.

La actividad superficial de una molécula es una medida de su capacidad para acumularse en la interfase. Una molécula tiende a acumularse en la interfase cuando la energía libre del estado adsorbido es significativamente menor que la del estado desorbido (Hiemenz, 1986). Los emulsionantes son moléculas que se adsorben en la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que evita que las gotas se acerquen lo suficiente como para agregarse. Los emulsionantes son moléculas anfílicas (que contienen regiones polares y no polares dentro de la misma molécula).

El contacto directo de las moléculas de aceite y agua, es reemplazado por contacto entre segmentos no polares del emulsionante y las moléculas de aceite, y entre los segmentos polares del emulsionante y la moléculas de agua

(Israelachvili, 1992). Estas interacciones son menos desfavorables energéticamente que el contacto directo entre las fases inmiscibles.

La disminución en la energía libre de un sistema ocurre cuando la actividad superficial de la molécula adsorbida en la interfase manifiesta por sí misma un descenso en la tensión interfacial. La extensión de este descenso depende de la efectividad de la molécula para proteger las interacciones directas entre las moléculas de aceite y agua (McClements, 1999).

### **2.2.2 FORMACIÓN DE PELÍCULAS SUPERFICIALES.**

Cuando una sustancia interfacialmente activa se acumula en la interfase, puede formar una película monomolecular denominada monocapa. Puede formarse espontáneamente por adsorción a partir de cualquiera de las fases adyacentes o por deposición o esparcido directo sobre la interfase (Ter Minassian-Saraga, 1985).

Las monocapas se pueden clasificar en dos tipos, dependiendo de cómo se formen:

- Monocapas esparcidas: se obtienen por esparcimiento o deposición directo sobre la interfase. Para ello es necesario el empleo de un disolvente volátil como líquido portador de la sustancia formadora de monocapa.

- Monocapas adsorbidas: Se forman por acumulación en la interfase de sustancias disueltas en la subfase. El proceso por el que las sustancias disueltas en la subfase ascienden hasta situarse en la interfase es lo que se denomina adsorción e implica cambios progresivos en los valores de la tensión superficial con el tiempo hasta alcanzar el equilibrio entre subfase e interfase.

Si la cantidad de surfactante añadido es elevada, estas películas son fuertemente compactas. Se alcanza un momento en el que la superficie está totalmente llena, si se aumenta aún más la concentración superficial, las moléculas adicionales pueden acumularse en la masa del líquido formando estructuras



organizadas que se denominan micelas. La concentración mínima de tensioactivo a la que se forman micelas es la concentración micelar crítica (CMC). Si se aumenta la concentración por encima de CMC, no se adsorben más moléculas de tensioactivo en la interfase, y no se observa un descenso en la tensión superficial (Fennema, 1985).

Sólo cierto tipo de moléculas son capaces de formar monocapas insolubles en la interfase gas-líquido, ya que su estabilidad depende de un balance entre las propiedades de las sustancias involucradas. Gaines hace la siguiente clasificación (Gaines, 1966):

- a) Sustancia simples, que son suficientemente insolubles, pero con tal atracción por la subfase como para permitir ser esparcidas y dispersadas sobre la superficie.
- b) Materiales poliméricos, que se adsorben sobre la interfase gas-líquido desde el seno de la fase.

En el caso de sustancias simples, tales como ácidos grasos y alcoholes, con una estructura molecular compuesta de una cadena larga, entre 11 y 18 átomos de carbono, hidrofóbica y no polar, la cadena hidrocarbonada y un grupo funcional polar o hidrofílico, tal como  $-\text{COOH}$  y  $-\text{OH}$ , pueden formar monocapas insolubles sobre la superficie del agua. El grupo polar tiende a conferir la solubilidad en el agua, mientras que la parte hidrófoba repele el contacto con la misma. El balance entre ellos determina cuando una molécula puede formar una monocapa insoluble. Sin embargo, el espectro de sustancias que pueden formar monocapas no tiene por qué estar limitado a los ácidos y alcoholes antes citados. Pueden considerarse además otros factores para examinar la disponibilidad de los monómeros para formar monocapas estables. Estos factores son (Breton, 1981):

- Interacciones entre las moléculas formadoras de monocapas, tanto en la superficie como en el seno de la fase acuosa.

- Fuerzas intermoleculares entre la monocapa y la subfase, las cuales son distintas para cada disolución empleada.

- Volatilidad de las sustancias que forman la monocapa. Debe ser tal que permita la existencia de la misma durante un periodo de tiempo finito.

En el caso de sustancias con un alto grado de polimerización, deben ser aplicados otros criterios. La formación de una monocapa estable depende también de la atracción por la superficie de la subfase, sin embargo, no se requiere un alto grado de insolubilidad. Es necesario únicamente que las unidades monoméricas individuales tengan una energía libre de adsorción desde el seno de la fase en la superficie finita para que la monocapa formada sea estable (Gaines, 1966). A bajas concentraciones sustancias poliméricas como las proteínas pueden formar películas monomoleculares insolubles tanto en la interfase aire-agua como aceite-agua (Dickinson y Stainsby, 1982). Su comportamiento es muy diferente al de simples tensioactivos (Larsson y Frieberg, 1990).

### **2.3 REOLOGÍA. CONCEPTOS BÁSICOS.**

La palabra reología significa etimológicamente estudio del flujo (del griego *reos*: fluir y *logos*: ciencia) y fue propuesta por E.C.Bingham para definir la rama de la ingeniería cuyo objetivo es el conocimiento fundamental y práctico de la deformación o flujo de la materia. Hoy en día se acepta que la Reología es una ciencia interdisciplinar cuyo objeto es el estudio de la deformación y/o características de flujo de la materia debido a la acción de fuerzas mecánicas externas. La reología estudia el comportamiento de materiales viscoelásticos, los cuales, durante un ensayo de deformación, exhiben al mismo tiempo propiedades viscosas y elásticas (Macosko, 1994).

La creciente importancia económica y social de la producción de alimentos, junto con la complejidad de la tecnología de producción, procesado, transporte y aceptación de estos materiales alimentarios frágiles y perecederos requiere un mayor conocimiento de sus propiedades físicas y mecánicas. Para

producir alimentos de mayor calidad es necesario comprender las leyes físicas que gobiernan la respuesta de los materiales viscoelásticos.

### **2.3.1. CLASIFICACIÓN REOLÓGICA DE LOS MATERIALES.**

Tradicionalmente, los materiales en unas determinadas condiciones de temperatura y presión, se clasifican como sólidos o fluidos.

Los sólidos ideales se deforman elásticamente de forma que la energía requerida para la deformación se recupera totalmente cuando se eliminan los esfuerzos.

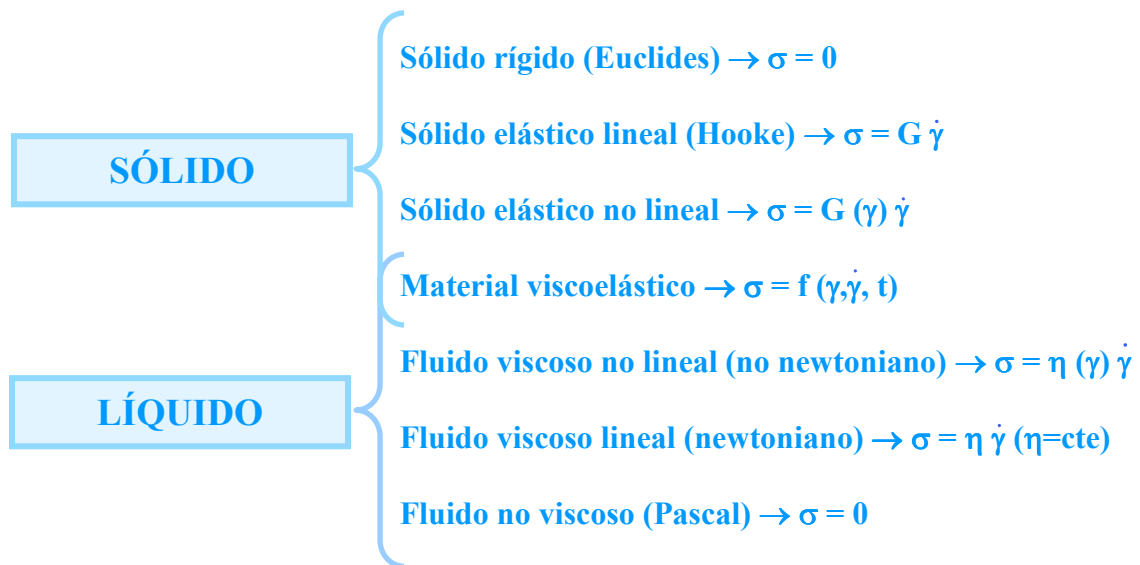
Los fluidos ideales como los líquidos y los gases se deforman irreversiblemente. La energía requerida para la deformación se disipa dentro del fluido en forma de calor y no puede recuperarse simplemente eliminando los esfuerzos. Sin embargo, los cuerpos reales no se comportan ni como sólidos ni como fluidos.

Los sólidos reales pueden deformarse irreversiblemente bajo la influencia de fuerzas de suficiente magnitud. Solo algunos líquidos de importancia práctica tienen un comportamiento que se acerca al de los líquidos ideales. La mayoría de líquidos muestran un comportamiento reológico que los clasifica en una zona entre los líquidos y los sólidos: son tanto elásticos como viscosos y pueden por tanto denominarse “viscoelásticos”.

Los sólidos pueden someterse tanto a esfuerzos de cizalla como uniaxiales (compresión y tracción) mientras que los fluidos sólo pueden cizallarse.

Debido a esto, se puede hacer una clasificación de los materiales con respecto a su comportamiento en cizalla simple. En este caso, los materiales se caracterizan por una relación entre el esfuerzo cortante aplicado y la deformación por cizalla. Estas expresiones son “modelos” ideales de comportamiento de estos materiales, pero no reales.

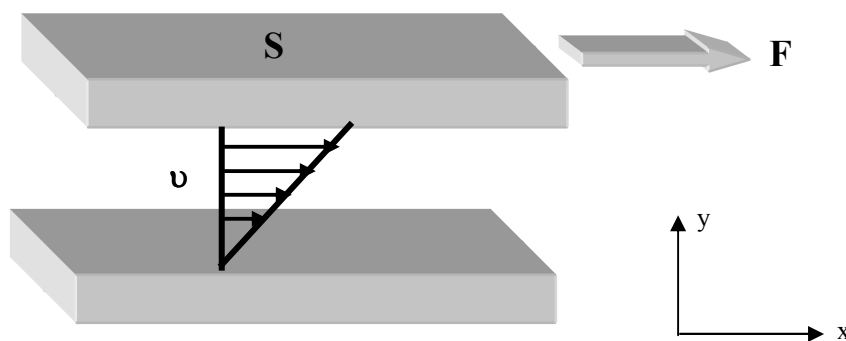
Una clasificación comúnmente utilizada es la siguiente (Aplicaciones Industriales de la Reología, 1993):



Esta clasificación del comportamiento reológico de materiales relacionados con su respuesta a esfuerzos aplicados se extiende más mediante la introducción del a escala de tiempo del proceso de deformación.

### 2.3.2 FLUIDOS NEWTONIANOS.

Si consideramos un fluido contenido entre dos placas planas y paralelas, sobre el cual se aplica una fuerza tangencial,  $F$ , cuando la fuerza aplicada supera la resistencia al flujo que opone el fluido, la placa superior se pone en movimiento en la dirección del eje  $x$  con la velocidad constante,  $v$



Se define el esfuerzo de cizalla ( $\sigma$ ) como el cociente entre la fuerza de cizalla aplicada, F, y la superficie de la placa, S:

$$\sigma = \frac{F}{S}$$

Como consecuencia de este esfuerzo, una vez alcanzado el estado estacionario, se establece un perfil de velocidades que origina un gradiente de velocidades de cizalla ( $\dot{\gamma}$ ):

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dy}$$

Para fluidos Newtonianos se comprueba experimentalmente que el esfuerzo de cizalla es proporcional a la velocidad de cizalla:

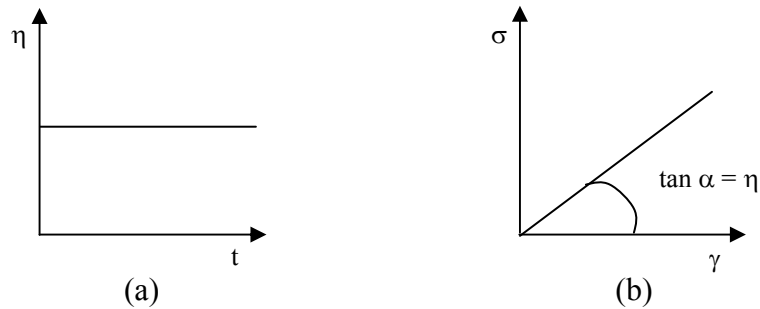
$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

donde  $\eta$  es una constante característica del fluido, conocida como viscosidad.

Esta es la **ley de Newton** de la viscosidad y los fluidos que la cumplen se denominan **newtonianos**.

Los fluidos newtonianos poseen la misma velocidad en reposo que tras agitación, de modo que al representar la viscosidad frente al tiempo de agitación (para cualquier velocidad de cizalla) resulta una recta paralela al eje de abscisas.

De acuerdo con la ley de Newton, la representación gráfica del esfuerzo frente a la velocidad de cizalla, llamada *reograma o curva de flujo*, da lugar a una línea recta que pasa por el origen de coordenadas y cuya pendiente coincide con el valor de la viscosidad.



La viscosidad es una medida de la intensidad de disipación de la energía necesaria para mantener la deformación continua de un fluido. La viscosidad newtoniana es constante a una temperatura y presión dadas.

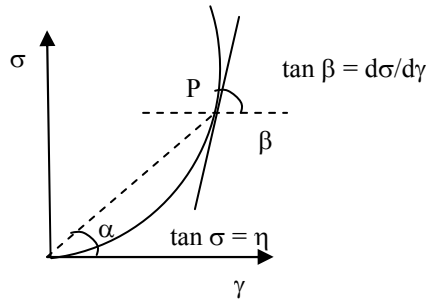
Se denomina *fluidéz* ( $\phi$ ) a la inversa de la viscosidad:  $\phi = 1/\eta$

También se define la *viscosidad cinemática* ( $\nu$ ) de un fluido como:  $\nu = \eta/\rho$  donde  $\rho$  es la densidad del fluido.

El comportamiento newtoniano se encuentra en fluidos puros de bajo peso molecular, disoluciones poliméricas altamente diluidas y sistemas dispersos de bajo contenido de fase dispersa.

### 2.3.3 FLUIDOS NO NEWTONIANOS.

Existen algunos fluidos en los que la relación entre esfuerzo y velocidad de cizalla no es constante, sino que depende de la velocidad de cizalla y, en muchas ocasiones del tiempo. Son fluidos que no cumplen la ley de Newton de la viscosidad. Se conocen como fluidos *no newtonianos* o *de viscosidad real*. Sin embargo, aunque muchos fluidos no newtonianos no son viscosos puros, se pueden realizar medidas de esfuerzo y velocidad de cizalla en estado estacionario, y puede definirse la relación entre estas magnitudes como una característica reológica análoga a la viscosidad newtoniana. Se trata de la llamada *viscosidad aparente* o *viscosidad de cizalla*,  $\eta$ , que es la que correspondería un sistema newtoniano cuya recta característica cortase a la curva que representa al fluido no newtoniano en el punto P en el cual queremos definir la viscosidad aparente.



Es menos frecuente caracterizar este tipo de fluidos mediante la *viscosidad diferencial*,  $d\sigma/d\gamma$ , que viene dada por la pendiente de la tangente trazada a la curva en el punto P.

➤ **Tipos de fluidos no newtonianos:**

**Fluidos pseudoplásticos.**

Para estos sistemas, al aumentar el esfuerzo aplicado la velocidad de cizalla también aumenta, pero su dependencia con el esfuerzo es mayor que lineal, por tanto la viscosidad aparente disminuye.

Este comportamiento es el más habitual entre los fluidos no newtonianos, presentándose en fluidos de alto peso molecular, disoluciones poliméricas concentradas y sistemas dispersos de alto contenido en fase dispersa y puede explicarse considerando las interacciones moleculares. En reposo las moléculas poliméricas dispersadas se encuentran entrelazadas unas con otras y las partículas en suspensión ocupan posiciones distribuidas al azar a causa del movimiento de agitación térmica de las mismas. Cuando se agita el sistema, las cadenas poliméricas se desenredan y las partículas se alinean a lo largo de líneas de corriente. Todo ello da lugar a un decrecimiento de la fricción interna y, por tanto, de la viscosidad aparente del sistema.

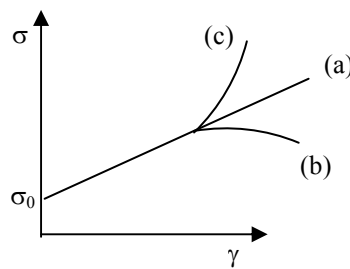
**Fluidos dilatantes.**

En estos sistemas, al contrario que en los fluidos pseudoplásticos, un aumento del esfuerzo da lugar a un aumento proporcionalmente menor de la velocidad de cizalla, aumentando, por tanto, la viscosidad aparente.

Este comportamiento aparece en suspensiones altamente concentradas de partículas en un líquido. En reposo, el espacio que ocupa el líquido entre las partículas es mínimo. A baja velocidad de cizalla, la fricción entre las partículas es relativamente baja porque el líquido actúa como lubricante. Sin embargo, a alta velocidad de cizalla, el movimiento de unas partículas respecto a las otras aumenta la fricción entre las partículas.

### **Fluidos plásticos.**

Se caracterizan por necesitar un valor del esfuerzo de cizalla,  $\sigma_0$  (esfuerzo umbral), para que empiecen a fluir. Para los valores de esfuerzo mayores que el esfuerzo umbral pueden darse dos tipos de respuestas: análogo al de un fluido newtoniano (fluido plástico de Bingham) o comportamiento no lineal.



Los sistemas que presentan este tipo de comportamiento están constituidos por dos o más fases, una o más de las cuales se hallan dispersas en forma de partículas en la fase líquida. A altas concentraciones de la dispersión, la interacción entre las partículas dispersas puede conducir a la formación de una estructura tridimensional de rigidez suficiente para soportar cualquier esfuerzo de cizalla inferior a  $\sigma_0$  sin deformarse. En estas condiciones, el sistema se comporta como un sólido elástico. Una vez sobrepasado el valor límite tiene lugar la destrucción de la estructura mencionada y la sustancia comienza a fluir. Ejemplos de sistemas plásticos son las gomas naturales, algunas pastas, grasas, lápiz de labios, pastas de dientes y chocolate.



Además de esta clasificación del comportamiento de fluidos, éstos pueden presentar diferentes comportamientos en función del tiempo de cizallado (tixotropía).

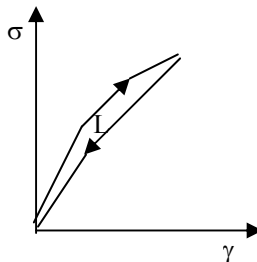
### **Tixotropía.**

Muchos fluidos simples y sistemas diluidos no revelan efectos apreciables en función del tiempo. Es el caso de los fluidos newtonianos en los que en la representación de la variación del esfuerzo frente al tiempo, el esfuerzo experimenta una variación escalonada.

Existen sistemas en los que al finalizar la cizalla sólo recuperan su viscosidad inicial tras un periodo de tiempo. A este comportamiento se le denomina *tixotropía* y lo suelen mostrar sistemas dispersos en los que la fase dispersa está formada por partículas agregadas; además, la tixotropía normalmente está asociada al comportamiento pseudoplástico.

La aplicación de condiciones de cizalla da el origen inmediato a un proceso de ruptura estructural que conduce a una reducción gradual de las dimensiones del agregado; de esta forma, la viscosidad se reduce progresivamente con el tiempo.

La superficie de la curva de histéresis L de la curva de fluidez (esfuerzo frente a la velocidad de cizalla) entre ambas ramas de la curva define la magnitud de este comportamiento dependiente del cizallamiento de la sustancia, al que se denomina tixotropía.



La superficie tiene unidades de potencia en relación con el volumen cizallado. Si se multiplica esta potencia por el tiempo de cizalla se obtiene el trabajo (W) que es necesario para destruir la estructura tixotrópica de las fuerzas de unión en el volumen de sustancia (V):  $L = \sigma \cdot \gamma$ ;  $L \cdot t = W/V$

El tipo contrario de comportamiento, que implica un aumento gradual del esfuerzo con el tiempo se conoce como *antitixotropía o reopexia*. Aunque es menos frecuente que la tixotropía, es típico de suspensiones de partículas altamente concentradas y suele asociarse al comportamiento dilatante.

Los fluidos reopéxicos muestran un comportamiento de flujo en el que la viscosidad original sólo puede recuperarse transcurrido un periodo de tiempo después de finalizar la cizalla.

### **2.3.4 VISCOELASTICIDAD LINEAL. MODELOS ANALÓGICOS.**

#### **2.3.4.1 ENSAYOS VISCOELÁSTICOS DINÁMICOS.**

Estos ensayos, también denominados oscilatorios, se realizan utilizando deformaciones por cizalla y permiten una caracterización viscoelástica en una escala de tiempos distinta a la de ensayos estáticos como los de fluencia o relajación. Consisten en aplicar un esfuerzo de cizalla que se hace variar sinusoidalmente a lo largo del tiempo en que se realiza el ensayo. Si la amplitud de la función sinusoidal estímulo es lo suficientemente pequeña para que el ensayo se realice en el dominio viscoelástico lineal y los fenómenos de inercia no son significativos, la respuesta (deformación por cizalla o esfuerzo de cizalla, respectivamente) dependerá del tiempo siguiendo también una función sinusoidal a la misma frecuencia, pero con una amplitud y un ángulo de desfase característicos. Las respuestas elástica y viscosa pueden ser calculadas independientemente y, por tanto, comparadas (Muñoz y Alfaro, 1997).

Al trabajar en el dominio viscoelástico lineal se puede considerar el ensayo como no destructivo. Por ello, los resultados obtenidos se pueden relacionar con la estructura de la muestra, siendo muy sensibles a cambios de la misma.

La respuesta de una material viscoelástico lineal a un esfuerzo sinusoidal aplicado viene dado como:

$$\sigma(t) = \gamma_0 G'(\omega) \sin(\omega t) + \gamma_0 G''(\omega) \cos(\omega t)$$

Las funciones dependientes de la frecuencia  $G'(\omega)$  y  $G''(\omega)$  se conocen como módulo elástico (o de almacenamiento) y módulo viscoso (o de pérdidas), respectivamente.

La componente elástica es una medida de la energía almacenada y, subsecuentemente, liberada por ciclo de deformación y por unidad de volumen. Es la propiedad que está relacionada con los fenómenos moleculares de naturaleza elástica. La componente viscosa mide la energía disipada en forma de calor por ciclo de deformación y por unidad de volumen, siendo la propiedad que se relaciona con los fenómenos moleculares de naturaleza viscosa.

Otra propiedad viscoelástica dinámica comúnmente utilizada, es la tangente de pérdidas ( $\tan \delta = G''/G'$ ) que denota los efectos relativos de las componentes viscosa y elástica dentro de un comportamiento viscoelástico.

A veces, se emplea también el módulo complejo,  $G^*$ , para describir los datos de ensayos dinámicos, definiéndose en función de  $G'$  y  $G''$  de la siguiente manera:

$$|G^*| = \sqrt{|G'|^2 + |G''|^2}$$

De forma similar, se puede definir la viscosidad compleja,  $\eta^*$ , en términos de la parte real ( $\eta'$ ) e imaginaria ( $\eta''$ ) de la viscosidad:

$$|\eta^*| = \sqrt{\eta'^2 + \eta''^2}$$

Para un fluido viscoso ideal, el esfuerzo de cizalla es directamente proporcional a la velocidad de cizalla ( $\dot{\gamma}$ ), lo cual es equivalente a un desfase de  $90^\circ$ . Por el contrario, un fluido puramente elástico está relacionado linealmente con la deformación según la ley de Hooke y genera un desplazamiento de  $0^\circ$ . Por tanto, un fluido viscoelástico tendrá un ángulo de desfase entre  $0$  y  $90^\circ$ .

$$\left. \begin{aligned} \gamma &\equiv \gamma_0 \text{sen} \omega t \\ \dot{\gamma} &= \frac{d\gamma}{dt} \end{aligned} \right\} \begin{aligned} \dot{\gamma} &= \omega \gamma_0 \cos(\omega t) \\ \dot{\gamma} &= \omega \gamma_0 \text{sen}(\omega t + \delta), \delta = 90^\circ \end{aligned}$$

### **Espectros mecánicos.**

A partir de la caracterización viscoelástica lineal de un material se puede obtener la dependencia de los módulos elástico y viscoso ( $G'$  y  $G''$ ) con respecto a la frecuencia en un intervalo de frecuencias lo más amplio posible. Esta representación se conoce como espectro mecánico.

A valores de frecuencia bajos se observa la respuesta característica de la zona de relajación terminal. En esta zona, representando los módulos frente a la frecuencia en coordenadas doblemente logarítmicas, las funciones  $G'$  y  $G''$  se caracterizan por tener pendientes límites de 2 y 1, respectivamente, presentando el material una respuesta predominantemente viscosa ya que  $G'' > G'$ . En este caso, en la escala de tiempo de las medidas se producen movimientos moleculares bastante rápidos de forma que las cadenas macromoleculares recuperan su configuración de equilibrio sin que existan interacciones específicas entre ellas. Ejemplos de sistemas que en su representación del espectro mecánico muestran este comportamiento son las disoluciones diluidas de polímeros, de emulsionantes de bajo peso molecular y suspensiones diluidas.

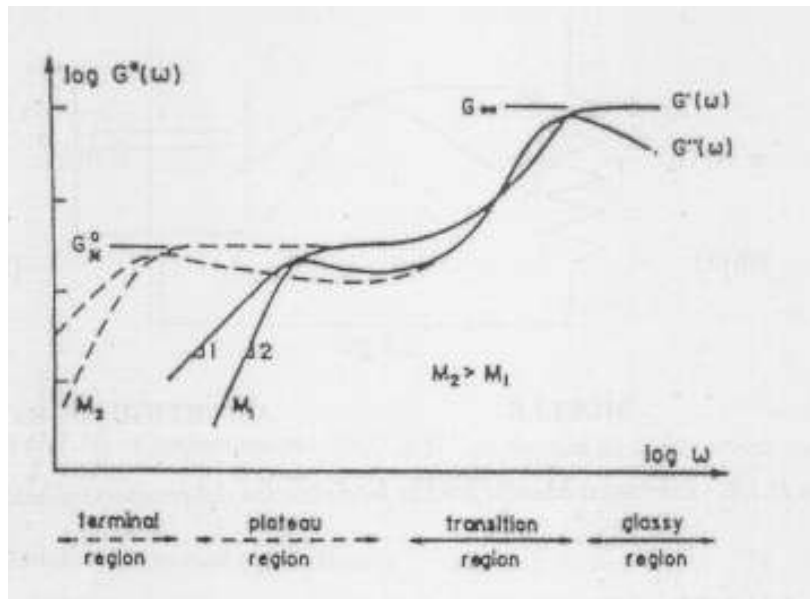
Si aumentara la concentración de dispersiones tales como las de polímeros, la forma del espectro mecánico va cambiando, de modo que  $G'$  supera a  $G''$  a frecuencias progresivamente menores. La frecuencia a la que se produce el cruce

permite estimar un tiempo aproximado de relajación terminal ( $\lambda = 1/\omega$ ) característico del material.

Este mismo efecto se obtendría con un aumento del peso molecular medio del polímero. Este comportamiento se asocia al desarrollo de una zona plateau, que cuando está totalmente desarrollada se caracteriza por valores de  $G'$  casi constantes con la frecuencia, característico de un comportamiento cuasielástico. La componente elástica es predominante en esta zona,  $G' > G''$ . La justificación estructural de este comportamiento se basa en la existencia de entrelazamientos entre las unidades responsables del flujo en el material, que en muchas ocasiones son de naturaleza transitoria ya que tienden a deshacerse y reformarse continuamente. En esta zona la escala de tiempo del ensayo oscilatorio es menor que la del tiempo de relajación de las interacciones responsables de los entrecruzamientos.  $G''$  puede presentar un mínimo que correspondería a un mínimo en la representación de la tangente de pérdidas con la frecuencia. La frecuencia a la que se encuentra este mínimo permite localizar el denominado módulo plateau ( $G_N^0$ ), parámetro relacionado con la densidad de entrecruzamientos entre la unidades responsables del flujo y que coincide con el valor de  $G'$  a la frecuencia a la que se produce el mínimo en  $G''$ .

Los espectros mecánicos de sistemas estructurados como geles débiles, emulsionantes y suspensiones concentradas se caracterizan por la aparición exclusiva de la zona plateau en los intervalos de frecuencia usuales de trabajo de los reómetros actuales ( $10^{-2}$  a 100 rad/s).

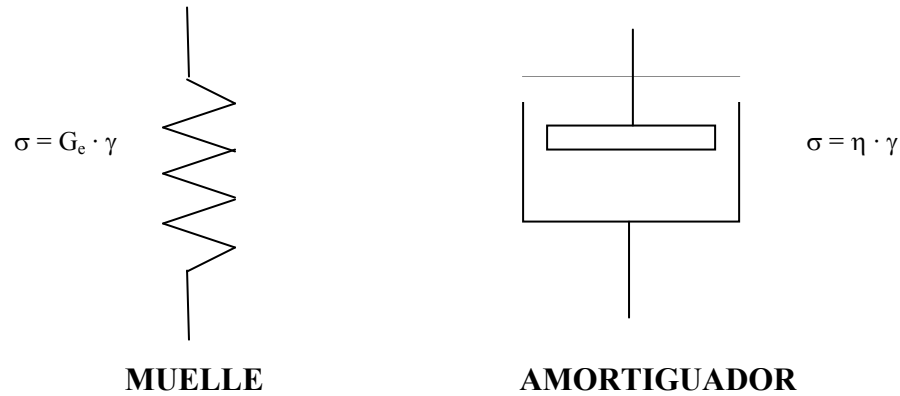
En el caso de sistemas aún más estructurados como geles verdaderos, el espectro mecánico se caracteriza por valores de  $G'$  de al menos dos órdenes de magnitud superiores a los de  $G''$  y una pendiente con respecto a la frecuencia prácticamente nula. El valor límite a baja frecuencia de  $G'$  se asocia en estos casos a un valor del módulo de equilibrio  $G_e$  característico de un comportamiento viscoelástico para los materiales con propiedades mecánicas predominantemente sólidas.



### Modelización de espectros mecánicos.

Debido a la diversidad de comportamientos de los materiales reales y su complejidad, se recurre a los modelos mecánicos para explicar su respuesta a la aplicación de una acción externa. Cada modelo explica un determinado comportamiento, se define con ecuaciones matemáticas y se representa gráficamente en función de las tres variables implicadas: esfuerzo, deformación y tiempo. En base a estos modelos se puede interpretar y clasificar los datos experimentales obtenidos en el estudio del comportamiento reológico.

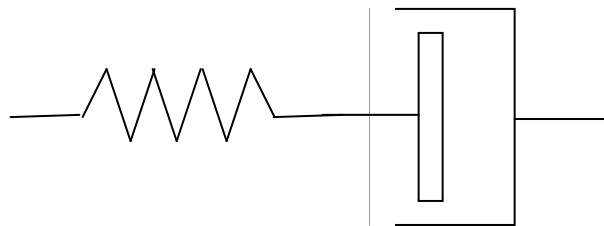
En el diseño de los modelos mecánicos intervienen dos elementos simples que, combinados de distinta forma, representan diferentes comportamientos reológicos. Estos dos elementos son: el elemento elástico ideal que se representa mediante un muelle y cuyo comportamiento queda definido por una constante elástica  $G_e$  y un elemento viscoso ideal que se representa mediante un amortiguador en el que el pistón se mueve holgadamente dentro de un líquido newtoniano y cuyo comportamiento queda definido por su viscosidad  $\eta$ .



- **Modelo de Maxwell.**

El modelo de Maxwell es uno de los modelos analógicos mecánicos más simples, consiste en un muelle ideal en serie con un amortiguador hidráulico. Este modelo corresponde al comportamiento de un material viscoelástico en el cual la primera fase de respuesta frente a la aplicación de una fuerza externa es la de un sólido elástico ideal.

La ecuación de estado para este modelo es:  $\sigma + \lambda(d\sigma/dt) = \eta(dy/dt)$   
 donde  $\lambda$  es el tiempo de relajación,  $\lambda = \eta/G$

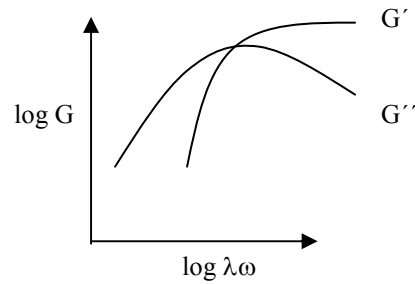


Las expresiones que predice este modelo en cizalla oscilatoria de baja amplitud son:

$$G' = G[(\omega^2 \lambda^2)/(1 + \omega^2 \lambda^2)]$$

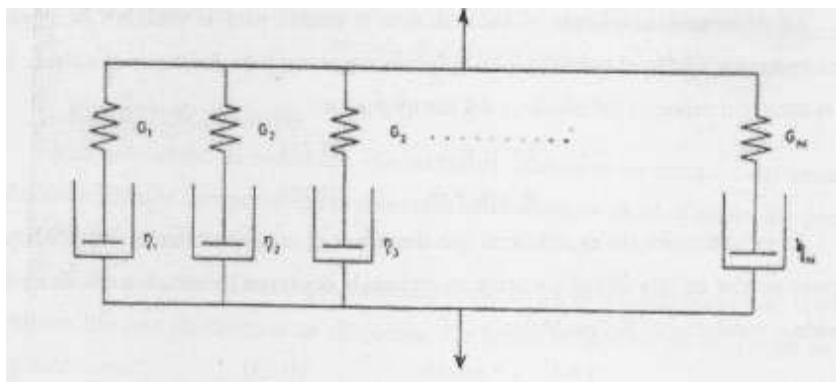
$$G'' = G[(\omega\lambda)/(1 + \omega^2 \lambda^2)]$$

En la siguiente figura se encuentra el espectro mecánico correspondiente a un modelo de Maxwell:



- **Modelo de Maxwell generalizado.**

El modelo de Maxwell está caracterizado por un único tiempo de relajación  $\lambda$ , y no suele ajustar la dependencia de las funciones viscoelásticas dinámicas en un intervalo amplio de frecuencias. Una mejora de este modelo consiste en permitir que el modelo admita un número indeterminado de tiempos de relajación, dando lugar así a un modelo muy versátil capaz de describir el comportamiento viscoelástico dinámico de muchos sistemas. Este modelo se puede representar como un conjunto de elementos simples de Maxwell colocados en paralelo, estando caracterizado cada elemento por una viscosidad  $\eta$ , un módulo de cizalla  $G$  y un tiempo de relajación  $\lambda$ .



Este modelo, por tanto se corresponde con la existencia de una distribución discreta de tiempos de relajación. Las expresiones matemáticas de la dependencia respecto a la frecuencia de las funciones viscoelásticas dinámicas se pueden expresar como la suma de la contribución ideal de cada elemento de Maxwell simple:

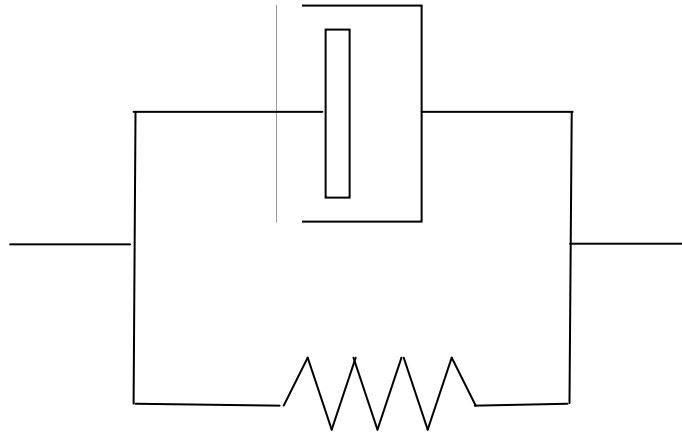


$$G' = \sum_k \frac{\eta_k \lambda_k \omega^2}{1 + (\lambda_k \omega)^2}$$

$$G'' = \sum_k \frac{\eta_k \omega}{1 + (\lambda_k \omega)^2}$$

- **Modelo de Kelvin-Voigt.**

Este modelo representa el comportamiento de un material tal que al aplicarle una fuerza, sus elementos viscoso y elástico actúan simultáneamente desde el comienzo. Mecánicamente se compone de un muelle y un amortiguador en serie.



La deformación aplicada al sistema será la misma para el muelle como para el amortiguador siendo el esfuerzo total aplicado necesario para deformar el sistema igual a la suma del esfuerzo del muelle y del amortiguador:

$$\gamma = \gamma_v = \gamma_e$$

$$\sigma = \sigma_e + \sigma_v$$

Si se sustituyen las expresiones que describen el comportamiento del muelle y del amortiguador en esta última ecuación se obtiene la ecuación constitutiva que describe el modelo mecánico de Kelvin-Voigt:

$$\sigma = G \cdot \gamma + \eta (d\gamma/dt)$$

Si se aplica una deformación sinusoidal,  $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$ , entonces la ecuación resultante sería la siguiente:

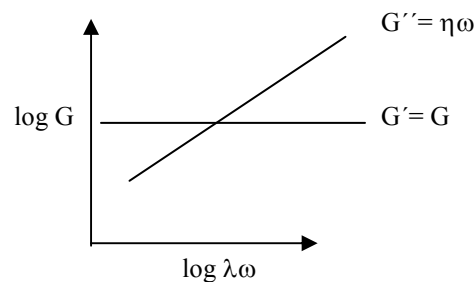
$$\sigma = G \cdot \gamma_0 \sin(\omega t) + \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cos(\omega t)$$

Las expresiones que predice este modelo en cizalla oscilatoria de baja amplitud son:

$$G' = G$$

$$G'' = \eta \cdot \omega$$

La respuesta elástica se debe completamente al muelle y la viscosa del amortiguador. La representación de  $G'$  y  $G''$  frente a la frecuencia para este modelo daría lugar a un valor de  $G'$  constante y un valor de  $G''$  que aumenta proporcionalmente con la frecuencia como se muestra en la figura. Un material de este tipo se puede describir como un sólido viscoelástico ya que siempre vuelve a su posición de equilibrio inicial. La escala de tiempo necesaria para la respuesta es el tiempo de retardación  $\lambda = \eta/G$ . Si la viscosidad del amortiguador es alta, el amortiguamiento de la respuesta a un esfuerzo aplicado será grande. Este comportamiento se puede encontrar en geles y gomas.



### **Espectros de relajación.**

La conversión de resultados viscoelásticos dinámicos en términos del espectro de relajación permite interpretar las propiedades viscoelásticas en el dominio del tiempo en lugar del dominio de la frecuencia.

El modelo de Maxwell generalizado, como se ha citado anteriormente, implica un conjunto discreto de tiempos de relajación. De hecho el módulo de relajación se puede expresar como:

$$G(t) = \sum_{i=1}^N G_i e^{\left(-\frac{t}{\lambda_i}\right)}$$

$G_i$  puede ser considerado como la densidad de los elementos de relajación de la forma  $\exp(-t/\lambda_i)$  que conforman los valores del módulo de relajación,  $G(t)$ . Un conjunto de parejas  $G_i-\lambda_i$  define lo que se denomina un espectro discreto de tiempos de relajación,  $H(\lambda)$ . Esta misma información se puede obtener de la aplicación del modelo de Maxwell generalizado a ensayos oscilatorios de baja amplitud. La mayor precisión de los resultados oscilatorios y facilidad para trabajar en condiciones viscoelásticas lineales, hacen que sea más recomendable la determinación del espectro de relajación a partir de datos en cizalla oscilatoria que de ensayos directos de relajación del esfuerzo.

La combinación más simple de modelos es un elemento de Maxwell en serie con un elemento de Voigt. Por ello, la capacitancia viene dada por la suma de ambos modelos:

$$J(t) = J_0 + \frac{t}{\eta} + J_1 e^{\left(\frac{-t}{\lambda}\right)}$$

Este es un modelo de una retardación. Debido a que hay cuatro parámetros desconocidos en este modelo ( $J_0$ ,  $J_1$ ,  $\eta$  y  $\lambda$ ) se conoce como el modelo de cuatro parámetros.

En la práctica, la reología de la mayoría de las emulsiones alimentarias es complicada y no puede describirse mediante el modelo de 4 parámetros. En la práctica es necesario combinar más de un elemento de Voigt con un elemento de Maxwell para describir el comportamiento reológico. El más empleado es el modelo conocido como Kelvin-Voigt que implica dos procesos de retardación y viene descrito mediante la siguiente ecuación:

$$J(t) = J_0 + J_1 e^{\left(\frac{-t}{\lambda_1}\right)} + J_2 e^{\left(\frac{-t}{\lambda_2}\right)} + \frac{t}{\eta}$$

La ecuación anterior puede generalizarse fácilmente para incluir más de dos procesos de retardación:

$$J(t) = J_0 + \sum_i^n J_i e^{\left(-\frac{t}{\lambda_i}\right)} + \frac{t}{\eta}$$

donde n representa el número de elementos de Voigt en serie con el elemento de Maxwell.

### 2.3.5 VISCOELASTICIDAD NO LINEAL.

La mayoría de la emulsiones alimentarias muestran un comportamiento reológico no lineal a deformaciones bastante pequeñas. Cuando el esfuerzo o la deformación que se aplican a un material superan un determinado valor, aparecen desviaciones significativas del comportamiento viscoelástico lineal, dependiendo en este caso del esfuerzo aplicado y la deformación producida de la magnitud del esfuerzo o viceversa.

La existencia más común de la no linealidad se produce durante medidas viscosimétricas rotacionales, donde la emulsión es sometida a un esfuerzo de cizalla rotacional. El sistema entra rápidamente en zona no lineal debido a la rotura estructural que se produce en el sistema.

Aunque la viscoelasticidad lineal es muy apropiada para la obtención de información sobre las estructuras y organización del material, la mayoría de las operaciones de procesamiento de alimentos, como la extrusión, el bombeo y el mezclado, implican deformaciones grandes y rápidas que no pueden modelizarse sólo mediante la teoría de la viscoelasticidad lineal (Gunasekaran y Mehmet, 2000). Para ello, es necesario obtener información sobre las propiedades de flujo en función de la velocidad de cizalla. La mayoría de emulsiones alimentarias muestran un comportamiento estructural caracterizado por una disminución de la viscosidad a medida que aumenta la velocidad de cizalla siguiendo una dependencia con la velocidad de cizalla de tipo potencial (Rahalkar, 1992).

Para el desarrollo de ecuaciones constitutivas no lineales, que deben reflejar la influencia del valor del esfuerzo y la deformación aplicados, en algunos casos se puede separar el módulo de relajación no lineal con dos funciones distintas:

$$G(\gamma,t) = G(t) h(\gamma)$$

siendo  $G(\gamma,t)$  el módulo de relajación no lineal y  $h(\gamma)$  la función de amortiguación, que representa los efectos no lineales. En este caso, la ecuación constitutiva que resulta para el esfuerzo aplicado es la siguiente:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t-t')h(\gamma)\dot{\gamma}(t,t')dt'$$

### 2.3.6 REOLOGÍA INTERFACIAL.

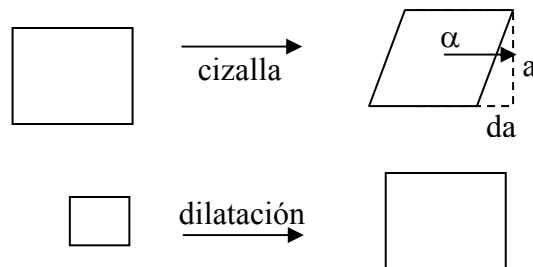
Las proteínas y los surfactantes de bajo peso molecular juegan un papel crucial en la estabilización de estructuras de algunas emulsiones y espumas que son la base de productos alimentarios. La formación de emulsiones y espumas y la estabilización depende de estos sistemas fuertemente del desarrollo de las interfases durante el procesado y de su interacción mutua. Aspectos importantes durante la formación y estabilización de emulsiones y espumas pueden estar divididos en los relacionados con las propiedades físicas de los fluidos y en los relacionados con la presencia de especies tensoactivas en la interfase.

Propiedades importantes de los fluidos son la viscosidad de la fase continua ( $\eta_c$ ) y de la fase dispersa ( $\eta_d$ ), sus densidades, la pureza y la polaridad de estas fases y el pH y la fuerza iónica de la fase continua.

En reología interfacial se estudia la relación entre la deformación de una superficie líquida y la aplicación de fuerzas como una función de tiempo. Las deformaciones de la interfase líquida pueden ser de distintos tipos: dilatacional, de cizalla y por torcedura. En deformación dilatacional el área de la superficie líquida se aumenta o disminuye mientras que la forma del área superficial es la misma. En una deformación por rotura de la interfase líquida se producen cambios,

mientras el área interfacial permanece constante. Las fuerzas son dadas en unidades de fuerza por longitud (N/m).

En definitiva, los parámetros reológicos característicos son usados para distinguir dos categorías de técnicas de medida: (a) acercarse al equilibrio usando una medida dinámica; y (b) alejarnos del equilibrio midiendo en estado estacionario o no estacionario.



- a) Acercarse al equilibrio.
- Deformación dilatacional: Se aplica una variación infinitesimal sinusoidal relativa al cambio en el área superficial  $dA/A = d \ln A$  en la interfase fluido-fluido, al mismo tiempo se hace un barrido de medidas según Langmuir. Esta medida conduce a un cambio sinusoidal en la tensión superficial,  $d\gamma$ . La relación de  $d\gamma$  con  $d \ln A$  da el módulo dilatacional interfacial,  $E^d$ , definido por:  $E^d = d\gamma/d \ln A$ , que es una medida de la pérdida de dureza de la interfase en contra de una compresión o expansión dilatacional.
  - Deformación por cizalla simple: Es una medida dinámica. Se aplica un cambio infinitesimal en la forma de la superficie,  $da/a = \tan a$ , en la interfase líquida de modo sinusoidal. Los cambios resultantes de tensión en la línea tangencial superficial,  $d\sigma$ , es una medida de la resistencia que muestra la interfase a la deformación por cizalla. El módulo de pérdida interfacial  $G^s$  se define como  $G^s = d\sigma/(da/a)$ .

## b) Alejarse del equilibrio:

- Deformación dilatacional: En un estado estacionario se experimenta un alejamiento del equilibrio, el área de la superficie líquida  $A$  está sujeta a una velocidad relativamente constante de cambios expresada por  $dA/Adt = d \ln A/dt$ , que es positiva cuando la interfase está continuamente expandiéndose y negativa cuando la superficie está comprimiéndose continuamente. Esto se puede hacer experimentalmente mediante barridos de Langmuir. Esta técnica, sin embargo, no está libre de deformaciones por cizalla. La viscosidad interfacial dilatacional,  $\eta^d$  (N·s/m), se puede determinar de acuerdo a  $\gamma_{\text{dyn}} - \gamma_{\text{eq}} = \Delta\gamma = \eta^d \cdot d \ln A/dt$ , donde  $d \ln A/dt$  representa la velocidad relativa de expansión del área superficial  $A$ . Esta relación especifica la viscosidad interfacial dilatacional como una constante de proporcionalidad entre el exceso de tensión interfacial de la superficie expandida y la velocidad relativa de expansión.
- Deformación por cizalla simple: En un estado estacionario se experimenta un alejamiento del equilibrio, el área de la superficie líquida  $A$  está sujeta a una deformación por cizalla. La determinación de la viscosidad interfacial de cizalla ha desarrollado más atención que la viscosidad interfacial dilatacional, ambas para pequeñas moléculas de surfactantes y proteínas. Varios estudios han demostrado que la viscosidad interfacial de cizalla de películas de proteínas adsorbidas es mayor que la de moléculas de surfactantes. Una alta viscosidad interfacial de cizalla implica una alta estabilidad de emulsiones y espumas, sin embargo, la relevancia de la estabilidad durante la emulsificación y el espumado es mucho más dudosa por dos razones: primero por el tipo de deformación a la que se somete la interfase y segundo por la escala de tiempo en la que se forma la nueva interfase que puede ser de 1ms o menor.

**\* Comportamiento en cizalla:**

La medida de viscosidad interfacial de cizalla es una técnica muy sensible a la estructura y composición de la capa de proteína adsorbida y a la naturaleza de las interacciones intermoleculares en la película, tanto en la interfase aire/agua como en la aceite/agua.

La técnica más usada para el estudio de la reología interfacial de cizalla de proteínas en competencia con otras proteínas o surfactantes es la equivalente a la bidimensional de viscosímetro tipo Cohete, que consiste en medidas de movimiento rotacional de un disco o anillo en la interfase. Las fuerzas actúan en el disco o el anillo como una función de la velocidad rotacional del cilindro exterior de medida. Una condición esencial para el cálculo de parámetros reológicos es que no debe haber deslizamiento entre el disco o anillo y la pared exterior. La ventaja de este tipo de reómetros es que puede ser usado tanto para interfases aire/agua como para aceite/agua.

En la práctica, la relación entre la fuerza y la deformación de las proteínas es fuertemente no lineal. A continuación se resumen las características de esta relación en función del tipo de tensioactivo:

a) *Surfactantes de bajo peso molecular:*

Los resultados obtenidos para la cizalla interfacial de surfactantes de bajo peso molecular dependen del tipo y velocidad de deformación. Según Djabbarah y Wasan las magnitudes  $G^s$  y  $\eta^s$  para surfactantes iónicos y no iónicos en la interfase aire/agua son de varios órdenes de magnitud menores que  $E^d$  y  $\eta^d$  en las mismas condiciones. La reología interfacial de cizalla característica de los surfactantes de bajo peso molecular depende claramente de que el tensioactivo sea soluble en aceite o en la fase acuosa. Además, las altas concentraciones de sal provocan un fenómeno de agregación interfacial, que va a depender del tipo de sal usada; esto además se refleja en un aumento de la viscosidad interfacial de cizalla.

b) *Proteínas:*

La reología interfacial de cizalla se ha empleado para el estudio de las interacciones proteína-proteína en la interfase. La viscosidad interfacial de cizalla de las proteínas es mucho mayor que la de los surfactantes de bajo peso molecular. Esto se debe a las interacciones colaterales existentes entre las proteínas como los puentes de hidrógeno, puentes hidrofóbicos y covalentes e



interacciones electrostáticas. Las interacciones entre las moléculas de proteína adsorbidas pueden ser muy diferentes. La deformabilidad de una película empaquetada de moléculas de proteína adsorbidas será también un factor importante en las medidas de viscosidad. Por tanto, las diferencias entre los datos de viscosidad interfacial de cizalla de varias proteínas son bastante grandes y reflejan diferencias en la estructura de las proteínas en estado adsorbido. La sensibilidad a las interacciones entre las moléculas de proteínas adsorbidas y los posibles cambios conformacionales hacen que los parámetros reológicos interfaciales de cizalla cambien como una función del tiempo de envejecimiento de la película adsorbida.

**\* Comportamiento en dilatación:**

La reología dilatacional está basada en aplicar un cambio en el área interfacial durante el cual la tensión interfacial,  $\gamma$ , se registra continuamente. Hay varios métodos para medir estos parámetros. El cambio aplicado en el área puede ser oscilatorio, continuo o paso a paso expansión o compresión. También puede aplicarse una deformación no uniforme, resultando un gradiente de tensión superficial y un análisis de datos no lineales complicado.

Los experimentos de relajación son experimentos con medidas sin perturbación basadas en medidas de propagación y amortiguación de las ondas capilares naturales. Estas ondas capilares ocurren en un rango de alta frecuencia y son las responsables principales de la perturbación espontánea de la interfase que provoca la ruptura de la película.

a) *Surfactantes de bajo peso molecular:*

El estudio reológico interfacial de películas de surfactantes insolubles revela una relación entre parámetros de reología dilatacional y la fase de la monocapa de surfactante.

b) *Proteínas:*

La interpretación de los datos de reología dilatacional interfacial de proteínas depende de la escala de tiempo. En escalas cortas de tiempo, el desdoblamiento de la proteína no afecta a los valores medidos. Benjamins y Van Voorts Vaer establecen que el módulo dilatacional interfacial de la proteína adsorbida es menor dependiendo del envejecimiento de la proteína que el módulo de cizalla. En reología de cizalla la parte viscosa es normalmente predominante cuando se consideran escalas de tiempos largas para bajas frecuencias y bajas velocidades de cizalla. Se supone que los cambios conformacionales lentos dependen de su conformación y es esperado que los enlaces inter- e intramoleculares estén unidos a la conformación interfacial dilatacional y sean los responsables de la viscosidad interfacial de cizalla. Para proteínas alimentarias con pequeña estructura interna, un cambio marcado en la reología interfacial dilatacional se puede observar como una función del tiempo y/o de la presión interfacial.

Para el caso de proteínas en la interfase aceite/agua: hay que considerar, además, que los aceites usados en la industria alimentaria, como el aceite de girasol, pueden influir en la capa adsorbida de diferente manera. La polaridad de la fase oleosa, la cristalización y la presencia de pequeñas impurezas en el aceite pueden afectar a los resultados de reología interfacial. Comparando resultados del módulo dilatacional en la interfase aire/agua con los obtenidos en la interfase aceite de girasol/agua, se observa que los valores obtenidos en la interfase aire/agua son mayores que los obtenidos en la interfase aceite/agua. (Bos y van Vliet, 2002)

## **2.4 ESTABILIDAD DE EMULSIONES.**

El término estabilidad de emulsiones se utiliza ampliamente para describir la capacidad de una emulsión de resistir cambios en sus propiedades con el tiempo.

Es posible formar una emulsión por homogeneización de aceite y agua, pero las dos fases se separan rápidamente formando un sistema compuesto por una capa de aceite sobre una capa de agua, esto se debe a que las gotas tienden a agregarse cuando colisionan. La fuerza impulsora de este proceso de desestabilización es el hecho de que el contacto entre moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable, por esta razón las emulsiones y también las espumas son sistemas termodinámicamente inestables. Existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos responsables de alteraciones en la estructura de una emulsión, y es muy importante conocer cual de ellos es el que produce dicha desestabilización.

Desde el punto de vista energético, las partículas coloidales en un medio disperso están siempre sometidas a movimiento browniano, produciéndose fuertes colisiones entre ellas. La estabilidad del sistema queda determinada por el resultado de las interacciones entre las partículas durante las colisiones. Las fuerzas interparticulares en emulsiones surgen, principalmente, debido a tres tipos de interacciones: atractivas, repulsivas y estéricas (Rahalkar, 1992).

♣ Interacciones atractivas: Las más comunes son las de Van der Waals, que surgen debido a efectos de orientación, inducción y dispersión. Normalmente es deseable la existencia de una pequeña cantidad de fuerzas de este tipo que conducen a una atracción débil entre las gotas, ya que da lugar a la formación de la estructura reticular, estabilizando la emulsión. Por otro lado, la presencia de fuerzas de Van der Waals fuertes, conducen a la formación de agregados individuales y es indeseable. En el límite, el sistema puede desestabilizarse en dos fases, debido a que las fuerzas de Van der Waals fuertes causan una floculación extrema, teniendo lugar la separación entre los agregados y el fluido que los rodea.

♣ Interacciones repulsivas: Surgen principalmente debido a la doble capa (capa de cargas electrostáticas que rodean a la gota por la adsorción de iones en la superficie). Las interacciones repulsivas pueden clasificarse como de esfera rígida y de esfera blanda.

Las de esfera rígida se producen cuando la capa doble es fina y está pobremente desarrollada. En este caso, cuando las gotas se alcanzan unas a otras, hay poca variación en la energía de interacción, hasta en separaciones muy pequeñas, se produce una fuerte repulsión y la energía de interacción aumenta rápidamente hasta un valor infinito.

Las interacciones de esfera blanda se producen entre dobles capas gruesas y extensas, pudiendo ser el radio efectivo de la gota varias veces su radio.

♣ **Interacciones estéricas:** Están presentes cuando las partículas poseen una capa adsorbida de emulsiones y/o macromoléculas.

Muchas emulsiones alimentarias contienen espesantes que pueden actuar como estabilizantes estéricos. La estabilización estérica puede ser importante incluso cuando no se añadan espesantes. La presencia de estabilizadores estéricos en la interfase normalmente conduce a una doble capa extendida, que aumenta, por tanto, las interacciones electrostáticas. Debido a la presencia de una doble capa adsorbida, las gotas no tienen un contacto suficiente para que se produzca la coagulación. Por tanto, la estabilización estérica generalmente tiende a suprimir las interacciones atractivas.

La estabilización estérica es muy importante para emulsiones alimentarios debido a los diferentes espesantes y estabilizantes utilizados. La mayoría de estas moléculas son polielectrolitos. El análisis es más complicado para polielectrolitos debido a la presencia de cargas superficiales adicionales.

#### **2.4.1 PROCESOS DE DESESTABILIZACIÓN.**

A continuación se describen los principales procesos de desestabilización de emulsiones (Krog y col., 1985):

♣ **Crechado:** Es un proceso de separación por gravedad. En este caso no se modifican ni el tamaño de las gotas dispersas ni la distribución de tamaños de las mismas. Se produce un gradiente de concentración que, en el caso límite,

provoca el agrupamiento de todas las gotas en el extremo superior de la emulsión, mientras que el resto del volumen del sistema es ocupado por la fase líquida continua. La velocidad de cremado depende de distintos factores: de la diferencia de densidad entre las dos fases, de la viscosidad de la fase continua y del tamaño de las gotas dispersas. Dicha velocidad se puede determinar aplicando la ley de Stokes (Fennema, 1985).

♣ **Sedimentación:** Se trata de separación por gravedad. La sedimentación describe el movimiento de bajada de las gotas debido a que tienen una mayor densidad que el líquido que las rodea.

♣ **Floculación:** Consiste en la agregación de gotas en el seno de la emulsión en forma de racimos, manteniendo cada una su identidad, es decir, este proceso no implica la ruptura de la película interfacial. Las fuerzas que existen entre las partículas en los flóculos son débiles, por lo que normalmente la floculación es un proceso reversible. Las partículas floculadas pueden volver a ser redispersadas por una acción del movimiento browniano y por agitación (Dickinson y Stainsby, 1982).

♣ **Coagulación o coalescencia:** Las gotas que se encuentran floculadas o bien, las gotas que se encuentran en un alto grado de empaquetamiento como resultado de uno de los procesos anteriores pueden coalescer, es decir, pueden unirse para formar gotas de mayor tamaño. Este proceso sí implica la ruptura de la película interfacial, por lo que la velocidad de coalescencia dependerá de la estabilidad de dicha película. Una característica muy importante de ésta será su elasticidad y viscosidad superficial (Larsson, 1990).

Las fuerzas que existen entre las partículas coaguladas son generalmente muy intensas por lo que el proceso es con frecuencia irreversible (Dickinson y Stainsby, 1982).

♣ **Maduración de Ostwald:** Es un proceso alternativo a la coalescencia en el cual se produce también el incremento en el tamaño de las gotas. Dicho

proceso se produce si los dos líquidos que forman la fase continua y dispersa no son totalmente inmiscibles. Consiste en el crecimiento, en emulsiones polidispersas, de las gotas de mayor tamaño a expensas de las de menor. El equivalente a este proceso en el caso de las espumas es la difusión de gas desde las burbujas de menor tamaño hasta las de mayores (Tadros y Vicent,1985).

♣ **Inversión de fases:** No es un proceso de rotura en el sentido estricto de la palabra, ya que al final se obtiene una nueva emulsión pero en la que la fase dispersa está constituida por la sustancia que originalmente formaba la fase continua. Este proceso se puede producir por cambios en la temperatura, en la concentración de uno de los componentes o por adición de un tercer componente al sistema. Es especialmente importante en el caso de emulsiones con un elevado volumen de fase dispersa. Puede ser deseable durante el proceso de fabricación de la emulsión para ahorrar energía o durante su consumo para realzar sabores en la boca (Dickinson, 1992; Lehnert y col.,1994).

Además de los procesos de inestabilidad físicos mencionados, se deben tener en cuenta otros procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos que pueden producirse en emulsiones alimentarias que también pueden afectar a su vida media y a su calidad (Robins, 2000a).

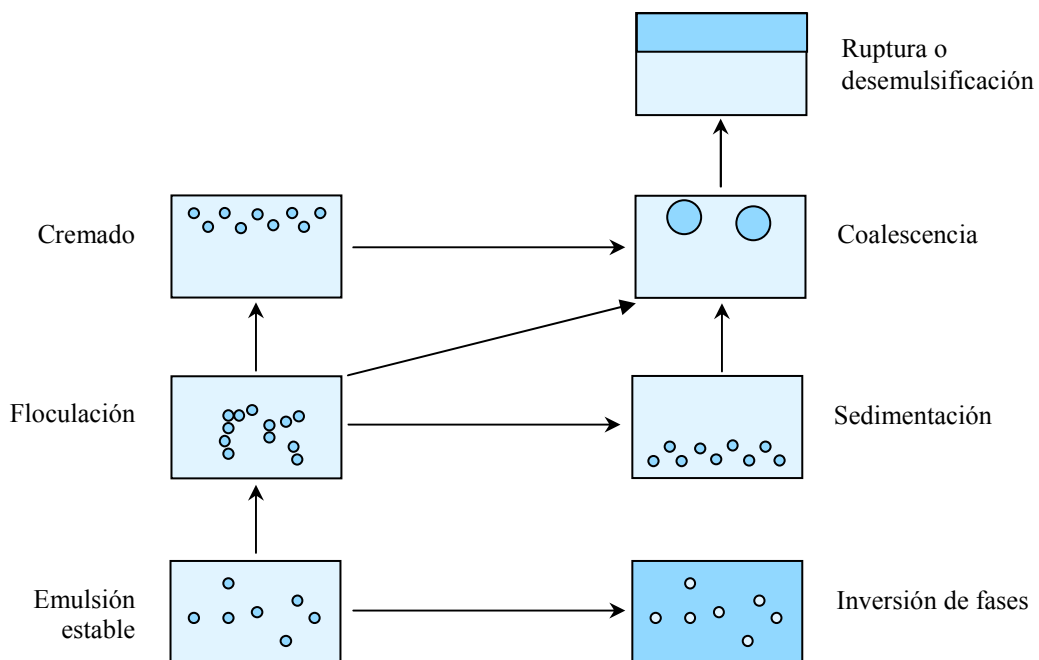


Fig 2. 2: Procesos de desestabilización de una emulsión.

### 2.4.2 ESTABILIDAD CINÉTICA.

Una emulsión se dice que es estable si durante un cierto periodo de tiempo se aprecia poca tendencia a la agregación de partículas (Dickinson y Stainsby, 1982).

En muchos sistemas coloidales, un estado termodinámicamente estable sólo es alcanzado, de manera ideal, cuando las partículas, gotas o burbujas están unidas en una única estructura homogénea de fase dispersa; por lo tanto, cualquier estabilidad aparente ha de ser considerada como un fenómeno puramente cinético. Un coloide no puede formarse espontáneamente y, si se forma, es termodinámicamente inestable o al menos metaestable. Si la velocidad de cambio es suficientemente lenta, en la escala de tiempo en la que interesa que dicho producto se mantenga intacto, se puede considerar el coloide estable. Es importante definir el intervalo de tiempo de utilización del alimento para establecer la estabilidad del mismo. Hay emulsiones que interesa que sean estables durante un largo periodo de tiempo, mientras otras interesan con una estabilidad limitada (Krog y col., 1985). Es necesario, por lo tanto, controlar la velocidad del proceso que promueve la inestabilidad, una vez que se establece el mecanismo o mecanismos que la originan (Cheftel y col., 1989; Darling, 1987; Paquin y Dickinson, 1990).

La estabilidad de una dispersión depende de las características de la interfase, de la distribución de tamaños de la fase dispersa, de la viscosidad de la fase continua, de la relación en volumen de ambas fases y de la diferencia de densidad entre las mismas (Fennema, 1985).

Existe una amplia gama de productos y procesos industriales que implican la formación de una emulsión estable.

Una forma de apreciar la diferencia entre la estabilidad termodinámica de un sistema y su estabilidad cinética es crucial para la comprensión de las propiedades de emulsiones alimentarias. Si se considera un sistema compuesto

por un gran número de moléculas que pueden ocupar dos estados diferentes:  $E_{baja}$  y  $E_{alta}$ , el estado con la menor energía libre es el termodinámicamente favorable y, por tanto, el que las moléculas tienen más posibilidad de ocupar. En el equilibrio termodinámico, los estados se relacionan según la distribución de Boltzmann (Atkins, 1994):

$$\frac{\phi_{alta}}{\phi_{baja}} = \exp\left[-\frac{E_{baja} - E_{alta}}{k \cdot T}\right]$$

donde  $\phi$  es la fracción de moléculas que ocupa el nivel de energía  $E$ ,  $k$  es la constante de Boltzmann ( $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K) y  $T$  es la temperatura absoluta.

Cuanto mayor es la diferencia entre dos niveles de energía del sistema ( $(-E_0 - E_a)/kT$ ), mayor es la fracción de moléculas que se encuentra en el estado energético más bajo. En la práctica, un sistema no puede ser capaz de alcanzar el equilibrio durante la escala de tiempo de observación debido a la presencia de una barrera energética ( $\Delta E^*$ ) entre los dos estados. Un sistema en el estado energético alto debe adquirir una energía mayor que  $\Delta E^*$  antes de pasar al estado energético bajo. La velocidad a la cual ocurre la transformación de un estado energético alto a uno bajo disminuye al aumentar la barrera energética. Cuando la barrera energética es lo suficientemente grande, el sistema puede permanecer en un estado termodinámicamente inestable durante un periodo de tiempo considerablemente largo, en cuyo caso se dice que es cinéticamente estable o metaestable. En emulsiones alimentarias hay un gran número de estados intermedios metaestables entre la emulsión inicial y las fases separadas, y existe una barrera energética asociada a una transición entre cada uno de estos estados. Sin embargo, suele ser posible identificar una barrera energética, que se asocia a un determinado proceso físicoquímico, el cual es el factor más importante para determinar la estabilidad cinética total de una emulsión (McClements, 1999).

La **teoría DLVO** ( Derjaguin y Landau, 1941; Verwey y Overbeer, 1948) relaciona la carga superficial de la película con la estabilidad que posee la



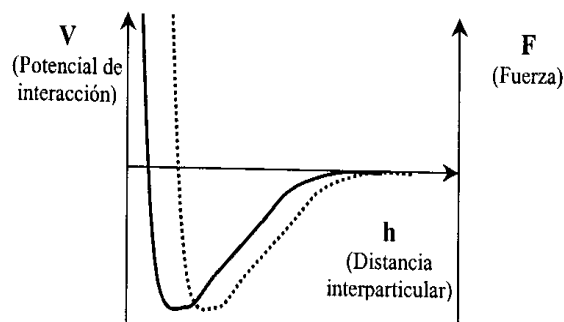
dispersión; constituye, por lo tanto, las bases de la teoría coloidal de la estabilización de tipo electrostática (Evans y Wennerström, 1994).

Según esta 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:

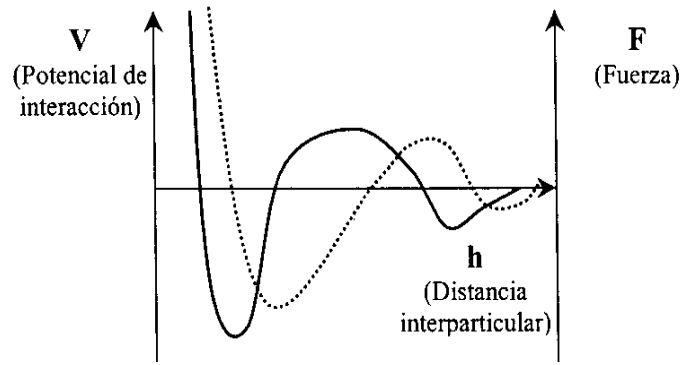
$$V(h) = V_A(h) + V_R(h)$$

Si se representa  $V_T$  en función de la distancia de separación entre las partículas, la curva pasa por un máximo ( $V_{m\acute{a}x}$ ) que se puede asociar con la existencia de una barrera de energía frente a la asociación de las partículas. Las partículas de una dispersión pueden poseer, en general, una energía térmica media del orden de  $kT$ . Si el  $V_{m\acute{a}x} \gg kT$  existirán pocas partículas en contacto y la mayoría permanecerán dispersas en el medio. Sin embargo, en un sistema real, las partículas poseerán una distribución de energía potencial. Por lo tanto, es esperable que una cierta proporción de partículas posean energía suficiente para superar esta barrera energética y coalescer.

Para un sistema coloidal estático, se pueden identificar dos tipos generales de curvas de potencial de interacción que se observan en la figura siguiente:



**Fig 2. 3: Curva de potencial. La energía potencial decrece de forma monótona conduciendo a una asociación reversible de las partículas.**



**Fig 2. 4: Curva de potencial. La curva de energía potencial presenta dos mínimos.**

En la primera figura no existe barrera de energía que prevenga el sistema de alcanzar el mínimo potencial y, por ello, se llega a este estado de agregación de las partículas fácilmente. El punto hasta el cual la asociación entre partículas es reversible depende de la profundidad del pozo de potencial y de los procesos posteriores posibles en el estado agregado.

La asociación reversible se conoce como floculación y la irreversible como coagulación.

Las gotas de aceite en agua manifiestan una fuerte fuerza de adhesión. Una vez que dos gotas de aceite se ponen en contacto, se unen irreversiblemente dando una gota de mayor tamaño. En este caso, la coalescencia sigue a la coagulación, ya que el mínimo de potencial es muy profundo.

En el caso de la segunda figura, el potencial de interacción tiene un comportamiento más complejo mostrando dos mínimos. Si el sistema alcanza el mínimo primario, el proceso de coagulación es irreversible. Además, el mínimo secundario puede ser lo suficientemente profundo como para permitir una floculación reversible. Si la barrera energética es mayor que  $kT$ , el mínimo primario se hace inaccesible y el sistema es cinéticamente estable. Con una barrera del orden de  $kT$  es posible que se alcance relativamente rápido.

## 2.5 AGENTES DE SUPERFICIE Y ESTABILIZANTES.

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

El ingrediente que se puede utilizar para mejorar la estabilidad de una emulsión puede ser tanto un emulsionante como un agente espesante (McClements, 1999). Agentes emulsionantes son aquellas especies químicas simples que promueven la formación de emulsiones en poco tiempo, estabilizando las mismas por una acción interfacial. Existen fundamentalmente dos tipos de emulsionantes de interés alimentario: macromoléculas y productos anfífilos de bajo peso molecular. Los surfactantes de moléculas pequeñas no son efectivos para conferir estabilidad por mucho tiempo, por lo que se requieren. Agentes estabilizantes son componentes químicos simples o mezclas que aumentan de vida media a las sustancias. Son normalmente biopolímeros, proteínas o polisacáridos (Dickinson y Stainsby, 1982).

La acción de estabilización de emulsiones por incorporación de polisacáridos alimentarios es por modificación de la viscosidad o por gelificación en la fase continua acuosa. Las proteínas, por otro lado tienen tendencia a adsorberse en el aceite (Dickinson, 2002).

La mayoría de emulsionantes son moléculas anfífilas, esto es que contienen regiones polares y no polares en la misma molécula. Se adsorben en la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, formando una membrana protectora para evitar que las gotas se acerquen lo suficiente como

para agregarse. Pueden producir una estabilización estérica o electrostática si se trata de iones.

Los surfactantes o emulsionantes de bajo peso molecular, se incorporan al alimento con una triple finalidad (Krog, 1976):

1.- Reducir la tensión superficial de las interfases aceite-agua de modo que promueva la emulsificación y formación de fases en equilibrio entre aceite-agua-emulsionante con el fin de que las interfases estabilicen la emulsión. Como consecuencia se disminuye el consumo energético del proceso y se reduce el tamaño de la fase dispersa, lo que es favorable para la estabilidad de la formulación.

2.- Interaccionar con el almidón y las proteínas componentes del alimento con modificación de la textura y propiedades reológicas del mismo.

3.- Modificar la cristalización de grasas y aceites.

Puede ser necesario el empleo de dos o más emulsionantes a fin de conseguir el efecto deseado. La funcionalidad depende también de la cantidad añadida (Leadbetter, 1990).

También las macromoléculas que se adsorben en la interfase estabilizan las emulsiones vía dos mecanismos (Garti y col., 1999), aunque macromoléculas no adsorbidas implican presión osmótica:

- Los hidrocoloides se dispersan en el agua aumentando la viscosidad de la fase continua. Se emplean gomas vegetales y gelatina. Las gomas son polisacáridos altamente hidrófilos.

- Partículas sólidas finamente divididas que se adsorben en la interfase. Son generalmente silicatos, tierra de diatomea, proteínas coaguladas, hidróxidos de alcalinotérreos, etc. Se distribuyen en la fase acuosa fundamentalmente, pero se pueden distribuir también en la fase oleosa o en la interfase. La adsorción de

partículas sólidas se caracteriza por el ángulo de contacto propio del material con el medio. Conducen a una estabilización estérica.

En la industria alimentaria se usan numerosos agentes emulsionantes, que varían ampliamente en su estructura y propiedades. Se clasifican por distintos criterios. Una clasificación de emulsionantes según su procedencia (Nawar, 1985):

1.- Emulsionantes de origen natural, formados por fosfolípidos y proteínas.

2.- Emulsionantes sintéticos, formados por mono y diglicéridos, derivados de ácidos grasos con otros polioles, productos de condensación de óxidos de etileno sobre los compuestos anteriores, ...

## **2.5.1 CLASIFICACIÓN DE AGENTES EMULSIONANTES Y ESTABILIZANTES.**

### **2.5.1.1 EMULSIONANTES DE BAJO PESO MOLECULAR.**

La principal aplicación de emulsionantes de bajo peso molecular está en alimentos basados en una emulsión o espuma del tipo de las margarinas, helados, productos al horno, etc... Pueden aumentar la estabilidad de las emulsiones O/W estabilizadas por proteínas y poseen cierta importancia biológica como intermediarios en la digestión y metabolismo de los lípidos.

Los más empleados en la industria alimentaria son:

#### **2.5.1.1.1 MONOGLICÉRIDOS Y DIGLICÉRIDOS.**

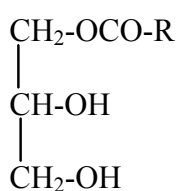
Los monoglicéridos comenzaron a utilizarse en torno al año 1930. Son los emulsionantes más comúnmente empleados. Tienden a estar disponibles en forma de distintas combinaciones con di- y triglicéridos, más que en forma pura, pero la fracción de monoglicérido (45%) ejerce la mayor función emulsificante (Dziezak, 1988; Lauridsen, 1986; Leadbetter, 1990). Un producto más concentrado puede

ser obtenido por destilación molecular de película delgada a alto vacío y altas temperaturas (92-95% monoglicérido).

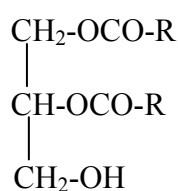
Los monoglicéridos son ésteres de ácidos grasos con glicerol. Se preparan comercialmente por esterificación directa de la glicerina con ácidos grasos a elevadas temperaturas o por glicerólisis de las grasas comestibles o aceites, por reacción a 200°C, bajo catálisis alcalina. Las grasas comestibles y ácidos grasos que se emplean en la manufactura son de origen vegetal, animal o aceites marinos que deben ser hidrogenados (Krog, 1992 y Lauridsen, 1976).

Los diglicéridos están presentes normalmente en menores cantidades y no se consideran componentes principales, sin embargo, se pueden obtener productos que contengan 50-60% de diglicéridos, mezcla de dos isómeros en equilibrio, por glicerólisis.

Los monoglicéridos son compuestos de naturaleza lipófila y por tanto útiles para formar y estabilizar emulsiones del tipo W/O. El tipo de cadena hidrocarbonada del ácido graso esterificado, da carácter al glicérido dependiendo de su longitud (número de grupos -CH<sub>2</sub>-) y del número y situación de las insaturaciones (de la Fuente Feria, 1993).



1-Monoglicérido



1,2-Diglicérido

Los mono- y diglicéridos forman parte de cualquier dieta diaria y se generan durante la digestión y absorción de cada comida que contenga grasa. No se han descrito efectos dañinos particularmente asociados a estos productos ni efectos tóxicos a los niveles empleados (Leadbetter, 1990).

#### 2.5.1.1.2 DERIVADOS DE MONOGLICÉRIDOS.

Los hidroxilos libres de los monoglicéridos pueden reaccionar con otros componentes tales como ácidos orgánicos o sus derivados, obteniendo una gran variedad de emulsionantes. Entre otros se pueden destacar:

- Ésteres de monoglicéridos con ácido láctico, cítrico o acético, que se producen por reacción de monoglicéridos destilados o mezclas de mono- y diglicéridos con ácido láctico, cítrico y anhídrido acético (Dziezak, 1988; Lauridsen, 1976, 1986). Son más hidrófilos que los glicéridos de los que proceden y, por tanto, adecuados para emulsiones del tipo O/W.

- Los diacilésteres del ácido tartárico con monoglicéridos se producen haciendo reaccionar anhídrido del ácido tartárico acetilado con monoglicéridos (Lauridsen, 1986; Van Haften, 1979).

- Los mono- y diglicéridos etoxilados son productos formados por reacción de 20 moles de óxido de etileno con una mezcla de mono- y diglicérido en presencia de una pequeña cantidad de hidróxido de sodio (Dziezak, 1988; Van Haften, 1979).

#### 2.5.1.1.3 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS.

El sorbitol, los polialcoholes o los grupos –OH presentes en azúcares y en ácido láctico, pueden esterificar a los ácidos grasos:

- Los ésteres del sorbitano se preparan por reacción del sorbitol con el ácido esteárico a 225-250°C, en presencia de un catalizador ácido. Los productos resultantes se conocen como “Span”, estos agentes tienden a estabilizar emulsiones W/O. Si estos productos reaccionan posteriormente con óxido de etileno en presencia de un catalizador básico, se producen polisorbatos o ésteres de polioxietilensorbitano, son comercialmente conocidos como “Tweens”.

- Los ésteres del poliglicerol son el resultado de la polimerización de la glicerina bajo condiciones alcalinas a elevadas temperaturas y posterior esterificación de ácidos grasos seleccionados.

- Los ésteres de propilenglicol se producen por esterificación de este alcohol con ácidos grasos y posterior destilación. Alternativamente pueden prepararse por interesterificación de triglicéridos con propilenglicol.

- Los ésteres de sacarosa se forman por reacción entre la sacarosa y metilésteres de ácidos grasos. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador básico y dimetilformamida pero debido a la toxicidad de este disolvente se han introducido otros métodos que emplean otros solventes o que producen los ésteres de sacarosa en ausencia de solvente.

#### **2.5.1.1.4 FOSFOLÍPIDOS (LECITINAS).**

- Lecitinas naturales: la función de las lecitinas de la yema de huevo en la estabilidad de las emulsiones O/W es bien conocida. Los compuestos activos de la lecitina son los fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol, en proporciones similares. La fosfatidil colina tiene propiedades de estabilización de emulsiones O/W, mientras que la fosfatidiletanolamina, y en menor grado el fosfatidilinositol, tienen propiedades de emulsionante de W/O.

- Lecitinas sintéticas: tienen como mejoras con relación a las naturales el no poseer sabor alguno, así como ser un producto estándar y más eficaz. Consiste en una mezcla que contiene triacilgliceroles (40%), fosfolípidos neutros (15%), sales amónicas de ácidos fosfatídicos mixtos (40%) y sales de amonio del ácido fosfórico (5%).

#### **2.5.1.2 PROTEÍNAS.**

Las proteínas se usan como agentes estabilizantes de emulsiones, ya que tienen tendencia a situarse preferentemente en la interfase W/O debido a su carácter anfifílico. Estos biopolímeros, además de reducir la tensión interfacial,



pueden formar una película continua sobre la interfase por medio de complejas interacciones intermoleculares, comunicándole una deseable rigidez estructural a la interfase. Como consecuencia de esta adsorción, la proteína se desnaturaliza.

#### 2.5.1.2.1 ESTRUCTURA.

Las proteínas son polímeros hechos con 20 diferentes aminoácidos unidos por enlace peptídico (Damodaran, 1997). Los aminoácidos constituyentes difieren sólo en la naturaleza química de los grupos de las cadenas laterales unidas a los átomos de  $\alpha$ -C. Las propiedades físico-químicas, como la carga, solubilidad, reactividad química,... de los aminoácidos son dependientes de la naturaleza química de los grupos de cadena lateral. Algunos aminoácidos con cadena lateral alifática o aromática son no polares, muestran una solubilidad limitada en agua; mientras que otros, con cadena lateral cargada o no, muestran solubilidad en agua. La carga neta de la proteína se determina por los residuos de aminoácidos ácidos y básicos en la proteína.

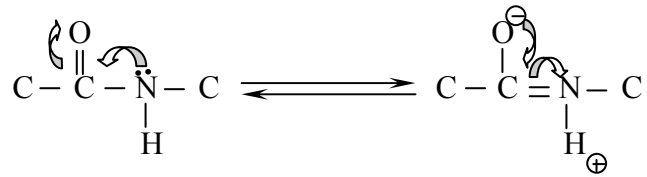
Uno de los factores que más influye en las propiedades, como en estabilidad conformacional, solubilidad, actividad superficial, etc., de las proteínas es la hidrofobicidad total de los aminoácidos constituyentes.

La conducta funcional de proteínas de importancia biológica y alimentaria es dependiente de su estructura. En las proteínas existen cuatro niveles estructurales llamados estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

##### a).- Estructura primaria:

Denota la secuencia lineal en la que los aminoácidos se enlazan por enlaces peptídicos. La longitud de la cadena y la secuencia de aminoácidos del polipéptido determina su estructura tridimensional esencial en solución.

Una de las características estructurales que distingue a la proteína de otros biopolímeros es el carácter parcial del doble enlace del enlace peptídico, resultando una estructura resonante:



La restricción de su libre rotación disminuye drásticamente la flexibilidad de la cadena polipeptídica. La mayoría de las proteínas asumen una estructura ordenada compacta, a causa de las interacciones estéricas y otras no covalentes entre los aminoácidos.

b).- Estructura secundaria:

Las estructuras secundarias más comunes son la  $\alpha$ -hélice y la  $\beta$ -laminar. Las proteínas con estructura  $\alpha$ -hélice son normalmente anfifílicas, la mitad de la hélice es hidrófila y la otra mitad es hidrófoba. La  $\beta$ -laminar está extendida a estructuras en las que los grupos C=O y N-H están orientados perpendicularmente a la dirección de la cadena principal. En esta configuración los enlaces por puentes de hidrógeno pueden ocurrir sólo entre láminas. Generalmente la proteínas  $\beta$ -laminar son más hidrofóbicas que las  $\alpha$ -hélice. Muestran gran desnaturalización a altas temperaturas. La  $\beta$ -lactoglobulina es 51%  $\beta$ -laminar.

c).- Estructura terciaria:

La estructura terciaria es la disposición espacial de la cadena de polipéptidos completa con segmentos de estructura secundaria en una forma tridimensional compacta plegada. La geometría más importante de reorganización que ocurre en la formación de la estructura terciaria es el restablecimiento de los residuos no polares en el interior y la disposición de los residuos hidrofílicos en el exterior de la molécula de proteína. Aunque una mayoría de grupos hidrofóbicos se ocultan en el interior de la proteína, no todos pueden ser ocultados, de hecho, el análisis de la superficie de varias proteínas globulares indica que en torno a un 40-50% de la superficie de proteína accesible por el agua está ocupada por residuos apolares.

En esencia el plegado de la proteína en una estructura terciaria compacta está acompañado de una reducción del área interfacial entre los grupos no polares de la proteína y el disolvente acuoso que la rodea.

d).- Estructura cuaternaria:

Consiste en la disposición espacial de una proteína que contiene varias cadenas de polipéptidos.

El plegado de una proteína desde una estructura primaria lineal hasta una terciaria o cuaternaria compleja es conducido por varias interacciones no covalentes, como fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, estéricas e hidrofóbicas o puentes de hidrógeno. La estabilidad de la estructura plegada nativa está expresada como la diferencia entre energía libre de los estados nativos y desplegado de la proteína. Este estado es metaestable, la proteína puede sufrir cambio conformacional fácilmente cuando unos pocos puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas o hidrofóbicas se rompen.

#### **2.5.1.2.2 ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS.**

Las proteínas como estabilizantes de alto peso molecular, se adsorben a la interfase en un proceso tedioso, debido a sus complejas características conformacionales. Forman una película alrededor de las gotas de aceite para dar emulsiones concentradas O/W estables.

El mecanismo de actuación de las proteínas se puede dividir en tres etapas:

- a) La molécula de proteína nativa se difunde hacia la interfase.
- b) La proteína penetra en la interfase.
- c) Las moléculas se reordenan para alcanzar un mínimo de energía.

La primera etapa de adsorción de proteínas es un proceso dependiente de la difusión en el que afectan variables como la temperatura, la forma de las

proteínas y la viscosidad del medio. En la segunda etapa, la molécula de proteína contacta con la interfase aceite-agua y causa una reducción de la tensión interfacial. La reordenación conformacional de la proteína es rápida si esta es flexible y es lenta para proteínas globulares rígidas.

Aparte de los factores moleculares intrínsecos, la actividad superficial de una proteína en un sistema alimentario complejo se verá marcada por otros factores extrínsecos como pH, temperatura o fuerza iónica; aparte de factores ambientales e interacciones de la proteína con otros componentes del alimento como lípidos, proteínas y polisacáridos.

Estos factores moleculares afectan a las propiedades de emulsificación. Destacan (Damodaran, 1997):

- Solubilidad: aunque las proteínas altamente insolubles no actúan como emulsionantes, no existe una relación fiable entre la solubilidad y la acción emulsificadora.

- Hidrofobicidad superficial: las propiedades emulsionantes de las proteínas muestran una correlación positiva con la hidrofobicidad superficial, pero no significa que la tengan con los aminoácidos residuales. Parece que esta relación pueda resultar del hecho que las proteínas tengan algunas zonas hidrofóbicas en su superficie, siendo potencialmente inestables en la interfase O/W. Por otro lado la pobre correlación entre las propiedades de emulsificación y la hidrofobicidad indica que algunas proteínas son inestables y sufren cambios conformacionales en la interfase O/W, no son extensamente desnaturalizadas como ocurre en la interfase A/W. Esto es razonable porque la energía libre interfacial de interfase O/W es considerablemente menor que la de interfase A/W. Algunas proteínas como  $\beta$ -lactoglobulina no muestran una fuerte correlación entre sus propiedades emulsionantes y la hidrofobicidad superficial.

- Desnaturalización por calor: se pueden mejorar las propiedades de emulsificación de proteínas controlando el calor de desnaturalización antes de emulsificación, sin que resulte en insolubilidad. En experimentos de

competitividad de adsorción para  $\beta$ -lactoglobulina nativa y  $\alpha$ -lactoalbúmina en estado globular fundido, preferentemente se adsorbe en la interfase O/W el segundo.

- Adsorción competitiva: Los alimentos son mezcla de componentes con actividad superficial, cabe esperar competencia por adsorberse a la superficie. Shimizu mostró que las proteínas de la leche muestran adsorción selectiva por la interfase O/W (Shimizu y col., 1987).

- Surfactantes de bajo peso molecular: Las emulsiones alimentarias contienen cantidades significantes de surfactantes de bajo peso molecular como fosfolípidos, mono- y diglicéridos. La adsorción competitiva entre proteínas y surfactantes de bajo peso molecular puede influir en la estabilidad de emulsiones alimentarias. Estos surfactantes son más activos superficialmente que las proteínas y compiten por adsorberse en la interfase.

Cuando los surfactantes de bajo peso molecular se añaden antes de emulsificación, sólo hay un desplazamiento parcial de la proteína. Cuando son añadidos después de emulsificación puede ocurrir un desplazamiento completo de la proteína, dependiendo de la cantidad añadida (Dalglish, 1995).

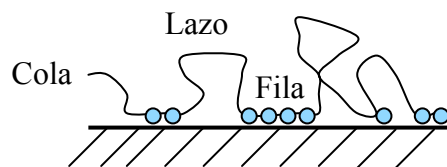
- Conformación de la proteína adsorbida: La investigación de las conformaciones secundarias y terciarias de las proteínas en la interfase líquida es muy complicada. Sin embargo evidencias indirectas sugieren que la proteína sufre un cambio conformacional significativo en la interfase. Éstos van a ser esperados porque la conformación de la proteína es una manifestación de las interacciones consigo misma y con el medio, algún cambio en el medio de la proteína puede causar cambios conformacionales. Esto debe involucrar el descenso neto de la energía libre comparada con la que tiene en el seno de la fase.

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 dependen de la flexibilidad molecular de la cadena de polipéptido y de la afinidad

de ésta por el medio de disolución. Los cálculos de área de una molécula de proteína adsorbida indican que sólo una fracción de la cadena de polipéptido está en contacto con la interfase (superficie). Las configuraciones de una cadena de polipéptidos flexible en un plano bidimensional de la interfase pueden ser clasificadas dentro de tres grupos de *filas (train)*, *lazos (loops)* y *colas (tails)*:

- Las filas son los segmentos hidrofóbicos que se encuentran planos en la superficie, haciendo contacto con las fases acuosa y oleosa.
- Los lazos son los segmentos polipéptidos entre las filas suspendidas en la fase acuosa continua.
- Las colas son los segmentos N- y C- terminales siempre suspendidos en la fase acuosa. Como estos grupos están cargados a pH neutro, es de esperar que las colas estén presentes en el seno de la fase acuosa.

La distribución relativa de las filas, lazos y colas en la molécula adsorbida determina las propiedades de la emulsión.



**Fig 2. 5: Configuraciones de una cadena polipéptica en una interfase.**

El proceso de adsorción desde la subfase juega un papel fundamental y determinante del comportamiento de las emulsiones alimentarias. 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 o con partículas se considera, a menudo, que el proceso de adsorción es irreversible, ya que la escala de tiempo para la desorción o reordenación sobre la superficie puede ser larga, 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, conocida también como 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 (G/L o L/L), la concentración superficial en exceso del componente  $i$  se define como (Adamson, 1990):

$$\Gamma_i = n_i/A$$

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:

$$d\sigma = -\sum \Gamma_i d\mu_i$$

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:

$$d\sigma = -\Gamma_1 d\mu_1 - \Gamma_2 d\mu_2$$

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

$$\Gamma_2 = -d\sigma/d\mu \approx -(x_2/RT) (d\sigma/dx_2)$$

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 la tensión superficial o interfacial con la composición. Para una solución real, se tiene:

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

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 de la interfase líquida.

#### **2.5.1.2.3 PROTEÍNAS LÁCTEAS: $\beta$ -LACTOGLOBULINA.**

El suero lácteo es una mezcla de proteínas con numerosas y diversas propiedades funcionales y por lo tanto puede tener algunos usos potenciales. Las principales proteínas son  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Representan aproximadamente el 70% del suero y son responsables de la hidratación, gelificación y propiedades de actividad superficial de los ingredientes del suero lácteo. Tienen varios usos en la industria alimenticia, como en la fabricación del pan, galletas, cereales para el desayuno, pastas,...Estos ingredientes son usados también por sus propiedades nutricionales y terapéuticas en dietas de bajas calorías.

La  $\beta$ -lactoglobulina supone entre 2-4 g/l en el suero, tiene una masa molecular de  $0,2 \cdot 10^4$ . Contiene 162 residuos de aminoácidos con un grupo tiol y dos enlaces bisulfatos.



La estructura primaria de  $\beta$ -lactoglobulina para varias especies rumiantes es conocida y se muestra en la figura 6 (Baurntizer, 1972). Las estructuras secundaria y terciaria muestran un alto grado de organización con una gran porción de  $\beta$ -láminar (43-50% de los residuos) y sólo 10-15 % de  $\alpha$ -hélice y 15-20% de  $\beta$ -girada. Los monómeros que forman la  $\beta$ -lactoglobulina se parecen a un cono con una cavidad hidrofóbica capaz de unir vitamina A con ácidos grasos. En este respecto, la estructura de la  $\beta$ -lactoglobulina es análoga a la retinol unido a proteínas del plasma sanguíneo (Papiz y col., 1986). La estructura compacta es similar a una pila de nueve  $\beta$ -láminas y dos puentes de bisulfato. Ésta es resistente a proteólisis completa por proteasas digestivas. Al pH de la leche la  $\beta$ -lactoglobulina existe como un dímero constituido por dos pilas de conos (Monaco y col. 1987).

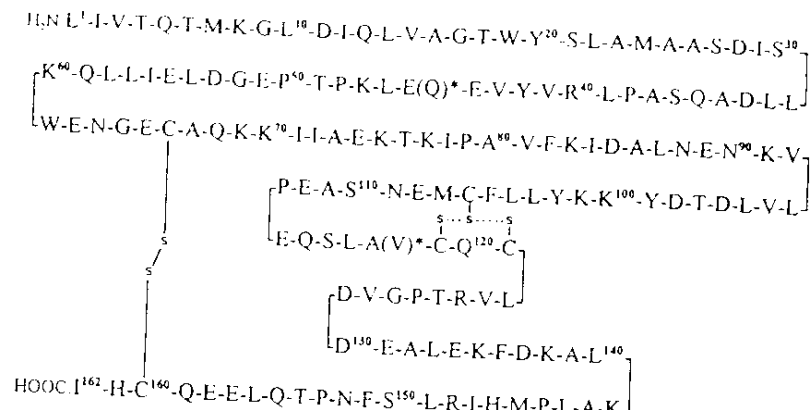
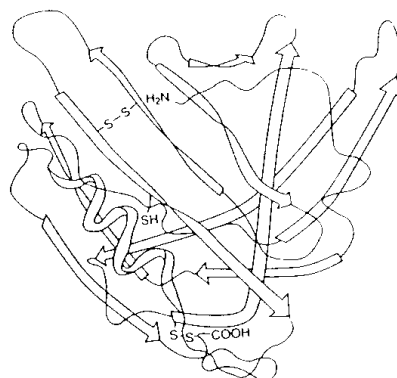


Fig 2. 6: Estructura primaria de la  $\beta$ -lactoglobulina.



**Fig 2. 7: Estructura secundaria de la  $\beta$ -lactoglobulina.**

La conformación y las propiedades fisicoquímicas de las proteínas dependen del medio iónico, es decir, concentración de sales y pH.

A pH entre 5 y 8 la  $\beta$ -lactoglobulina existe como un dímero, entre 3 y 5 los dímeros están asociados formando octómeros, y a valores extremos de pH (pH<2 o pH>8) existe principalmente como monómeros. A pH>9 la molécula es irreversiblemente desnaturalizada (Pessen y col., 1985). A causa de este comportamiento de asociación-disociación dependiente del pH no se producen cambios significantes en la viscosidad intrínseca y en la movilidad de los lados de las cadenas de  $\beta$ -lactoglobulina cuando el pH está cambiando (Colas y col., 1989). Estas proteínas rígidas y compactas están menos afectadas por las interacciones iónicas.

En la interfase aceite/agua la  $\beta$ -lactoglobulina padece significantes cambios estructurales. La reorganización ocurre durante la formación de la película. La adsorción interfacial se puede ver como un proceso dinámico de enrollamiento parcial y desplegado lento de una parte de la molécula seguida de enlaces de estas regiones a la interfase. En un sistema quieto, una monocapa se forma en seis horas. Esta adsorción a la interfase es dependiente del pH. A pH 9 el comportamiento de adsorción de la proteína desnaturalizada es parecido a una proteína flexible, como la  $\beta$ -caseína.

Aunque la  $\beta$ -lactoglobulina tiene un alto residuo hidrofóbico, es muy soluble en agua, porque la mayoría de los residuos no polares están ocultos en el interior de la proteína y la mayoría de los polares están expuestos a la superficie (Mangino, 1984).

A menudo es difícil comparar las propiedades superficiales de diferentes proteínas lácteas o de éstas con otras proteínas porque sus propiedades dependen mucho del estado de desnaturalización, del tratamiento tecnológico usado para la extracción de proteínas y, por encima de todo, de las condiciones de la solución. No obstante, la  $\beta$ -lactoglobulina, que se desnaturaliza fácilmente en la interfase (Matsumura y col., 1994), tiene mejor actividad superficial que la  $\alpha$ -lactoalbúmina. Estas propiedades son muy importantes para el uso de la  $\beta$ -lactoglobulina en la industria.

Las propiedades superficiales a menudo se relacionan con la solubilidad. La pérdida de solubilidad no permite que la molécula se difunda y migre a la interfase. De cualquier modo, aunque existe una buena correlación entre propiedades superficiales e hidrofobicidad superficial, hay muchas excepciones alimentaria (Dickinson, 1992).

**- Relación estructura-propiedades funcionales (Damodaran, 1997):**

a).- Solubilidad y adsorción en el agua:

La solubilidad de la proteína depende de la capacidad para enlazarse con el agua y del estado físico (Mangino, 1984). El agua puede unirse por enlaces no covalentes como hidratación iónica, puentes de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo inducido. La velocidad de hidratación depende de los sitios disponibles para hidratar, la conformación y las propiedades de la superficie de la proteína. Las proteínas lácteas concentradas son muy solubles, incluso su capacidad de adsorción es relativamente lenta.

La solubilidad depende de la actividad del agua y de la estructura de la proteína. Para la  $\beta$ -lactoglobulina al aumentar la actividad del agua aumentan las ataduras; el dímero es menos activo que el octómero.

b).- Viscosidad:

Las soluciones de proteínas lácteas no son muy viscosas, incluso a altas concentraciones. El pH tiene una pequeña influencia en la conformación inicial de la proteína, mientras que la viscosidad disminuye cuando el pH alcanza al punto isoeléctrico.

c).- Gelificación:

La gelificación se consigue por adición de sales o enzimas a una solución concentrada de proteínas a un pH extremo o calentando. El calentamiento induce gelificación en la proteína láctea por un mecanismo en dos pasos: desdoblamiento inicial de la molécula seguido de agregación.

d).- Propiedades emulsionantes:

Las proteínas lácteas actúan como surfactantes, disminuyen la tensión interfacial de la interfase aceite/agua y forman una fina película cohesiva alrededor de las gotas de aceite. Incluso estabilizan emulsiones impidiendo la coagulación y coalescencia. Estas propiedades van a depender de la diferentes fuentes de proteínas lácteas concentradas o aisladas, de la variación de su composición y de los métodos analíticos usados.

Las proteínas lácteas son muy eficientes como estabilizantes de emulsiones, sin embargo, las propiedades emulsionantes sólo pueden ser interpretadas si se especifica el pH y la temperatura. La velocidad de adsorción de las proteínas globulares es menor que la de pequeñas moléculas de surfactante, esto es en parte porque la proteína necesita sufrir un cambio conformacional para permanecer en la interfase.

Durante la adsorción en la interfase las proteínas globulares normalmente retienen parte de sus estructuras secundaria y terciaria. Así, las películas de proteínas adsorbidas contienen sólo moléculas de proteínas parcialmente deformadas. Por otro lado, las proteínas fuertes sufren un pequeño cambio conformacional en la interfase.

La adsorción interfacial de la  $\beta$ -lactoglobulina depende del pH. A pH 9, la estructura monomérica es destruida y la proteína adsorbida actúa como una proteína flexible con lazos y filas. A pH 7, la conformación de monómeros y dímeros es alterada en el estado adsorbido y la proteína forma una película interfacial rígida. A pH 4,65, muy próximo al punto isoelectrico, la proteína se adsorbe muy rápidamente. Shimizu mostró con una técnica inmunoquímica que el cambio de conformación de  $\beta$ -lactoglobulina involucra una parte de la molécula, la región  $\alpha$ -hélice no se desnaturaliza. Las proteínas globulares de la leche se adsorben formando una monocapa, mientras que los caseinatos forman multicapas.

e).- Propiedades espumantes:

Los factores que afectan a la capacidad de la proteína para formar y estabilizar espumas son los mismos que los de formación de emulsiones. Estos son: rápida difusión de la molécula a la interfase aire/agua, estructura anfifílica, solubilidad y flexibilidad. La capacidad de espumado de las proteínas lácteas depende del método de preparación. Está relacionada con las propiedades reológicas de la película interfacial, esta película debe ser viscoelástica para resistir a tensiones. La  $\beta$ -lactoglobulina es mejor estabilizador de espumas que la  $\alpha$ -lactoalbúmina y las proteínas lácteas concentradas.

#### 2.5.1.2.4 PROTEÍNAS DE CEREALES:

Hay varios métodos de clasificación de las proteínas de cereales, desde un punto de vista funcional es conveniente dividir las proteínas en dos clases: proteínas monoméricas y poliméricas, dependiendo de que estén compuestas por cadenas de polipéptidos simples o múltiples (Damodaran, 1997).

\* **Proteínas Monoméricas**: Están compuestas por dos grupos las gliadinas y las albúminas/globulinas. Las gliadinas son proteínas de almacenamiento mientras las albúminas/globulinas son metabólicas e incluyen varios enzimas.

- a) Gliadinas: Están normalmente divididas en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas. Sus pesos moleculares son del rango de 30000 a 80000.
- b) Albúminas/globulinas: Las albúminas, solubles en agua, y las globulinas, solubles en soluciones diluidas de sal, son una mezcla de componentes de bajo peso molecular, algunos de los cuales son enzimas. La mayoría son de menor peso molecular que las gliadinas (20000-30000).

\* **Proteínas Poliméricas**: Están compuestas por tres grupos, las gluteninas, las albúminas de alto peso molecular y las triticinas.

- a) Gluteninas: Forman la mayor proporción de las proteínas poliméricas, sobre el 85%. Son similares a las gliadinas en cuanto a composición química. Están formadas por dos grupos, subunidades de gluteninas de alto peso molecular (80000-120000) y subunidades de gluteninas de bajo peso molecular (40000-55000).
- b) Albúminas de alto peso molecular: Son las siguientes en abundancia de las proteínas poliméricas. Son principalmente  $\beta$ -amilasa.
- c) Triticinas: Son proteínas tipo globulinas.

**GLUTEN:**

El gluten es el principal componente del trigo y es el responsable final de muchos alimentos. Específicamente, las aplicaciones del gluten son:

- Panificación: se utiliza para incrementar la fuerza de la harina.
- Pastas: la adición de gluten de trigo aumenta la resistencia a la cocción de las pastas, mejora la firmeza del producto cocido y refuerza el contenido proteico.
- Embutidos: se emplea como aglutinante y homogeneizador en los embutidos crudos y cocidos de carne o pollo.
- Productos dietéticos: es utilizado como sustituto proteicos de los carbohidratos en los regímenes dietéticos.
- Otros usos: cereales para desayuno, “carne vegetal”, alimentos para animales domésticos, dietas para peces,...

El gluten de trigo posee un color amarillento y su sabor es suave respecto del trigo. Este producto se caracteriza por ser insoluble en agua. Sus propiedades de absorción de agua, viscoelasticidad y termocoagulación lo diferencian de cualquier otra proteína vegetal.

Las proteínas de reserva del trigo son únicas en muchos aspectos, y para su estudio, se clasificaron en un principio mediante el clásico proceso de fraccionamiento secuencial de Osborne en 1907, basado en la solubilidad diferencial de las proteínas de cereales y utilizado para separarlas en cuatro grupos principales: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. De éstas, las albúminas son solubles en agua; las globulinas solubles en soluciones salinas diluidas; las prolaminas son solubles en soluciones acuosas alcohólicas y las glutelinas en ácidos o álcalis. Las albúminas y globulinas son eliminadas en el proceso de extracción del almidón. Las prolaminas y glutelinas del trigo reciben el nombre específico de gliadinas y gluteninas, respectivamente, y forman el gluten de trigo.

Las gluteninas de alto peso molecular son el componente minoritario en cantidad, pero el factor clave para determinar la elasticidad del gluten (Guerrieri, 2004).

Para entender la estructura del gluten se han propuesto diferentes modelos. “El modelo del enredo” propuesto por MacRitchie (1999) está inspirado en la teoría de los polímeros. Éste sugiere que los polímeros de glutenina pueden ser descritos como una cadena de polímeros enredados. Los agregados covalentes pueden unirse a través de enredos físicos. La cantidad está relacionada con la estructura, tamaño y concentración de los polímeros. La atención en el tamaño de los polímeros de gluten ha provocado que se investigue el cálculo de la distribución de tamaños de moléculas de los macropolímeros usando técnicas como electroforesis del gel, flujo de campo libre y dispersión ligera. La estructura de la cadena de gluten es una superimposición de enlaces covalentes e interacciones no covalentes. Los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones electrostáticas son relativamente débiles, pero juntas tienen una gran fuerza.

El tamaño de los polímeros de glutenina aumenta mucho calentando, por ejemplo a 50°C, mostrando una reorganización de los enlaces covalentes entre las subunidades de gluteninas y las gliadinas posiblemente. Entre 10 y 50°C se puede observar la variación de los enlaces intermoleculares de baja energía. En torno a esta temperatura, el intercambio sulfhidrilo-disulfido provoca un aumento de tamaño de las gluteninas. El calentamiento de las gluteninas y de las gliadinas ha provocado una disminución en el contenido de  $\alpha$ -hélice. Comparándolas con las proteínas globulares, las prolaminas tienen un alto grado de movilidad cuando están hidratadas. Lo primero que provoca la desnaturalización por calentamiento es una mayor solubilidad, el doble para los residuos de glutamina. No hay transición desde un estado plegado hasta un estado desnaturalizado de la proteína globular. Una primera transición se puede ver a 45°C, donde aparece una mayor hidrofobicidad, la modificación estructural inducida a esta temperatura provoca un descenso de la fuerza de interacción entre las gluteninas y las gliadinas.



**- Relación estructura-propiedades funcionales:**

a).- Adsorción (Örnebro y col., 1999):

Las proteínas del gluten tienen una inherente anfifilicidad que es usada en numerosas aplicaciones relativas a emulsiones, espumas, estabilización de emulsiones, ... Las fuerzas que conducen a la mejor adsorción de las proteínas son el aumento de la entropía conformacional de las proteínas, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones de Coulomb. Aunque el interior de las proteínas globulares está densamente empaquetado, sólo son estables aisladas a temperatura ambiente. Así, sólo pequeños cambios en la estructura de las proteínas, proporcionados por cambios en el medio, puede perturbar el delicado equilibrio entre las fuerzas intermoleculares.

La adsorción desde la disolución concentrada está restringida a la fracción de proteína soluble en agua. Incluso la estabilidad de las espumas no es importante a lo largo del tiempo. Esta fracción juega un papel importante en la estabilidad de las burbujas de aire que se forma inicialmente durante el proceso de mezclado.

b).- Solubilidad (Day y col., 2006):

Mientras que la naturaleza insoluble del gluten es una cualidad considerable en aplicaciones tradicionales de este ingrediente los productos de panadería y bollería donde es esencial por sus propiedades estructurales, esta insolubilidad es importante para otras muchas aplicaciones. Esto es porque la solubilidad es a menudo un requisito previo para una buena hidratación y adsorción de agua, viscosidad, gelificación, capacidad espumante y estabilización de espumas, y las propiedades emulsionantes que son necesarios en ingredientes proteínicos. Por otro lado, cuando un ingrediente es usado en un sistema líquido que se procesa en caliente, es necesario que los ingredientes tengan una estabilidad adecuada en caliente para permitir que se procese en caliente sin coagulación o excesivo espesado.

#### 2.5.1.2.5 PROTEÍNAS DE LEGUMINOSAS: SOJA:

Las proteínas de las semillas de las legumbres, incluida la soja, son albúminas y globulinas. Las globulinas, las mayoritarias, entre el 50-90% de las proteínas de semilla. Las globulinas están agrupadas en dos tipos dependiendo de su coeficiente de sedimentación: globulinas 7S y globulinas 11S.

Las **globulinas 7S** de la soja están clasificadas en tres fracciones mayoritarias dependiendo con diferentes propiedades físico-químicas, denominadas  $\beta$ -conglucina,  $\gamma$ -conglucina y globulinas 7S básicas. Las  $\beta$ -conglucinas es la que se encuentra en mayor cantidad, entre el 30 y el 50% del total de las proteínas de la semilla. Ésta es una proteína tipo vicilin, que se encuentre en semillas leguminosas y no leguminosas. Las  $\gamma$ -conglucina y globulinas 7S básicas se encuentran en menor porcentaje.

Las globulinas 7S básicas tienen un punto isoelectrico mayor que el de las demás especies. Su masa molecular es de 168 kDa y están compuestas por cuatro subunidades consistentes en un polipéptido de alto peso molecular y un polipéptido de bajo peso molecular, las cuales están unidas por puentes disulfidos.

Las  $\gamma$ -conglucinas son glicoproteínas y tienen una masa molecular de 170 kDa, están compuestas de tres subunidades idénticas. La secuencia terminal de aminoácidos no es como la de otras globulinas.

Las  $\beta$ -conglucinas son una fracción con una masa molecular de 150-200 kDa. Están constituidas por cuatro subunidades identificadas: tres mayores  $\alpha'$  (72kDa),  $\alpha$  (68 kDa) y  $\beta$  (52 kDa) y una menor  $\gamma$  similar en tamaño a la  $\beta$ . La secuencia de aminoácidos de todas las subunidades es similar, aunque el grupo terminal de la subunidad  $\gamma$  está bloqueado.

Las **globulinas 11S** de las proteínas tipo leguminosas, están normalmente distribuidas en semillas leguminosas y no leguminosas y son generalmente proteínas simples, aunque hay algunas excepciones. Las globulinas 11S de la soja

es un hexámero con una masa molecular entre 300-380 kDa. Estas subunidades están compuestas por un polipéptido ácido con una masa molecular de 35 kDa y un polipéptido básico con una masa molecular de 20 kDa. Los polipéptidos ácidos y básicos están unidos por puentes disulfidos. Inicialmente un polipéptido simple es el precursor de la síntesis y procesado de los polipéptidos ácidos y básicos.

La glicina muestra polimorfismo en la composición de las subunidades entre los cultivos. Los cultivos de soja se han clasificado en cinco grupos de acuerdo a la composición de las subunidades de glicina por el focusín isoelectrico. Sin embargo, la secuencia de los aminoácidos de estas subunidades es diferente entre los cultivos. La glicina incluso muestra heterogeneidad molecular, y de ahí las especies moleculares con diferentes composiciones de subunidades y diferente masa molecular. Estas subunidades muestran diferentes comportamientos frente al calentamiento. Esto implica que la glicina muestre propiedades funcionales distintas. De hecho, la glicina de diferentes cultivos muestra propiedades funcionales diferentes.

El polimorfismo de la composición de subunidades y la heterogeneidad molecular de la glicina indica que la especificidad de la interacción de las subunidades para construir moléculas de glicina no es estricta.

Es conocido que los hexámeros de glicina se disocian en sus constituyentes polipéptidos y en medias moléculas bajo ciertas condiciones del medio como pH, fuerza iónica y temperatura.

**- Relación estructura-propiedades funcionales (Damodaran, 1997):**

a) Gelificación:

La habilidad para formar gel de las proteínas de soja es la propiedad funcional más importante usada en alimentación tradicional. Las dos globulinas glicina y  $\beta$ -conglucina tienen diferentes estructuras y propiedades gelificantes. Las propiedades gelificantes de la glicina y de la  $\beta$ -conglucina han sido investigadas

individualmente, mientras la interacción entre ambas ha sido investigada en sistemas mezclados como la proteína de soja aislada.

En un sistema mezclado como una proteína de soja aislada, la gelificación está influenciada por la interacción de los componentes individuales.

Babajimopoulos et al. han demostrado que la proteína de soja aislada muestra mejores propiedades gelificantes a 80°C que las fracciones constituyentes de la proteína individualmente.

b) Propiedades emulsionantes:

La proteína de soja actúa como un tensioactivo macromolecular para estabilizar emulsiones aceite en agua en productos alimentarios. De todas formas, la importancia comercial de la soja en cuanto a sus propiedades como emulsionante es baja en comparación con la que presentan sus propiedades gelificantes.

La diferencia sustancial entre la  $\beta$ -conglucina y la glicina en su tendencia a bajar la tensión interfacial puede atribuirse a las propiedades químicas y estructurales de estas proteínas. La  $\beta$ -conglucina es más hidrofóbica y tiene menor masa molecular que la glicina. Esto provoca que haya un mayor número de grupos hidrofóbicos en la superficie, pudiendo la  $\beta$ -conglucina adsorberse a la interfase más rápidamente que la glicina. Además, los cambios conformacionales de la glicina en la interfase son lentos debido a los enlaces disulfidos existentes entre las subunidades. La repulsión entre las moléculas cargadas en las cercanías de la interfase puede también retardar la adsorción de la glicina debido a su alta carga negativa.

Los estudios de la tensión interfacial y de la reología interfacial sugieren que la  $\beta$ -conglucina tiene mejores propiedades emulsionantes y estabilizantes que la glicina.

### 2.5.1.2.6 PROTEÍNAS DE HUEVO: OVOALBÚMINA:

El huevo es un alimento considerado proteico por la cantidad y calidad de sus proteínas, si bien contiene una cantidad de grasa fosforada y colesterol, aunque está prácticamente exento de hidratos de carbono.

En el huevo se distinguen físicamente dos componentes principales: clara y yema. La composición del huevo se detalla en la siguiente tabla:

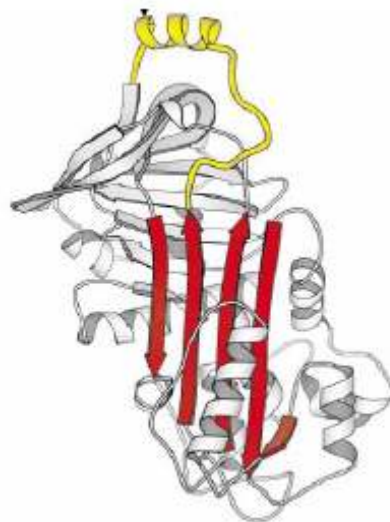
Clara	Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Muy alto valor biológico; se toman como tipo de proteína completa.</li> <li>— Son glicoproteínas y fosfoglicoproteínas.</li> <li>— Mayoritarias las albúminas (fosfoglicoproteínas).</li> <li>— Coagulan por el calor. Gran poder gelificante.</li> <li>— Gran poder espumante.</li> <li>— Una glicoproteína minoritaria (avomucina) inhibe la tripsina; la clara de huevo cruda dificulta la digestión.</li> <li>— La avidina fija biotina y puede dar síntomas carenciales.</li> </ul>
	Azúcares	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Principal: glucosa.</li> <li>— Con aminoácidos da pardeamiento de Maillard en huevo líquido concentrado o deshidratado.</li> <li>— Se elimina fermentándola con levadura u oxidándola con glucosa oxidasa.</li> </ul>
Yema	Plasma	<p>Muy alto valor biológico.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— Microglóbulos en suspensión, muy ricos en glicéridos, con un núcleo graso, recubierto por una membrana de proteína y lecitinas; glóbulos parecidos a los de la leche. Muy alto contenido en colesterol, azúcares, glicoproteínas, sales y vitaminas. Emulgente. Gelificante.</li> </ul>
	Gránulos	<p>Muy alto valor biológico.</p> <p>Lipoproteínas formadas por proteínas más fosfolípidos.</p> <p>Fosfoglicoproteínas con muchos grupos de serina esterificadas con ácido fosfórico. El contenido en fósforo es muy elevado.</p> <p>Gran poder emulgente. Gelificante.</p>
Grasas	<p>Están en la yema: el plasma es rico en glicéridos y los gránulos en fosfolípidos.</p> <p>El 60% de los ácidos grasos son insaturados.</p> <p>En el huevo deshidratado la grasa se enrancia a la luz y al aire.</p> <p>Es una de las grasas con mayor proporción de colesterol.</p>	
Vitaminas	<p>Tocoferoles, vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, pantoténico y fólico.</p> <p>El color amarillo de la yema se debe a carotenoides; algunos de ellos son provitaminas A.</p>	
Minerales	<p>Muy alta proporción de P, por las fosfoproteínas de la yema.</p> <p>Aportación importante de Ca, K y Fe.</p>	
Derivados	<p>Líquidos pasterizados.</p> <p>Concentrados por ósmosis inversa.</p> <p>Congelados.</p> <p>Deshidratados (huevo en polvo).</p>	

Las proteínas de la clara de huevo entran dentro de la definición de glicoproteínas, que son proteínas que llevan enlazados contenidos diversos de glúcidos a la cadena de aminoácidos. Entre éstas, la más abundante es la ovoalbúmina, que es una fosfoglicoproteína.

La ovoalbúmina es la principal proteína de la clara de huevo y la que le da sus propiedades características junto con la glicoproteína, aunque existen otras no presentes en cantidad apreciable como se muestra en la siguiente tabla:

Proteínas	% del total	Contenidos
Ovalbúmina	aprox.60	fosfo-glico-proteína
Conalbúmina (Ovotransferrina)	aprox.12	glicoproteína
Ovomucoide	aprox.10	glicoproteína
Ovomucina	aprox.2	glicoproteína
Varias globulinas	aprox.12-15	(30% de glúcidos)

La ovoalbúmina es por lo tanto una fosfoglicoproteína de 385 restos de aminoácido con un peso molecular aproximado de unos 42,5 KDa. Es una proteína de referencia en bioquímica y es conocida en la industria alimentaria por sus propiedades como transportadora, estabilizadora y formadora de emulsiones. Se desnaturaliza por calor a los 78°C perdiendo su estructura replegada de albúmina y produciendo un gel con gran retención de agua.



Ovoalbúmina

La ovoalbúmina cambia con el tiempo hacia una estructura ligeramente diferente denominada S-ovoalbúmina de propiedades algo diferente a la original. En primer lugar, la clara aparece más fluida y deformable y se pierde en cierta medida la capacidad de formar espumas. Por otra parte, la temperatura de desnaturalización de la S-ovoalbúmina asciende a los 86°C. Este cambio coincide con una apreciación de degradación en la calidad del huevo por el consumidor.

Este cambio lleva unos días, pero se puede decir que cuando el huevo está al alcance del consumidor ya se ha producido este cambio. La velocidad depende mucho de las condiciones, pero digamos que se puede inducir in vitro en 20 horas manteniendo la ovoalbúmina a 55°C a pH 10 en una disolución 100 mM de fosfato sódico.

Por otra parte, conviene señalar, respecto a las otras proteínas que el ovomucoide es inhibidor de tripsina, por lo que la clara cruda dificulta la digestión. La avidina, que está en muy baja proporción (0,05%), liga biotina y produce síntomas carenciales cuando se ingiere clara de huevo cruda. La avidina se desnaturaliza por la cocción y pierde esa actividad.

**- Relación estructura-propiedades funcionales (Damodaran, 1997):**

a) Gelificación:

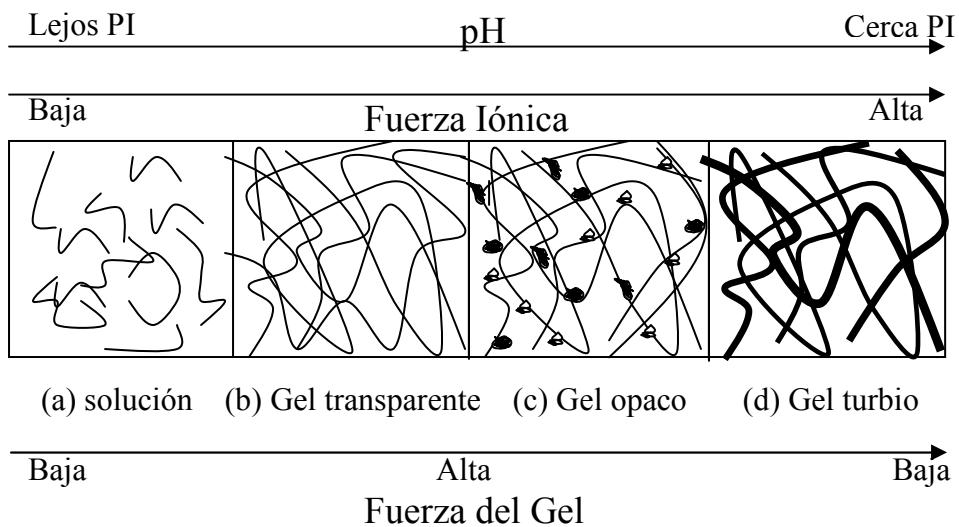
El mecanismo por el cual se forma el gel de proteínas globulares, como la ovoalbúmina, es diferente del de las proteínas fibrosas.

La clara de huevo es un líquido viscoso transparente, pero después de calentarlo cambia a un gel turbio. El término “clara de huevo” podría ser derivado de este fenómeno. Normalmente el calentamiento de una solución de ovoalbúmina resulta en una suspensión o gel turbio, sin embargo, bajo ciertas condiciones de solución y calentamiento resulta una solución o gel transparente. La turbidez de la solución de ovoalbúmina depende del pH, de la fuerza iónica y de la concentración de proteína. La turbidez aparece cuando el pH está cercano al punto isoeléctrico. A pH ácido y básico se forman soluciones y geles transparentes.

En general, los geles tipo coágulo se caracterizan por agregados de proteína que se obtienen durante el calentamiento por interacciones proteína-proteína. Los geles o soluciones transparentes contienen agregados lineales, mientras los geles turbios o suspensiones contienen agregados aleatorios.

Estos estudios indican que la estructura secundaria de la ovoalbúmina desnaturalizada por calentamiento no es muy diferente de la molécula nativa, pero algunas de las áreas hidrofóbicas estaban ocultas en la molécula nativa, llegando a exponerse después del calentamiento. Las interacciones entre moléculas de ovoalbúmina desnaturalizadas por calentamiento, que están aún en forma globular, están controladas por las interacciones hidrofóbicas atractivas y electrostáticas repulsivas. Cuando las repulsiones electrostáticas son relativamente fuertes y las atracciones hidrofóbicas están restringidas, las moléculas de ovoalbúminas desnaturalizadas forman agregados lineales solubles. Este tipo de agregados se forma cuando al ovoalbúmina se calienta a pH lejano al punto isoeléctrico de la proteína y a baja fuerza iónica. Bajo estas condiciones las moléculas de proteína cambian y las repulsiones electrostáticas entre ellas son significativas. A alta concentración de proteínas los agregados lineales solubles están dispuestos en cadenas cruzadas y forman un gel tridimensional. En estas condiciones no hay muchos agregados aleatorios y el gel se presenta transparente. Cuando la concentración de proteína es baja, no se forman geles.

Las estructuras de los distintos tipos de geles se muestra en la siguiente figura:



b) Desnaturalización y propiedades espumantes:

La clara de huevo es un ingrediente formador de espumas importante para aplicaciones en alimentos. Las propiedades espumantes de las proteínas se



evalúan según la formación y la estabilidad. Las propiedades espumantes de las proteínas difieren de los métodos por los cuales se forman las espumas. La espumabilidad se relaciona con la velocidad a la cual la tensión superficial de la interfase aire/agua disminuye, mientras la estabilidad de las espumas se relaciona con la estructura de la superficie de la proteína desnaturizada. La formación es representada cuantitativamente por la velocidad constante de decaimiento de la tensión superficial, y ésta está representada por la viscosidad superficial. La tendencia a formar espumas de la ovoalbúmina es relativamente baja y esta formabilidad disminuye por tratamiento ácido, alcalino o por desnaturización por calentamiento. La proteína tiene una estructura flexible y anfipática, puede cambiar su conformación en la interfase aire/agua. Algunas proteínas globulares aparecen desdobladas orientando su área hidrofóbica hacia el aire, bajando de esta manera la energía superficial del sistema. Esta desnaturización superficial de las proteínas en la interfase aire/agua, puede inhibir la actividad de algunos enzimas. Normalmente la tensión superficial de las soluciones de proteínas globulares disminuye de forma continua a lo largo del tiempo, esto es causado por los cambios lentos en la conformación y por la reorientación lenta de los grupos de la proteína hacia la interfase. La desnaturización superficial de la ovoalbúmina se detecta por un aumento en la reactividad de los grupos sulfhidrilos.

### **2.5.2 MEZCLAS DE EMULSIONANTES.**

La formación de emulsiones y la estabilidad en la mayoría de los alimentos están muy ayudadas por la presencia de proteínas, que durante el proceso de emulsificación y creación de nuevas superficies, tienden a adsorberse en la interfase aceite/agua (O/W).

Una vez adsorbida, la proteína sufre desdoblamiento y reordenación en la interfase; las moléculas interaccionan unas con otras vía hidrofóbica, por puentes de hidrógeno, por interacciones de Van der Waals, por interacciones iónicas y por formación de película viscoelástica. Sin embargo, las proteínas no son los únicos agentes superficiales que componen los sistemas alimentarios; típicamente contienen varios agentes superficiales de bajo peso molecular de forma natural o que son añadidos intencionadamente, que competirán por adsorberse en la

interfase O/W. Esto puede resultar en interacciones cooperativas con las moléculas de proteína adsorbidas o en el desplazamiento de las mismas desde la interfase, que podría causar la desestabilización de la emulsión.

Así mismo, si otros biopolímeros están presentes en la fase acuosa, las interacciones de éstos con las proteínas, o incluso con los emulsionantes de bajo peso molecular, puede conducir a cambios importantes en la interfase o en el seno de la fase acuosa, que contribuyan significativamente a la estabilidad o inestabilidad del sistema final. Los resultados son muy dependientes de la existencia o no de cargas eléctricas en cada uno de los componentes implicados en el sistema.

#### **\* INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA.**

La organización estructural de los complejos lípido-proteína en sistemas biológicos es muy diferente de los formados en el procesado de productos alimenticios. Sin embargo, las características fisico-químicas de las interacciones lípido-proteína que ocurren en alimentos como resultado de calentamiento, mezcla, etc..., son de la misma clase que las responsables de la estabilidad y funcionamiento de los sistemas vivos.

La mayoría de las fuerzas involucradas en las interacciones proteína-lípido y proteína-activadores del sabor son similares a las responsables del plegado de la proteína (Chobert, J-M. y Haertlé, T., 1997). Así, las interacciones entre lípidos y proteínas pueden modificar o interferir en la formación de la estructura inicial de la proteína, como ocurre cuando las proteínas son transferidas desde la fase acuosa a la fase lípida. La mayoría de las membranas proteicas pierden sus plegamientos, actividad o función estructural una vez que son desplazadas de la bicapa lipídica a la fase acuosa. Usualmente se desnaturalizan irreversiblemente cuando se mueven de su medio nativo.

Uno de los métodos más comunes para proporcionar estabilidad a las emulsiones de leche es la adición de varios tipos de surfactantes, como mono- y diglicéridos. Los glicéridos adsorbidos sobre la superficie globular de la grasa

hacen disminuir la energía libre superficial y, consecuentemente, proporciona estabilidad contra la coalescencia. Puede ser interesante el estudio de las interacciones entre glicéridos y las proteínas de la leche cuando se usan juntos en la formulación de emulsiones de leche.

Se han estudiado las interacciones entre proteínas y lípidos en sistemas modelo. Para ello se ha usado cromatografía, resonancia o espectroscopia. Algunos de estos estudios se han enfocado particularmente en la influencia de la estructura de lípidos y proteínas en la interacción. Las proteínas con regiones hidrofóbicas encajadas en el interior de sus estructuras tridimensionales estaban menos unidas a los lípidos que las de regiones hidrofóbicas más accesibles. Aumentando la longitud de las cadenas hidrocarbonadas o disminuyendo el grado de insaturaciones del lípido se mejoran las interacciones entre lípidos y proteínas. Así mismo, las ligaduras de retinol en  $\beta$ -lactoglobulina sugieren la presencia de un lugar enlazante no polar. De esta manera, los resultados están en concordancia con la hipótesis de que las interacciones entre lípidos y proteínas fundamentalmente son de naturaleza hidrofóbica.

# OBJETIVOS

### **3. OBJETIVOS.**

En las formulaciones de muchos alimentos es necesario la adición de agentes tensioactivos que confieran estabilidad al sistema. El objetivo principal de este trabajo es evaluar nuevas aplicaciones de proteínas de distinto origen, animal y vegetal, como estabilizantes de formulaciones alimentarias del tipo emulsión y/o espuma. Para ello se hará una caracterización interfacial, empleando sistemas modelo y analizando cómo influyen variables como la composición, la fuerza iónica y el pH de la subfase acuosa, la temperatura y la presencia en el medio de un emulsionante de bajo peso molecular.

La adición de un emulsionante al sistema produce una disminución de la tensión superficial que puede determinarse mediante tensiómetros automáticos como los basados en el método de la placa Wilhelmy. Igualmente, la presencia en el sistema de sustancias que se adsorben en la interfase origina cambios en la tensión que pueden seguirse experimentalmente. Las sustancias que se sitúan en la interfase forman una película alrededor de las gotas dispersas manteniendo estable el estado de dispersión del sistema durante un intervalo de tiempo mayor. Tanto la estructura como la estabilidad de la película interfacial, dependen de las interacciones que las moléculas de emulsionante establecen entre sí y con los componentes de la disolución. Las modificaciones que se producen en la interfase debido a cambios en las condiciones del sistema, así como la existencia de interacciones entre diferentes componentes que presentan afinidad por la interfase, puede ser deducida, al menos cualitativamente, a partir de estas medidas de tensiometría.

En este trabajo se pretende caracterizar los valores de tensión superficial, en condiciones de equilibrio, de películas adsorbidas de proteínas en ausencia y en presencia de un emulsionante de bajo peso molecular, la monoestearina.

Para algunos de los sistemas estudiados, se determinará la cinética de adsorción de las moléculas de proteínas a partir de la variación en la tensión superficial con el tiempo, y se analizará la influencia que tienen sobre la misma

variables como la composición y el pH de la subfase acuosa, así como la temperatura.

En el último apartado se estudiará el comportamiento reológico de las películas de proteínas sometidas a procesos de cizalla de la interfase. Se establecerán las propiedades físicas de los fluidos implicados en la formación de la interfase, tales como su viscosidad y se estudiará el efecto sobre la reología interfacial de las proteínas en la interfase O/W, de variables como el pH de la fase acuosa, la presencia de monoglicérido y el tiempo.

# EXPERIMENTAL

## 4. EXPERIMENTAL.

Existen diversos métodos y técnicas experimentales para la determinación de las propiedades interfaciales. En el caso concreto de emulsiones y espumas, es de gran interés la determinación de la variación en los valores de tensión con el tiempo, así como el establecimiento de la tensión interfacial estática o de equilibrio en sistemas modelo, empleando técnicas de tensiometría. Por otro lado, el estudio de la reología interfacial puede aplicarse a la determinación de la tensión interfacial dinámica (es decir, cuando la interfase está sometida a procesos de cizalla), además de proporcionar información acerca de las capas adsorbidas en la interfase.

### 4.1 TENSÍOMETRO.

#### **Principio de funcionamiento:**

Para obtener directamente la medida de tensión superficial/interfacial de una sustancia que ocupa una superficie determinada se emplea un tensiómetro. El método de medida del tensiómetro usado consiste en determinar la fuerza de interacción de un cuerpo sumergido entre dos fases fluidas. Si uno de los fluidos es un gas se mide la tensión superficial, si son dos fases líquidas se trata de una tensión interfacial. Hay dos tipos de dispositivos normalmente usados, el anillo de Du Nouy y la placa Wilhelmy.

El anillo de Du Nouy es un anillo de platino suspendido horizontalmente; la placa Wilhelmy es una placa rugosa de platino, suspendida verticalmente cuyas dimensiones son conocidas.

El método de placa es más extendido y fiable para la obtención de tensiones interfaciales y ha sido el usado para obtener los resultados presentados en esta memoria.



Para realizar la medida, el borde inferior de la placa se pone en contacto con el líquido y es mojada (Fig 4.1). La fuerza (k) con la que es empujada la placa mojada hacia el líquido se puede medir. El valor de la tensión interfacial está directamente relacionado con el perímetro mojado de la placa mediante la expresión que relaciona el esfuerzo y la geometría del dispositivo:

$$\sigma = \frac{k}{L_b \cdot \cos \theta}$$

siendo:  $\theta$ : el ángulo de contacto, es decir, el ángulo entre la superficie de la placa y la tangente a la línea de mojado. Cuando el mojado es total dicho ángulo es cero.

$L_b$ : perímetro mojado ( $2L+2b$ )

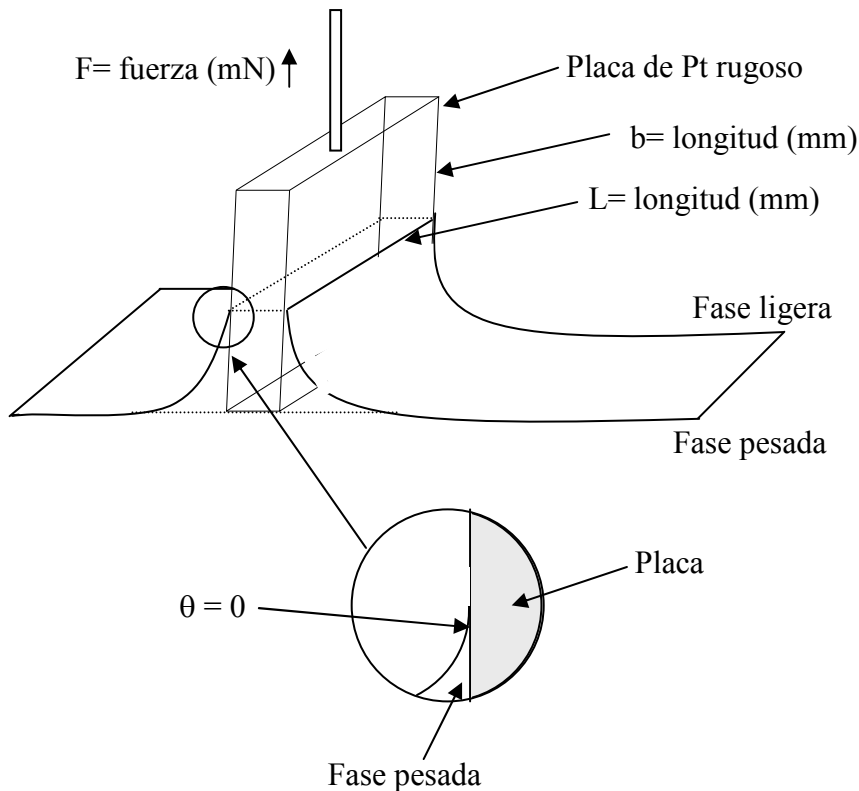


Fig 4. 1: Plato de Wilhelmy en posición de medida

**Dispositivo experimental:**

El equipo que se ha empleado para la realización de las medidas es un tensiómetro KSV Sigma 701 (Fig 4.2). Consta de un dispositivo de sección circular, de  $66 \text{ cm}^2$  de área, donde se introduce la muestra. Las dimensiones de la placa de platino son:  $L=19.6 \text{ mm}$  y  $b=0.1 \text{ mm}$  por lo que  $L_b= 39.4 \text{ mm}$ .

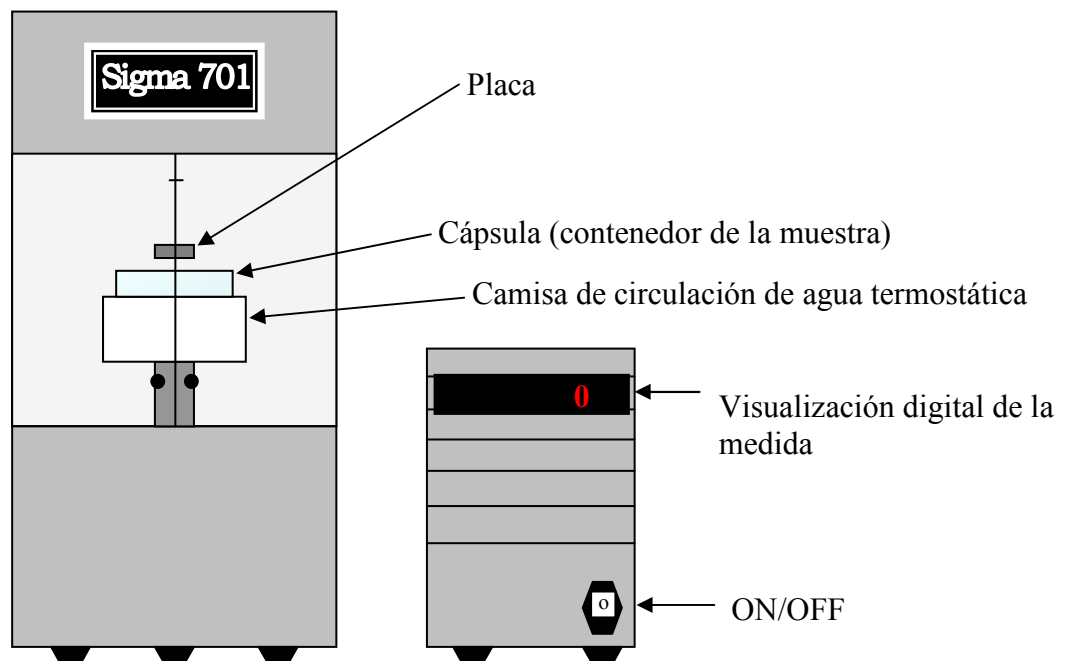


Fig 4. 2: Tensiómetro digital KSV sigma 701.

### **Medida de tensión superficial e interfacial:**

En primer lugar se activa la placa. Para ello, se sumerge en etanol para eliminar cualquier impureza que pueda contaminar la superficie, se lava con agua para eliminar el etanol y por último se flamea a la llama de un mechero Bunsen.

Para realizar la medida de tensión superficial se introducen aproximadamente 25-30 ml de disolución acuosa en la cubeta de medida a temperatura ambiente. Se ajusta el cero con la placa suspendida muy cerca del líquido. A continuación se comienza la medida automática, la plataforma que contiene la cubeta sube, la placa entra en contacto con el líquido, se moja una vez antes de medir y, cuando la placa está saliendo de la solución y justo en la superficie, se para y toma el valor de tensión, a continuación se sumerge 0,5 mm y comienza a tomar valores que va registrando el ordenador en una base de datos. La medida de la tensión interfacial se realiza de la misma manera sólo que el cero se hace con la placa sumergida en la fase ligera.

Las medidas se realizan varias veces para asegurar que el valor tomado es el correcto.

En aquellos sistemas en los que está presente una película de monoestearina, una vez analizada la tensión en ausencia de lípido, se esparce una cantidad fija de monoglicérido disuelto en un disolvente volátil con ayuda de una micropipeta y se mide la tensión 24 horas después del esparcimiento, cuando las moléculas de monoestearina han adoptado una conformación de equilibrio.

### **Medidas de cinética de adsorción:**

La cinética de adsorción de las proteínas sobre la interfase A/W se analiza a partir de los cambios de tensión superficial,  $\sigma$ , con el tiempo,  $\theta$ . El tiempo de adsorción comienza en el momento 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). La velocidad de cambio de la concentración puede expresarse mediante:

$$d\Gamma/d\theta = (d\Gamma/d\pi) \cdot (d\pi/d\theta)$$

Si  $d\Gamma/d\pi$  es constante,  $d\pi/d\theta$  puede usarse para evaluar la velocidad de adsorción.

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 representaciones de la presión superficial en función del tiempo, hasta que se alcanzan las condiciones estacionarias. La velocidad de incremento de la presión superficial está determinada por tres procesos consecutivos o concurrentes:

- 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 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.

Independientemente del tipo de interfase estudiada se han realizado medidas a diferentes temperaturas en el intervalo de 10 a 30°C. Para ello, se bombea continuamente agua desde un criostato/termostato hasta la camisa que rodea a la célula de medida. Las disoluciones acuosas se introducen en la célula de medida y se esperan 30 minutos para que se alcance la temperatura deseada para la operación, con el plato de medida en posición. La proteína se ha inyectado en la

fase acuosa después de que el valor de la tensión superficial de las disoluciones acuosas coincide con el de la literatura.

## 4.2 REÓMETRO.

### Principio de funcionamiento:

En la interfase entre dos líquidos inmiscibles o entre un líquido y un gas, existe una fase bidimensional que tiene conocidas propiedades reológicas, distintas de las que tienen ambas fases por separado (Edwards, D.A. y col., 1991). Se han desarrollado varios métodos para la investigación de la reología de esta fase interfacial (S-G. Oh y J.C. Slattery, 1978), uno de los cuales es un sistema cilíndrico con una concentración bidimensional similar a la estándar con un reómetro rotacional (Shotton, E. y col., 1971). Aunque los principios de este método fueron descritos hace algunos años, ha sido recientemente cuando se han comercializado reómetros rotacionales con suficiente sensibilidad para poder ser usados generalmente en este tipo de sistemas.

Al reómetro rotacional AR 2000 y al conector Smart Swap<sup>TM</sup> se le ha asignado un accesorio que le permite trabajar en estos principios. El accesorio interfacial consiste en una taza circular con una tapa desmontable y un bicono fino, tal y como se muestra en la figura 4.3.

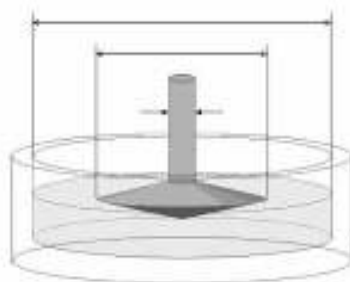


Fig 4. 3: Bicono

Para reducir los inertes químicos y el efecto menisco, debido a la tendencia del líquido al mojado del material del que están fabricados los útiles, tanto la cubeta como la tapa están fabricadas en poliuretano, PTFE, y el bicono de acero inoxidable. Es importante que la cubeta y el disco estén alineados concéntricamente, y la base con la conexión Smart Swap™ en la cual se asienta la cubeta para asegurarla.

Normalmente la cubeta se llena la mitad con el fluido más denso y la otra mitad hasta la superficie con el menos denso. El disco es situado en la interfase de los dos fluidos. En el centro de la cubeta se ha inscrito una ligera marca para indicar cuando está llena a la mitad, como se indica en la figura.



**Fig 4. 4:** Cubeta donde se llevan a cabo las medidas.

#### **Dimensiones:**

- Cubeta:
- Profundidad: 45 mm
  - Radio: 40 mm
  - Volumen: 226 cm<sup>3</sup>
  - Material: PTFE

- Bicono:
- Radio del disco: 34 mm
  - Ángulo del bicono: 10°
  - Inercia: 20,3 μNm s<sup>2</sup>
  - Material: BS970-303 S31 acero inoxidable.

El gap del bicono con la taza medio llena: 19500  $\mu\text{m}$ . Se denomina gap a la posición que adopta el bicono que además coincide con la posición de la interfase o con la mitad de la taza.

Las experiencias se han llevado a cabo a temperatura ambiente.



**Fig 4. 5: Reómetro AR 2000.**

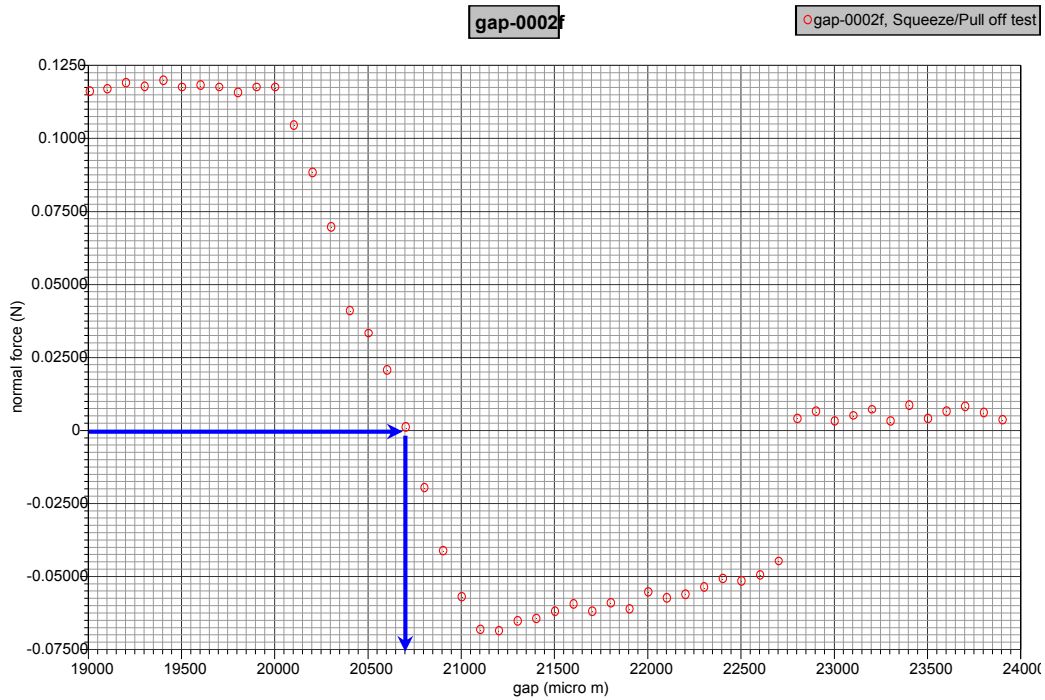
**Procedimiento experimental:**

Las medidas se han realizado, en todos los casos a temperatura ambiente, antes de comenzar a realizar medidas hay que someter el reómetro a calibración, para ello lo primero es marcar el cero del gap, que debe hacerse siempre que se cambie la geometría del sensor. Se coloca la taza en el conector y el bicono en el dispositivo destinado para el mismo. Con la taza vacía se baja el bicono hasta que los topes del mismo casi toquen la tapa y a continuación se programa el ordenador para que el programa del equipo busque el cero gap. En este momento y de manera automática el bicono sigue bajando hasta que el aparato detecta el fondo de la taza, se para y fija el cero en esa posición. A continuación se realiza la calibración de la inercia del bicono, es conveniente realizarla cada vez que se

instale la geometría, con sensor y sin muestra, es necesario corregir las oscilaciones que pueda tener el bicono debido a los giros que realiza durante la medida. Por último se realiza el calibrado del sistema sensor que varía de una geometría a otra y que puede ser rotacional u oscilatoria, ambos se realizan con sensor y sin muestra.

Para la realización de la medida, se llena la mitad de la taza, colocada en el conector, con el fluido pesado (disolución acuosa), se coloca el bicono situándolo en la mitad de la taza marcando el gap  $19500\mu\text{m}$ ; se llena la otra mitad de la taza con la fase ligera (disolución oleosa) con cuidado para evitar el mezclado de ambas fases. Se cierra la tapa y si es necesario se añade más aceite hasta que supere el hueco anular entre la tapa y el sensor. Antes de comenzar la realización de las medidas de viscosidad hay que fijar el punto en el que se encuentra el gap real del sistema. Para ello se ha situado el bicono en el gap de  $19500\mu\text{m}$ , para lo cual el aparato comienza a bajar el bicono por compresión registrando en una gráfica datos de esfuerzo normal (N) frente a gap ( $\mu\text{m}$ ). El bicono se para cuando alcanza un gap de  $24000\mu\text{m}$  (parte superior de la taza). En la gráfica se comprueba cuando el esfuerzo normal se hace cero, es en ese momento cuando el bicono se ha situado en la interfase como se muestra en la figura.





**Fig 4. 6: Gráfica de esfuerzo normal vs gap. Determina en que punto se encuentra la interfase**

Por último se coloca el bicono en el gap real calculado, se fijan los parámetros de medida y se procede a la obtención de datos.

Antes de realizar medidas de viscosidad interfacial hay que determinar la contribución de ambos fluidos, para ello el procedimiento de medida es el mismo sólo que se llena la taza de un solo fluido.

Los resultados obtenidos son datos de viscosidad aparente, hay que corregirlos para transformarlos en valores de viscosidad real. Para ello se ha trazado una gráfica con el factor de corrección para el aceite de girasol y se ha obtenido un valor numérico que relaciona ambas viscosidades, con lo cual los datos obtenidos sólo hay que multiplicarlos por el factor de corrección y se tienen datos de viscosidad real.

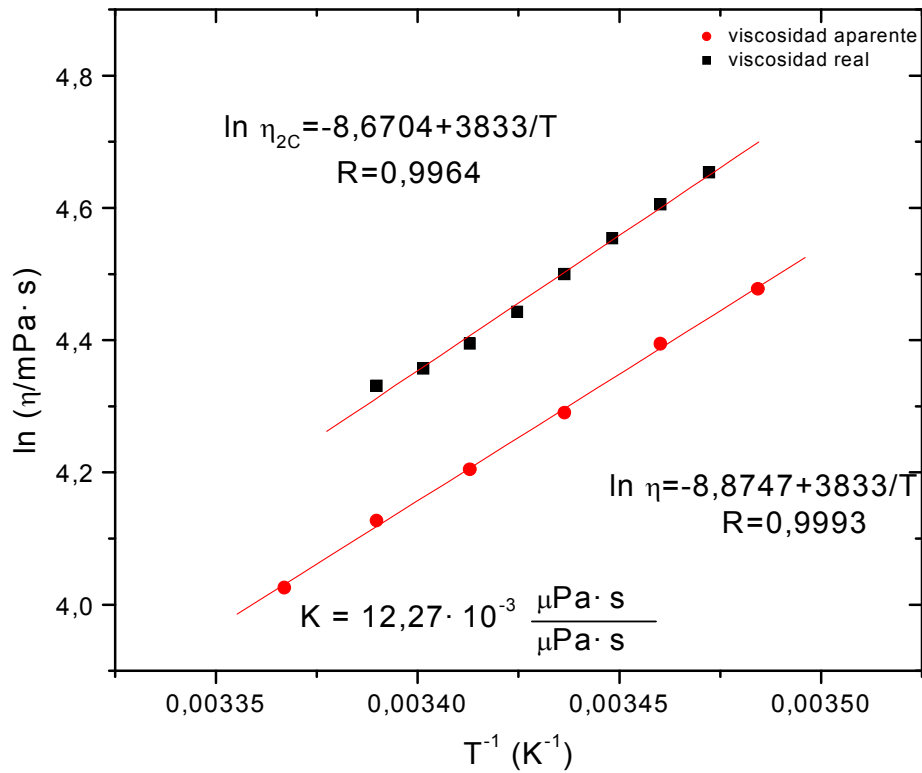


Fig 4. 7: Factor de corrección del aceite de girasol.

Los datos que se obtienen del reómetro hay que corregirlos para obtener los datos de viscosidad interfacial. Estos datos se corrigen respecto al torque de las fases individualmente:

$$\text{Torque}_{\text{subfase}} = (\text{Torque}_{\text{aceite}} + \text{Torque}_{\text{agua}})/2$$

$$\text{Torque}_{\text{interfase}} = \text{Torque}_{\text{total}} - \text{Torque}_{\text{subfase}}$$

$$\sigma_{\text{interfacial}} = 118,57 \cdot \text{Torque}_{\text{interfase}}$$

$$\eta_{\text{interfacial}} = \sigma_{\text{interfacial}} / \dot{\gamma}$$

### 4.3 DESCRIPCIÓN DE LOS PRODUCTOS EMPLEADOS.

1.- Fase acuosa: como subfases acuosas, se han empleado soluciones de  $\beta$ -lactoglobulina, gluten, soja y ovoalbúmina a distintas concentraciones y pH.

En todas las disoluciones se ha empleado agua desionizada, sometida a un sistema de purificación por filtración y cambio iónico del tipo Millipore, modalidad Mille Q<sup>TM</sup>, por ser el agua de menor actividad superficial. Además, es posible estandarizar su calidad mediante la medida de la resistividad (18  $\mu\Omega$ .cm) para las experiencias realizadas.

El resto de los solutos añadidos a la subfase son todos de grado analítico, han sido de la firma Merck y utilizados sin posterior purificación. A continuación se especifica la naturaleza y pureza de los solutos empleados, así como las concentraciones de las disoluciones a las cuales se han estudiado:

♣  $\beta$ -Lactoglobulina de leche bovina, liofilizada, de la firma Sigma. Las disoluciones de proteínas se realizan en una mezcla de trizma . A partir de ésta por diluciones se obtienen el resto de concentraciones de proteína deseadas. Se recomienda dejar un periodo de 24 horas desde la preparación de la disolución concentrada hasta la preparación de las diluidas y por lo tanto su medida, con el fin de asegurar la homogeneización y estabilización de la disolución.

♣ Gluten: Se ha empleado gluten de nombre comercial Glutenflor Supervital, comercializada por Riba, S.A. (Barcelona, España). La ficha técnica se puede resumir en el siguiente cuadro:

#### **GLUTENFLOR SUPERVITAL: Ficha Técnica**

##### ESPECIFICACIONES

Humedad	máx. 8%
Materia Proteica	mín. 83%
Partículas superiores a 200 micras	1% máx.

Cenizas	0,7 ó 0,8%
Lípidos extraíbles	1,5 a 2%
Absorción de agua	160%
pH	5,0-6,7
Residuo sobre 100 micras	15 a 17%

#### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Gérmenes totales	50 000/g máx.
Levaduras/mohos	500/g máx.
Coliformes	100/g máx.
E. Coli	Ausencia en 1g.
Salmonella	Ausencia en 25g.

♣ Soja: Se ha empleado soja de nombre comercial “Supro 500E”. La ficha técnica puede resumirse en el siguiente cuadro:

#### **SUPRO 500E: Ficha Técnica**

#### ESPECIFICACIONES

Humedad	máx. 6%
Materia Proteica	mín. 90%
Grasas	máx. 1%
Cenizas	máx. 4,5%
pH	6,9-7,3

#### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Aerobios	10 000/g máx.
Levaduras/mohos	100/g máx.
Coliformes	10/g máx.
E. Coli	Ausencia
Salmonella	Ausencia

♣ Ovoalbúmina: Se ha empleado albúmina de huevo en polvo, comercializado por Ovossec, S.A. (Valladolid, España). Se trata de un producto obtenido de clara de huevo de gallina tratada enzimáticamente con glucosa oxidada con catalasa para eliminar la glucosa. La clara de partida no ha sido

sometida a proceso de extracción por lisozima. Se obtiene por pasteurización a 56°C durante tres minutos y desecación a 90°C durante 25 segundos. La ficha técnica puede resumirse en el siguiente cuadro:

### **ALBÚMINA DE HUEVO EN POLVO: Ficha Técnica**

#### ESPECIFICACIONES

Humedad	máx. 8%
Materia Proteica	mín. 78%
Cenizas	máx. 6%
Azúcares Reductores	máx. 0,1%
pH	6,0-7,5
Ácido 3-OH-Butírico	10 mg/K máx. sss

#### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Aerobios	5 000/g máx.
Enterobacterias	100 col/g.
Salmonella	Ausencia/ 50 g.
St. Aureus	Ausencia/g.
Bacillus Cereus	menos 100/g.
Levaduras y mohos	menos 100 col/g.

2.-Fase oleosa: La fase ligera empleada en las medidas de viscosidad interfacial es aceite de girasol comercializado por la marca Koipesol.

3.-Tensioactivo: El tensioactivo empleado es un monoglicérido, 1-monoestearina (1-monooctadecanoil-rac-glicerol). Suministrada por Sigma, 99% pureza. Esta sustancia se esparce sobre la interfase, previamente disuelta, tanto para las experiencias de medida de tensión como para las reologías en un líquido portador.

El líquido portador de la monocapa debe cumplir una serie de requisitos: ser una sustancia muy volátil para que no quede retenido entre las moléculas de la monocapa, ser inerte al soluto y a la subfase, ser un buen disolvente del

tensioactivo, ser insoluble a la subfase y poseer una elevada pureza. Considerando todos estos requisitos se ha empleado como disolvente una mezcla de hexano:etanol, en proporción volumétrica 9:1. El etanol y hexano empleados como portadores de la monocapa, son de grado analítico, proceden de la firma Merck y se han empleado sin posterior purificación.

La concentración de disolución de monoglicérido se calcula teniendo en cuenta que la cantidad de sustancia esparcida sobre la superficie contenga el número de moléculas necesario para que el área esté totalmente cubierta por moléculas de monoestearina. Como norma general se deja transcurrir al menos un periodo de 24 horas desde la preparación hasta la utilización, con el fin de asegurar la homogeneización y estabilización de la disolución.

Es necesario tener especial cuidado para evitar la contaminación de las disoluciones y la evaporación del disolvente, para conocer exactamente la concentración de la disolución y así el número de moléculas esparcidas.

Para evitar esto se han seguido una serie de normas de preparación y conservación de la disolución:

- ♣ Guardar la disolución en recipientes de vidrio, que previamente han sido tratados con peroxodisulfato de amonio, para evitar cualquier resto de sustancia que interfiera en las medidas.

- ♣ Mantener la disolución a bajas temperaturas para que no se evapore el disolvente.

- ♣ Evitar cualquier contacto con sustancias que puedan ser alteradas por el disolvente.

#### **4.4 VARIABLES ESTUDIADAS.**

Tanto la tensión superficial como la cinética de adsorción están influenciadas por distintos parámetros, entre los que se destacan:

a).- Naturaleza de la fase acuosa:

Como subfase se han usado disoluciones acuosas de las distintas proteínas a valores de pH de 2,14; 4,00; 7,00 y 11,25; valores de fuerza iónica de 0,008; 0,016 y 0,032 y concentraciones de proteína de 0;  $10^{-4}$ ;  $10^{-3}$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$ ;  $10^{-2}$ ;  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1%.

Las proteínas estudiadas son de distinta naturaleza, tanto animal como vegetal.

En el estudio de la cinética de adsorción se ha contemplado también la influencia que ejerce la variación de la temperatura (10, 20 y 30°C).

b).- Presencia/ausencia de sustancias tensioactivas de bajo peso molecular:

Se estudia la influencia que ejerce sobre el valor de la tensión la presencia o no del tensioactivo. Se ha elegido como surfactante de bajo peso molecular un monoglicérido, la 1-monoestearina, ampliamente utilizada en formulaciones alimentarias.

#### **4.5 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Se sigue el mismo procedimiento para la preparación de las muestras de las distintas proteínas que se estudian en este trabajo.

Se han realizado una serie de experiencias previas que consisten en el estudio de la estabilidad de las disoluciones de proteínas preparadas a distintos pH.

Debido a la inestabilidad de las disoluciones a pH neutro y ácidos, se realiza la disolución a pH básico (11,25) y se modifica el pH de la disolución final con mezclas de NaOH y HCl (2M).

El procedimiento a seguir es añadir la cantidad necesaria de proteína al agua desionizada a la que se le modifica el pH con NaOH 2M hasta 11,25. La mezcla se tiene durante 1h en un agitador magnético a una velocidad de 1200 rpm. Pasado este tiempo se la añade la azida sódica y se sigue agitando durante 5 min. Cuando se tiene preparada la disolución “madre”, se esperan 24 h antes de preparar las disoluciones a otros pH para permitir que la disolución se estabilice y homogenice.



RESULTADOS  
EXPERIMENTALES Y  
DISCUSIÓN

## **5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.**

En este apartado se analizan las propiedades interfaciales de películas de distintas proteínas (gluten, soja y ovoalbúmina), así como de sus mezclas con monoestearina, en términos de valores de la tensión interfacial y de las propiedades reológicas, en función de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa y de factores externos como el pH o la fuerza iónica. A partir de los resultados, se intentarán establecer conclusiones acerca de la naturaleza y estabilidad de la capa interfacial para cada uno de los sistemas estudiados, así como de las interacciones existentes en la misma.

### **5.1. MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL.**

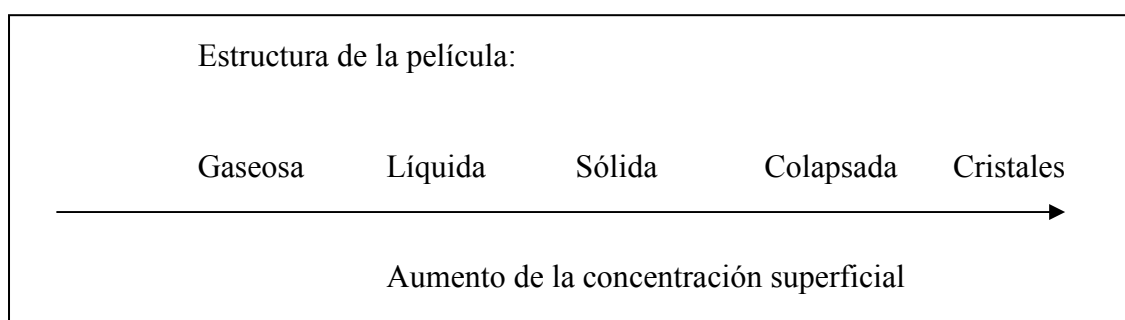
#### **5.1.1. EXPERIENCIAS PREVIAS.**

Antes de comenzar el estudio de la influencia que la presencia de proteína tiene sobre los valores de la tensión superficial, se ha determinado el efecto sobre dichos valores de los cambios en la concentración de monoglicérido. Este estudio va a permitir seleccionar las características de la película de lípido a esparcir en todas las experiencias.

Por otro lado, se ha estudiado la variación de la tensión superficial en función de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, para las películas adsorbidas de  $\beta$ -lactoglobulina y sus mezclas con monoestearina, empleando una proteína de calidad analítica. La ausencia de impurezas en la proteína empleada y el conocimiento previo de la misma del que se dispone, debido a trabajos realizados con anterioridad y a que está bien documentada en la bibliografía (Pessen y col., 1985; Papiz y col., 1986; Monaco, M. y col., 1987; Courthaudon, J.L. y col., 1991; Leenhouts y col., 1997; Baeza, R. y col., 2004; Baeza, R. y col., 2005) ayudará a establecer el comportamiento en la interfase del resto de los sistemas proteicos aquí estudiados.

### Concentración superficial de monoglicérido.

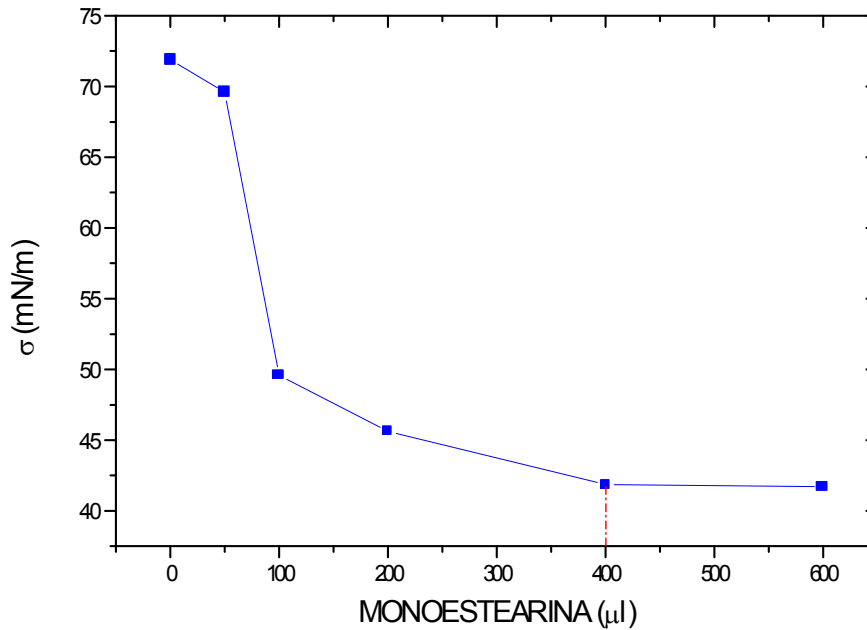
Como monoglicérido tensioactivo se ha elegido la monoestearina. El monoglicérido se esparce directamente desde la disolución hexano:etanol (9:1) sobre la interfase aire/agua. Un aumento de la concentración superficial de monoestearina tiene como consecuencia la formación de películas cada vez más condensadas, llegándose al estado no estable desde el punto de vista termodinámico de formación de cristales en la interfase o bien de formación de multicapas.



**Fig 5.1.1: Estructura de la película superficial en función de la concentración.**

Para el estudio que nos concierne, es necesario que la interfase se encuentre totalmente ocupada por las moléculas de monoglicérido, si bien, no es deseable que las interacciones entre ellas sean tan elevadas como para evitar la penetración de otras moléculas con carácter tensioactivo y el establecimiento de nuevas interacciones.

En la figura 5.1.2 se muestra la variación de la tensión, en la interfase aire-agua, en función del volumen de disolución patrón de monoestearina añadido. Como puede observarse en la figura, un aumento de la cantidad de monoestearina esparcida por encima de 400  $\mu\text{l}$  de disolución patrón, no disminuye el valor de la tensión superficial. Para 400  $\mu\text{l}$  de disolución patrón la superficie está totalmente cubierta, y a partir de esta cantidad se está saturando.



**Fig 5.1.2:** Variación de la tensión superficial de la interfase aire-agua en función del volumen de disolución patrón de monoestearina añadido.

Por todo lo anteriormente expuesto, en todas las experiencias se esparcirá una cantidad de monoglicérido tal que la concentración de monoestearina presente en la interfase proporcione un valor de tensión superficial igual al del equilibrio de la misma. Puesto que se ha tomado una disolución patrón de monoestearina en la mezcla hexano:etanol con una concentración de  $32 \cdot 10^{16}$  moléculas/ml y la superficie a ocupar es constante, la correspondiente al equipo de medida,  $3,42 \cdot 10^{19} \text{ \AA}^2$ , la cantidad de disolución patrón a esparcir será siempre la misma en todas las experiencias e igual a 400  $\mu\text{l}$ .

### Adsorción de $\beta$ -Lactoglobulina.

La variación de la tensión superficial de las disoluciones de  $\beta$ -lactoglobulina en función de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa a  $\text{pH}=7,5$  se muestra en la figura 5.1.3.

La  $\beta$ -lactoglobulina presenta una fuerte tendencia a adsorberse en la interfase aire-agua lo que justifica la posibilidad de su uso como estabilizante en emulsiones

alimentarias (Corthaudon, J.L. y col., 1991). Hay que tener en cuenta que, en las condiciones en las que se ha llevado a cabo este estudio, las moléculas de proteína están cargadas negativamente. Es esperable, por tanto, que a valores de pH a los cuales la proteína está neutra (próximos a su punto isoeléctrico), se produzca una adsorción mayor.

Debido a la adsorción de la proteína, se produce una disminución de la tensión superficial de equilibrio, mayor cuanto mayor sea la cantidad de lactoglobulina presente en el sistema, hasta alcanzar un valor estable que se corresponde con la saturación total de la interfase por las moléculas de proteínas. Esta saturación se consigue con un 0,05% de  $\beta$ -lactoglobulina. Otros autores han encontrado una dependencia similar entre la tensión de equilibrio y la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa (Joos y Serrien, 1991; Miller y col., 2001).

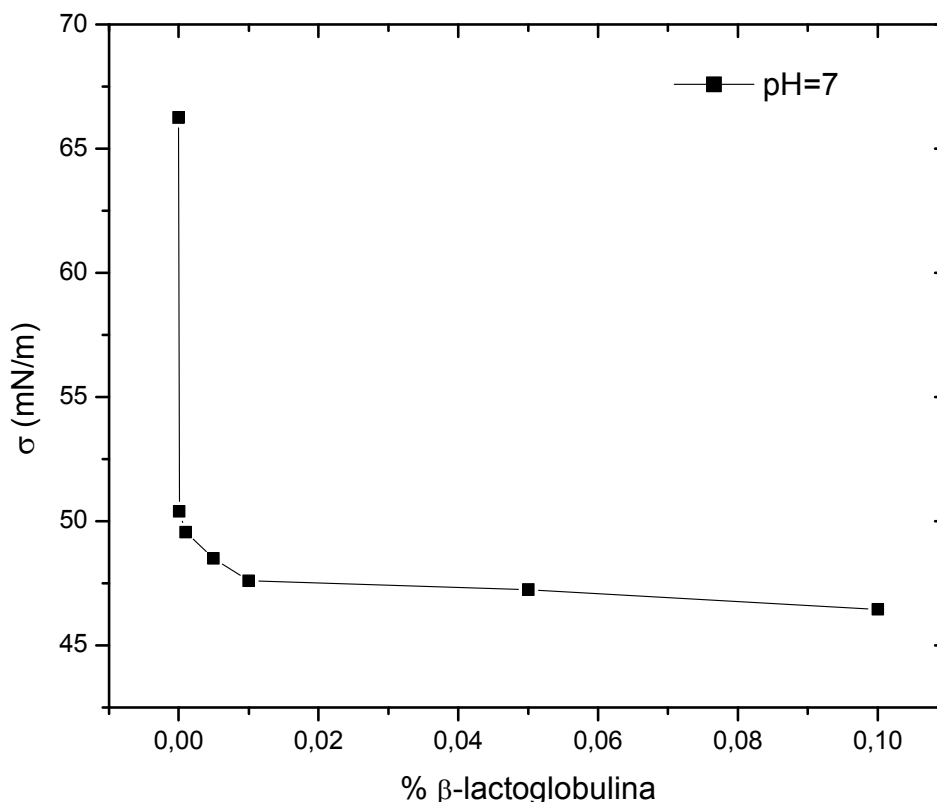


Fig 5.1.3: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de  $\beta$ -lactoglobulina.

Los resultados observados se pueden explicar en términos de ocupación de la interfase por parte de las moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina. A bajas concentraciones, las moléculas disponen de un gran área superficial donde situarse, dando variaciones importantes en la tensión. Al aumentar la concentración de proteína, se forma ya una capa de moléculas adsorbidas que recubren totalmente la interfase, pero donde cada molécula ocupa una elevada área interfacial. La incorporación de más moléculas de proteína a la interfase, da lugar a cambios conformacionales con formación de plegamientos o lazos, a fin de permitir la distribución de ese mayor número de moléculas, hasta que la interfase se satura. A partir de este momento, no se aprecia variación en los valores de tensión aunque se incremente la concentración de proteínas en el seno de la fase acuosa.

Estos resultados se ajustan a lo que predicen las teorías que estudian los procesos de adsorción de las proteínas. Una vez que las moléculas de proteína alcanzan la interfase por difusión y/o convección, se adsorben, lo que implica que se extiendan y ocupen una cierta área superficial en función del espacio disponible. Una vez adsorbidas, las moléculas pueden adoptar múltiples estados (Fainerman y col., 1996 y 1998, Fainerman y Miller, 1998, Makievski y col., 1998), cada uno de los cuales se corresponde con una diferente conformación molecular en la interfase y, por tanto, con una diferente área ocupada. Sin embargo, estudios recientes proponen, para el caso de proteínas globulares como la  $\beta$ -lactoglobulina, la existencia única de dos estados para las moléculas adsorbidas. Aunque este planteamiento es realmente una simplificación, representa un modelo razonable cuando la superficie está altamente cubierta ya que las moléculas adsorbidas no encuentran espacio suficiente para cambiar de conformación en la interfase (Miller y col., 2001).

La composición y características finales de la capa superficial se encuentran controladas por los valores de la tensión superficial. A menor tensión superficial, mayor es la cantidad de moléculas adsorbidas. Los estados adsorbidos presentan menores áreas molares parciales y, por tanto, el espesor de la capa aumenta. Sin embargo, se puede dar la adsorción de moléculas sin que se aprecie disminución en la tensión superficial debido a la formación de agregados en la capa adsorbida (Fainerman y col., 1999) o a la formación de una segunda capa de adsorción (Guzmán y col., 1986, Douillard y Lefebvre, 1990).

La incorporación de moléculas de monoestearina produce variaciones muy significativas en la tensión superficial debido a la competencia existente entre ambas sustancias por situarse en la interfase (Fig 5.1.4.).

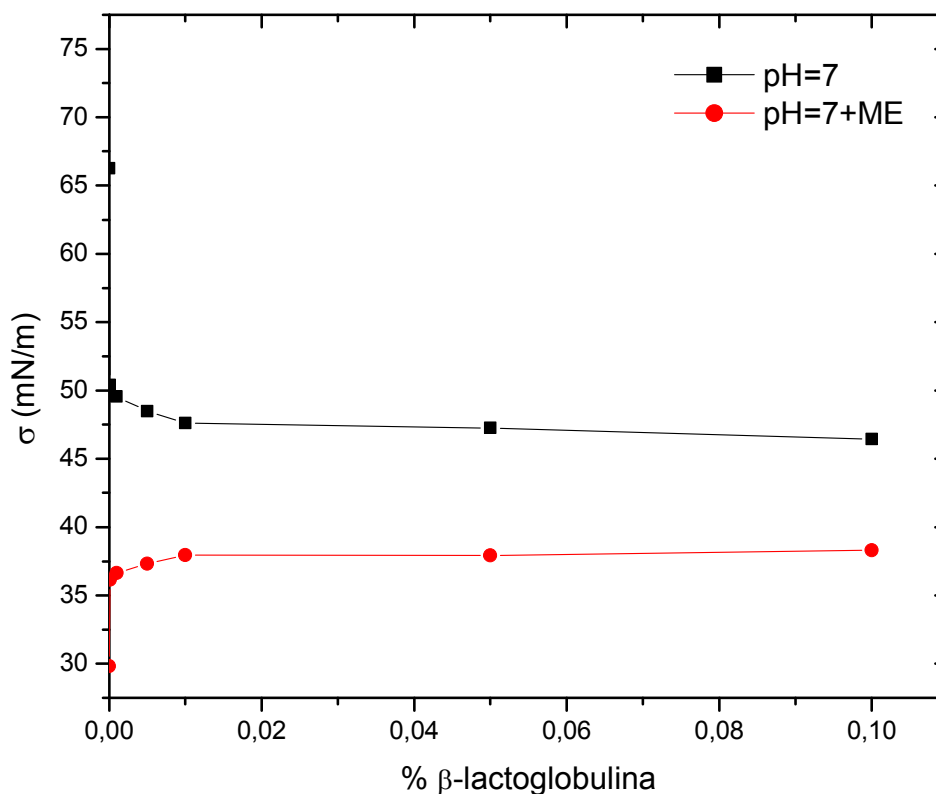


Fig 5.1.4: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de  $\beta$ -lactoglobulina con/sin monoestearina. (■) Sin monoestearina, (●) Con monoestearina. pH= 7.

En la interfase aire-agua cuando el lípido está solo y en cantidad suficiente, puede llegar a formar monocapas muy condensadas, con la parte polar en contacto con la subfase acuosa y las cadenas hidrocarbonadas dispuestas paralelamente entre sí y perpendicularmente respecto a la interfase, reduciendo bastante la tensión superficial. Sin embargo, las monocapas mixtas o las formadas únicamente por proteína son más expandidas, observándose por tanto un aumento de la tensión superficial. Las diferencias entre los valores de tensión para las películas de proteínas y para sus

mezclas con monoestearina, se hacen menores cuanto mayor sea la concentración de proteína en la fase acuosa, debido al desplazamiento del lípido de la interfase.

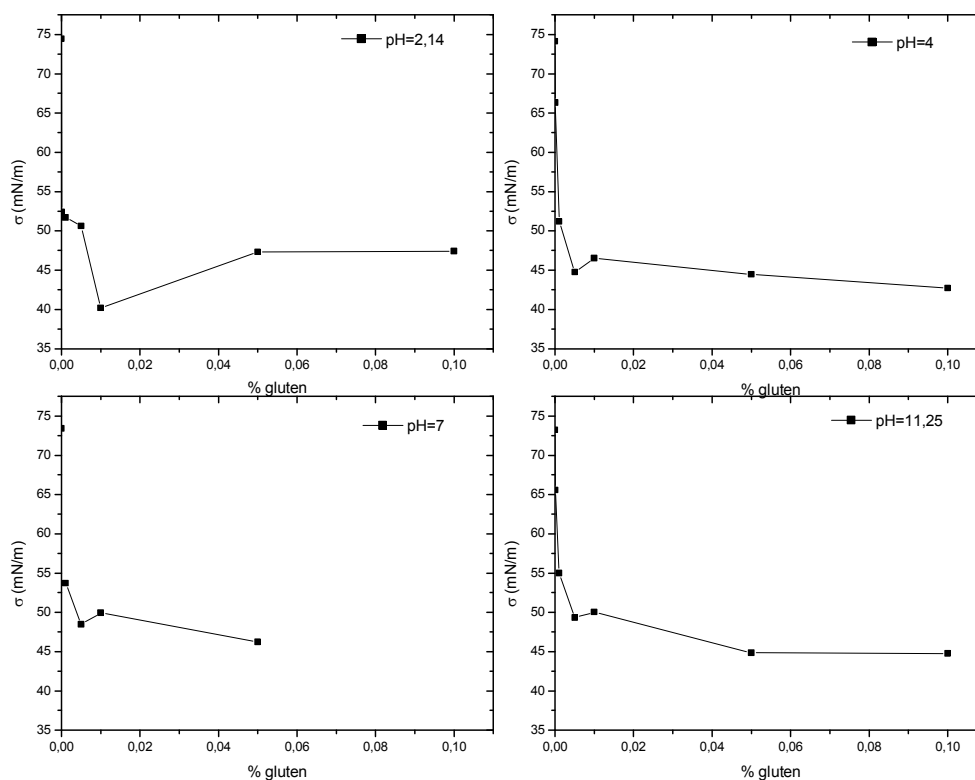
## **5.1.2. PELÍCULAS DE PROTEÍNAS Y SUS MEZCLAS CON MONOESTEARINA.**

### **5.1.2.1 GLUTEN**

El comportamiento interfacial de las proteínas vegetales ha sido mucho menos estudiado que el de las proteínas de origen animal, a pesar de estar ampliamente incorporadas a la dieta humana (Van Vliet y col., 2002). Dentro de las proteínas vegetales, el gluten constituye una importante fracción ya que se utiliza frecuentemente para dar textura a los alimentos.

En este apartado se estudia la variación de la tensión superficial de las disoluciones de gluten en las interfases aire-agua en función de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa y del pH de la misma. Los resultados se muestran en la figura 5.1.5.





**Fig 5.1. 5: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de gluten a distintos pH.**

La presencia de las proteínas del gluten, para todos los valores de pH y de concentración estudiados, produce una reducción en los valores de tensión superficial, lo que es concordante con la adsorción de moléculas de proteína en la interfase A/W. Dicha reducción es mayor al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, hasta alcanzar un valor estable que no experimenta cambios significativos aunque se modifique la concentración de proteína en la disolución. Este valor se alcanza generalmente para una concentración de proteína en el medio acuoso de 0,05 % y suele coincidir con el menor valor de tensión alcanzado en el sistema, excepto a pH=2,14 que presenta un mínimo excepcional en los valores de tensión a una concentración de proteína del 0,01%.

Se puede afirmar por tanto que, un aumento en la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, aumenta es el número de moléculas que se sitúan en la interfase y reduce la tensión. Una vez formada una película que cubra totalmente la interfase, la incorporación de nuevas moléculas de proteína podría dar lugar a una capa proteica de

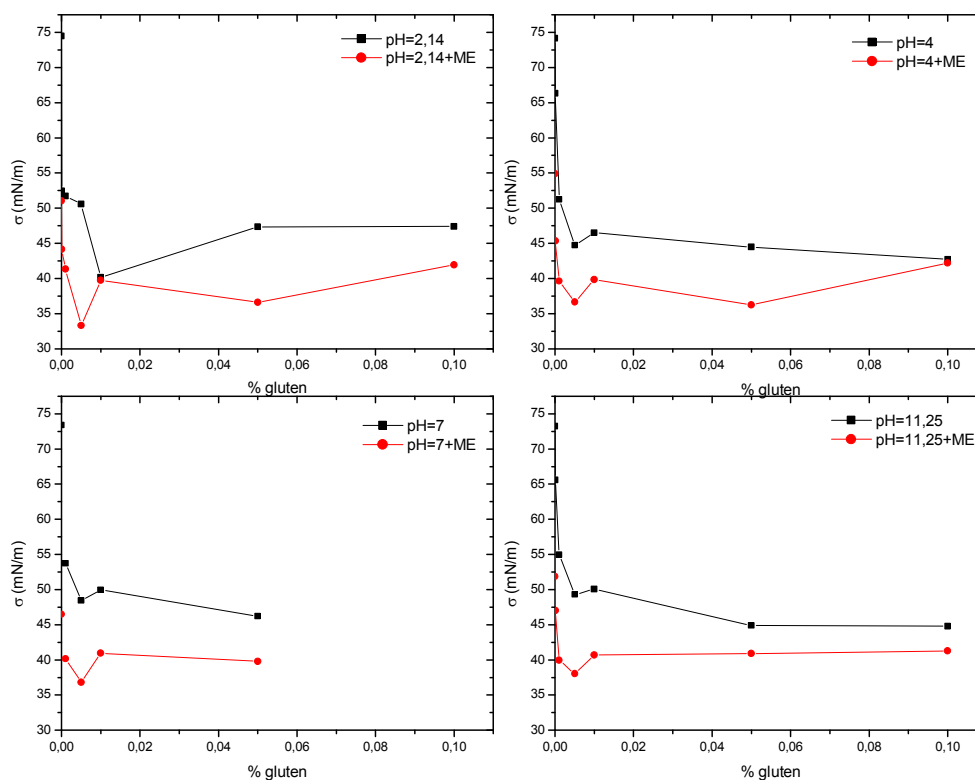
mayor espesor, pero, al no variar el número total de moléculas presentes en la interfase, estos cambios no modifican sustancialmente los valores de tensión del sistema.

Durante la preparación de las dispersiones de gluten, se observó que las más estables eran las obtenidas a  $\text{pH} = 11$ . Esta estabilidad se aprecia también en el comportamiento interfacial de la proteína, alcanzándose antes los valores de tensión correspondientes a una situación de equilibrio, para cualquiera de las concentraciones estudiadas, y siendo estos valores más fácilmente reproducibles.

La influencia de la concentración de proteína sobre los valores de tensión superficial estática es mucho mayor que el efecto del  $\text{pH}$ , debido al bajo carácter iónico de las proteínas del gluten. A  $\text{pH} = 2, 7$  y  $11$ , tanto la forma de la curva como los valores de tensión a las menores concentraciones de proteína son similares. El valor de tensión correspondiente a la saturación de la interfase por las moléculas de proteínas se reduce al aumentar el  $\text{pH}$  en estas tres disoluciones.

A  $\text{pH} = 4$ , sin embargo, los valores de tensión alcanzados son menores que para el resto de las disoluciones de gluten, para casi la totalidad de las concentraciones de proteína aquí mostradas. Estos valores inferiores de tensión obtenidos podrían ser debido a que las moléculas de proteína experimenten fenómenos de agregación a este  $\text{pH}$ . La existencia de estas estructuras más compactas permitiría la incorporación de un mayor número de moléculas a la interfase. Takeda y col. (2001) han encontrado que en el intervalo de  $\text{pH} = 4-5$ , la fracción solubilizada del gluten presenta buenas propiedades emulsionantes. Bajo estas condiciones las gliadinas son superficialmente más activas que las gluteninas, es decir, se adsorben más rápidamente, aunque el análisis de la capa de proteína adsorbida, una vez que se ha esperado suficiente tiempo, muestra la existencia una fracción importante de glutenina.

La adición de monoestearina a la interfase produce un desplazamiento parcial de las moléculas de proteína adsorbidas, generándose una película interfacial mixta, con valores de tensión inferiores a los de ambos componentes individuales (ver figura 5.1.6). Esta reducción en la tensión superficial depende de la concentración de gluten y del  $\text{pH}$  de la disolución.



**Fig 5.1. 6: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de gluten con/sin monoestearina. (■) Sin monoestearina, (●) Con monoestearina. A distintos valores de pH.**

La reducción en los valores de tensión para las películas mixtas son mayores a bajos valores de concentración de proteína, lo que puede deberse al predominio de las moléculas del lípido en la película interfacial. A altos valores de concentración de proteína, es este surfactante el que predomina en la interfase, aproximándose los valores de tensión superficial a los obtenidos cuando está presente la proteína sola. Cambios en el pH del medio acuoso no modifican significativamente los valores de tensión, siendo éstos levemente inferiores cuanto más bajo es el pH, excepto a la mayor de las concentraciones estudiadas, ya que la tensión experimenta un aumento a esta concentración para los pH ácidos e inferiores al punto isoeléctrico de la proteína. Nuevamente observamos cómo a pH=11 los sistemas se estabilizan antes, saturándose la interfase a concentraciones inferiores de proteína.

### 5.1.2.2 SOJA.

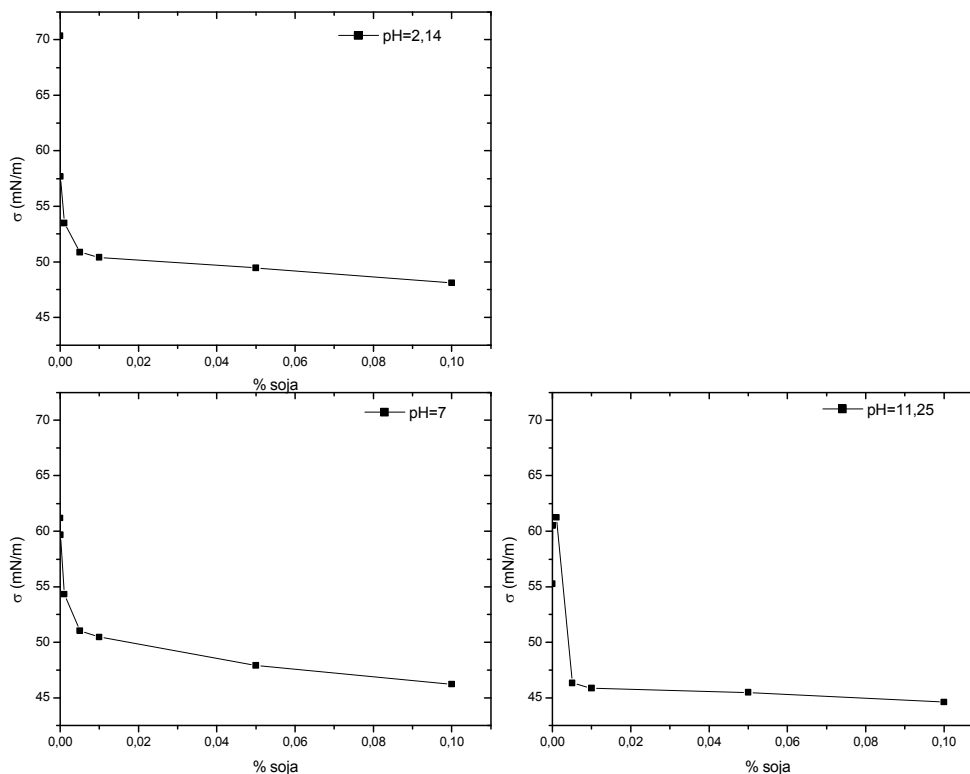
En la actualidad existe una tendencia creciente a estudiar la estabilidad de dispersiones alimentarias estabilizadas por proteínas vegetales procedentes de leguminosas. En este contexto, las proteínas de soja presentan interesantes propiedades funcionales en comparación con otras proteínas de origen vegetal (Utsumi y col., 1997; Zayas, 1997; Hettiarachchy y Kalapathy, 1998). Actualmente, la soja se encuentra en una gran variedad de productos alimentarios, fundamentalmente debido a su alto valor proteico. Su empleo en alimentos para consumo humano y animal está relacionado con su capacidad de modificar la textura y de estabilizar las gotas dispersas en una emulsión o las burbujas en una espuma (Van Vliet y col., 2002). Sin embargo, un uso óptimo de las proteínas de soja en productos alimentarios del tipo emulsiones o espumas requiere un mayor conocimiento de sus propiedades superficiales, bajo diferentes condiciones experimentales, del que se posee en la actualidad (Utsumi y col., 1997).

Una importante dificultad a la hora de estudiar el comportamiento interfacial de las proteínas de leguminosas es que siempre se presentan en forma de mezclas (Schwenke, 2001; Wolf y Briggs, 1956; Lakemond y col., 2000). En el caso de la soja, la fracción más importante es la 11S, formada por moléculas hexaméricas, estable a  $\text{pH}=7,6$  pero que, dependiendo del  $\text{pH}$  o fuerza iónica, se puede disociar dando fracciones 7S (formada por trímeros) o 3S (formada por monómeros).

Una característica fundamental de las proteínas de la soja es la gran influencia que ejerce el  $\text{pH}$  del medio acuoso sobre su conformación (Petruccelli y Añón, 1996; Puppo y Añón, 1999) y las principales propiedades funcionales (solubilidad, características espumantes y emulsionantes, etc...) asociadas a ésta (Utsumi y col., 1997). Los valores inferiores de solubilidad se corresponden con el intervalo de  $\text{pH} = 4,5-6,0$ . Sin embargo, a  $\text{pH}$  ácidos inferiores a 3,0 o a valores de  $\text{pH}$  alcalinos ( $>6,5$ ), la solubilidad es elevada (Molina y col., 2003).

En este apartado se presentarán los valores de la tensión de las disoluciones de proteína en la interfase aire-agua en función de la concentración de soja y del  $\text{pH}$  del

medio acuoso (figura 5.1.7). No se han podido obtener datos con soja a pH=4 ya que las disoluciones no son estables.



**Fig 5.1. 7: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de soja a distintos pH.**

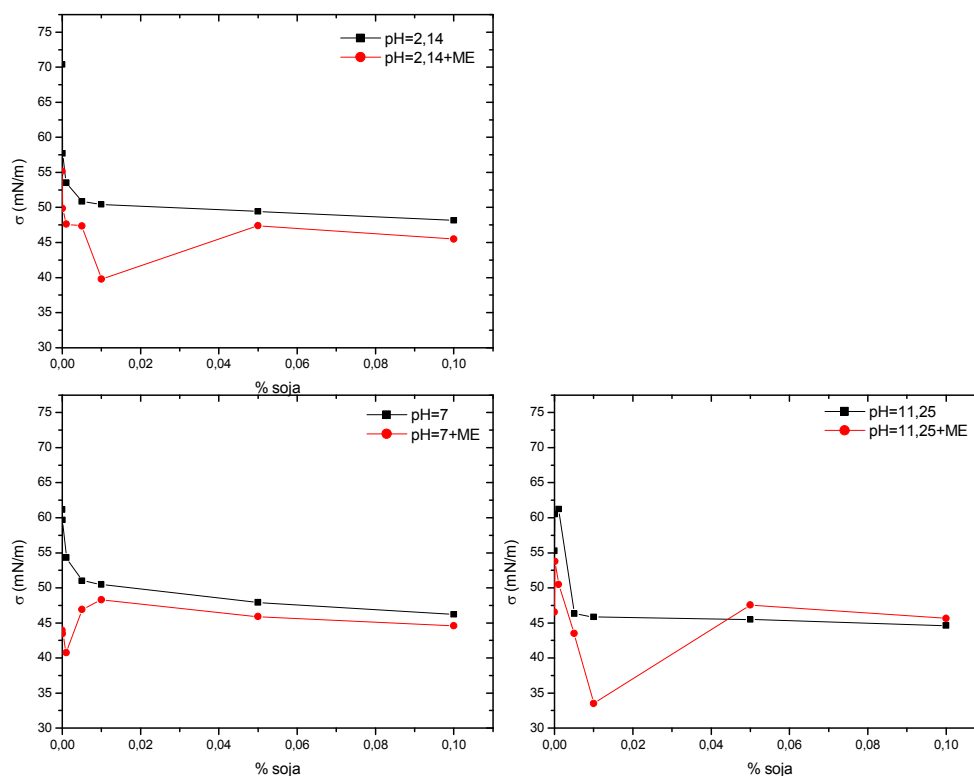
En el caso de la soja, cambios en la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa produce modificaciones en la tensión superficial similares a los observados para las proteínas del gluten. Es decir, a más cantidad de proteína en el medio acuoso, más moléculas se sitúan en la interfase y menor es la tensión superficial del sistema, hasta alcanzar un valor estable a partir del cual no se registran cambios en la tensión debido a la existencia de una película proteica que recubre totalmente la interfase.

A diferencia de los resultados obtenidos con el gluten, la curva no presenta un mínimo a bajos valores de concentración de proteína y los valores de tensión son inferiores a medida que aumenta el pH del medio acuoso. A pH=11,25 se obtiene la mayor estabilidad del sistema, alcanzándose un valor constante para la tensión a una menor concentración de proteína (0,01%) que para el resto de los pH estudiados.

Resultados similares han sido encontrados por otros autores al estudiar la adsorción en función del pH de distintas fracciones aisladas de proteínas de soja en soluciones ácidas (Molina y col., 2003). Dichas películas adsorbidas presentan valores de presión superficial ( $\pi = \sigma_{\text{subfase sola}} - \sigma_{\text{película de proteína}}$ ) en el equilibrio que se incrementan de forma sigmoidal con la concentración de proteína en la fase acuosa. Se requiere una mayor concentración de proteína a pH=2,0 que a pH=8,0 para alcanzar la zona plateau y el valor de presión de equilibrio en esta zona es inferior cuando se emplea una subfase ácida. A pH=8,0 estas fracciones proteicas se encuentran en su estado nativo, mientras que a pH=2,0 se produce una desnaturalización parcial y una disociación de las moléculas.

Bos y col. (2001) y Martin y col. (2002b) estudiaron la tensión y la reología de la fracción 11S de la soja, en la interfase aire-agua, en función del pH y de la fuerza iónica y relacionaron los resultados con factores conformacionales. Si las condiciones experimentales son tales que la glicina está disociada en un trímero (pH=8), la adsorción en la interfase aire-agua es mucho más rápida, observándose una mayor concentración superficial y un mayor valor del módulo dilatacional que cuando se encuentra en forma de hexámero (pH=6,7).

Cuando están presentes en la interfase moléculas de monoestearina (figura 5.1.8), los valores de tensión superficial, a todos los pH, son generalmente inferiores a los obtenidos en ausencia de lípido, especialmente a las menores concentraciones de proteína, siendo esta reducción consecuencia de la incorporación a la interfase de moléculas con una alta actividad superficial. Estos mismos resultados se habían obtenido para las películas mixtas gluten-monoestearina.



**Fig 5. 1.8: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de soja con/sin monoestearina. (■) Sin monoestearina, (●) Con monoestearina. A distintos valores de pH.**

A pH=7 y bajas concentraciones de proteína, la película interfacial es de naturaleza fundamentalmente lipídica. A mayores concentraciones de proteína, las moléculas de ésta desplazan al monoglicérido aumentando los valores de tensión hasta acercarse a los característicos de una película formada únicamente por moléculas de proteína.

A valores de pH 2 o 11, los valores de tensión, para cualquiera de las concentraciones estudiadas, son inferiores a los obtenidos para cada uno de los componentes por separado, lo que indica que ambos contribuyen al recubrimiento de la interfase, probablemente con formación de una película heterogénea con existencia de dominios o agrupamientos de moléculas de cada una de las especies. A medida que se incorporan más moléculas de proteína a la interfase, los valores de tensión se aproximan

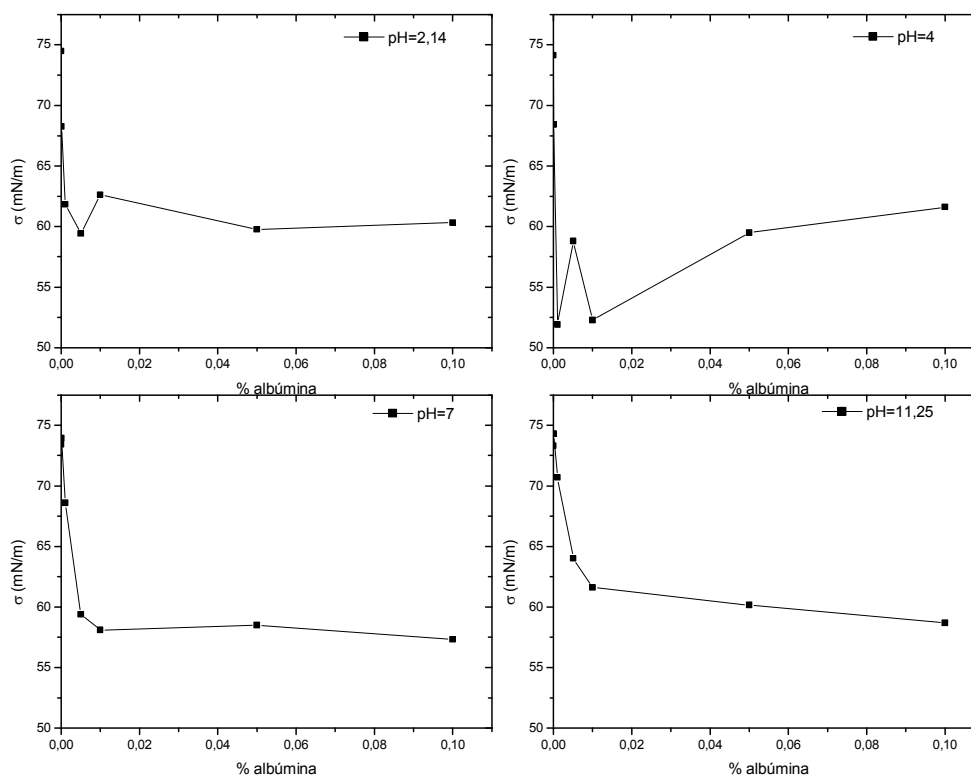
a los obtenidos en ausencia del monoglicérido. Las mayores diferencias obtenidas en los valores de tensión, como consecuencia de la presencia del lípido, se observan para pH=11 y concentración de proteína de 0,01%, por lo que es esperable que, a este valor, se formen agregados lípido-proteínas muy estables que reduzcan la tensión. Estos agregados evolucionan hacia la formación de una película proteica o lipídica según aumente o disminuya, respectivamente, la concentración de proteína en la subfase acuosa, acercándose los valores de tensión de la película mixta a los correspondientes a cada componente individual.

### **5.1.2.3 OVOALBÚMINA.**

Esta proteína contribuye en gran medida a la funcionalidad de la clara de huevo, ampliamente utilizada como agente espumante en formulaciones alimentarias (Pezennec y col., 2000). Aunque existen algunos estudios acerca de la cinética de adsorción de la ovoalbúmina en la interfase aire/agua (de Feijter y Benjamins, 1987), sólo se han llevado a cabo algunas investigaciones sobre la reología de las películas adsorbidas de esta proteína (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998).

En este apartado se estudia la variación de la tensión de las disoluciones de ovoalbúmina en la interfase aire-agua en función de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa y del pH de la misma (Fig 5.1.9). Valores análogos a los aquí mostrados han sido obtenidos por otros autores en condiciones similares de experimentación (Bos y Van Vliet, 2001).





**Fig 5. 1.9: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de ovoalbúmina a distintos pH.**

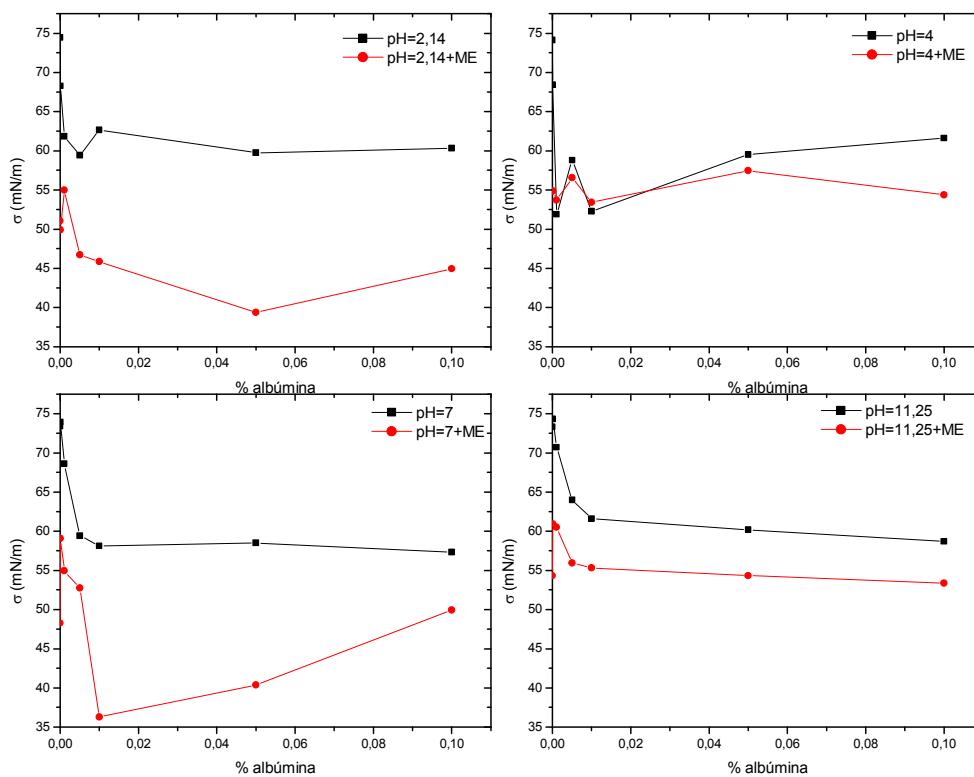
La ovoalbúmina presenta actividad superficial, lo que se traduce en una reducción de los valores de tensión superficial con la concentración de proteína hasta alcanzar la saturación o cobertura total de la interfase. La influencia de la concentración de proteína es similar, por tanto, a la obtenida para las otras proteínas estudiadas. En el caso de la ovoalbúmina el valor de saturación se encuentra en torno al 0,05% de concentración, para la mayoría de los pH estudiados.

Cambios en el pH de la fase acuosa tienen una mayor incidencia en los valores de tensión que en las proteínas anteriores. Los valores alcanzados una vez que la interfase está saturada con moléculas de proteína, descienden en el sentido  $\text{pH}=2 > \text{pH}=11 > \text{pH}=7$ . Nuevamente, las disoluciones a  $\text{pH}=4$  presentan un comportamiento distinto que al del resto de pH, debido a la proximidad al punto isoeléctrico de la proteína ( $\text{pI}=4,75$ ). A este pH, los valores de tensión superficial son inferiores para las

soluciones de proteínas más diluídas pero, una vez saturada la interfase, la tensión es superior a la obtenida para el resto de las subfases estudiadas.

A pH=4 desaparecen las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de ovoalbúmina, lo que permite una mayor acumulación de éstas en la interfase cuando la concentración de proteína en el seno de la fase es baja, produciéndose una reducción rápida en la tensión. Sin embargo, cuando el número de moléculas de ovoalbúmina es elevado, las interacciones laterales que se puedan establecer entre las mismas estabiliza la presencia de dichas moléculas en el seno de la fase frente a la interfase, con el consiguiente incremento en la tensión.

Al igual que con el resto de las proteínas estudiadas, las películas mixtas proteínas-monoestearina presentan menores valores de tensión superficial, en general, que los componentes individuales, aunque existe una dependencia importante del pH del medio (Fig 5.1.10).



**Fig 5.1. 10: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de ovoalbúmina con/sin monoestearina. (■) Sin monoestearina, (●) Con monoestearina. A distintos valores de pH.**

A pH=4, el comportamiento de la ovoalbúmina es diferente al de las otras proteínas estudiadas en este trabajo. A bajas concentraciones de proteína, tanto en presencia como en ausencia de monoestearina los valores de tensión son similares, lo que indica que es la proteína la que se sitúa en la interfase preferentemente, mientras a altas concentraciones de proteína los valores de tensión superficial disminuyen al aumentar la concentración de proteína, es decir, la tensión superficial está siendo controlada por la actividad de la monoestearina. Se puede explicar porque a pH=4 la ovoalbúmina forma agregados debido a la proximidad de su punto isoeléctrico permitiendo esta estructura más compacta la incorporación a la interfase de más moléculas de monoestearina lo que hace que descienda notablemente el valor de la tensión interfacial.

Para el resto de los pH, las monocapas mixtas presentan valores más bajos de tensión que cualquiera de los componentes individuales. Estos descensos son más significativos a pH 2 y 7 y para bajas concentraciones de proteína. Es, por tanto, en estas condiciones donde se pueden establecer asociaciones lípido-proteínas de alta estabilidad.

#### **5.1.2.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS.**

La determinación de la estructura de las películas de proteínas adsorbidas en las interfases fluidas es de gran interés práctico debido a que de ella dependen muchas de sus propiedades funcionales. Tradicionalmente, el estudio de los sistemas dispersos alimenticios estabilizados por proteínas ha estado orientado hacia la utilización de las proteínas lácteas. Sin embargo, en la actualidad existe una tendencia a incorporar proteínas vegetales en dichos sistemas dispersos.

En este apartado, se comparan los valores de tensión de las proteínas estudiadas en este trabajo ( $\beta$ -lactoglobulina, gluten, soja y ovoalbúmina) en ausencia y en presencia de monoestearina a pH=7.

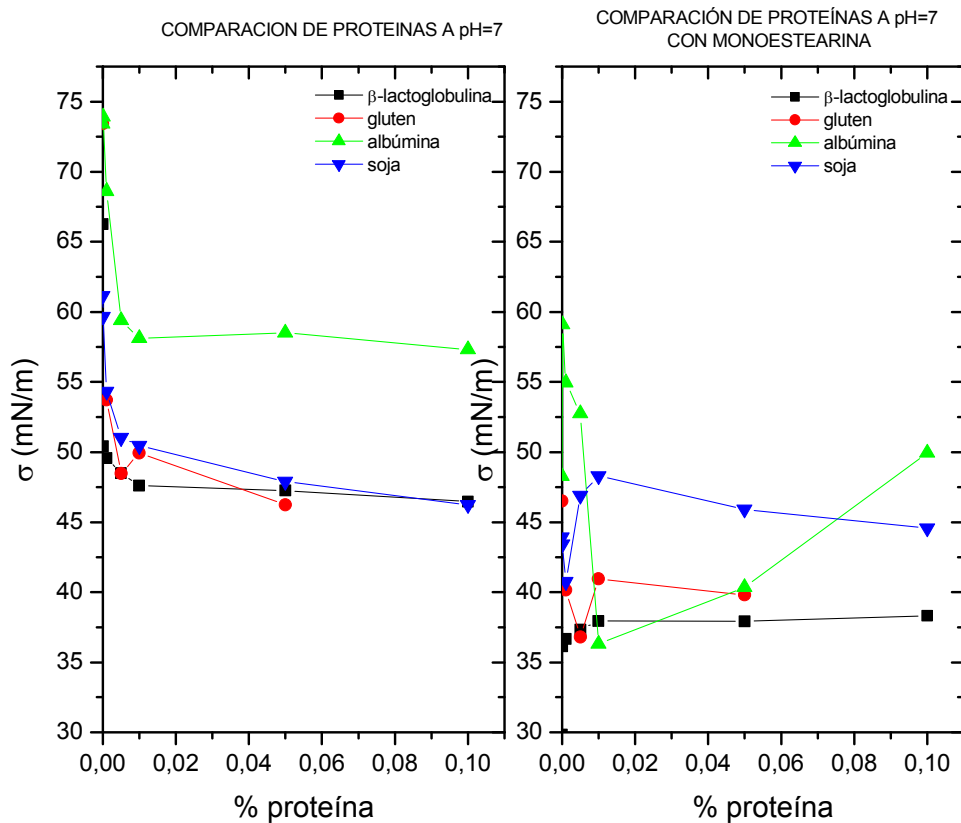


Fig 5. 1.11: Variación de la tensión superficial de las disoluciones de proteína con/sin monoestearina. A pH=7.

Todas las proteínas aquí estudiadas presentan una fuerte tendencia a la adsorción en la interfase aire-agua lo que justifica la posibilidad de su uso como estabilizantes en emulsiones alimentarias. Debido al proceso de adsorción en la interfase, se produce una reducción en la tensión, mayor cuanto más alta sea la concentración de proteína que se introduce en el sistema, hasta alcanzar un valor estable que se corresponde con la saturación total de la interfase por moléculas de proteínas. Esta saturación se consigue aproximadamente con un 0,05% de proteína, aunque depende del tipo de proteína.

El comportamiento interfacial de la ovoalbúmina es diferente al del resto de las proteínas, presentando una menor actividad cuando no hay monoestearina presente. Si se comparan las proteínas estudiadas en función de la naturaleza de su procedencia se puede concluir que, las proteínas de origen vegetal son más activas que las de origen animal, excluyendo la  $\beta$ -lactoglobulina que en este trabajo se está empleando como

modelo y por tanto, se trata de una sustancia químicamente pura y no de una proteína comercial.

La adsorción de proteínas en la interfase produce cambios en las propiedades físicas de la misma, especialmente en la tensión interfacial (Van der Vegt y col., 1996). El cambio en la tensión está influenciado, entre otros factores, por la concentración de proteína en el seno de la fase adyacente y por sus características moleculares. Generalmente, a mayor concentración más rápido es el descenso en la tensión y menor el valor final adoptado por el sistema una vez que alcanza la situación estacionaria (Paulsson y Kejmek, 1992; Suttiprasit y col., 1992). Las proteínas más pequeñas y con estructuras más flexibles y desordenadas promueven cambios mayores en la tensión superficial que las de mayor tamaño, con una estructura globular y mayor estabilidad (Suttiprasit y col, 1992).

La adición de moléculas de monoestearina produce variaciones muy significativas en los valores de tensión superficial debido a la competencia existente entre ambas sustancias por situarse en la interfase. La forma de la curva es similar para soja, gluten y  $\beta$ -lactoglobulina. Sin embargo, los valores de tensión no son del mismo orden de magnitud para las películas mixtas, sino que descienden en el orden siguiente: soja > gluten >  $\beta$ -lactoglobulina. La ovoalbúmina vuelve a presentar un comportamiento particular, observándose una reducción importante en la tensión para las películas mixtas a valores intermedios de concentración de proteína (0,01-0,05%).

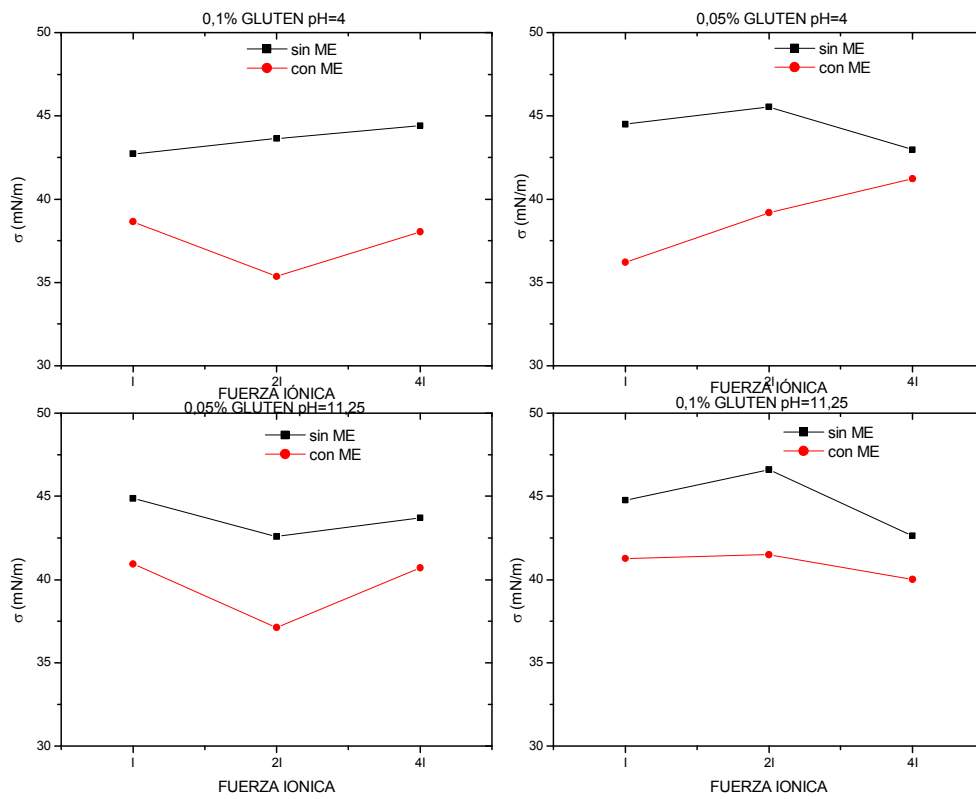
### **5.1.3 INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.**

Muchas de las propiedades que presentan las proteínas globulares en disolución, tales como su solubilidad o la posibilidad de interaccionar las moléculas proteicas entre sí o con otros componentes del medio acuoso, dependen de la extensión de la superficie hidrófoba expuesta al exterior, es decir, de la conformación o estructura que adopten las moléculas, tanto en el seno de la fase como en la interfase (Yampolskaya y Platikanov, 2006). La posibilidad de que se produzcan cambios conformacionales en las moléculas de proteínas se incrementa a medida que los valores de pH del medio acuoso se desvían del punto isoeléctrico de la misma y depende ampliamente de la concentración de sales

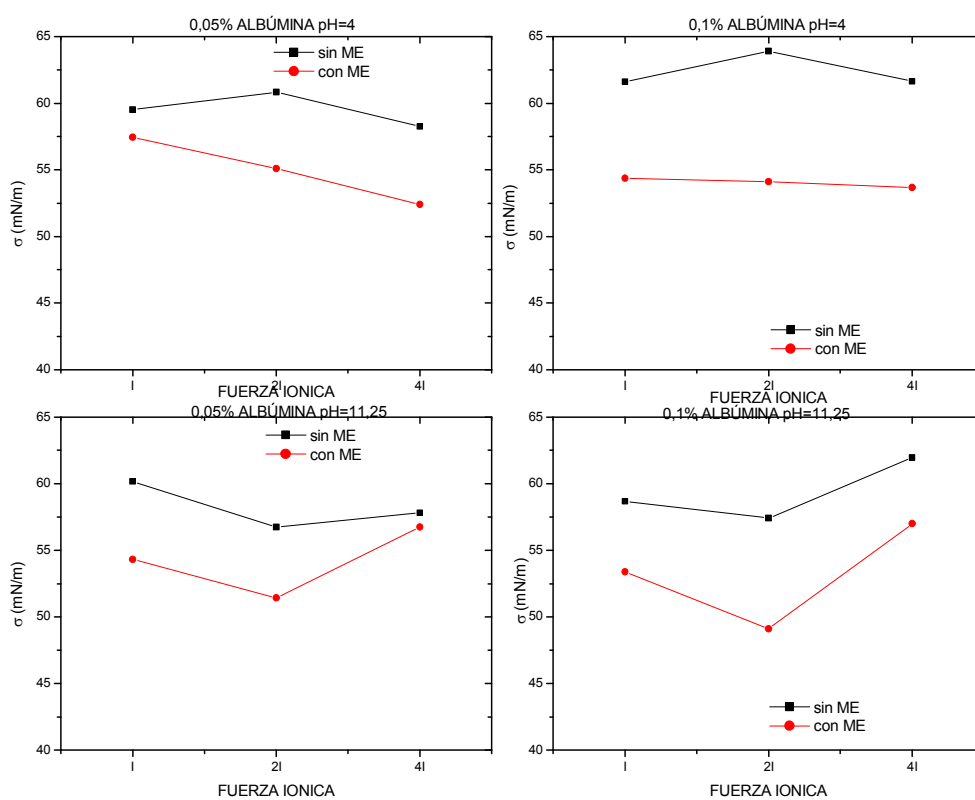
que haya en el medio, debido a cambios en las interacciones totales existentes en el sistema y a efectos de tipo osmótico (Yampolskaya y Platikanov, 2006).

La adición de sales (KCl o fosfatos) a la disolución acuosa de proteína reduce el tiempo de inducción que es el tiempo necesario para que las moléculas lleguen a la interfase, alcanzándose antes la estabilidad de la película. Esto es debido a que la presencia de iones en la disolución facilita el desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, porque contribuyen a la disminución de las atracciones electrostáticas (cohesión intramolecular) entre las mismas. (Miñones Trillo et al., 2003).

En este apartado se presentan los resultados obtenidos al analizar la influencia sobre los valores de tensión superficial de las disoluciones de proteínas al variar la fuerza iónica del medio, para sistemas acuosos conteniendo gluten u ovoalbúmina, en función del pH, de la concentración de proteína y de la presencia o no de monoestearina. Los resultados se muestran en las figuras 5.1.12 y 5.1.13. Se puede concluir que no hay una variación significativa de los valores de tensión superficial como consecuencia de los cambios en la fuerza iónica del medio en los sistemas estudiados. Pezennec y col. (2000) no encontraron variaciones significativas en la presión superficial de películas adsorbidas de ovoalbúmina a pH 6 y diferentes fuerzas iónicas.



**Fig 5. 1.12: Valores de tensión superficial en función de la fuerza iónica para películas de proteínas del gluten y sus mezclas con monoestearina, a distintos pH y concentraciones de proteína.**



**Fig 5. 1.13: Valores de tensión superficial en función de la fuerza iónica para películas de ovoalbúmina y sus mezclas con monoestearina, a distintos pH y concentraciones de proteína.**



## 5.2 CINÉTICA DE ADSORCIÓN.

La descripción teórica de la cinética de adsorción de proteínas en interfases líquidas entraña cierta dificultad, por lo que existen sólo un número limitado de publicaciones al respecto (Miller y col., 2001). En diferentes monografías, la cinética y el equilibrio del proceso de adsorción de macromoléculas, en especial de proteínas, ha sido abordado para interfases sólidas (Malmsten, 1998) y líquidas (Möbius y Miller, 1998). En interfases fluidas, el proceso de adsorción de las moléculas de proteínas es significativamente distinto de la adsorción en una superficie sólida. Por un lado, las moléculas pueden penetrar en la fase no acuosa y, por otra parte, se pueden mover más libremente en la interfase (Dickinson, 1999).

Para ambos tipos de interfases, relaciones muy simples han sido establecidas, generalmente basadas en la raíz cuadrada del transporte difusional (MacRitchie, 1998) o en una ecuación de primer orden (Ramsden, 1998). En la teoría dada por Van Eijk y Cohen Stuart (1997), se establece el proceso de adsorción de una proteína como el resultado de tres pasos: primero la proteína se desplaza hacia la interfase mediante difusión y/o convección, después se adsorbe en la interfase y, finalmente, se esparce y ocupa un cierto área interfacial, en función del espacio disponible. Este modelo es concordante con el descrito cualitativamente por Fainerman y Miller (1998).

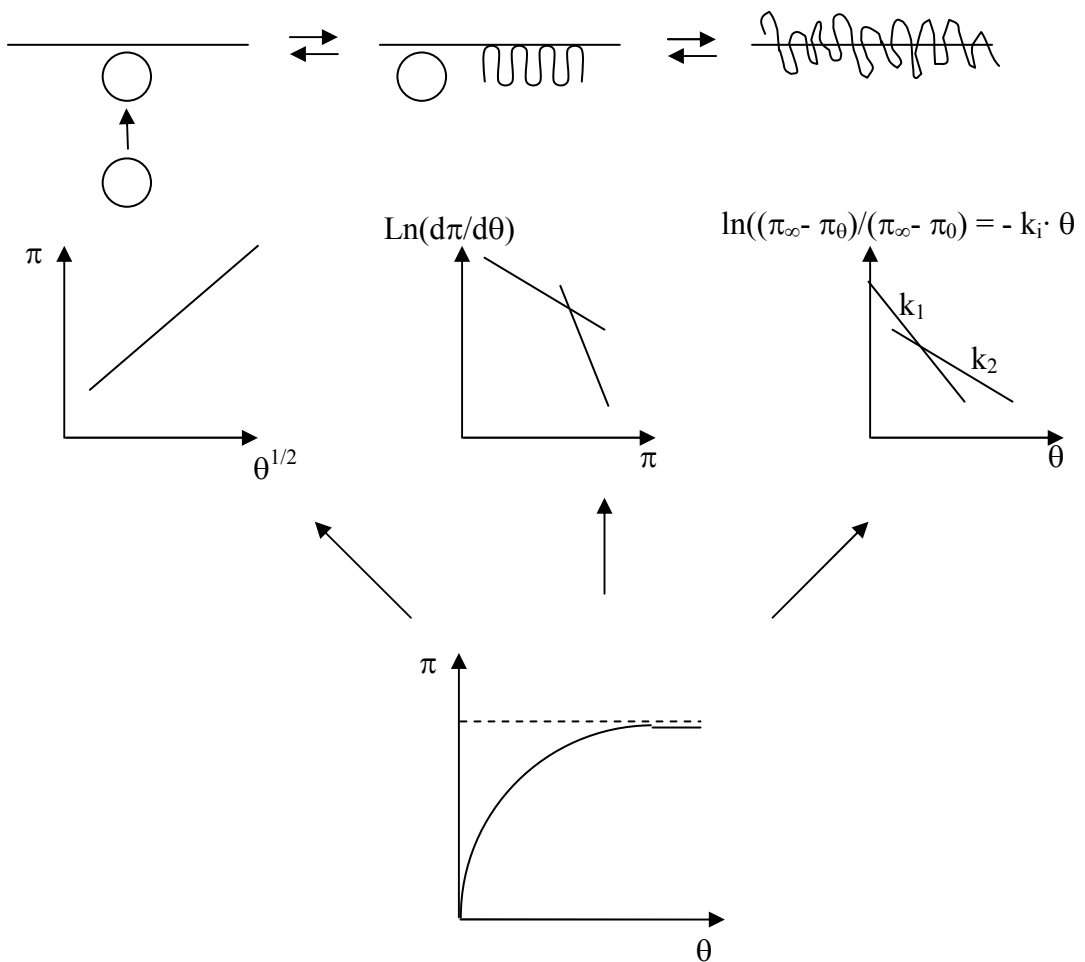
En este apartado, la cinética de adsorción de proteínas alimentarias sobre la interfase aire/agua se analizará a partir de los cambios en la presión superficial con el tiempo. La presión superficial se define como la diferencia entre la tensión superficial de la disolución acuosa y la tensión superficial tras adsorberse la proteína,  $\pi = \sigma_0 - \sigma$ . El tiempo de adsorción comienza en el momento 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). La velocidad de cambio de la concentración superficial puede expresarse mediante (MacRitchie y Alexander, 1963):

$$d\Gamma/d\theta = (d\Gamma/d\pi) \cdot (d\pi/d\theta)$$

Si  $d\Gamma/d\pi$  es constante,  $d\pi/d\theta$  puede usarse para evaluar la velocidad de adsorción.

La evaluación de la cinética de adsorción, en función del mecanismo que controla el proceso, se realiza a partir de representaciones de la presión superficial frente al tiempo, hasta que se alcanzan las condiciones estacionarias. La velocidad de incremento de la presión superficial está determinada por tres procesos consecutivos y concurrentes (MatRitchie, 1978) que se muestran en la figura:



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

c) Reordenación molecular de las moléculas adsorbidas.

Los dos últimos mecanismos comprenden el transporte de las proteínas o de los 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 reordenación de las proteínas en la película interfacial son los mecanismos que controlan el proceso.

**a) 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:

$$\pi = 2 \cdot C \cdot K \cdot T \cdot (D \cdot \theta / \pi)^{1/2}$$

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.

La representación gráfica de  $\pi$  frente a  $\theta^{1/2}$  debe ser lineal. De esta representación lineal se obtiene el valor de la pendiente y de aquí el coeficiente de difusión.

Aunque el papel de la difusión en las variaciones de la presión superficial con el tiempo ha sido estudiado por diversos autores, empleando diferentes métodos y bajo distintas condiciones experimentales (Asanov y col., 1997; Paulsson y Dejmek, 1992; Tripp y col., 1995; Van der Vegt y col., 1996; Ybert y di Meglio, 1998), no es fácil comparar los resultados ya que éstos pueden verse ampliamente influenciados por diferentes factores tales como el método de inyección de la proteína en la fase líquida, la presencia o no de agitación, etc.

**b) 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:

A) Análisis de la velocidad de estos procesos mediante una ecuación cinética de primer orden:

$$\ln((\pi_{\infty} - \pi_{\theta})/(\pi_{\infty} - \pi_0)) = - k_i \cdot \theta$$

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

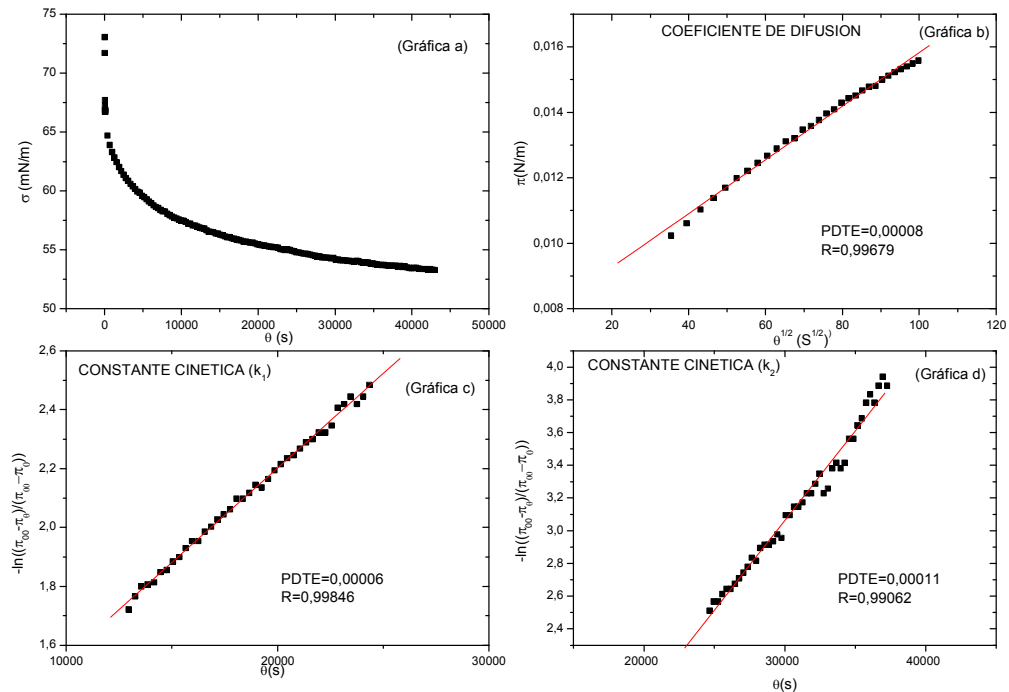
B) En muchos procesos de adsorción de proteínas se ha observado que la velocidad de adsorción es menor que la velocidad de difusión (de Feijter y col., 1987). Cuando existe una barrera de energía, la velocidad de penetración de la proteína en la película interfacial podría ser la etapa limitante de la 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 Ward y Tordai (1946) ha sido usada por Ward y Regan (1980).

$$\ln (d\pi/d\theta) = \ln(k' \cdot \nu \cdot C) - \pi \cdot \Delta A/k \cdot T$$

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

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

En las gráficas siguientes se muestra de qué manera se han obtenido los parámetros difusividad,  $k_1$  y  $k_2$  en función de las ecuaciones anteriormente indicadas a partir de los resultados obtenidos de la experimentación.



**Fig 5. 2.0: (Gráfica a) Cinética de adsorción de la proteína; (Gráfica b) Representación de la ecuación de Ward y Tordai para la obtención del coeficiente de difusividad; (Gráficas c y d) Representación de la ecuación cinética de primer orden para la obtención de  $k_1$  y  $k_2$ .**

### 5.2.1. GLUTEN.

Para las películas de gluten en la interfase aire/agua, se ha estudiado la cinética de adsorción en función de la concentración de proteína, pH y temperatura. Los resultados se muestran a continuación.

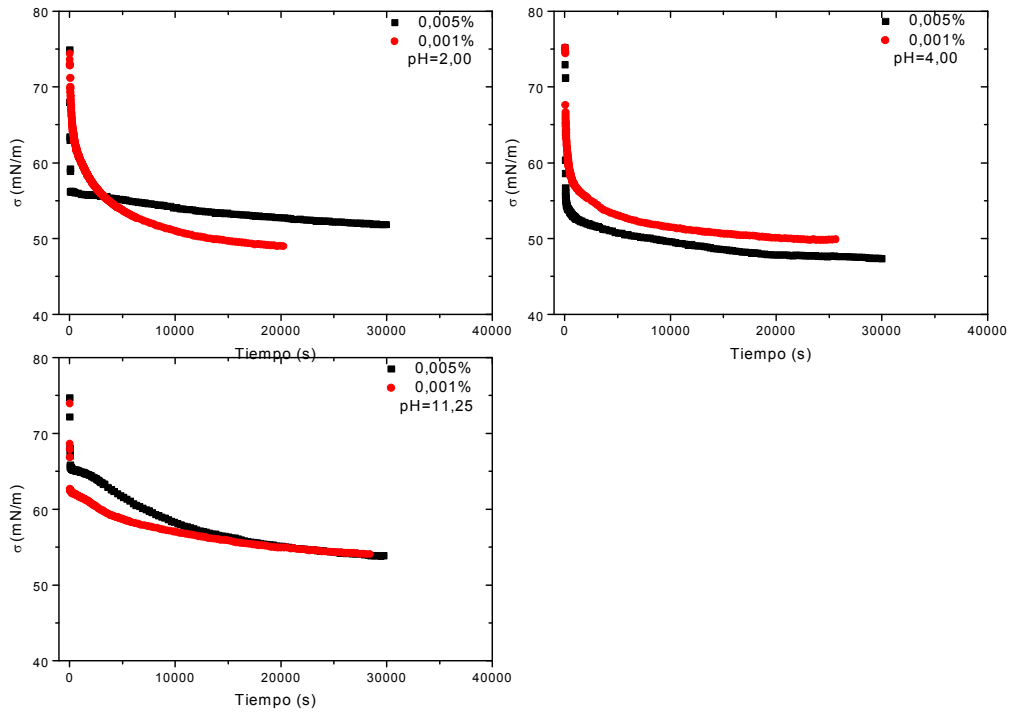


Fig 5.2.1: Cinética del gluten en función de la concentración y del pH a 10°C.

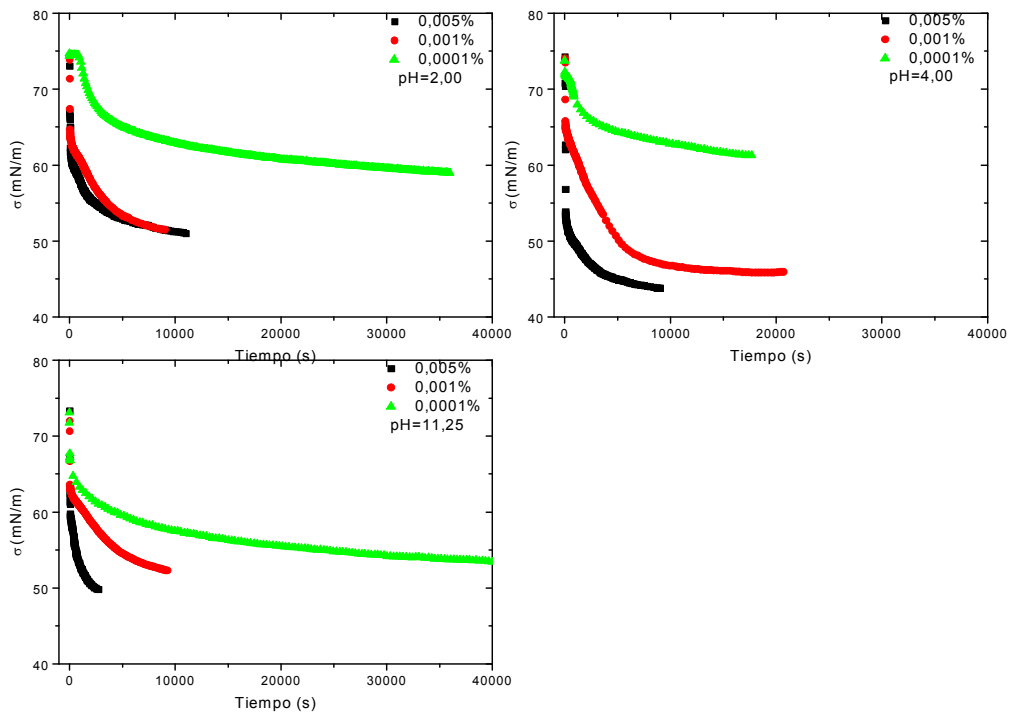


Fig 5.2.2: Cinética del gluten en función de la concentración y del pH a 20°C.

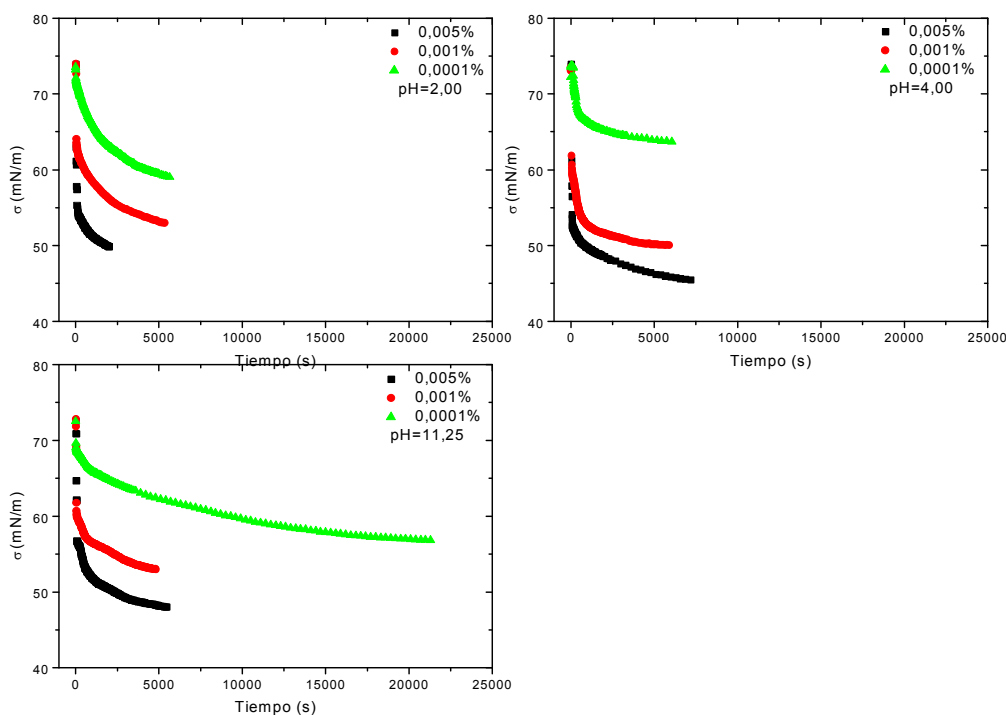


Fig 5.2.3: Cinética del gluten en función de la concentración y del pH a 30°C.

De la observación de estos resultados se puede establecer que, en general:

- un aumento de la concentración de proteína en la subfase acuosa no sólo produce una reducción en el valor de tensión que se alcanza una vez que se estabiliza la película interfacial, sino que la disminución de la tensión es más rápida. Es decir, no sólo se sitúan más moléculas en la interfase sino que éstas alcanzan la interfase en menos tiempo;

- un aumento en la temperatura puede disminuir el tiempo requerido para que se estabilice la tensión, pero el valor final alcanzado puede no modificarse o incluso aumentar al hacerlo la temperatura, dependiendo del pH y de la concentración de proteína;

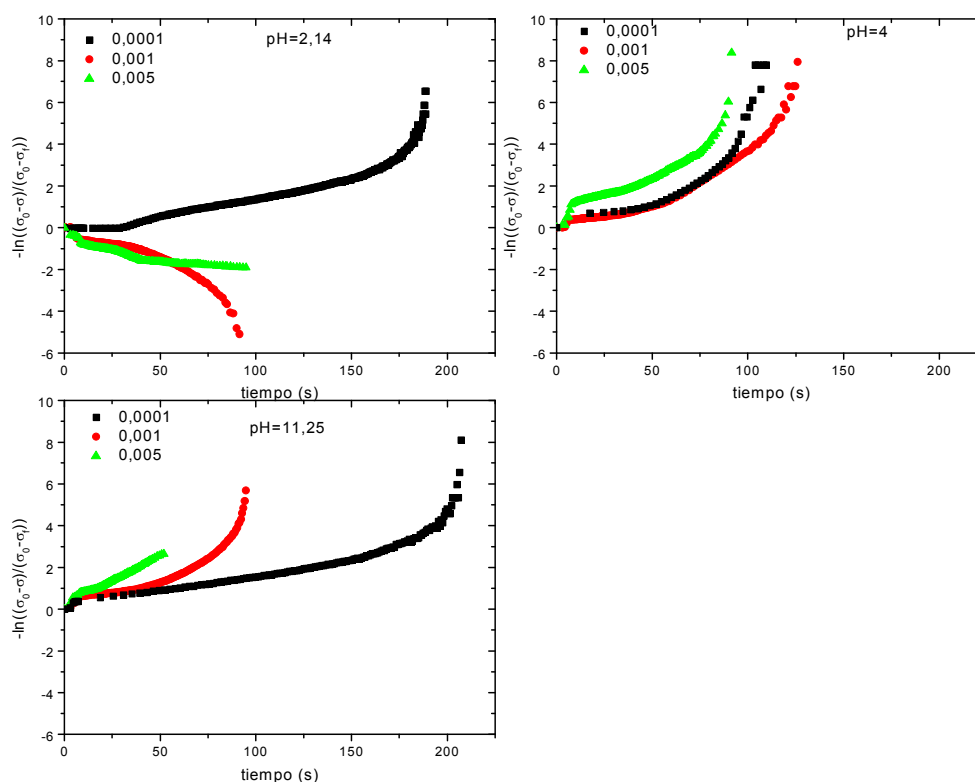
- las soluciones a pH 4 son las que presentan cinéticas de adsorción más rápidas y valores finales de tensión más pequeños. Los cambios producidos por el pH sobre la

cinética son menores a la mayor de las temperaturas estudiadas y más significativos cuanto mayor es la concentración de proteína.

Al inicio, el proceso está gobernado por la difusión de las moléculas de proteína hacia la interfase. Durante este período de inducción, los valores de  $\pi$  se mantienen próximos a cero. La tensión superficial descenderá respecto a la correspondiente al solvente puro sólo cuando una cantidad significativa de surfactante se haya adsorbido en la interfase aire/agua. Estos períodos de inducción no siempre se observan, especialmente a altas concentraciones o cinéticas de adsorción muy rápidas (B.C. Tripa, J.J.Magda y J.D.Andrade, 1995). En los sistemas aquí estudiados, sólo a los valores más bajos de concentración de proteína y de temperatura y para ciertos pH, la difusión es lo suficientemente lenta como para poder ser analizada mediante el registro de la tensión frente al tiempo.

A fin de establecer algunas conclusiones acerca del resto de las etapas o procesos implicados en la cinética de adsorción de estas proteínas, se representa gráficamente  $\ln((\pi_{\infty} - \pi_{\theta})/(\pi_{\infty} - \pi_0))$  vs  $\theta$ . En la siguiente figura, se muestran los resultados obtenidos a 20°C.





**Fig 5.2.4:** Cinética de adsorción del gluten en función de la concentración de proteína y pH de la fase acuosa.

El ajuste de los datos experimentales al mecanismo cinético se ha realizado a intervalos de tiempo a partir de las gráficas anteriores, tomando como criterio el del mejor coeficiente de regresión lineal. Los resultados muestran que en la cinética de adsorción de las moléculas de proteína están implicadas, como mínimo, dos etapas distintas, adsorción y posterior reordenamiento de las moléculas, representadas por sus correspondientes constantes cinéticas,  $k_1$  y  $k_2$ . En la Tabla 5.2.1 se recogen los valores de estas constantes para los distintos sistemas aquí estudiados.

$C \cdot 10^5$ (%)	$k_1 \cdot 10^5$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2 \cdot 10^5$ (s <sup>-1</sup> )		
5	8	18	pH=2,14	10°C
1	68	34		
5	10	28	pH=4,00	
1	72	22		
5	4	12	pH=11,25	
1	12	11		
5	237	37	pH=2,14	20°C
1	40	112		
0,1	8	14		
5	42	48	pH=4,00	
1	27	36		
0,1	66	23		
5	80	113	pH=11,25	
1	34	50		
0,1	6	11		
5	366	143	pH=2,14	30°C
1	56	163		
0,1	55	80		
5	69	36	pH=4,00	
1	205	79		
0,1	251	61		
5	143	66	pH=11,25	
1	109	36		
0,1	31	12		

Tabla 5.2. 1: Valores de las constantes cinéticas obtenidas para el gluten en función de la concentración y del pH de la fase acuosa a distintas temperaturas (10, 20 y 30°C)

### Efecto de las variables en $k_1$ .

El incremento de la presión superficial durante la etapa de adsorción de la proteína es menor cuando decrece su concentración en el seno de la fase. Inicialmente, la cinética está controlada por la difusión, siendo la velocidad de difusión menor cuanto más baja es la concentración de proteína en el seno de la fase. A mayores tiempos de adsorción, cuando existe una barrera de energía para la misma, 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, la cinética está representada por el valor de la constante  $k_1$ .

No se puede establecer una conclusión única acerca de la influencia que la concentración de proteína tiene sobre los valores de  $k_1$ . Los resultados son dependientes del resto de los factores implicados: pH y temperatura. Así, a pH 2 y 11 y para 10°C de temperatura, mayores valores de  $k_1$  se obtienen a menores concentraciones de proteína, mientras que el efecto contrario se observa para estos mismos pH y el resto de las temperaturas aquí estudiadas. A bajas temperaturas y, por lo tanto, menor contenido de energía para el sistema, el proceso de adsorción se ve favorecido por la existencia de un menor número de moléculas en las proximidades de la interfase. Cuando se incrementa la temperatura y, con ello, el porcentaje de moléculas con energía suficiente para la adsorción, la velocidad de adsorción aumenta si lo hace el número de moléculas de proteína que alcanzan la interfase.

A pH 4 y 10°C de temperatura, la influencia de la concentración de proteína sobre los valores de  $k_1$  es similar a la del resto de los pH a esta temperatura, es decir, la adsorción es más rápida si desciende la concentración de proteínas en el seno de la fase acuosa. Sin embargo, el mismo efecto se observa a este pH y 30°C, mientras que no hay una variación significativa en  $k_1$  con la concentración de proteína, a 20°C y pH 4. Los datos de tensión correspondientes al estado final de equilibrio para las películas adsorbidas de gluten son inferiores a pH 4 que al resto de los pH, hecho que se ha relacionado con la posible agregación de las partículas de gluten en el seno de la fase acuosa, por lo que, una menor concentración de partículas de gluten, a cualquier temperatura, puede acelerar el proceso de adsorción en la interfase aire/agua.

En general, las variaciones que produce el pH sobre los valores de  $k_1$  son menos significativas a menores temperaturas, es decir, cuando el proceso de adsorción está más desfavorecido. Y, sea cual sea la temperatura, los valores de  $k_1$  a pH 4 son los más bajos cuando la concentración de proteína es del  $5 \cdot 10^{-5}$  % y los más altos al resto de las concentraciones. Es decir, no sólo se adsorbe más cantidad de proteína en la interfase aire/agua al pH más próximo al punto isoeléctrico, sino que dicha adsorción es más rápida, salvo que la concentración de proteína sea lo suficientemente alta como para favorecer los procesos de agregación de las moléculas en el seno de la fase. En este

caso, aunque el número final de moléculas adsorbidas pueda ser mayor, el proceso de adsorción se da más lentamente.

### **Efecto de las variables en $k_2$ .**

Al igual que se había observado en  $k_1$ , los cambios producidos en  $k_2$  como consecuencia de variaciones en la concentración de proteína son muy dependientes del pH y de la temperatura. No se pueden separar los efectos de las variables. En general, un aumento en la concentración de proteína produce o un aumento en los valores de esta constante o variaciones no significativas (por ejemplo, a 10°C y pH 11). Sólo hay una excepción: a pH 2 y 10°C, un aumento en la concentración produce un descenso en  $k_2$  al igual que había obtenido con  $k_1$ . En general se puede establecer que, al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, aumenta la velocidad de reordenación de las moléculas adsorbidas en la interfase, con la que se asocia el valor de la constante  $k_2$ , aunque los resultados dependen del pH y de la temperatura.

En cuanto al pH, en general los valores de  $k_2$  tienden a aumentar al descender el pH del medio acuoso. A pH 4, al cual se produce agregación de las moléculas de proteína, se observan variaciones importantes en el proceso de adsorción, pero la existencia de agregados no es significativa para la reordenación de las moléculas una vez adsorbidas.

### **5.2.2. SOJA.**

En la siguiente figura se muestran los datos experimentales obtenidos al estudiar la cinética de adsorción de las proteínas de soja, en función del pH y de la concentración de proteína.

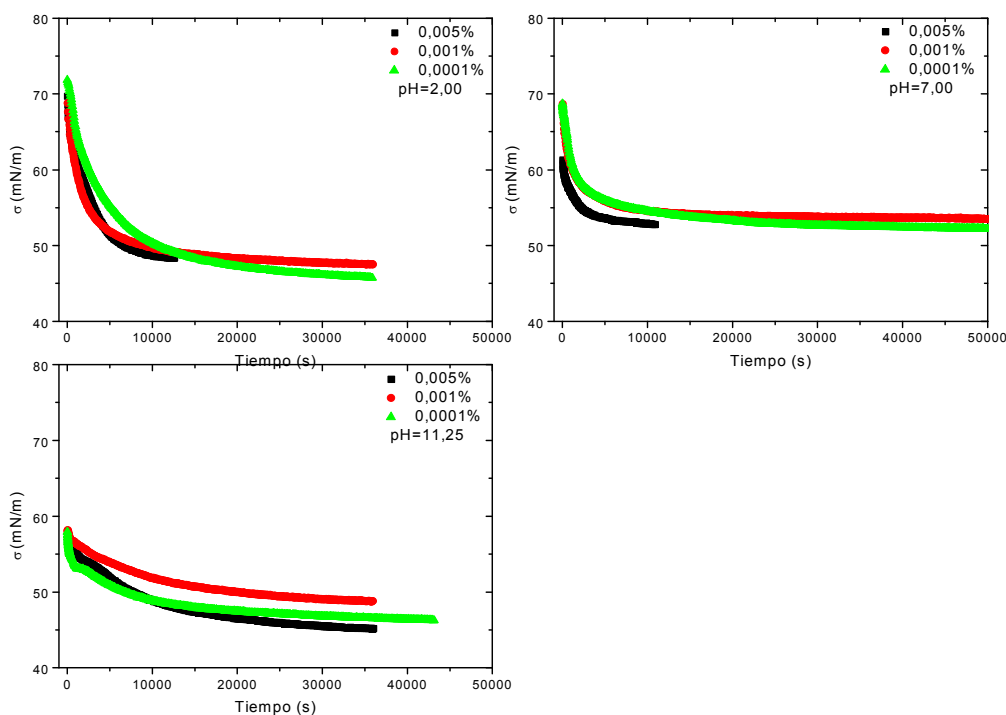
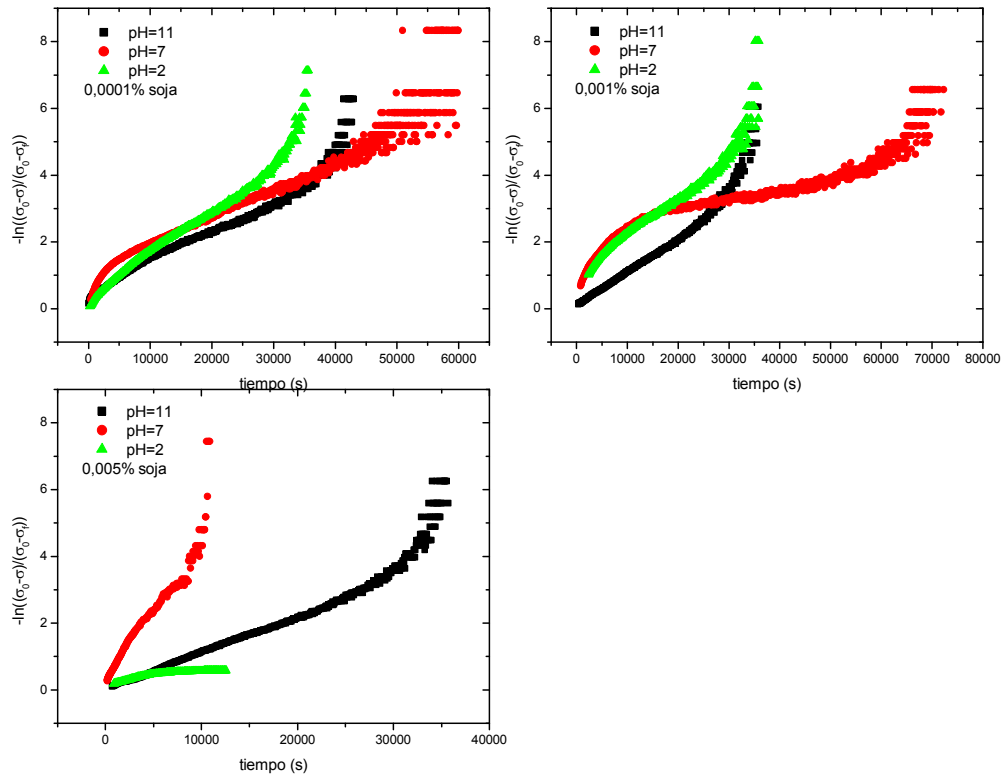


Fig 5.2.5: Cinética de la soja en función de la concentración y del pH a 20°C.

Mayor concentración de soja en el seno de la fase acuosa produce una reducción más importante de la tensión y más rápida, aunque el efecto es menor que con las proteínas del gluten.

A pH=11,25, las modificaciones en el valor de tensión con el tiempo son inferiores al del resto de los pH estudiados y aumenta el tiempo requerido para la formación de una película estable, aunque los valores finales alcanzados sean inferiores. Las dispersiones acuosas de soja a este pH presentan una alta estabilidad, con las moléculas de proteína desplegadas y con una mayor fracción de moléculas en las proximidades de la interfase. Es, por tanto, el sistema que presenta menor tensión en los instantes iniciales, de forma que la llegada de nuevas moléculas a la interfase y su posterior adsorción se produce más gradualmente. Es a pH=2 donde se observa una cinética de adsorción más rápida y donde los cambios totales en la tensión son más elevados.

La representación gráfica  $\ln((\pi_{\infty} - \pi_{\theta})/(\pi_{\infty} - \pi_0))$  vs  $\theta$  para las películas de soja en la interfase aire/agua, en función del pH y de la concentración se recogen en la siguiente figura.



**Fig 5.2.6: Cinética de adsorción de la soja en función de la concentración y del pH de la subfase acuosa.**

Se ajustan los datos experimentales a regresiones lineales, a intervalos de tiempo, tomando como válida aquella a la que le corresponde un mejor coeficiente de regresión. Los valores de las constantes cinéticas calculadas a partir de estas regresiones se muestran en la Tabla 5.2.2.

$C \cdot 10^5$ (%)	$k_1 \cdot 10^5$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2 \cdot 10^5$ (s <sup>-1</sup> )		20°C
5	7,73	3,84	pH=2,14	
1	31,97	21,62		
0,1	22,12	14,32		
5	52,81	32,59	pH=7,00	
1	32,45	18,13		
0,1	58,22	29,15		
5	13,36	11,67	pH=11,25	
1	97,92	13,70		
0,1	71,80	30,79		

**Tabla 5.2. 2: Valores de las constantes cinéticas obtenidas para la soja en función de la concentración y del pH de la fase acuosa a 20°C.**

### Efecto de las variables en la cinética.

Un aumento de concentración de proteína implica mayor número de moléculas o segmentos de soja que se adsorben en la superficie y esto se refleja en un descenso de tensión superficial, o lo que es lo mismo en un aumento de presión superficial. En la etapa inicial de adsorción de la soja, etapa controlada por la difusión, la presión superficial aumenta con la concentración lo que es equivalente a que la velocidad de difusión disminuya con la concentración. A bajas concentraciones hay menor número de interacciones entre las moléculas de proteína, lo que permite que éstas lleguen de forma más rápida a la superficie desde el seno de la fase acuosa.

A mayores tiempos es la adsorción la etapa controlante del proceso. El número de colisiones entre las moléculas de soja y por lo tanto el número de grupos que se adsorben en la superficie dependen de la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa y del pH. Al igual que se había observado con las proteínas del gluten, no es posible separar el efecto de estas variables. A pH 2 y 11, se observa un máximo en los valores de  $k_1$  para una concentración intermedia de proteína,  $10^{-5}$  % y un descenso importante para el mayor valor de concentración. Es decir, concentraciones más bajas favorecen la adsorción de las moléculas de proteína. A pH 7, las variaciones son menos significativas, adoptando  $k_1$  el menor valor para una concentración de proteína del  $10^{-5}$  %. Las mayores variaciones en los valores de  $k_1$  con la concentración se producen en subfases básicas.

En cuanto al efecto del pH, en general  $k_1$  aumenta con el pH del medio. Por tanto, se puede concluir que a pH 11, la adsorción suele ser más rápida que a otros pH, siendo la velocidad de adsorción muy dependiente de la concentración de proteína en el medio acuoso.

Para la etapa posterior de reordenación molecular, a una concentración de  $10^{-5}$  % de proteína, se observa un máximo en el valor de  $k_2$  si el pH es ácido y un mínimo a subfases neutras. Para estos valores de pH, por tanto, hay coincidencia en la variación de  $k_1$  y  $k_2$  con la concentración de proteína. Sin embargo, a pH 11 se observan mayores valores en la constante cinética asociada a la reordenación molecular, cuanto menor es la concentración de proteína. Las menores variaciones en los valores de  $k_2$  con el pH se producen a la concentración intermedia de proteína, del  $10^{-5}$  %.

Se puede concluir, por tanto, que las moléculas de soja se adsorben más rápidamente a concentraciones más bajas y a pH más elevados. Una vez adsorbidas, variaciones en el pH no producen cambios significativos en el proceso de reordenación molecular, salvo a la mayor de las concentraciones aquí estudiadas, observándose que esta etapa es más rápida a pH 7 para este valor de concentración. A pH=11,25 las dispersiones de soja son más estables, las moléculas adoptan una conformación más desplegada, lo que favorece el proceso de adsorción. A pH=7 y alta concentración de proteína se establece un mayor número de interacciones entre las moléculas de soja, formándose una película más compacta reduciéndose el tiempo total necesario para alcanzar un valor estable de tensión.

### **5.2.3 COMPARACIÓN CINÉTICA DE LAS PROTEÍNAS.**

En las gráficas siguientes, se comparan las cinéticas de adsorción para las proteínas de gluten y de soja, en función de la concentración. Se puede observar que las dispersiones de gluten alcanzan la estabilidad en menor tiempo que las de soja.

Las moléculas de soja son más pequeñas que las de gluten, por lo que difunden hasta la interfase más rápidamente, como se puede comprobar a partir de los valores de los coeficientes de difusión. Al ser las moléculas más pequeñas, se requiere un mayor



número para saturar la interfase y es por este motivo por lo que la película adsorbida tarda más tiempo en alcanzar la estabilidad superficial.

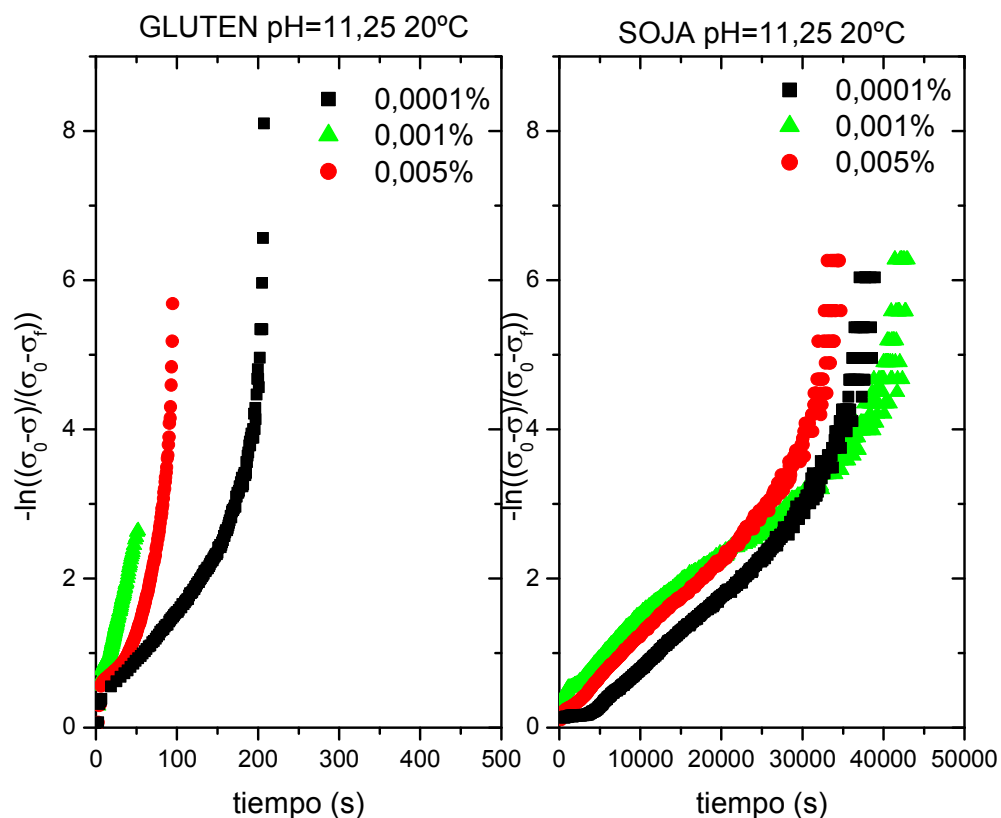


Fig 5.2.7: Cinética de adsorción del gluten y de la soja en función de la concentración de proteína y pH de la fase acuosa.

	GLUTEN	SOJA
<b>0,0001</b>	$5,23 \cdot 10^{45}$	$5,39 \cdot 10^{44}$
<b>0,001</b>	$2,87 \cdot 10^{43}$	$4,77 \cdot 10^{49}$
<b>0,005</b>	$2,76 \cdot 10^{41}$	$1,06 \cdot 10^{49}$

Tabla 5.2. 3: Valores de difusividad para disoluciones de gluten y soja a pH=2,14 en función de la concentración de la subfase acuosa.

### 5.3. REOLOGÍA INTERFACIAL.

La reología interfacial se ocupa del estudio de las propiedades mecánicas y de flujo de las capas adsorbidas en interfases fluidas. Entre las variables más importantes se estudian aquellas relacionadas con la resistencia que presenta la interfase a la deformación y con la fuerza de cohesión de la película interfacial (Burgess y col., 1991; James y Sherman, 1976).

En el caso de sistemas que contienen proteínas, la reducción que se produce en la tensión interfacial no explica tanto la estabilización de emulsiones y espumas alimentarias como la capacidad que le confieren a la interfase fluida de resistir los esfuerzos tangenciales de las fases líquidas adyacentes (Lucassen-Reynders y Benjamins, 1999). Es importante, por lo tanto, el estudio de las propiedades reológicas superficiales de las capas de proteínas adsorbidas (Lucassen-Reynders, 1993; Murray, 1998; Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998).

Las propiedades reológicas de las proteínas en disolución o dispersión se encuentran entre las propiedades funcionales más importantes de las proteínas alimentarias. Son importantes porque de ellas depende en gran medida la estabilidad de las emulsiones y de otras partículas suspendidas en los alimentos. Contribuyen al sabor de los alimentos directamente y sirven para controlar el tamaño de los cristales de azúcar en productos confeccionados y golosinas. El procesado induce cambios en las proteínas como la agregación, la polimerización y la hidrólisis que afecta a las propiedades reológicas de los productos alimentarios. Una de sus propiedades reológicas más importantes es la viscosidad (G.M.Hall, 1996).

La concentración y las propiedades físico-químicas inherentes afectan a la viscosidad de las proteínas en disolución. La concentración y las propiedades físico-químicas de otros solutos iónicos y no iónicos ejercen también una importante influencia en la viscosidad de las soluciones de proteínas por su contribución directa e incluso por su tendencia a interactuar y a modificar las propiedades físico-químicas de las proteínas. La reología interfacial de cizalla parece ser sensible a la estructura

macromolecular detallada y a la naturaleza de las interacciones intermoleculares de las capas adsorbidas (Murray y col., 1985; Rodríguez Patino y Niño, 1999).

VARIABLES como la concentración, las condiciones de dispersión, el pH y la fuerza iónica pueden afectar a la viscosidad de las disoluciones de proteínas. La viscosidad de estos sistemas proteicos, al igual que el resto de propiedades reológicas, es altamente sensible a la historia termomecánica y por tanto a las técnicas usadas para medirla. Otros factores que afectan a la viscosidad de las disoluciones de proteínas son el procesado y los factores de composición, como temperatura y pH de precipitación, temperatura de secado, contenido de calcio, etc. (Hall, G.M., 1996).

La reología de cizalla interfacial es considerada una técnica útil para obtener información acerca de la estructura que presentan las películas adsorbidas de proteínas y/o tensioactivos (Martin y col., 2002a). Al igual que la reología de cizalla tridimensional en sistemas coloidales es sensible a la naturaleza de las interacciones entre las partículas de los distintos componentes, también la reología de cizalla interfacial parece ser particularmente sensible a la composición de la capa interfacial y a las interacciones intra e intermoleculares que se establecen en las especies presentes en dicha película (Murray, 2002).

Se puede establecer, por tanto, que todo factor que produzca un reforzamiento de las interacciones entre las moléculas adyacentes de la película interfacial, dará lugar a mayores valores de la viscosidad interfacial, excepto si este reforzamiento se da también en el seno de la fase acuosa, con formación de agregados y con una reducción en el número de moléculas que se adsorben en la interfase (Martin y col., 2002b). Entre los factores que originan modificaciones en las interacciones existentes en el sistema a nivel interfacial, se pueden citar la adición de tensioactivos de bajo peso molecular, solubles o insolubles en la fase acuosa (como los lípidos), el incremento en la diferencia entre el pH del medio y el punto isoeléctrico de la proteína y la aplicación de esfuerzos de cizalla (Murray, 2002).

Actualmente no existe ningún modelo teórico que pueda predecir, ni siquiera cualitativamente, la reología interfacial de lípidos y proteínas (Murray, 2002). Se ha observado que un incremento en la viscosidad de cizalla interfacial suele ir paralelo a un

incremento en la complejidad de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína nativa, debido a un aumento en la posibilidad de establecer enlaces intramoleculares en la capa interfacial. Rao y Damodaran (2000) establecieron que los valores de viscosidad de cizalla interfacial tienden a aumentar cuando es mayor la tendencia de las moléculas a la agregación, lo que está relacionado con un incremento en la probabilidad de que las moléculas de agua sean excluidas de la región interfacial. Este hecho permitiría conectar las variaciones observadas en la viscosidad interfacial con las variaciones en la tensión interfacial del sistema, aunque una descripción cuantitativa del proceso no es posible sin conocer las conformaciones que las moléculas de proteína adoptan en la interfase.

Varios autores asumen que las propiedades reológicas de cizalla interfacial juegan un importante papel en la formación y estabilización de emulsiones y espumas (Coke y col., 1990; Dickinson, 1999; Roth y col., 2000). Recientemente, se han desarrollado diversos estudios, tanto experimentales como teóricos, para intentar establecer conexiones entre el comportamiento reológico interfacial y la estabilidad o las propiedades finales de los sistemas coloidales tipo emulsión y espuma (Kloek y col., 2001; Meinder y col., 2001; Hammerxhoj y col., 1999; Williams y col., 1997). Sin embargo, aunque se han producido avances en los últimos años, esta conexión directa aún no es posible (Bos y van Vliet, 2001; Murray, 2002).

Generalmente, un estudio del comportamiento reológico interfacial requiere realizar al menos dos tipos de ensayos. El primero de estos ensayos consiste en la aplicación de una velocidad de cizalla constante a la película adsorbida, obteniéndose la viscosidad superficial aparente ( $\eta_{app}^s$ ). El segundo tipo de ensayo consiste en la aplicación de una deformación (o esfuerzo) de cizalla oscilatoria de la interfase. Un parámetro característico de este tipo de ensayo es el módulo de cizalla superficial ( $G^s$ ) (Martin y col., 2002a).

En este apartado se analizarán las propiedades reológicas interfaciales de las películas de proteína objeto de esta memoria, así como de sus mezclas con monoestearina. El estudio se ha centrado en las proteínas del gluten, ya que éste ha sido el sistema más ampliamente investigado en esta memoria. También se han llevado a cabo experiencias reológicas con las proteínas de soja, a fin de poder establecer conclusiones acerca del comportamiento de las proteínas de origen vegetal. No se han

podido obtener datos con ovoalbúmina ya que, en las condiciones de trabajo, se forman agregados en las disoluciones.

Como experiencia previa se ha medido la viscosidad interfacial del sistema aceite-agua en función del pH de la fase acuosa y en ausencia de proteína. Los resultados se muestran en la figura 5.3.1. Se observa que existe una influencia significativa del pH de la subfase sobre la consistencia de la interfase aceite-agua. A pH neutro la contribución de la viscosidad interfacial es despreciable. Sin embargo, la ionización de la subfase, tanto en condiciones ácidas como alcalinas, induce cierto grado de ordenación de la interfase que se traduce en valores significativos de viscosidad interfacial, especialmente a pH=4. Esta estructura es muy sensible a la cizalla ya que, como puede apreciarse, tiende a desaparecer al aumentar la velocidad de rotación, no observándose cambios en la viscosidad interfacial a velocidades de cizalla superiores a  $2 \text{ s}^{-1}$ , para pH=2 y 11, y por encima de  $3,5 \text{ s}^{-1}$  para pH=4.

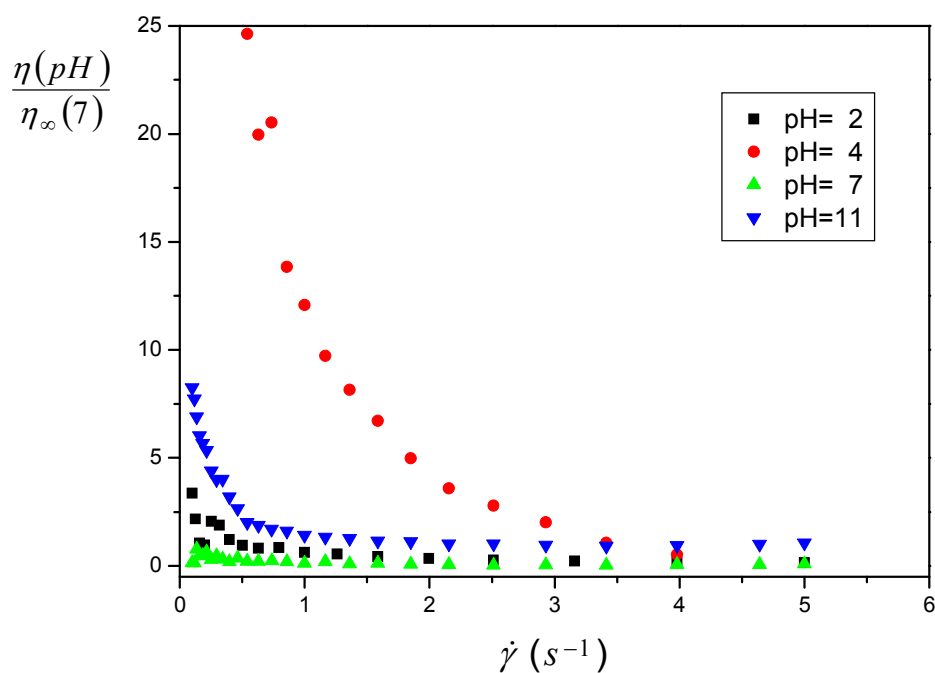


Fig 5.3. 1: Variación de la viscosidad interfacial de la interfase aceite-agua en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla.

A partir de los resultados experimentales de viscosidad, se ha determinado la viscosidad interfacial específica a partir del valor de viscosidad interfacial relativo a la viscosidad interfacial a pH 7 del blanco (interfase aceite/agua libre de lípido o proteína):

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{\eta_i(\dot{\gamma}, pH)}{\eta_i(\dot{\gamma}_{\infty}, pH = 7)} - 1$$

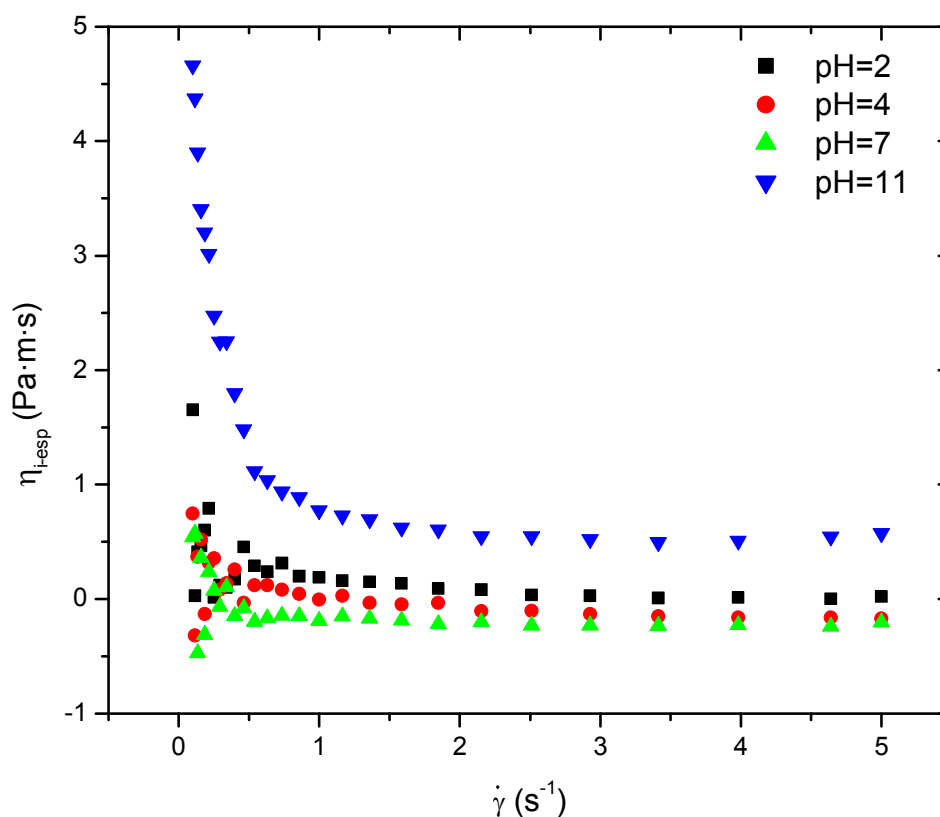
$$\eta_i(\dot{\gamma}, pH) - \eta_i(\dot{\gamma}_{\infty}, pH = 7) = \eta_{Ti}(\dot{\gamma}, pH) - \eta_{Ti}(\dot{\gamma}_{\infty}, pH = 7)$$

Los valores de  $\eta_T$  son los que se registran directamente del reómetro y por tanto incluyen la contribución de ambas fases, además de la de la interfase, mientras que los de  $\eta_i$ , que sólo representan la contribución de la interfase, hay que calcularlos a partir de los datos del reómetro mediante la siguiente relación:

$$\eta_i(\dot{\gamma}_{\infty}, pH = 7) = \eta_{Ti}(\dot{\gamma}_{\infty}, pH = 7) - \frac{k}{2}(\mu_w - \mu_o)$$

Estos valores de viscosidad específica serán los que se utilizarán para mostrar y discutir los resultados del estudio reológico interfacial de las películas de proteínas y sus mezclas con monoestearina.

En la figura 5.3.2 se representan los valores de la viscosidad interfacial específica en función de la velocidad de cizalla y el pH de la fase acuosa, en presencia de monoglicérido (165  $\mu$ l) y en ausencia de proteína. Por lo general, se produce una reducción de la viscosidad interfacial en presencia de monoestearina. A baja velocidad de cizalla, existe también una dependencia de la viscosidad interfacial con el pH del medio acuoso, siendo ahora los valores más elevados para las soluciones a pH=11. Esta dependencia tiende a desaparecer al aumentar la cizalla. Es en la subfase neutra (pH=7) donde la velocidad de cizalla ejerce menos influencia sobre la viscosidad.



**Fig 5.3. 2:** Variación de la viscosidad interfacial de la interfase aceite-agua en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla en presencia de monoestearina.

En la gráfica anterior se observan algunos valores de viscosidad negativos, hay que indicar que carecen de importancia ya que los valores de viscosidad se han corregido respecto a los del blanco a pH=7 en ausencia de monoestearina, que son valores más altos que los que se obtienen en presencia de monoestearina.

A fin de establecer mejor los efectos que el pH del medio acuoso o la presencia de lípido ejercen sobre la reología interfacial, se han analizado los datos anteriores a dos velocidades de cizalla constantes, tomadas como referencia. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

	$0,1 \text{ s}^{-1}$				$1 \text{ s}^{-1}$			
	pH=2	pH=4	pH=7	pH=11	pH=2	pH=4	pH=7	pH=11
<b>Blanco</b>	<b>1,89</b>	<b>106,19</b>	<b>0,05</b>	<b>1,10</b>	<b>0,32</b>	<b>6,84</b>	<b>0,04</b>	<b>0,89</b>
<b>Blanco+ME</b>	<b>1,65</b>	<b>0,74</b>	<b>0,53</b>	<b>4,66</b>	<b>0,19</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0,78</b>

**Tabla 5.3.1: Datos de viscosidad interfacial específica en función del pH de la subfase acuosa para dos velocidades de cizalla constantes.**

Como se ha comentado previamente, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- la interfase aceite/agua presenta una cierta viscosidad interfacial a bajos valores de velocidad de cizalla y subfases acuosas ácidas o alcalinas, debido probablemente a un cierto grado de ordenación o estructuración de las moléculas en la interfase cuando ésta se encuentra prácticamente en reposo,

- el aumento en el grado de cizallamiento de la interfase da lugar a la disminución de esta viscosidad interfacial, por la disrupción de las posibles estructuras que existan en la interfase,

- la formación de una película de monoestearina en la interfase aceite/agua no origina una viscosidad interfacial significativa excepto a valores muy bajos de velocidad de cizalla y a pH 11, lo que es concordante con el comportamiento normal de las películas de tensioactivos de bajo peso molecular, especialmente si tenemos en cuenta que las moléculas de monoestearina pueden estar parcialmente disueltas en la fase aceite.

### **5.3.1. GLUTEN.**

Para analizar el comportamiento reológico interfacial de las películas de proteínas, se han llevado a cabo ensayos de flujo para determinar la viscosidad interfacial en función de la velocidad de cizalla, a distintos tiempos desde la colocación de la muestra. Estos ensayos se han realizado para cada uno de los valores de pH



estudiados, tal y como se muestra en la figura 5.3.3 para la solución acuosa de gluten a pH=2. En general, se ha encontrado que las películas interfaciales formadas por las proteínas adsorbidas del gluten presentan valores de viscosidad dependientes de la velocidad de rotación de la interfase, del tiempo y del pH del medio acuoso.

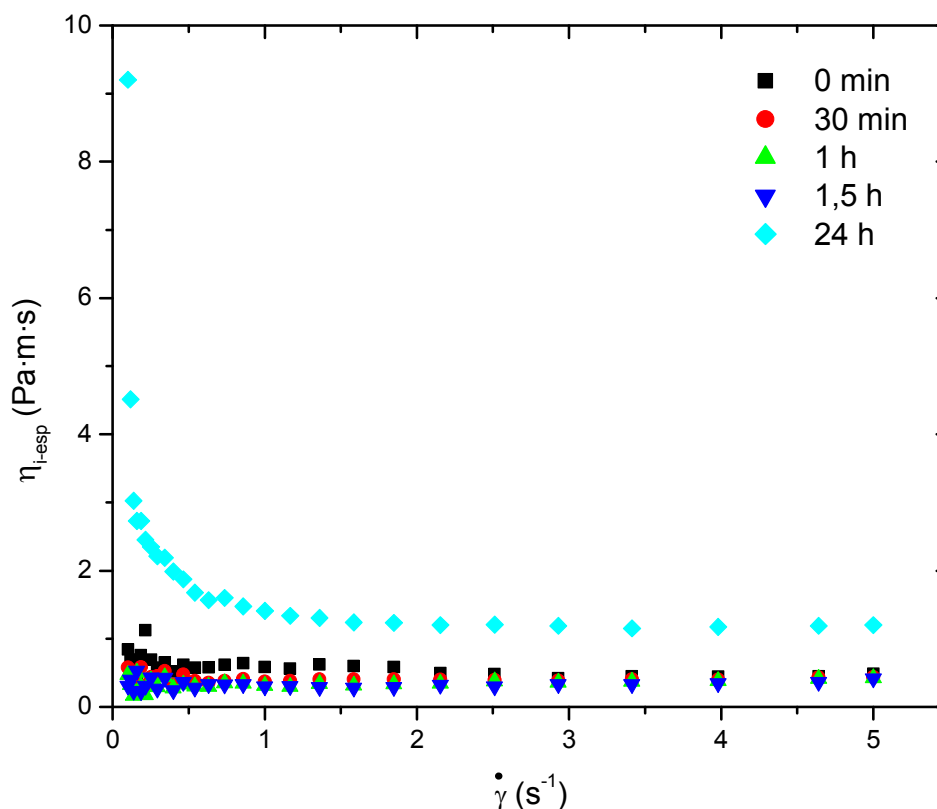


Fig 5.3. 3: Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de gluten a pH=2 en función del tiempo de maduración y de la velocidad de cizalla.

Debido a que la proteína necesita un tiempo para colocarse en la interfase, se producen aumentos en la viscosidad con el tiempo, fenómeno que se justifica por un incremento en el número de molécula adsorbidas y en la probabilidad de que se establezcan interacciones entre las mismas, con formación de una película de mayor viscoelasticidad (Burgess y Sahin, 1997). Las características reológicas de las películas adsorbidas como una función del envejecimiento de la película son un reflejo del fenómeno de restructuración particular que ocurre después de la adsorción molecular (Martin y col., 2002b; Roth y col., 2000).

Martin y col. (2002a) encontraron también un incremento con el tiempo en los valores de viscosidad interfacial de cizalla para películas de  $\beta$ -lactoglobulina y de ovoalbúmina en la interfase aire/agua, Bos y van Vliet (2001) para diferentes proteínas en la interfase n-tetradecano/agua y Pérez-Orozco y col. (2004) para distintas mezclas de biopolímeros.

Las diferencias en la viscosidad con el tiempo se hacen menores al incrementar la velocidad de cizalla, probablemente debido al desplazamiento de la proteína de la capa interfacial o a la destrucción de interacciones que se hayan generado entre las moléculas de proteína en la interfase.

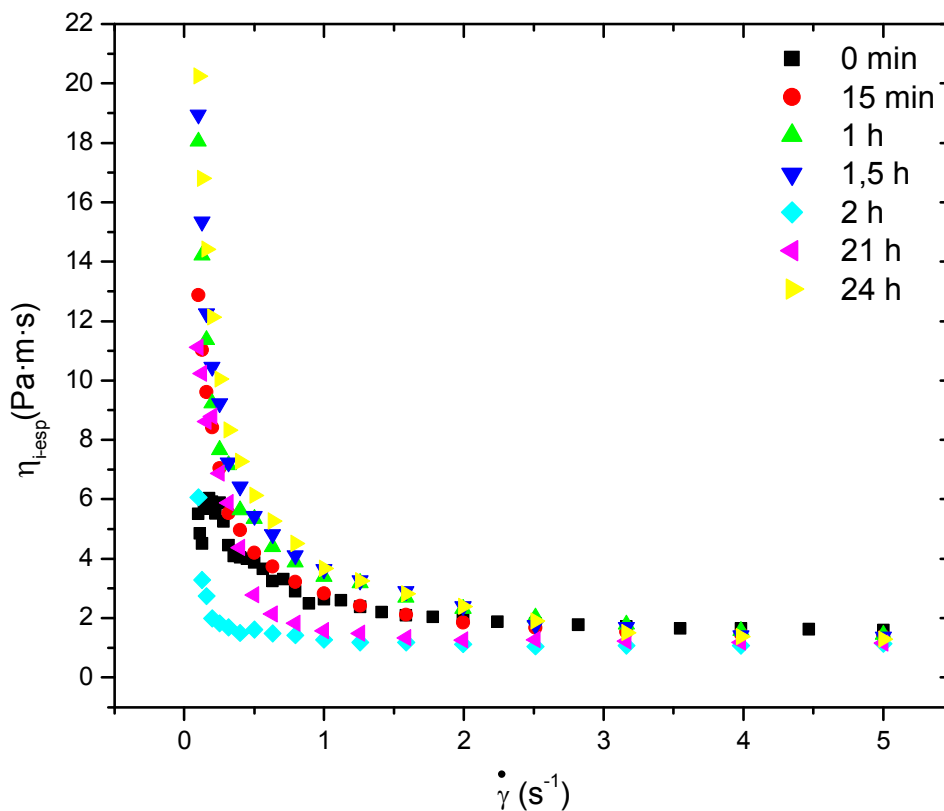
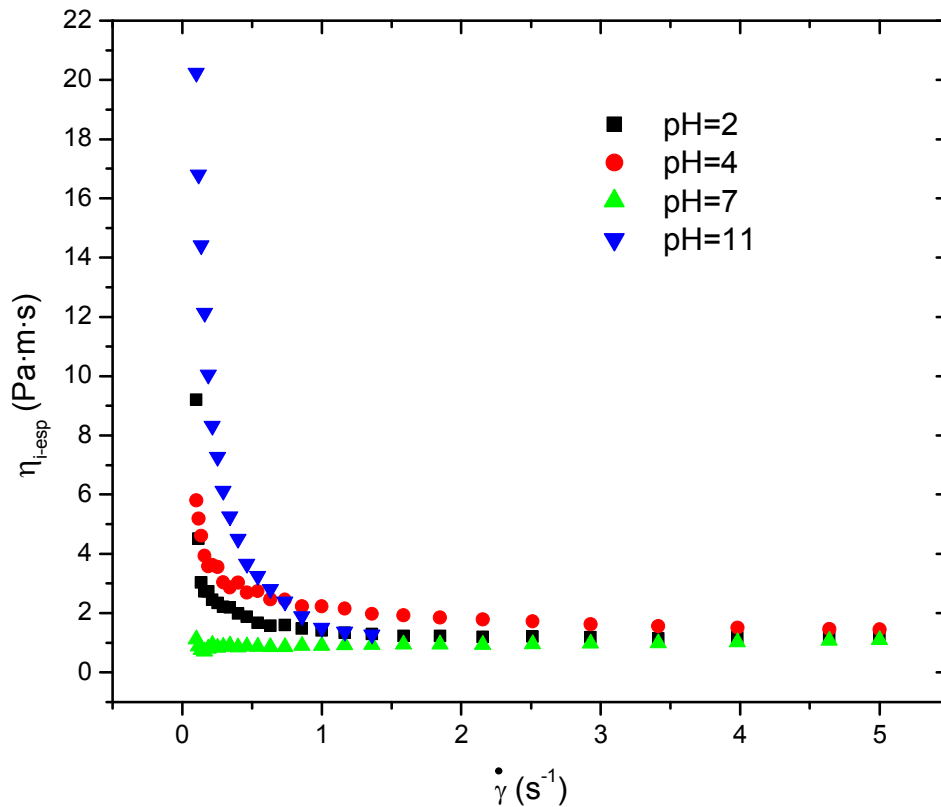


Fig 5. 3.4: Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de gluten a pH=11 en función del tiempo de maduración y de la velocidad de cizalla.

Es a pH=11 y a bajas velocidades de rotación donde se ha obtenido una mayor influencia del tiempo de envejecimiento sobre los valores de viscosidad interfacial. A este pH, las dispersiones acuosas de gluten presentan mayor estabilidad y menor tendencia a la agregación. Es probable, por tanto, que las moléculas de proteínas adopten una estructura desplegada en la interfase y que, a medida que se vayan adsorbiendo más moléculas, se produzcan cambios conformacionales importantes y el establecimiento de interacciones entre moléculas vecinas.

A efectos de comparación, para eliminar la influencia del tiempo, se mostrarán siempre los valores de viscosidad interfacial obtenidos al cizallar la muestra a las 24 horas de su colocación en el reómetro.

En la figura 5.3.5 se pueden observar los valores de viscosidad interfacial para el gluten en función del pH y de la velocidad de cizalla. En general puede afirmarse que la interfase presenta viscosidad interfacial siempre, dependiente del pH. De nuevo se observa una mayor influencia del pH a bajas velocidades de cizalla. Este efecto desaparece prácticamente a partir de velocidades del orden de  $3 \text{ s}^{-1}$ . Para las películas interfaciales de proteínas del gluten, no sólo se reducen y estabilizan los valores de viscosidad interfacial al aumentar la velocidad de cizalla, para un valor de pH determinado, sino que incluso, dichos valores de viscosidad se hacen coincidentes, para las distintas subfases acuosas, a un alto grado de cizalla.



**Fig 5. 3.5: Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de gluten en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla.**

Aunque el efecto de la velocidad de cizalla es más significativo que la influencia del pH, se pueden establecer algunas conclusiones acerca del comportamiento reológico de las películas de proteínas del gluten, en función del pH:

- a pH=7 no existe una viscosidad interfacial significativa, incluso aunque la interfase se encuentre sometida a una cizalla muy débil. Las disoluciones acuosas a pH=7 se corresponden con la mínima solubilidad del gluten (A. Guerrero y col., 2005) y es el valor del pH, dentro de los aquí estudiados, más próximo al punto isoeléctrico de la proteína.

- en las condiciones de cizalla en las que sí son representativos los valores de viscosidad en función del pH, se produce una disminución de la viscosidad cuando se

reduce el pH del medio acuoso (viscosidad a pH=11 > viscosidad a pH=4 > viscosidad a pH=2),

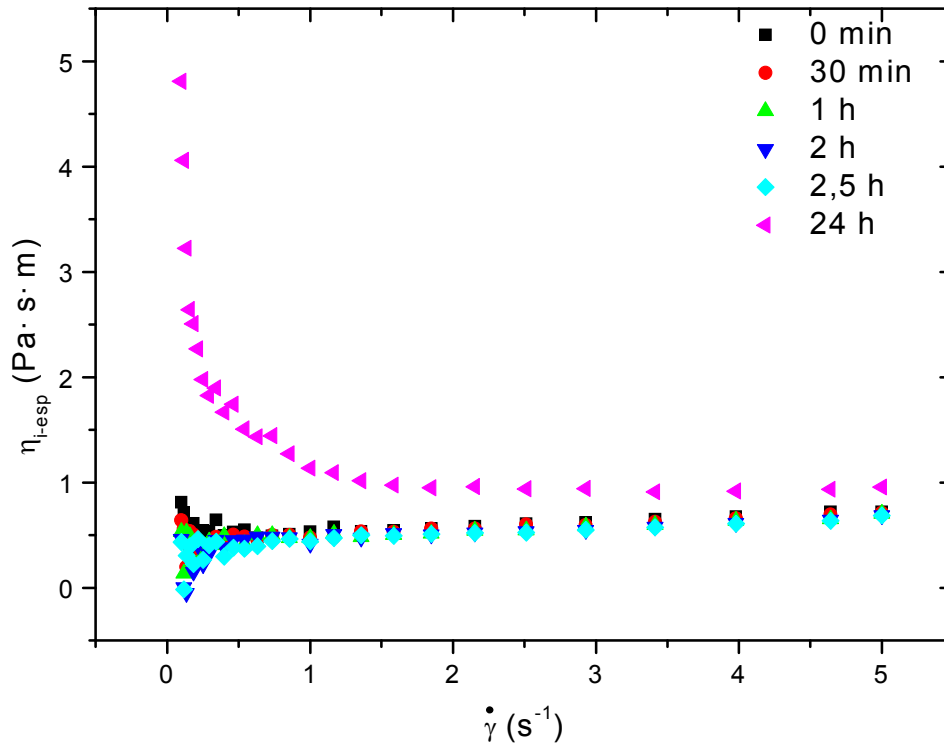
- en general, a cualquier pH y velocidad de cizalla, la presencia de gluten produce mayores valores de viscosidad interfacial que los obtenidos para interfases aceite/agua en ausencia de proteína, tal y como se muestra en la siguiente Tabla, cuyos datos se han extraído de las gráficas anteriores. A pH=4, la interfase aceite-agua libre de proteína presenta un valor de viscosidad excepcionalmente elevado, por lo que, en este caso, no se aprecia la influencia del gluten.

	pH=2	pH=4	pH=7	pH=11
<b>Blanco</b>	<b>1,89</b>	<b>106,19</b>	<b>0,05</b>	<b>1,10</b>
<b>Gluten</b>	<b>9,20</b>	<b>5,81</b>	<b>1,13</b>	<b>20,24</b>

**Tabla 5.3.2: Valores de viscosidad interfacial a  $1s^{-1}$  para disoluciones con y sin gluten para distintos valores de pH.**

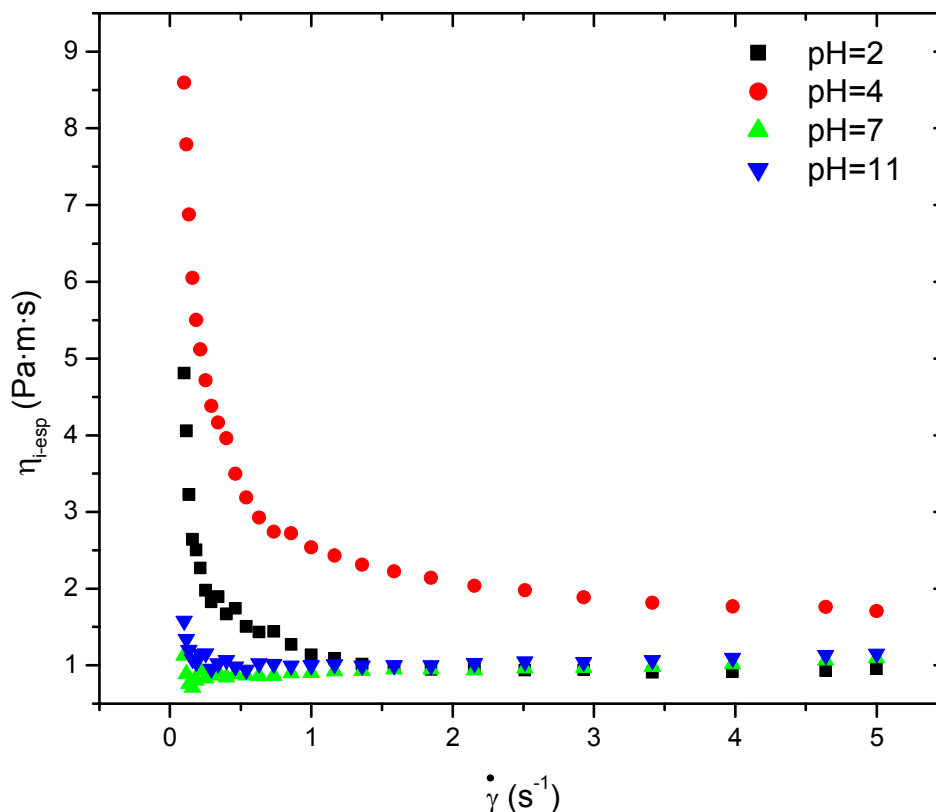
La incorporación de tensioactivos de bajo peso molecular produce la rotura de las interacciones proteína-proteína en la capa interfacial, debido al desplazamiento de las moléculas de proteínas por moléculas del tensioactivo o a la formación de complejos interfaciales proteína-tensioactivo (Bos y Van Vliet, 2001). La adición de monoestearina origina cambios en las características reológicas de la capa interfacial. Variaciones en el pH o en la velocidad de cizalla producen mayores modificaciones en los valores de viscosidad interfacial de las disoluciones acuosas de gluten cuando está presente el lípido en la interfase.

En la siguiente figura, se muestran los valores de viscosidad interfacial a pH=2 de estas películas mixtas obtenidos al someter el sistema a un barrido de velocidades de cizalla, a distintos tiempos. Al igual que en el caso de las películas interfaciales constituidas únicamente por moléculas de proteína, los valores más significativos son los obtenidos tras 24 horas.



**Fig 5.3.6:** Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de gluten a pH=2 en función del tiempo de maduración y de la velocidad de cizalla en presencia de monoestearina.

A fin de establecer conclusiones acerca de la influencia del pH sobre el comportamiento reológico de estas películas, se comparan los valores de viscosidad en un amplio intervalo de velocidades de cizalla, para los distintos pH del medio acuoso (Fig 5.3.6).



**Fig 5. 3.7:** Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de gluten en función del pH y de la velocidad de cizalla en presencia de monoestearina.

Se pueden establecer las consideraciones siguientes:

- las películas mixtas gluten-monoestearina, presentan viscosidades interfaciales positivas, cuyos valores son dependientes del pH y de la velocidad de cizalla, siendo el efecto del pH sobre los valores de viscosidad interfacial más significativo cuando el grado de cizalla de la interfase es bajo,
- a diferencia de lo observado en los componentes individuales, las películas mixtas presentan un ligero incremento en la viscosidad interfacial con la velocidad de cizalla, para los mayores valores de ésta y a pH 7 y 11,

- de todas las subfases acuosas estudiadas, la correspondiente a pH=4 es la que presenta mayores valores de viscosidad para todo el intervalo de velocidades de cizalla. Para el resto de los pH y, a bajas cizallas, la viscosidad disminuye en el orden  $2 > 11 > 7$ .

A modo de resumen de la influencia de los distintos parámetros estudiados (pH, grado de cizalla y presencia o no de lípido en la interfase) sobre la reología interfacial, se muestran a continuación los valores de viscosidad para las películas de gluten y sus mezclas con monoestearina a los distintos pH, para tres velocidades de cizalla tomadas de referencia. El aumento en el grado de cizalla o la introducción de moléculas de monoestearina reducen la viscosidad interfacial de las películas de gluten. También el pH tiene una incidencia significativa sobre la viscosidad, aunque esta incidencia es distinta dependiendo del valor considerado.

	Gluten			Gluten+ME		
	$0,1 \text{ s}^{-1}$	$1 \text{ s}^{-1}$	$5 \text{ s}^{-1}$	$0,1 \text{ s}^{-1}$	$1 \text{ s}^{-1}$	$5 \text{ s}^{-1}$
<b>pH=2</b>	<b>9,20</b>	<b>1,41</b>	<b>1,20</b>	<b>4,81</b>	<b>1,14</b>	<b>0,92</b>
<b>pH=4</b>	<b>5,81</b>	<b>2,23</b>	<b>1,45</b>	<b>8,60</b>	<b>2,54</b>	<b>1,77</b>
<b>pH=7</b>	<b>1,13</b>	<b>0,90</b>	<b>1,10</b>	<b>1,13</b>	<b>0,90</b>	<b>1,12</b>
<b>pH=11</b>	<b>20,24</b>	<b>3,67</b>	<b>1,28</b>	<b>1,58</b>	<b>1</b>	<b>1,10</b>

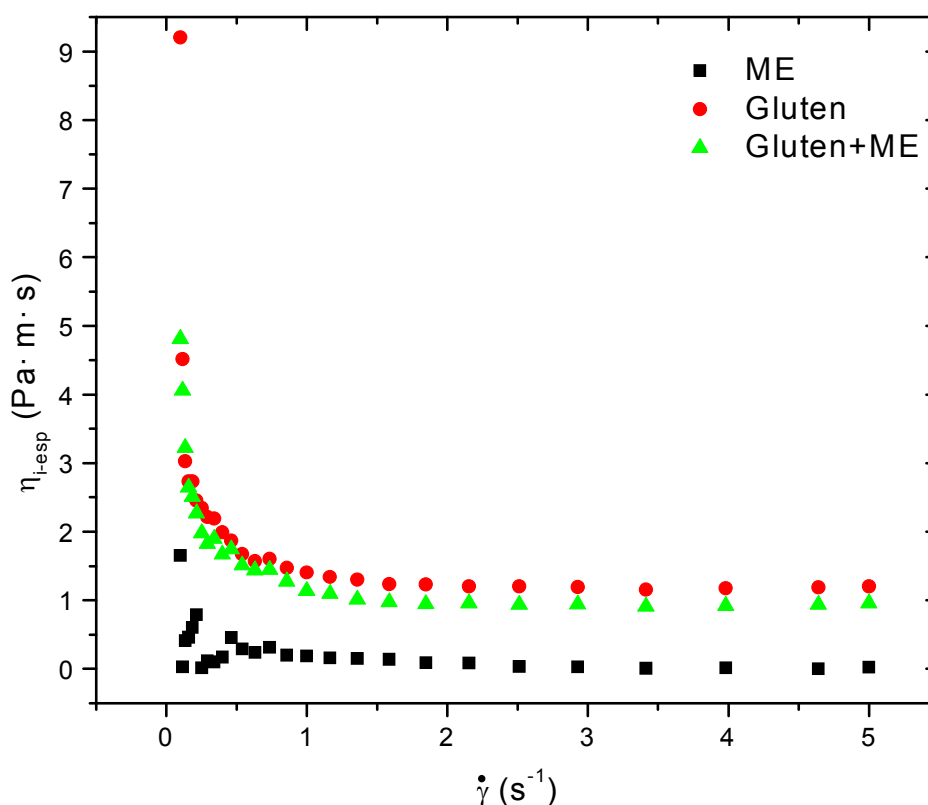
**Tabla 5.3.3: Datos de viscosidad interfacial específica de la disolución de gluten al 1% en ausencia y en presencia de monoestearina, en función del pH de la subfase acuosa para dos velocidades de cizalla constantes.**

El efecto de la presencia de monoglicérido en la interfase aceite/agua se visualiza mejor si se muestran, en la misma gráfica y para las mismas condiciones experimentales, los valores de viscosidad interfacial para las películas de cada uno de los componentes individuales y de su mezcla.

Salvo excepciones puntuales (pH=4 y bajas velocidades de cizalla), la presencia del monoglicérido produce una reducción en los valores de viscosidad interfacial, aunque dichos valores siguen siendo superiores a los correspondientes a las películas

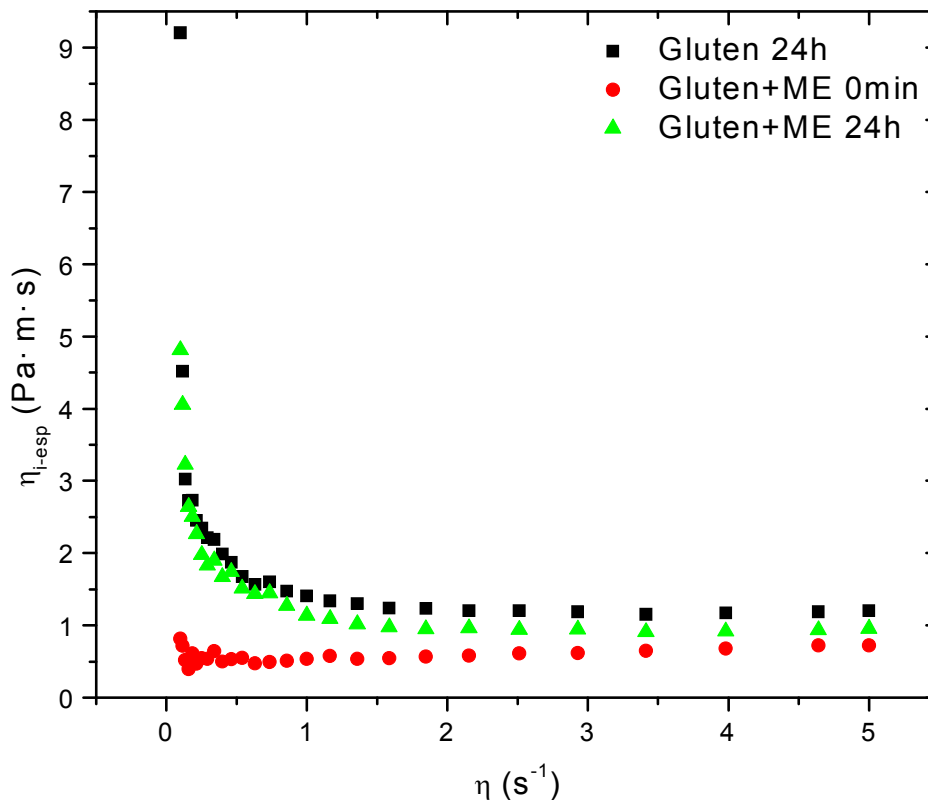


puras de lípido. Otros autores han establecido igualmente que la coadsorción de lípidos y proteínas puede dar lugar a la eliminación de los altos valores de viscosidad característicos de las películas de proteínas debido a su mayor carácter como agente de superficie (Petkov y col., 2000; Kragel y col., 1999). Las moléculas de lípido se sitúan en la interfase fracturando las películas de proteínas en islotes y comprimiendo a éstos, e incluso desplazando a las moléculas proteicas al seno de la fase acuosa adyacente (Mackie y col., 2000). Al ser la monoestearina soluble en la fase hidrófoba, la disminución que experimentan los valores de viscosidad interfacial para las películas mixtas en relación a las películas de proteínas es pequeña.



**Fig 5.3.8:** Estudio del efecto de la presencia y ausencia del gluten sobre los valores de viscosidad interfacial específica en función de la velocidad de cizalla y de la presencia y ausencia de la monoestearina en el medio para pH=2.

El envejecimiento de la interfase da lugar a cambios en la composición y estructura de la capa interfacial. Así, inmediatamente después de añadir la monoestearina, los valores de viscosidad interfacial son inferiores, más cercanos a los característicos para el lípido solo, pero a medida que transcurre el tiempo se van acercando a los que presenta la película proteica, tal y como se muestra en la siguiente figura para el pH=2, lo que indica que aunque inicialmente las moléculas de monoglicérido se esparcen sobre la película formada por el gluten, posteriormente se produce su introducción en esta película y reordenación del total de moléculas situadas en la interfase, hasta alcanzar una situación de equilibrio. Esta no se corresponde con la presencia predominante de un solo componente, sino con una mezcla de ambos.



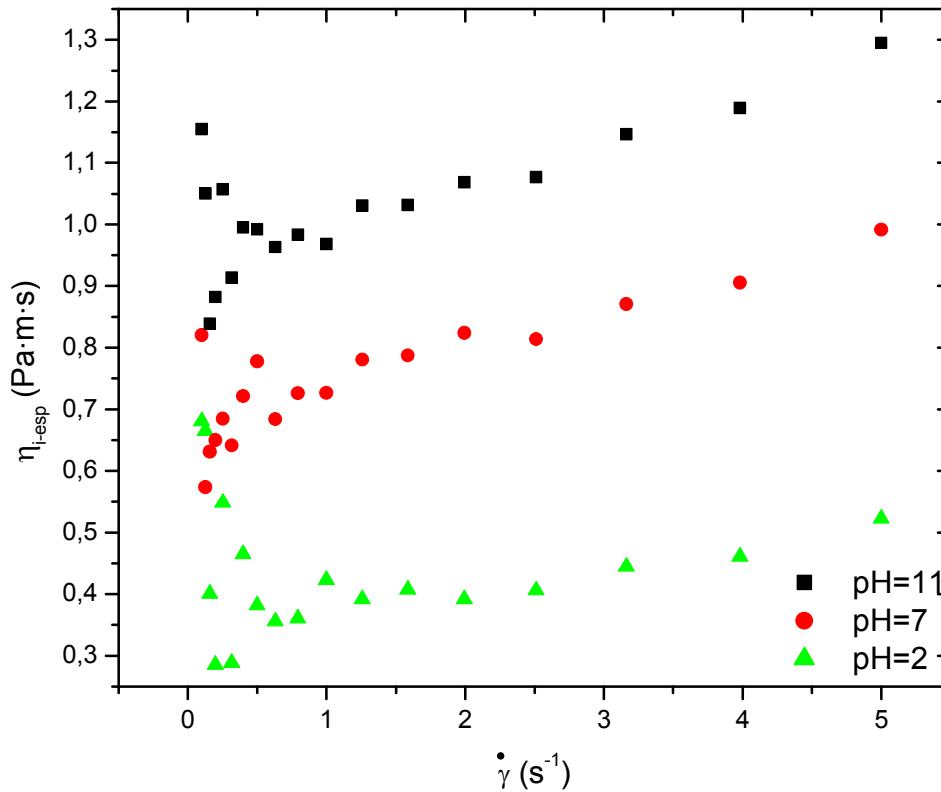
**Fig 5.3. 9:** Estudio del efecto de la presencia y ausencia de la monoestearina sobre los valores de viscosidad interfacial específica en función de la velocidad de cizalla de la solución acuosa de gluten a pH=2. Estudio del efecto del tiempo de estabilización sobre la monocapa de monoestearina.

Las propiedades que se derivan de la aplicación de una cizalla interfacial son especialmente sensibles a las interacciones proteína-proteína y al envejecimiento de las capas adsorbidas. En general, a mayor cohesión interna y grado de estructuración de las moléculas de proteína, mayores son los valores del módulo de cizalla (Bos y van Vliet, 2001). La introducción de surfactantes de bajo peso molecular en el sistema puede dar lugar a una disminución en el número total de interacciones proteína-proteína, con la consiguiente disminución en los valores de viscosidad de cizalla interfacial (Bos y van Vliet, 2001). Se puede establecer, por tanto, que la reología de cizalla interfacial proporciona información acerca de las interacciones proteína-proteína o proteína-surfactante en las interfases fluidas, por lo que su estudio puede contribuir a explicar las características de la capa interfacial en sistemas que contienen mezclas de surfactantes (Murray, 1998).

### **5.3.2. SOJA.**

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de experiencias similares a las realizadas para el gluten pero con soja. El comportamiento reológico que se ha observado en las películas interfaciales de proteínas de soja es, sin embargo, contrario al del gluten. Las moléculas de proteína de soja son de menor tamaño y forman películas interfaciales que alcanza la estabilidad en menor tiempo, lo que repercute en su comportamiento reológico. Se observa que los valores de viscosidad interfacial se incrementan con la velocidad de cizalla. El efecto de la cizalla es muy pequeño, inferior al del pH, y el ligero aumento de la viscosidad interfacial al incrementar el grado de cizalla se debe probablemente a la inestabilidad inducida por ésta.

A continuación se muestran los valores de viscosidad interfacial para las películas de soja, en función del pH y de la velocidad de cizalla, obtenidos tras 24 horas desde su introducción (Fig 5.3.10).



**Fig 5. 3.10: Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de soja en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla.**

Un incremento en la velocidad de cizalla produce un aumento en la viscosidad interfacial de estas películas, sea cual sea el pH del medio acuoso. A cualquiera de los valores de cizalla mostrados, el efecto del pH es significativo, produciéndose una disminución en la viscosidad a medida que desciende el pH. Se puede decir, por tanto, que, para las disoluciones de soja, los valores de viscosidad interfacial más elevados se alcanzan a pH=11 y a altas velocidades de cizalla, mientras los más bajos se alcanzan a bajas velocidades de cizalla y pH=2. En general, los mayores valores de viscosidad interfacial que presentan las películas de proteínas de soja son inferiores a los obtenidos con el gluten.

Van Vliet y col. (2002) y Martin y col. (2002b) encontraron que las propiedades reológicas, tanto de cizalla como dilatacional, son dependientes del pH del medio

aunque esta dependencia se reduce con el envejecimiento de la película interfacial debido a que las moléculas de proteína adoptan conformaciones hexaméricas a  $\text{pH}=6,7$  que requieren más tiempo para la adsorción, desnaturalización y reagrupamiento en la interfase, que las de tipo trímero que se presentan por disociación de las moléculas a  $\text{pH}=3$  o a  $\text{pH}=8$ .

La adición de monoestearina a la interfase puede producir modificaciones significativas o no de la viscosidad, dependiendo del  $\text{pH}$  del medio acuoso, como se muestra en la figura 5.3.11.

En presencia de monoestearina, aumenta la viscosidad interfacial de las disoluciones de soja con la velocidad de rotación, sea cual sea el  $\text{pH}$  del medio acuoso. Las principales modificaciones en los valores de viscosidad de las películas de proteína como consecuencia de la incorporación del monoglicérido se observan a  $\text{pH} 2$ , como puede deducirse de los valores presentados en la Tabla 5.3.4. Las películas mixtas presentan mayores valores de viscosidad a este  $\text{pH}$  que la proteína sola, siendo estos valores del mismo orden de magnitud que los obtenidos a  $\text{pH}$  neutro.

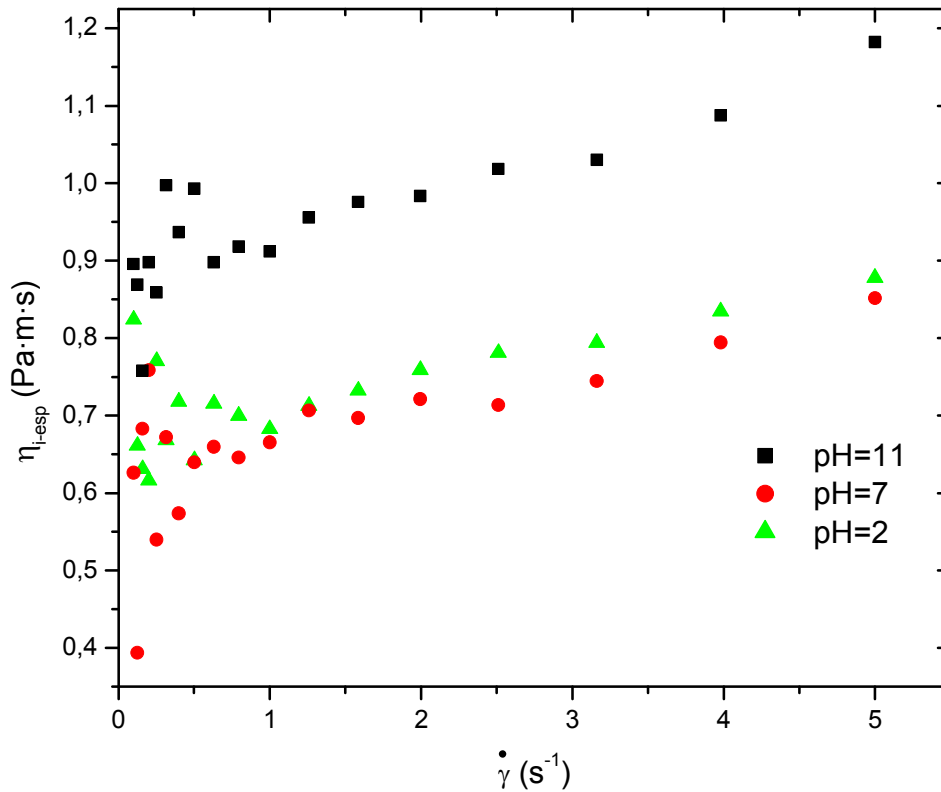


Fig 5. 3.11: Variación de la viscosidad interfacial específica de la disolución acuosa de soja en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla en presencia de monoestearina.

	0,1 s <sup>-1</sup>			1 s <sup>-1</sup>		
	pH=2	pH=7	pH=11	pH=2	pH=7	pH=11
<b>Soja</b>	<b>0,68</b>	<b>0,82</b>	<b>1,15</b>	<b>0,42</b>	<b>0,73</b>	<b>0,97</b>
<b>Soja+ME</b>	<b>0,82</b>	<b>0,63</b>	<b>0,89</b>	<b>0,68</b>	<b>0,66</b>	<b>0,91</b>

Tabla 5. 3.4: Datos de viscosidad interfacial específica de la disolución de soja al 1% en ausencia y en presencia de monoesterina, en función del pH de la subfase acuosa para dos velocidades de cizalla constantes.

### 5.3.3. COMPARACIÓN ENTRE GLUTEN Y SOJA.

En las gráficas siguientes, se comparan los valores de viscosidad interfacial para las proteínas de gluten y de soja, en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla, en ausencia y en presencia de monoestearina. Se puede observar que las dispersiones de gluten alcanzan valores de viscosidad más altos que las de soja.

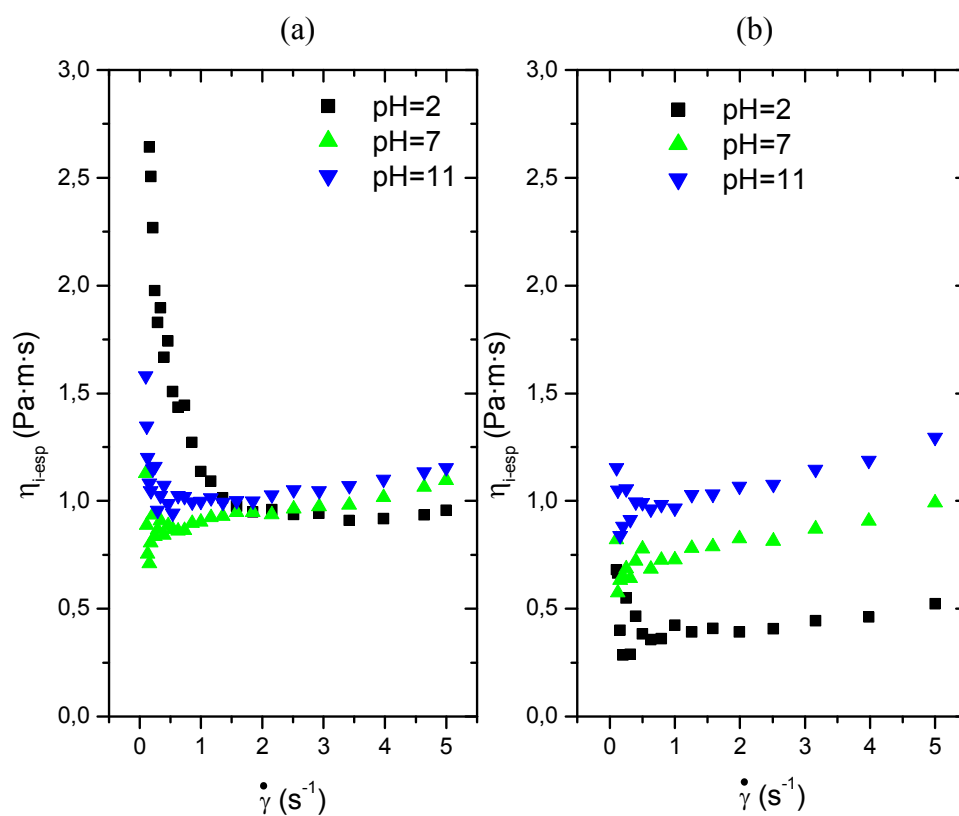
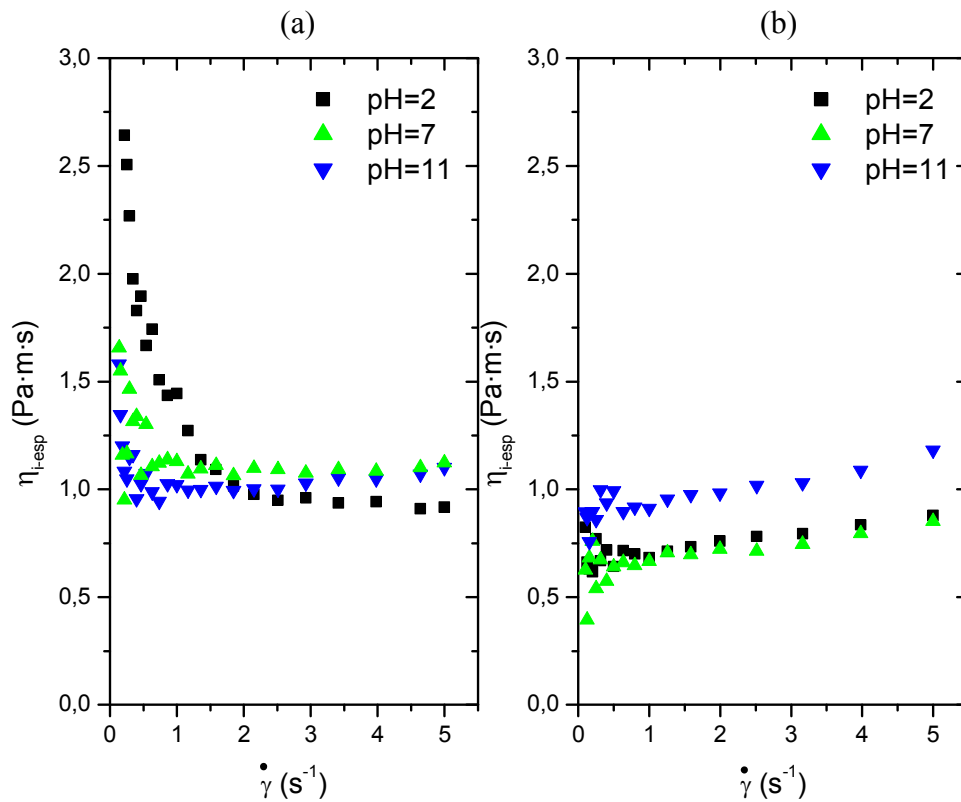


Fig 5.3.12: Variación de la viscosidad interfacial específica de las disoluciones acuosas de gluten (a) y soja (b) en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla.



**Fig 5.3.13:** Variación de la viscosidad interfacial específica de las disoluciones acuosas de gluten (a) y soja (b) en función del pH de la subfase acuosa y de la velocidad de cizalla en presencia de monoestearina.

Las proteínas de gluten son de mayor tamaño y con estructura globular, forman agregados y por lo tanto estructuras más compactas que interaccionan con las moléculas que se encuentran en las capas más internas de la fase pesada. Además, estas estructuras más compactas permiten la incorporación de más moléculas a la interfase originando una interfase más viscosa que la de las disoluciones acuosas de soja.

	0,1 s <sup>-1</sup>			1 s <sup>-1</sup>		
	pH=2	pH=7	pH=11	pH=2	pH=7	pH=11
Gluten	9,20	1,13	20,24	1,41	0,90	3,67
Soja	0,68	0,82	1,15	0,42	0,73	0,97
Gluten+ME	4,81	1,13	1,58	1,14	0,90	1,00
Soja+ME	0,82	0,63	0,89	0,68	0,66	0,91

**Tabla 5.3.4:** Datos de viscosidad interfacial específica de las disoluciones de gluten y soja al 1% en ausencia y en presencia de monoestearina, en función del pH de la subfase acuosa para dos velocidades de cizalla constantes.



# CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES.

### TENSIÓN SUPERFICIAL

1. Cuanto mayor sea la concentración de proteínas en el seno de la fase acuosa, mayor es el número de moléculas que se sitúan en la interfase hasta cubrirla totalmente, reduciéndose la tensión. La llegada a la capa interfacial compacta de nuevas moléculas de proteína implica cambios conformacionales en las moléculas presentes, pero no implica variación sustancial en los valores de tensión del sistema.

2. La adición de monoestearina a la interfase produce un desplazamiento parcial de las moléculas de proteína adsorbidas generándose una película interfacial mixta, con valores de tensión inferiores a los de ambos componentes individuales.

3. Influencia de la naturaleza de la proteína:

Gluten: La influencia de la concentración de proteína sobre los valores de la tensión superficial del sistema es mucho mayor que el efecto del pH, debido al bajo carácter iónico de las proteínas del gluten.

Soja: Los valores de tensión superficial del sistema son inferiores a medida que aumenta el pH del medio acuoso.

Ovoalbúmina: Las variaciones en el pH de la fase acuosa producen cambios más significativos en los valores de tensión que en las proteínas anteriores.

4. Las proteínas de origen vegetal son más activas superficialmente que las de origen animal.

## **CINÉTICA DE ADSORCIÓN**

5. Un aumento en la concentración de proteína implica un descenso en los valores de tensión superficial así como en el tiempo de estabilización de la superficie.

6. Un aumento en la temperatura de operación produce un descenso en el tiempo requerido para la estabilización del sistema, mientras que el valor final de tensión superficial puede no sufrir variación e incluso aumentar al hacerlo la temperatura, dependiendo del pH y de la concentración de la proteína.

7. Los cambios producidos por el pH sobre la cinética son menores a la mayor de las temperaturas estudiadas y más significativos cuanto mayor sea la concentración de proteína.

8. Influencia del tipo de proteína:

Gluten: Una menor concentración de partículas de gluten a cualquier temperatura puede acelerar el proceso de adsorción en la interfase aire-agua, que se relaciona con el valor de  $k_1$ . No sólo se adsorbe más cantidad de proteína en la interfase aire-agua al pH más próximo al punto isoeléctrico, sino que dicha adsorción es más rápida, salvo que la concentración de proteína sea lo suficientemente alta como para favorecer los procesos de agregación de las moléculas en el seno de la fase.

Al aumentar la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa aumenta la velocidad de reordenación de las moléculas adsorbidas en la interfase, con lo que se asocia el valor de  $k_2$ , aunque los resultados dependen del pH y de la temperatura.  $k_2$  aumenta al disminuir el pH del medio acuoso.

Soja:  $k_1$  aumenta con el pH del medio, siendo la velocidad de adsorción muy dependiente de la concentración de proteína en el medio acuoso. Las

moléculas de soja se adsorben más rápidamente a concentraciones más bajas y a pH más elevados.

### **REOLOGÍA INTERFACIAL**

9. La interfase aceite/agua presenta una cierta viscosidad interfacial a bajos valores de velocidad de cizalla y subfases acuosas ácidas o alcalinas, debido probablemente a un cierto grado de ordenación o estructuración de las moléculas en la interfase, al aumentar la velocidad de cizalla de la interfase da lugar a la eliminación de esta viscosidad interfacial, por la desaparición de las posibles estructuras que existan en la interfase. La formación de una película de monoestearina en la interfase aceite/agua no origina una viscosidad interfacial significativa excepto a valores muy bajos de velocidad de cizalla y a pH 11, lo que es concordante con el comportamiento normal de las películas de surfactantes de bajo peso molecular, especialmente si tenemos en cuenta que las moléculas de monoestearina pueden estar parcialmente disueltas en la fase aceite.

10. Influencia del tipo de proteína:

Gluten: A pH=7 no existe una viscosidad interfacial significativa, incluso aunque la interfase se encuentre sometida a una cizalla muy débil. En las condiciones de cizalla en las que sí son representativos los valores de viscosidad en función del pH, se produce una disminución de la viscosidad cuando se reduce el pH del medio acuoso. En general, a cualquier pH y velocidad de cizalla, la presencia de gluten produce mayores valores de viscosidad interfacial que los obtenidos para interfases aceite/agua en ausencia de proteína. A pH=4, la interfase aceite-agua libre de proteína presenta un valor de viscosidad excepcionalmente elevado, por lo que, en este caso, no se aprecia la influencia del gluten.

Soja: Un aumento en la velocidad de cizalla produce un aumento en el valor de la viscosidad interfacial sea cual sea el pH del medio acuoso.

11. Las películas mixtas de gluten+monoestearina presentan un ligero incremento en la viscosidad interfacial con la velocidad de cizalla, cuyos valores son dependientes del pH, siendo el efecto del pH más significativo cuando el grado de cizalla de la interfase es bajo. La subfase acuosa con pH=4 es la que presenta mayores valores de viscosidad interfacial para todo el intervalo de velocidades de cizalla. Para el resto de los pH y, a bajas cizallas, la viscosidad disminuye en el orden  $2 > 11 > 7$ .

La presencia de monoestearina en el caso de la soja aumenta la viscosidad interfacial con la velocidad de cizalla para cualquier pH del medio acuoso.

12. En general, los mayores valores de viscosidad interfacial que presentan los películas de proteínas de soja son inferiores a los obtenidos con el gluten.

# BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- A. Guerrero, L. López, J. de la Fuente, M. Ruiz y A. Romero; Coloides e Interfases, Salamanca 2005
- Adamson, A.W.; "Physical Chemistry of Surfaces", 5ª De., Jhon Wiley and Sons, New York, 1990.
- Akhtar, M.; Dickinson, E.; Mazoyer, J.; Langendorff, V. (2002); en "Emulsifying stabilisation of depolymerised pectin"; Food Hydrocolloids, 16, 249-265.
- Artz, W.E.; "Emulsifiers", en "Food Additives". A.L. Branen, P.M.Davidson y S.Salminen (Eds), p.347. Dekker, New York, 1990.
- Atkins, P.W.; en "Physical Chemistry", Oxford University Press, Oxford, 1994.
- B.C. Tripa, J.J.Magda y J.D.Andrade, 1995, J.of Coll. and Int. Sci. 173, p.16
- Barry, B.W.; Adv. Colloid Interface Sci., %, p.37, 1975.
- Becher, P.; "Emulsions: Theory and Practice", Van Nostrand Reinhold Publishing Co., New York, 1957.
- BeMiller, J.N.; en "Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives", Whistler R.L., BeMiller J. (Eds.), Academic Press, San Diego, 1993.
- Braunitzer, G.; Chen, R.; Schrank, B.; Stangl, A.; en "Automatische Sequenzanalyse eines Proteins", Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 1972.
- Breton, M.; Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.C21, p.61, 1981.
- Codex Alimentarius Comission. Report of the 4th session. Roma, Noviembre 7-14,1966, FAO/WHO, Roma, 1966, p38.
- Colas, B.; Simatos, D; en "Functional properties of caseinates: role of the flexibility of the protein and of its hydration level on surface properties", Budapest, 1989.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D.; "Proteínas Alimentarias". Ed.Acribia, Zaragoza, 1989.
- Chen, J.; Evison, J.; Dickinson, E. (1995);en "Surfactant-protein competitive adsorption and electrophoretic mobility of oil-in-water emulsions"; Dickinson, E. y Lorient, D. (eds.), Food macromolecules and colloids, p. 256-260, Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- Chobert, J-M., Haertlé, T. (1997);en "Protein-Lipid and Protein-Flavor Interactions", Food Proteins and Their Applications, Damodaran, S. y Paraf, A. (eds.), p.143-170.
- Dalgleish, D.G.; Hollocan, A.L.; Food Colloids: proteins, lipids and polysaccharides, Dickinson, E. Y Bergenstal, B. (Eds.), Real Sociedad de Química, Cambridge, Reino Unido, 246, 1997.

Dalgleish, D.G.; Srinivasan, M.; Singh, H.; en "Surface properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and Tween 20", *J.Agric.Food Chem.*, 43, 1995.

Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. En N.S.Hettiarachchy, G.R. Ziegler (Eds). *Protein functionality in food systems*, p. 1-38. USA: IFT Basic Symposium Series.

Damodaran, S.; (1990); en "*Adv.Food Nutr.Res.*"; p.34, 1

Darling, D.F.; "Food Structure and Behaviour". Blansshard and Lillford (Eds.). Academic Press, New York, 1987.

Day, L.; Augustin, M.A.; Batey, I.L.; Wrigley, C.W. (2006); en "Wheat-gluten Uses and Industry Needs"; *Trends in Food Science & Technology*, 17, p. 82-90.

Dea, I.C.M.; Madden, J.K. (1986); en "Acetylated pectin polysaccharides of sugar beet"; *Food Hydrocolloids*, 1(1), 71-88.

Derjaguin, B.V.; Landau, L.; *Acta Physiochem. USSR*, 14, p633, 1941.

Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15, 161-176.

Dickinson, E.; "An introduction to Food colloids". Oxford University Press. Oxford, 1992.

Dickinson, E.; (2003); en "Hydrocolloids at Interfaces and the influence on the properties of dispersed systems"; *Food hydrocolloids*, 17, 25-39.

Dickinson, E.; Elverson, D.J.; Murray, B.S. (1989); en "On the film forming and emulsion stabilising properties of gum arabic: dilution and flocculation aspects"; *Food Hydrocolloids*, 3, 101-114.

Dickinson, E.; en "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems", *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 25-39.

Dickinson, E.; Euston, S.R. (1991a);en "Stability of food emulsions containing both proteins and polysaccharides"; Dickinson, E. (ed.), *Food polymers gels and colloids* 82, p. 132-146, Cambridge, Royal Society of Chemistry.

Dickinson, E.; Euston, S.R. (1991b);en "Stability of food emulsions containing both proteins and polysaccharides"; Dickinson, E. (ed.), *Food polymers*, p. 132-146, London, Royal Society of Chemistry, Paston Press.

Dickinson, E.; Galazka, V.B. (1992);en "Emulsion stabilization by protein-polysaccharide complexes"; Phillips, G.O., Williams, P.A. y Wedlock, D.J. (eds.), *Gums and stabilizers for the food industry* 6, p. 351-362, Oxford, IRL Press.

Dickinson, E.; Galazka, V.B.; Anderson, D.M.; (1991); en "Emulsifying behaviour of gum arabic"; *Carbohydrate Polymers*, 141, 373-392.



- Dickinson, E.; McClements, D.J.; en "Advances in Food Colloids", Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1995.
- Dickinson, E.; Stainsby, G.; "Colloids in Food". Applied Science Publishers, London, New York, 1982.
- Dickinson, E.; Stainsby, G.; "Food Technology", 41, p.74, 1987b.
- Douillard, R.; Lefebvre, J. (1990); J. Colloid Interface Sci. 139, p. 488.
- Dziezak, E.; "Food Technology", 42, p.172, 1988.
- Fainerman, V.B.; Lucassen-Reynders, E.H.; Miller, R. (1998); en " Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects", 143, p. 141.
- Fainerman, V.B.; Miller, R. (1998); Möbius, D. y Miller, R. (eds.), Proteins at Liquid Interfaces, Studies of Interface Science 7, p. 51, Amsterdam, Elsevier.
- Fainerman, V.B.; Miller, R. (1999), Langmuir 15, p. 1812.
- Fainerman, V.B.; Miller, R.; Wüstneck, R. (1996); J. Colloid Interface Sci. 183, p. 26.
- Fennema, O.R.; "Introducción a la ciencia de los alimentos". Ed.Reverté, 1985.
- Friberg, S.; Larsson, K.; en "Food Emulsions", Marcel Dekker, New York, 1997.
- Friberg, S.E.; "Emulsion Stability" en "Emulsions- A Fundamental and Practical Approach". J.Sjöbolm (Ed.), 1992.
- Gaines, G.L.; J.Colloid Interface Sci., 21,p.315, 1966b.
- Garti, N.; Madar, Z.; Aserin, A.; Sternheim, B.; Food Science and Technology 30 (1997) 305.
- Garti, N.; Reichman, D.; 2003; en "Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers"; Food Structure, 12, 411-467.
- Garti, N.; Slavin, Y.; Aserin, A. (1991a); en "Portulaca oleracea gum and casein interactions and emulsion stability"; Food Hydrocolloids 13, p. 127-138.
- Garti, N; Aserin, A.; Slavin, Y.; en "Competitive adsorption in O/W emulsions stabilized by the new Portulaca oleracea hydrocolloid and nonionic emulsifiers", Food Hydrocolloids 13 (1999) 139-144.
- Garti, N; Slavin, Y.; Aserin, A.; en "Portulaca oleracea gum and casein interactions and emulsion stability", Food Hidrocolloids 13 (1999) 127-138.
- Garti, N; Slavin, Y.; Aserin, A.; en "Surface and emulsification properties of a new gum extracted from Portulaca oleracea L.", Food Hidrocolloids 13 (1999) 145-155.

Girard, M. y col., (2002), *Food Hydrocolloids* 16, p. 585-591.

Goddard, E.D. (1986), *Colloids and Surfaces* 19, p. 301.

Goddard, E.D. (2002), en "Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects", *J. Colloid and Interface Sci.* 256, p. 228-235.

Goddard, E.D., Hannan, R.B. (1976), *J. Colloid Interface Sci.* 55, p. 73.

Guzman, R.Z.; Carbonel, R.G.; Kilpatrick, P.K. (1986), *J. Colloid Interface Sci.* 114, p. 536,

Hall, G.M., 1996; "Methods Of Testing Protein Functionality"; Blackie Academia and Professional; pág 60.

Hansen, P.M.T.; 1982; en "Hydrocolloids-proteins interactions: relationship to stabilization of fluid milk products". A review, *Progress in foods and nutrition science*, 6, 127-138.

Jones, R.A.; Richards, R.W.; en "Polimers at surfaces and interfaces". Cambridge University Press; Cambridge, 1999.

Joos, P.; Serrien, G. (1991); *J. Colloid Interface Sci.* 145, p. 291.

Joos, P.; Van Uffelen, M; Serrien, G. (1992), *J. Colloids Interface Sci.* 152, p.521.

Kravtchenko, T.; Voragen, A.; Pilnik, W.; *Carbohydr. Polym.*, 18, 17, 1992.

Krog, N. and Lauridsen, J.; "Food Emulsifiers and their associations with water" en "Food Emulsifiers". Friberg, S. (Ed.), Dekker, New York, 1976.

Krog, N. *Food emulsions* 2ª ed. Larsson y Friberg (eds), p127. Dekker, New York, 1990.

Krog, N.; Riison, T.H.; Larson, K.; "Encyclopedia of Emulsion Technology", vol. 2, P.Becher (Ed.), p.321, Dekker, New York, 1985.

Larsson, K.; Friberg, S.E.; "Food Emulsions", 2ª Ed., Dekker, New York, 1990.

Lauridsen, J.B.; "Food Surfactants, their structure and polymorphism". AOCs short course on Physical Chemistry of Fats and Oils. Hawai 11-14 Mayo, 1986.

Lauridsen, J.B.; *J.Amer.Oil Chem.Soc.*, 53, p.400, 1976.

Leadbetter, S.L.; *Food Focus*, nº 9, Leatherhead Food R.A., 1990.

Leenhouts, J.M.; Demel, R.A.; De Kruijff, B.; Boots, J.-W.P. (1997); en "Charge-dependent insertion of b-lactoglobulin into monoglyceride monolayers"; *Biochim. et Biophys. Acta* 1330, p. 61-70.

- Lehnert, S.; Tarabishi, H.; Levenberger, H.; Colloids Surfaces, A91, p.227, 1994.
- Leroux, J.; Langendorff, V.; Schick, G.; Vaishnav, V.; Mazoyer, J. (2003); en "Emulsion stabilizing properties of pectin"; Food Hydrocolloids; 17, 455-462.
- Makievski, A.V.; Fainerman, V.B.; Bree, M.; Wüstneck, R.; Krägel, J.; Miller, R. (1998); J. Phys. Chem. 102, p. 417.
- Mandala, I.G.; Bayas, E.; en "Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions", Food hydrocolloids, 2003. In press accepted.
- Mangino, M.; en "Physicochemical aspects of whey proteins functionality", J.Dairy Sci., 67, 1984.
- Matsumura, Y.; Mitsui, S.; Dickinson, E.; Mori, T.; en "Competitive adsorption of  $\alpha$ -lactalbumin in the molten globule state", Food Hydrocolloid, 1994.
- McClements, D.J.; en "Food Emulsions. Principles, practice and techniques, CRC Press, Boca Raton, 1999.
- Michel, F.; Doublier, J-L.; Thibault, J.F.; Prog.Food Nutr.Sci., 6, 367, 1982.
- Miller, R.; Aksenenko, E.V.; Fainerman, V.B.; Pison, U. (2001); en "Kinetics of adsorption of globular proteins at liquid/fluid interfaces"; Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 183-185, p. 381-390.
- Miñones Trillo, Miñones Conde; Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial, 2003, pág 41
- Monaco, H.; Zanotti, G.; Spadon, P.; en "Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2,5Å resolution", J.Mol.Biol., 1987.
- Morris, E.R.; The Structure, Dynamics and Equilibrium Properties of colloidal Systems, Bloor, D.M. Y Wyn-Jones, E. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 449, 1990.
- Nawar, W.W.; "Food Chemistry", Fennema, O.R. (Ed.), Cap.5, Dekker, New York, 1985.
- Nussinovitch, A.; en "Hydrocolloid Applications". Gum technology in the food and other industries", Nussinovitch A.(Ed.), Blackie Academic and Professional, New York, 1997.
- Örnebro, J.; Nylandert, T.; Eliasson, A.-C.; en "Interfacial Behaviour of Wheat Proteins". Journal of Cereal Science, 31 (2000) 195-221.
- Osborne, T.B.; en "The Proteins of the Wheat Kernel". Publi. N° 84, Carnegie Institute, Washington, DC, 1907.

Osborne, D.W.; Pesheck, C.V.; Chipman, R.J.; en "Microemulsions and Emulsions in Food". El-Nokaly and Cornell (Eds.). ACS Symposium Series. Amer. Chem.Soc., New York, 1991.

Papiz, M.Z.; Sawyer, L.; Eliopoulos, E.; en "The structure of B-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein," Nature, 1986.

Paquin, P.; Dickinson, E.; Proceeding XXIII International Dairy Congress, Vol.2, p.1492, Mnotreal, 1990.

Pessen, H.; Purcell, J.; Farrell, H.; en "Proton relaxation rates of water in dilute solutions of B-lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of self associating globular protein", Biochim.Biophys., 1985.

Ravanat, G.; Rianudo, M.; Biopolymers, 19, 2209, 1980.

Reichman, D.; Garti, N. (1990);en "Interactions of galactomannans with ehoxyated sorbitan esters-surface tension and viscosity effects"; Phillips, G.O., Williams, P.A. y Wedlock, D.J. (eds.), Gums and stabilizers for the food industry 5, p. 441-446, Oxford, IRL Press.

Rianudo, M.; en "Pectins and Pectinases", Visser, J.; Voragen, A.G.J., (Eds.), Elsevier Science B.V., 1996.

Robins, M.; "Grasas y aceites", 51, fasc.1-2 (2000a), 26-34.

Rodríguez Niño, M.R.; Carrera Sánchez, C.; Cejudo Fernández, M.; Rodríguez Patino, J.M. (2001);en "Proteins and lipid films at the equilibrium at air-water interface"; JAOCS 78, p. 1-7.

Rodríguez Patino, J.M., Ruiz Domínguez, M., de la Fuente Feria, J. (1992);en "Monostearin monolayers spread on aqueous solutions containing etanol", J.Colloid and Interface Sci. 154, p.146-159.

Rodríguez Patino, J.M.; Ruiz Domínguez, M.; de la Fuente Feria, J. (1993);en "The effect of sugars on monostearin monolayers", J.Colloid and Interface Sci. 157, p.343-354.

Rolin, C.; en "Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives", Whistler R.L., BeMiller J.(Eds.), Academic Press, San Diego, 1993.

Ros, J.M.; Schols, H.; Voragen, A.G.J.; Carbohydrate Polimers, 37, 159, 1998.

Schols, M.A.; Posthumus, M.A.; Voragen, A.G.J.; Carbohyd. Res., 206, 117, 1990.

Shimizu, M.; Saito, M., Yamauchi, K.; en "The adsortivity of whey proteins on the surface of emulsified fat", Agric.Biol.Chem., 45, 1891.

Smit, C.J.B.; Bryant, E.F.; J.Food Sci., 33, 262, 1968.

- St. Angelo, A.J.; "A brief introduction to food emulsions and emulsifiers", en "Food emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications". G.Charalambous and G.Doxastakis (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1989.
- Tadros, T.F.; Vincent, B.; en "Encyclopedia of Emulsion Technology", vol.2, P:Becher (Ed.), p.129, Dekker, New York, 1985.
- Ter Minassian-Saraga, L.; Prigogine, I.; Mem.Serv.Chim.Etat. 38, p.109, París, 1953.
- Thomas, D.; William, A.; en "Starches", American Association of Cereal Chemists, 1999.
- Tolstoguzov, V.B. (1997); en "Protein-polysaccharide interactions", Damodaran, S. y Paraf, A. (eds.), Food proteins and their applications 80, p. 171-198. New York, Marcel Dekker Inc.
- Tolstoguzov, V.B. (1997);en "Protein-Polysaccharide Interactions"; Food Proteins and Their Applications, Damodaran, S. y Paraf, A. (eds.), p.171-198.
- Tolstoguzov, V.B.; Braudo, E.E. (1985); en "Proteins and anionic polysaccharides as stabilizers of o/w emulsions"; Journal of the Dispersion Science and Technology 6, p. 575-603.
- Van Haften, J.L.; J.Amer.Oil Chem.Soc.Noviembre, 831A, 1979.
- Verwey, E.J.W.; Overbeer, J.Th.G., en "Theory of the stability of lyophobic colloids", Elsevier, Amstendam, 1948.
- Voragen, A.G.; Pilnik, W.; Thibault, J-F.; Axelos, M.A.; Renard, C.; en "Food Polysaccharides and their Applications", Alistair M.Stephen (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1995.
- Wang, Q.; Qvist, K.B. (2000), Food Research Int. 33, p. 683.
- Zasyppkin, D.V.; Braudo, E.E.; Tolstogyzov, V.B. (1997); en "Multicomponet biopolymer gels"; Food Hydrocolloids 11, p. 159-170.