

**ESTUDIO REOLÓGICO DE EMULSIONES  
ALIMENTARIAS ESTABILIZADAS CON  
PROTEÍNAS VEGETALES**

*Sevilla, Abril de 2006*

**CARLOS BENGOCHEA RUIZ**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**ESTUDIO REOLÓGICO DE EMULSIONES  
ALIMENTARIAS ESTABILIZADAS CON  
PROTEÍNAS VEGETALES**

Memoria que presenta Carlos Bengoechea Ruiz, Licenciado en Ciencias Químicas, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Abril de 2006

Fdo.: Carlos Bengoechea Ruiz

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, siendo dirigida por los profesores Dr. D. Antonio Guerrero Conejo y Dr. D. Felipe Cordobés Carmona.

Sevilla, Abril de 2006

Fdo.: Antonio Guerrero Conejo

Fdo.: Felipe Cordobés Carmona

D. Vicente Flores Luque, Director del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D. Carlos Bengoechea Ruiz ha sido realizada dentro del Programa de doctorado Estudios Avanzados en Alimentos

Sevilla, Abril de 2006

Fdo.: Vicente Flores Luque

D<sup>a</sup>. María Montaña Durán Barrantes, Profesora Asociada de la Universidad de Sevilla, adscrita al Dpto. de Ingeniería Química y Tutora de D. Carlos Bengoechea Ruiz

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D. Carlos Bengoechea Ruiz ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química

Sevilla, Abril de 2006

Fdo.: María Montaña Durán Barrantes

La presente Tesis Doctoral ha recibido las ayudas de la Junta de Andalucía y de la Unión Europea mediante la concesión de las becas FPDI y Marie Curie Training Site. Además, forma parte del proyecto de investigación AGL2002-01106, subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Se agradece a todos los organismos citados por la financiación aportada.

En primer lugar desearía expresar el justo agradecimiento que merecen los profesores Antonio Guerrero y Felipe Cordobés por su labor como directores de la presente tesis doctoral, al haberme ofrecido la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación, guiándome y poniendo sus conocimientos a mi servicio siempre que fue necesario.

Parte del trabajo que se recoge en esta tesis fue realizado en el departamento de Food Sciences de la universidad de Nottingham (Reino Unido) siempre bajo la supervisión del profesor John R. Mitchell. Mi más sincero agradecimiento por el interés, dedicación y disposición que mostró durante mi estancia.

También me gustaría agradecer al Instituto de la Grasa por toda la ayuda que me prestaron durante mi investigación.

Aunque parezca que fue ayer cuando empecé a trabajar en el departamento de ingeniería química, han sido ya varios los años que han pasado desde entonces. Durante esos años, he tenido la oportunidad de conocer a muchas personas que de una u otra forma siempre formarán ya parte de mi vida.

Como mis compañeros, Isa, Nuria, Víctor, Ana, José Antonio, José Manuel, María Luisa,... con quienes he compartido muchos buenos momentos y que, sin que nos diéramos cuenta, se han convertido en algo más que simples compañeros.

O el Personal de Administración y Servicios (P.A.S.) del departamento, especialmente Juan Carlos, Nieves, Paco y Padi, que me prestaron su ayuda siempre que la solicité, y que forman parte de esa pequeña familia que se reúne en la 'fundación' a la hora del almuerzo.

También, Fernando, Mari Carmen, Montaña, Paco, Pepe y, especialmente, Cecilio, por escucharme cuando más lo necesité.

No me olvido de todos aquellos que nos visitaron, principalmente de Cecilia y Fernando, que nos trajeron nuevos aires y se hicieron querer.

En definitiva, me gustaría agradecer a todos los miembros del departamento de ingeniería química sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible de la misma manera.

Mi estancia en Nottingham hubiera sido muy diferente sin la presencia de mi 'Spanish Community', Ana, Javier, Marga, María, Pepa, Rafa, Rodrigo,..., quienes me hicieron sentir en casa, o de Chris, la mejor compañera que pude tener durante aquellos meses. También agradezco a Abde y a Val Street su inestimable ayuda. En general, a todos los compañeros de Food Sciences que hicieron de mi estancia una experiencia irrepetible.

Por último, y con un cariño muy especial, me gustaría agradecer a mi familia, a mis padres y hermanos, por ser parte de mí, y, especialmente, a Cynthia, por confiar en mí más que yo mismo, soportar todos mis agobios como si fueran propios y compartir su vida con la mía.

A todos, muchas gracias.

*“El mundo era tan reciente, que muchas cosas carecían de nombre, y para mencionarlas había que señalarlas con el dedo.”*

*G.G.M.*

*A Cynthia*  
*A mis padres*

# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo 1. Antecedentes bibliográficos</b>	
1.1. Proteínas alimentarias	
1.1.1. Introducción	5
1.1.2. Estructura y composición de las proteínas	6
1.1.3. Estabilidad conformacional y desnaturalización de proteínas	12
1.1.4. Propiedades funcionales	13
1.1.4.1. Interacciones proteína-agua	15
1.1.4.2. Solubilidad	16
1.1.4.3. Viscosidad y capacidad espesante	16
1.1.4.4. Flavor	17
1.1.4.5. Gelificación	17
1.1.4.6. Emulsificación y espumado	18
1.2. Gluten de trigo	
1.2.1. Introducción	20
1.2.2. Composición del gluten	20
1.2.2.1. Gliadinas	21
1.2.2.2. Gluteninas	22
1.3. Proteínas de soja	
1.3.1. Introducción	25
1.3.2. Proteínas de reserva de la soja	25
1.3.2.1. Estructuras básicas	26
1.3.2.2. Propiedades físico-químicas	26
1.3.2.3. Estructuras tridimensionales	29
1.4. Proteínas de la algarroba	
1.4.1. Introducción	30
1.4.2. Similitudes y diferencias con el gluten de trigo	30
1.5. Caseína	
1.5.1. Introducción	32

1.5.2. Heterogeneidad de las caseínas	32
1.5.3. Propiedades moleculares	33
1.5.4. Caseína micelar	33
1.5.4.1. Estabilidad de las micelas	34
1.6. Temperatura de transición vítrea	
1.6.1. Introducción	37
1.6.2. El agua como plastificante de biopolímeros	37
1.6.3. Teorías de la temperatura de transición vítrea	38
1.6.4. Relajaciones moleculares por debajo de la $T_g$	40
1.6.5. Técnicas para la medida de la $T_g$	
1.6.5.1. Dilatometría	41
1.6.5.2. Calorimetría	42
1.6.5.3. Reología	43
1.6.5.3. Otras técnicas	44
1.7. Emulsiones	
1.7.1. Características generales	45
1.7.2. Principios físicos de la emulsificación	46
1.7.3. Variables influyentes en la emulsificación	48
1.7.4. Tipos de homogeneizadores	51
1.7.5. Estabilidad de emulsiones	53
1.7.5.1. Fuerzas que actúan entre las partículas	54
1.7.5.2. Mecanismos de desestabilización	
1.7.5.2.1. Separación gravitacional	62
1.7.5.2.2. Floculación	62
1.7.5.2.3. Coalescencia	64
1.7.5.2.4. Maduración de Ostwald	65
1.7.5.2.5. Inversión de fases	66
1.7.5.2.6. Estabilidad química y bioquímica	66
1.7.6. Tamaños de partícula	67
1.7.6.1. Determinación experimental del tamaño de gota	69
1.8. Conceptos básicos de reología	
1.8.1. El tensor esfuerzo	71

1.8.2. Tensor deformación y tensor velocidad de deformación	73
1.8.3. Caracterización reológica de un material	74
1.8.4. Cizalla simple	74
1.8.5. Clasificación de los comportamientos reológicos	76
1.8.5.1. Comportamiento en flujo estacionario. Fluidos newtonianos	76
1.8.5.2. Comportamiento en flujo estacionario. Fluidos no newtonianos	77
1.8.5.2.1. Comportamiento dependiente del tiempo de cizalla	79
1.8.5.3. Concepto de viscoelasticidad	81
1.8.5.3.1. Viscoelasticidad lineal	81
1.8.5.3.2. Viscoelasticidad no lineal	91
1.8.6. Viscosidad extensional	93
1.8.7. Reometría capilar	97
1.9. Reología de emulsiones	
1.9.1. Generalidades	106
1.9.2. Comportamiento de flujo en estado estacionario	106
1.9.3. Viscoelasticidad lineal	108
1.9.4. Viscoelasticidad no lineal	112
1.9.5. Microestructura y reología de emulsiones	113
1.9.6. Efectos indeseables que se producen en ensayos reológicos con emulsiones	117

## Capítulo 2. Experimental

2.1. Materiales empleados	121
2.1.1. Gluten de trigo	121
2.1.2. Aislado de proteínas de soja	122
2.1.3. Aislado proteico de harina de algarroba	123
2.1.4. Caseína Rennet	124
2.2. Preparación de las muestras	125
2.2.1. Sistemas proteína-agua	125
2.2.2. Emulsiones	127
2.3. Técnicas experimentales	129

2.3.1. Sistemas proteína-agua	129
2.3.2. Emulsiones	134
2.4. Sistemas preparados	140
2.4.1. Sistemas proteína-agua	140
2.4.2. Emulsiones	141
2.4.2.1. Estudio estadístico	144
<b>Capítulo 3. Sistemas Proteína-Agua</b>	
3.1. Introducción	149
3.2. Resultados y Discusión	
3.2.1. Temperatura de transición vítrea	149
3.2.1.1. Determinación de la temperatura de transición vítrea	149
3.2.1.2. Influencia del contenido en agua sobre la $T_g$	158
3.2.2. Reometría capilar	164
3.2.2.1. Influencia de la concentración de agua	164
3.2.2.2. Influencia de la temperatura	170
3.2.2.3. Influencia del tipo de proteína	175
3.2.3. Relación entre $T_g$ y $\eta$	177
3.3. Conclusiones	181
<b>Capítulo 4. Procesado de Emulsiones</b>	
4.1. Introducción	183
4.2. Resultados y Discusión	183
4.2.1. Temperatura de procesado	183
4.2.2. Velocidad de rotación del elemento emulsificador	189
4.3. Conclusiones	195
<b>Capítulo 5. Composición</b>	
5.1. Introducción	197
5.2. Resultados y Discusión	197
5.2.1. Concentración de aceite	197
5.2.2. Concentración de proteína	204

---

5.2.3. pH	218
5.2.4. Combinación de efectos: Concentración de proteína y pH	225
5.2.5. Concentración de electrolito	228
5.3. Conclusiones	232
<b>Capítulo 6. Procesado Post-emulsificación</b>	
6.1. Introducción	235
6.2. Resultados y Discusión	235
6.2.1. Tratamientos térmicos	235
6.2.2. Modificación del pH en emulsiones finales	249
6.3. Conclusiones	257
<b>Capítulo 7. Modelo de viscoelasticidad</b>	
7.1. Introducción	259
7.2. Resultados y Discusión	259
7.2.1. Relación entre reología y parámetros estructurales	259
7.2.2. Viscoelasticidad lineal	262
7.2.3. Ensayos de relajación	268
7.2.4. Ensayos de crecimiento del esfuerzo	274
7.2.5. Modelo viscoelástico no lineal	280
7.3. Conclusiones	282
<b>Bibliografía</b>	285



# **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

Las proteínas se utilizan como ingredientes en diferentes productos alimenticios ya que contribuyen a la obtención de características deseables en los mismos. Estas características pueden estar relacionadas directamente con el consumidor (propiedades como la textura, apariencia, sabor,...) o con la tecnología empleada. Esto último se refiere tanto a lo concerniente al almacenamiento (vida media del producto) como al procesado (como la formación de espumas, emulsiones o geles). Las propiedades funcionales de las proteínas, entendidas como aquellas propiedades físico-químicas que controlan su comportamiento en un sistema alimentario durante su preparación, procesado, almacenamiento y consumo (Kinsella y Whitehead, 1989), son las responsables de la contribución de las mismas a las características finales de un producto (Luyten y col., 2004).

El comportamiento reológico de fundidos proteicos a contenidos en agua relativamente bajos (~15-50% (p/p)) es de gran importancia en la producción de alimentos mediante extrusión, tales como proteínas vegetales texturizadas. Además, el comportamiento reológico del gluten a bajos contenidos en agua será uno de los factores determinantes de su comportamiento durante la fabricación de pan. Existen diferentes estudios sobre la viscosidad de fundidos de biopolímeros mediante reometría capilar y reómetros de extrusión on-line. Las variables de estudio suelen ser la temperatura, la velocidad de cizalla y el contenido en agua. El agua puede actuar como plastificante del sistema proteico, produciendo un incremento de movilidad de las moléculas de proteína y reduciendo la temperatura a la que se produce la transición desde el estado vítreo al estado gomoso del sistema.

En los últimos años, ha habido un interés creciente por el estado vítreo de los alimentos. La temperatura de transición vítrea ha sido medida de forma extensiva tanto para el almidón como para sistemas proteicos, generalmente utilizando para ello técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) o métodos dinámicos y reológicos. Dentro del campo de las aplicaciones alimentarias es interesante el papel plastificante del agua, azúcares, polioles y otros aditivos de bajo peso molecular.

Las emulsiones alimentarias han sido tradicionalmente estabilizadas con proteínas de la yema de huevo (mayonesas, salsas para ensalada,...). Sin embargo, algunos autores han investigado la capacidad emulsionante de ciertas proteínas

vegetales, como posibles sustitutos de la yema de huevo (Tornberg, 1978; Elizalde y col., 1996; Gallegos y col., 2002). La principal ventaja de esta sustitución resultaría de la obtención de un producto bajo en colesterol y libre de riesgo de salmonella. Además, otra ventaja podría ser el aprovechamiento de la funcionalidad de sistemas proteicos que provienen de productos de origen vegetal para su posible valorización. En este sentido, concentrados o aislados proteicos de trigo, soja o algarroba podrían ser una importante alternativa.

El gluten de trigo se obtiene como subproducto de la industria del almidón, por medio del molido en vía húmeda, y se considera una mezcla amorfa de polipéptidos, que se dividen en dos grupos, en función de su grado de agregación: gliadinas y gluteninas. Una aplicación más extendida del gluten de trigo se encuentra en la industria panadera, que aprovecha sus propiedades únicas para formación de la masa de pan (Singh, 2005); Belton, 1999); sin embargo, muchos autores han estudiado otras propiedades funcionales del gluten, como es su uso en la formación de emulsiones y espumas (Takeda, 2001; Wu, 2001; Mimouni y col., 1999), o de bioplásticos (Derksen y col., 1996).

La solubilidad limitada del gluten de trigo en soluciones acuosas se ha atribuido generalmente a su gran tamaño molecular y a la agregación intermolecular, debida a fuertes interacciones no covalentes, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Weegels y col., 1994). Mejri y col. (2005) indicaron que la mínima solubilidad de las proteínas de gluten tiene lugar en el punto isoeléctrico, correspondiente a la carga neta neutra de las proteínas y estaría favorecida por el aumento de las reacciones de asociación de las cadenas de polipéptido en este punto (Drago y González, 2001). A ambos lados del punto isoeléctrico la solubilidad aumenta, debido al aumento de la carga neta de las proteínas ionizadas.

Takeda y col. (2001) concluyeron que el gluten actúa como un buen agente emulsionante en el rango de pH ácidos, por lo que presentaría unas propiedades funcionales que podrían hacerlo útil en el procesado de varios alimentos de bajo pH, como salsas y productos lácteos fermentados. En este estudio interesa ampliar el intervalo de pH desde valores ácidos a alcalinos para evaluar posibles mejoras de estabilidad.

Las proteínas de la soja se componen principalmente de las globulinas 7S y 11S, que representan alrededor del 70% del contenido proteico total. La globulina 7S es un trímero, mientras que la 11S está compuesta por seis subunidades (Fukushima, 2004).

El hecho de que muchas proteínas puedan funcionar como agentes emulsionantes se debe a que son moléculas superficialmente activas, lo que les confiere habilidad para facilitar la formación de emulsiones aceite en agua (O/W), mejorando además su estabilidad y proporcionando propiedades físico-químicas deseables (McClements, 1999). Las proteínas se adsorben en la superficie de las gotas de aceite recién formadas, creadas por la homogeneización de la mezcla aceite-agua-proteínas, en la que facilitan la ruptura de las gotas al bajar la tensión interfacial y retrasan la coalescencia de las gotas al formar membranas protectoras alrededor de las mismas. La capacidad de las proteínas para generar interacciones repulsivas (estéricas y electrostáticas) entre las gotas de aceite y formar una membrana interfacial que sea resistente a la ruptura juega también un papel importante en la estabilización de las gotas frente a la floculación y la coalescencia durante un almacenamiento prolongado (Bos y van Vliet, 2001, Tcholakova y col., 2002, Wilde y col., 2004).

La reología es una herramienta muy útil para la caracterización de emulsiones (Tadros, 1994), así mediante ensayos oscilatorios se pueden obtener valores, como el módulo plateau,  $G_N^0$ , o el esfuerzo crítico,  $\tau_c$ , que permiten tener una idea del grado de estructuración de la emulsión.

En la presente tesis doctoral se estudian diferentes propiedades (físicoquímicas, funcionales,...) de proteínas vegetales, como el gluten de trigo y las proteínas de la soja y la algarroba. En un primer lugar, se ha realizado un estudio de su temperatura de transición vítrea, así como de sus propiedades de flujo a diferentes contenidos en agua mediante un reómetro capilar. En esta parte del estudio se incluye una proteína no vegetal, como la caseína, concretamente la caseína obtenida por coagulación de la leche mediante un enzima proteolítico (quimosina), de la que existen abundantes datos en la bibliografía relacionados con las variables de estudio. En un segundo lugar, se ha estudiado a fondo la capacidad emulsionante de las proteínas de gluten, soja, y algarroba, para lo cual se han realizado ensayos a diferentes condiciones de procesado o composición, así como estudios de tratamientos post-emulsificación.



**CAPÍTULO 1.**  
**ANTECEDENTES**  
**BIBLIOGRÁFICOS**

# CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

## 1.1. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS

### 1.1.1. Introducción

Las proteínas son un grupo de polímeros altamente complejo que juega un importante papel en los sistemas biológicos y alimentarios. Las principales funciones que ejercen se describen a continuación:

- Biocatalizadores (enzimas), que catalizan las reacciones químicas que ocurren en las células vivas, acelerando en varios órdenes de magnitud su velocidad.
- Componentes estructurales de células y órganos (colágeno, queratina, elastina,...), que proporcionan soporte mecánico a los animales.
- Proteínas contráctiles (actina, miosina, tubulina), que posibilitan la motilidad celular, incluyendo el movimiento de las bacterias y el espermatozoide.
- Hormonas (insulina,...), que regulan muchos aspectos de la función celular, desde el metabolismo hasta la reproducción.
- Proteínas de transporte (hemoglobina, seroalbúmina, transferina), que llevan materiales a través de las membranas celulares.
- Proteínas quelantes (fosvitina, ferritina).
- Anticuerpos (inmunoglobulinas), que protegen de las infecciones de origen bacteriano o viral.
- Proteínas de protección (toxinas y alérgenos).
- Proteínas de almacenamiento (proteínas de las semillas, ovoalbúmina, micelas de caseína).

Esta diversidad funcional se debe al gran número de combinaciones posibles entre los 20 aminoácidos existentes, de forma que proteínas con diferentes estructuras y funciones pueden sintetizarse al variar la composición y secuencia de aminoácidos.

Las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos están relacionadas con sus propiedades físico-químicas y estructurales, de manera que para un óptimo empleo de las proteínas como ingredientes alimentarios es esencial un conocimiento de sus propiedades físicas, químicas y funcionales, así como de los cambios que sufren esas propiedades durante el procesado (Damodaran, 1997).

### 1.1.2. Estructura y composición de las proteínas

El término proteína engloba a un complejo grupo de compuestos orgánicos, que consiste básicamente en combinaciones de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, y que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y usualmente azufre. Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y animales y son esenciales para la vida (Morris, 1992). Todos los aminoácidos tienen una estructura común, difiriendo sólo en la naturaleza química de la cadena lateral unida al átomo de carbono central, denominado carbono  $\alpha$ . Este carbono  $\alpha$  se encuentra unido a cuatro grupos: un grupo amino básico ( $-\text{NH}_2$ ), un grupo carboxílico ácido ( $-\text{COOH}$ ), un átomo de hidrógeno y la ya mencionada cadena lateral ( $-\text{R}$ ), que define propiamente al aminoácido. De esta cadena lateral dependen propiedades físico-químicas, como la carga, solubilidad o reactividad química de los aminoácidos y, por extensión, de las proteínas. Los aminoácidos que poseen una cadena lateral alifática (alanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina) o aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina) son apolares, exhibiendo una solubilidad limitada en agua y disolventes polares. En cambio, los aminoácidos cuya cadena lateral posee carga (arginina, lisina, histidina, arginina, lisina, histidina) o es neutra (serina, treonina, asparragina, glutamina, cisteína) son bastante solubles en agua. La prolina es el único iminoácido presente en las proteínas. La carga neta de una proteína a cualquier pH está determinada por el número relativo de residuos de aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina) y ácidos (aspartato y glutamato) en la proteína.

A partir de todo lo anterior, se pueden definir las proteínas como polímeros formados a partir de hasta 19 diferentes aminoácidos y un iminoácido unidos mediante enlaces amida, conocidos como *enlaces peptídicos*. En la figura 1.1.2.1. aparecen las estructuras de todos ellos (Lehninger y col., 1993).

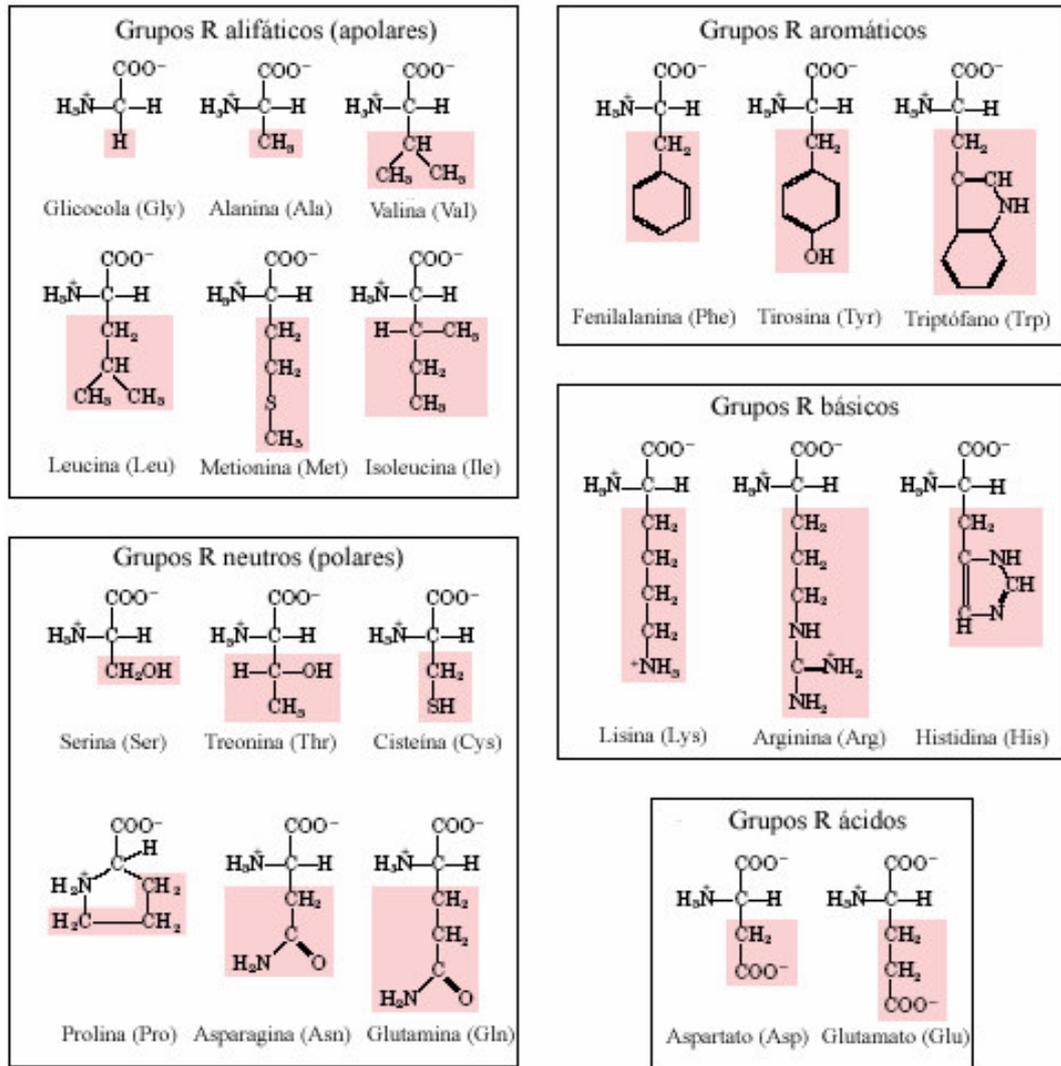


Figura 1.1.2.1. Estructuras de los 20 aminoácidos

El comportamiento de las proteínas en los alimentos depende de su estructura. En general, existen cuatro niveles estructurales: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (figura 1.1.2.2.):

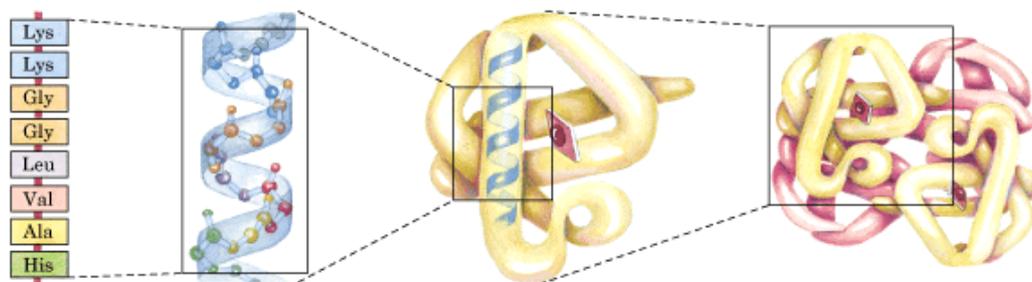


Figura 1.1.2.2. Diferentes niveles estructurales de las proteínas: desde la estructura primaria (izquierda) hasta la cuaternaria (derecha)

## a) Estructura primaria

La estructura primaria de una proteína denota la secuencia lineal en que se encuentran los aminoácidos que la constituyen, unidos por enlaces peptídicos. La estructura tridimensional definitiva que tiene la proteína en solución está determinada por la longitud de la cadena y por la secuencia de aminoácidos.

Una de los aspectos que diferencian a las proteínas de otros biopolímeros, como los polisacáridos o los ácidos nucleicos, es el carácter parcial de doble enlace que tiene el enlace peptídico, lo que origina una estructura resonante (figura 1.1.2.3.):



Figura 1.1.2.3. Estructura resonante de los aminoácidos que componen las proteínas

Como consecuencia de esta estructura resonante: i) la rotación del enlace entre péptidos está restringida a un máximo de unos  $6^\circ$ ; ii) los seis átomos que conforman el péptido se encuentran en el mismo plano; iii) la protonación del grupo N-H deja de ser posible; iv) los átomos de oxígeno e hidrógeno de los grupos C=O y N-H adquieren cargas parciales negativa y positiva respectivamente; y v) la unidad peptídico puede existir en configuración *cis* o *trans*.

La mayoría de los enlaces peptídicos en las proteínas existen en configuración *trans*, ya que es más estable que la configuración *cis*. Debido a las cargas parciales mencionadas con anterioridad, bajo determinadas condiciones, pueden existir puentes de hidrógeno inter e intracatenarios entre los grupos C=O y N-H.

Mientras que el carácter doble del enlace peptídico le impide la libre rotación, los enlaces sencillos N-C $\alpha$  y C-C $\alpha$  tienen libertad rotacional, denominándose ángulos de rotación  $\Phi$  y  $\Psi$ , respectivamente. Esta libertad rotacional se ve restringida con frecuencia por motivos estéricos.

## b) Estructura secundaria

La estructura secundaria comprende a las estructuras que se repiten de forma periódica en los polipéptidos y proteínas. Las estructuras secundarias más comunes son la hélice- $\alpha$  y la lámina plegada  $\beta$ , o simplemente lámina  $\beta$ .

### b.1.) Hélice- $\alpha$

La hélice- $\alpha$  está caracterizada por un giro de 0,54 nm compuesto por 3,6 residuos de aminoácidos. Está estabilizada por puentes de hidrógeno intracatenarios entre el grupo N-H de un residuo en una posición  $x$  y el grupo C=O del residuo situado en una posición  $x-4$  de la secuencia. Estos puentes de hidrógeno son casi paralelos al eje longitudinal de la hélice, de manera que los átomos de nitrógeno, hidrógeno y oxígeno del enlace están prácticamente alineados. Estas hélices pueden ser tanto dextrógiras como levógiras, aunque sólo se han encontrado las primeras en las estructuras de las proteínas. Esto es debido a que las hélices levógiras aparecen repulsiones de tipo estérico entre los grupos C=O y las cadenas laterales.

Algunos aminoácidos tienen más tendencia que otros a aparecer en las hélices  $\alpha$  como son los residuos pequeños o neutros (alanina, leucina, fenilalanina). Los residuos más polares (arginina, glutamato, serina) tienen una menor tendencia a presentarse en este tipo de estructuras, ya que se repelerían entre sí y desestabilizarían la hélice. La prolina debido a su anillo de pirrolidina nunca aparece en la hélice.

Las estructuras de hélice en la proteína son predominantemente anfifílicas, es decir, que una parte de la superficie helicoidal es hidrofílica y la otra parte es hidrofóbica. En la mayoría de las proteínas nativas, la superficie hidrofóbica de la hélice se encuentra situada hacia el interior de la proteína, y está relacionada con las interacciones hidrofóbicas con otros grupos no polares en el interior. Estas interacciones contribuyen a la estabilidad de la forma plegada de la proteína.

En una hélice- $\alpha$  ideal, sin interacciones entre cadenas laterales, los valores de  $\Phi$  y  $\Psi$  son  $-57^\circ$  y  $47^\circ$ , respectivamente.

### b.2.) lámina plegada $\beta$

La estructura tipo lámina plegada es una estructura extendida en la que los grupos C=O y N-H están orientados en una dirección casi perpendicular a la

del eje de la cadena. En esta configuración, los puentes de hidrógeno sólo pueden ocurrir entre láminas. En función de las direcciones de las láminas, existen dos tipos de lámina  $\beta$ : paralelas y antiparalelas. Los valores de los ángulos  $\Phi$  y  $\Psi$  en las láminas  $\beta$  son aproximadamente  $-119^\circ$  ( $\Phi$ ) y  $+113^\circ$  ( $\Psi$ ), para cadenas paralelas, y  $-139^\circ$  ( $\Phi$ ) y  $+135^\circ$  ( $\Psi$ ) para cadenas antiparalelas.

Segmentos que contienen residuos aminoácidos alternativamente polares y apolares tienen una gran probabilidad de formar láminas  $\beta$ .

De forma general, las proteínas con una conformación tipo lámina  $\beta$  son más hidrofóbicas que las que tienen una configuración de hélice  $\alpha$ , exhibiendo altas temperaturas de desnaturalización. Este es el caso de la globulina 11S de la soja (64% de lámina  $\beta$ ) que posee una temperatura de desnaturalización de  $84,5^\circ\text{C}$ . El calentamiento de soluciones proteicas con estructura de hélice puede provocar su conversión a láminas (Damodaran, 1988). En cambio no se conoce la existencia de la conversión inversa.

Proteínas con altos contenidos en el aminoácido prolina presentan normalmente una configuración aleatoria. Esto se debe al anillo de pirrolidina de este aminoácido, que hace imposible la formación de puentes de hidrógeno. Las caseínas y las proteínas de cereales, como las gliadinas y gluteninas, poseen una gran cantidad de prolina en su composición y, como consecuencia, en ellas predomina una estructura desordenada. Como la principal función biológica de estas proteínas es la de fuente de nitrógeno y energía para la infancia, una estructura desordenada favorece la susceptibilidad de estas proteínas hacia la digestión proteolítica.

En ciertas ocasiones aparecen las llamadas estructuras supersecundarias, que consisten en combinaciones de estructuras secundarias. La unidad  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  está formada por dos cadenas  $\beta$  paralelas conectadas entre sí a través de una cadena en hélice  $\alpha$ . Otras estructuras supersecundarias frecuentes son la greca o el meandro  $\beta$ .

### c) Estructura terciaria

La estructura terciaria hace referencia a la conformación tridimensional activa biológicamente de la proteína. El paso desde la configuración lineal (estructura primaria) hasta la estructura terciaria de una proteína en solución no es un proceso sencillo. Este paso está dirigido por la necesidad termodinámica de minimizar la energía libre de la molécula mediante la optimización de las distintas

interacciones no covalentes (interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de van der Waals, y puentes de hidrógeno) entre los grupos que forman la proteína. Durante la formación de la estructura terciaria, la redistribución más importante ocurre cuando los residuos apolares se sitúan en el interior, mientras que los residuos hidrofílicos se enfrentan al exterior de la molécula de proteína. No todos los residuos apolares se encuentran en el interior, así como no todos los polares se encuentran en el exterior de la molécula (Lee y Richards, 1971), aunque los grupos polares que quedan enterrados en el interior de la proteína se enlazan entre sí mediante puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas para minimizar la energía libre de la proteína y contribuir así a su estabilidad.

La forma en que se encuentran distribuidos los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la molécula influye decisivamente en las propiedades físico-químicas de la proteína (forma, solubilidad,...). Así, las proteínas que contienen un gran número de residuos hidrofílicos distribuidos uniformemente a lo largo de la cadena tienden a adquirir una forma elongada tipo 'bastón', de esta forma un mayor número de grupos hidrofílicos quedan expuestos hacia el disolvente. En cambio, las proteínas con un gran número de grupos hidrofóbicos tienden a tener una forma esférica (globular), ya que la forma esférica es la que tiene la menor relación área superficial por volumen, por lo que pueden existir mayor número de grupos hidrofóbicos en el interior.

En las estructuras terciarias de muchas proteínas aparecen regiones que se pliegan en una forma de estructura terciaria independiente; estas regiones reciben el nombre de *dominios* e incluyen alrededor de 100 a 150 residuos de aminoácidos. Estos dominios interactúan entre sí, formando una única estructura terciaria. El número de dominios que aparece en una proteína es función de su peso molecular, siendo el número de dominios mayor en las proteínas de mayor tamaño. La estabilidad estructural de cada dominio es independiente de la del resto, de forma que durante la desnaturalización térmica o interfacial, puede producirse un desdoblamiento secuencial de diferentes partes de la proteína.

#### d) Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria se refiere a la disposición espacial de una proteína que contiene varias cadenas polipeptídicas. Cada cadena de polipéptidos es conocida como monómero o subunidad, y el conjunto se conoce como oligómero. La

formación de estructuras oligoméricas tiene lugar debido a motivos termodinámicos, de forma que los residuos hidrofóbicos que no han podido situarse en el interior de la proteína interactúan con los residuos hidrofóbicos de otra proteína adyacente en la solución acuosa. Además de éstas, otras interacciones no covalentes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno) en la interfase contribuyen a la estabilidad de la estructura cuaternaria.

Las proteínas de cereales normalmente tienen un contenido de residuos hidrofóbicos demasiado elevado como para tenerlos todos situados en el interior, es por ello que presentan estructuras oligoméricas complejas. Así, las globulinas de la soja, 7S y 11S, existen como trímero y dodecámero, respectivamente.

### 1.1.3. Estabilidad conformacional y desnaturalización de proteínas

La estabilidad de la estructura de una proteína nativa es función del número de interacciones no covalentes y puentes de hidrógeno que se dan en la misma, y se expresa mediante la diferencia neta entre las energías libres del estado nativo y del estado desplegado (desnaturalizado) de la proteína:

$$\Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta G_H + \Delta G_{ele} + \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{vdW} - T\Delta S_{conf} \quad (1.1.3.1.)$$

donde  $\Delta G_H$ ,  $\Delta G_{ele}$ ,  $\Delta G_{H\phi}$  y  $\Delta G_{vdW}$  son los cambios en la energía libre para las interacciones por puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrofóbicas y de van der Waals, respectivamente,  $\Delta S_{conf}$  es el cambio en la entropía conformacional del polipéptido y T es la temperatura absoluta. Para la mayoría de las proteínas, independientemente de su tamaño,  $\Delta G_{D \rightarrow N}$  tiene un valor entre 10 y 20 kcal/mol; esto indica que, a pesar de la gran cantidad de interacciones que ocurren en las moléculas de proteína, no son demasiado estables, pudiendo cambiar la conformación fácilmente cuando se rompen unos pocos de enlaces.

El bajo valor de  $\Delta G_{D \rightarrow N}$  hace que cualquier cambio en el entorno de la proteína (pH, fuerza iónica, temperatura, naturaleza del disolvente) pueda producir cambios en la conformación de la proteína. Estos cambios conformacionales afectan a las funciones biológicas de las enzimas y a las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias. La desnaturalización produce la pérdida de la actividad en las enzimas y, normalmente, la insolubilización y pérdida de algunas propiedades funcionales en las proteínas

alimentarias. En ocasiones, es deseable la desnaturalización parcial de las proteínas alimentarias, puesto que aumenta su digestibilidad y mejoran algunas propiedades funcionales, como la capacidad espumante o emulsionante.

La desnaturalización de la proteína puede ser causada por diferentes agentes, como el calor, la presión, fuerzas interfaciales, cizalla mecánica, valores de pH extremos, presencia de sales, tensioactivos y disolventes orgánicos. El calor y la presión son los agentes desnaturalizantes más comunes en el procesado alimentario.

La estabilidad estructural de las proteínas se mantiene principalmente por interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de van der Waals. Además, las proteínas que tienen una alta estabilidad estructural en sistemas biológicos contienen normalmente puentes de azufre, puesto que éstos reducen la tendencia a desdoblarse de la cadena polipeptídica. Los puentes de azufre se forman cuando dos residuos de cisteína se encuentran lo suficientemente próximos entre sí con la orientación adecuada. La presencia de puentes de azufre intramoleculares en la estructura de una proteína contribuye a su resistencia a la desnaturalización térmica y a su desdoblamiento bajo condiciones de cizalla, como las utilizadas en la emulsificación (Li Chan y Nakai, 1991a,b).

Los puentes de hidrógeno aparecen predominantemente en las estructuras secundarias (hélice- $\alpha$  y lámina  $\beta$ ) de la cadena polipeptídica. Los puentes de hidrógeno entre segmentos ocurren predominantemente entre los residuos glutamina y asparragina, como por ejemplo, en las proteínas de gluten, ricas en dichos aminoácidos.

Las interacciones electrostáticas entre grupos cargados de signo opuesto son de gran importancia en la termoestabilidad de las proteínas, y dependen en gran medida del pH y la fuerza iónica.

Entre las interacciones no covalentes, las hidrofóbicas son las que mayor contribución suponen a la estabilidad conformacional de las proteínas. Al contrario que los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas son favorecidas por el aumento de la temperatura y por la entropía; la fuerza de este tipo de interacciones aumenta con la temperatura hasta los 100°C (Privalov y col., 1986).

#### **1.1.4. Propiedades funcionales**

Además de su función nutricional, las proteínas juegan un papel importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos. Las preferencias alimentarias

de los consumidores están basadas fundamentalmente en las propiedades organolépticas de los alimentos, como el color, el flavor o la textura. La proteína es uno de los ingredientes que más contribuye a las propiedades sensoriales de los alimentos. Por ejemplo, las propiedades de textura de los productos de panadería son el resultado de las propiedades viscoelásticas y de la capacidad para formar una masa que tiene el gluten de trigo.

Kinsella definió a las propiedades funcionales como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante su procesado, almacenamiento, preparación y consumo” (Kinsella, 1976). Estas propiedades de las proteínas son una consecuencia de sus propiedades físico-químicas tales como su tamaño, masa molecular, distribución de carga, hidrofobicidad, hidrofilia, estructura (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria), flexibilidad y rigidez molecular.

Sin embargo, la predicción del comportamiento de las proteínas en sistemas alimentarios reales no es en absoluto una tarea trivial. Una de las principales razones de esta dificultad es la desnaturalización de las proteínas durante el procesado y preparación de los alimentos. Una combinación de factores como el pH, la temperatura, el entorno iónico o la interacción de otros componentes del alimento (lípidos, carbohidratos, sales,...) con la proteína puede causar en ésta cambios estructurales impredecibles, afectando así su comportamiento funcional.

En la tabla 1.1.4.1., se exponen las relaciones que existen entre la estructura de las proteínas y su funcionalidad en diferentes alimentos (Damodaran, 1997).

Función	Mecanismo	Alimento	Tipo de proteína
Solubilidad	Hidrofilia	Ebidas	Proteínas del suero
Viscosidad	Ligación de agua, Tamaño y forma hidrodinámica	Sopas, salsas para ensalada, postres	Gelatina
Ligación de agua	Puentes de hidrógeno, hidratación iónica	Salchichas de carne, bizcochos, panes	Proteínas del músculo y del huevo
Gelificación	Inclusión de agua e inmovilización, Formación de entramado reticular	Carnes, geles, bizcochos, queso, panadería	Proteínas de la leche, del huevo y del músculo
Cohesión-Adhesión	Interacción hidrofóbica, iónica, por puentes de hidrógeno	Carnes, salchichas, pasta, panadería	Proteínas del músculo, del huevo y del suero
Elasticidad	Interacción hidrofóbica, puentes disulfuro	Carnes, panadería	Proteínas cereales y del músculo
Emulsificación	Adsorción formación de películas en las interfases	Salchichas, sopa bologna, bizcochos, salsas para ensaladas	Proteínas del músculo, del huevo y de la leche
Espumado	Adsorción interfacial y formación de una película	Helados, pasteles, postres, cremas	Proteínas del huevo y de la leche
Ligación de grasas y flavor	Interacción y retención hidrofóbica	Productos de panadería bajos en grasa	Proteínas de la leche, del huevo y de cereales

Tabla 1.1.4.1.

#### 1.1.4.1. Interacciones proteína-agua

El agua es un constituyente esencial de toda materia viva y por supuesto también de los alimentos. La estructura nativa que adquiere una proteína es consecuencia directa de su interacción con el agua que actúa como disolvente. Así, las diferentes propiedades funcionales de las proteínas pueden verse como manifestaciones de su interacción con el agua.

Las moléculas de agua se unen tanto a los grupos polares como a los no polares (hidratación hidrofóbica) de las proteínas mediante interacciones tipo dipolo-dipolo, carga-dipolo, y dipolo-dipolo inducido.

La capacidad de hidratación de las proteínas depende en gran medida de la composición de aminoácidos de la misma, de forma que cuanto mayor sea el número de residuos con carga, mayor será la capacidad de hidratación. Normalmente, una proteína globular puede unir alrededor de 0,3-0,5 gramos de agua por gramo de proteína cuando la actividad acuosa ( $a_w$ ) es de 0,9. Esa cantidad de agua representa a la que existe en una monocapa sobre la superficie de la proteína y que no se puede congelar. Se denomina “agua ligada”. La capacidad de hidratación de una proteína globular que ha

sufrido desnaturalización es un 10% mayor que la proteína en estado nativo. El aumento no es mayor porque, a pesar del desdoblamiento que ocurre en la desnaturalización, aún se retiene gran parte de la estructura original.

Las condiciones de la disolución en la que se encuentra la proteína, como el pH, la fuerza iónica o la temperatura, afectan la hidratación de las proteínas. La capacidad de hidratación es mínima en el punto isoeléctrico de la proteína, en el que la carga neta es cero y la interacción proteína-proteína es máxima.

En las aplicaciones alimentarias, la capacidad de retención de agua de una proteína es más importante que su capacidad de hidratación. La capacidad de retención de moléculas de agua se refiere a la habilidad de una matriz proteica para absorber y mantener agua atrapada en el interior de la estructura en contra de la gravedad.

#### 1.1.4.2. Solubilidad

Muchas propiedades funcionales de las proteínas, como la capacidad de espesamiento, formación de espumas, emulsiones o geles, se encuentran afectadas por su solubilidad. La solubilidad de la proteína está fundamentalmente relacionada con el equilibrio entre hidrofobicidad e hidrofilia.

La solubilidad de la proteína en soluciones acuosas depende del pH. La solubilidad mínima ocurre en el punto isoeléctrico, donde la repulsión electrostática y la hidratación de los iones son mínimas y la interacción hidrofóbica entre los residuos no polares es máxima.

Las sales pueden promover la disolución (salting-in) o la precipitación de las proteínas (salting-out), en función de la concentración y la naturaleza de la sal empleada, así como de las características físico-químicas de la superficie de la proteína (Regenstein y Regenstein, 1984; Li-Chan, 1996). Así, para proteínas con un alto contenido en residuos hidrofílicos, a un pH alejado del pI y una fuerza iónica alta, la solubilidad aumenta. Mientras que para proteínas con un elevado contenido de residuos hidrofóbicos, la solubilidad disminuye al aumentar la fuerza iónica.

#### 1.1.4.3. Viscosidad y Capacidad espesante

La aceptación por parte del consumidor de los alimentos líquidos o semisólidos depende en gran medida de la viscosidad o consistencia del producto.

La viscosidad de las soluciones proteicas usualmente aumenta de manera exponencial con la concentración de proteína. Esto se atribuye a la mayor interacción

entre las moléculas hidratadas de proteína. Además, la capacidad de las proteínas para absorber agua y aumentar de volumen afecta su viscosidad. La desnaturalización parcial y/o la polimerización inducida por calor producen un aumento del tamaño hidrodinámico de las proteínas, aumentando la viscosidad. La viscosidad de las soluciones de proteínas,  $\eta_{sp}$ , se ve afectada principalmente por dos factores: la forma hidrodinámica y el tamaño de las moléculas, siguiéndose la siguiente relación:

$$\eta_{sp} = \beta C(v_2 + \delta_1 v_1) \quad (1.1.4.3.1)$$

donde  $\beta$  es el factor forma,  $C$  es la concentración,  $v_1$  y  $v_2$  son los volúmenes parciales específicos del disolvente y la proteína, respectivamente, y  $\delta_1$  son los gramos de agua ligados por gramo de proteína.

Las condiciones del medio, como el pH, fuerza iónica y temperatura, afectan la viscosidad de las soluciones proteicas. La viscosidad de las soluciones de proteínas globulares generalmente decrece conforme el pH disminuye hacia el punto isoeléctrico de la proteína. El aumento de la fuerza iónica normalmente produce una disminución de la viscosidad, ya que afecta a su capacidad de hidratación.

#### 1.1.4.4. Flavor

La capacidad de las proteínas para captar sabores está relacionada con la interacción de flavorizantes de bajo peso molecular con pequeños huecos hidrofóbicos que hay en la superficie de la proteína. Esta capacidad será mayor o menor en función del número de hueco hidrofóbicos. Los flavorizantes de carácter polar también pueden unirse a la proteína mediante puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas.

Esta capacidad permite el uso de las proteínas como transportadores o modificadores del flavor, aunque siempre hay que tener en cuenta que las proteínas no tienen la misma afinidad por todos los flavorizantes.

#### 1.1.4.5. Gelificación

Gran parte de las características que presentan una gran variedad de alimentos están determinadas por la propiedad de gelificar de las proteínas durante su calentamiento. Por ejemplo, la textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de productos como embutidos, quesos, yogur, tofú, huevo duro y postres de gelatina están vinculados a la formación de un gel proteico.

La gelificación de proteínas puede producirse mediante tratamiento térmico, pero este no es el único método. En algunos casos la gelificación de las proteínas ocurre por hidrólisis enzimática moderada, por la adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (micelas de caseína, proteínas de soja) y por tratamientos a altas presiones.

Los geles exhiben propiedades microestructurales y mecánicas muy diversas de tal forma que es difícil definirlos. Según Clark (1991), un gel es un material formado por una red sólida tridimensional continua “network” que atrapa al disolvente (agua) y lo inmoviliza.

Durante esa “polimerización” de las proteínas en una red tridimensional, el líquido viscoso se transforma en una matriz viscoelástica. Sin embargo debido a que los geles pueden presentar una estructura fácil de romper, pudiendo fluir bajo la aplicación de fuerzas muy pequeñas, una definición estricta es muy difícil. Por este motivo, se suelen utilizar los términos *fuerte* y *débil* (“strong and weak”) para una subclasificación de los geles (Clark y Ross-Murphy, 1987).

Las proteínas pueden formar dos tipos de geles: coágulos o geles transparentes. El tipo de gel formado por una proteína depende fundamentalmente de su composición aminoacídica, aunque las condiciones ambientales (pH, fuerza iónica) también influyen. Las proteínas con alto contenido en residuos apolares forman a menudo geles débiles tipo coágulo, mientras que las proteínas que tienen un elevado contenido en residuos hidrofílicos tienden a formar geles transparentes.

La estabilidad del gel formado depende de la naturaleza y número de entrelazamientos formados por cadena de polímero. Teóricamente, un gel será más estable cuando la suma de las energías de interacción de una cadena polimérica sea mayor que su energía cinética a una temperatura dada. Esto explica que los geles formados a partir de largas cadenas poliméricas sean más estables que los formados a partir de cadenas cortas.

Los geles proteicos son estructuras altamente hidratadas, que contienen de 85 a 98% de agua, en función de la concentración de proteína utilizada.

#### 1.1.4.6. Emulsificación y formación de espumas

Muchos alimentos se presentan en forma de emulsiones o espumas, que son sistemas bifásicos en los que una de las fases (oleosa o gaseosa, o ambas) se encuentra dispersa en una fase continua acuosa. Debido a que las interfases aceite/agua y aire/agua poseen una energía muy alta, las emulsiones y las espumas se desestabilizan tan pronto

como se forman, a menos que se añada un agente emulsionante o espumante. Este agente (tensioactivo o proteína) gracias a su naturaleza anfifílica se adsorbe y orienta con los grupos lipofílicos hacia la fase apolar y los grupos hidrófilos hacia la fase acuosa. Esta disposición produce una disminución de la tensión interfacial, lo que facilita la formación continua de interfase conforme el sistema aceite-agua o gas-agua se va mezclando. En general, los alimentos son sistemas multifásicos compuestos de proteínas, polisacáridos, grasas, agua, y otros nutrientes menores y aditivos. En función de su concentración relativa y límites de solubilidad, y de la limitada compatibilidad termodinámica existente, los lípidos y macromoléculas aparecen generalmente como partículas y agregados coloidales.

Las propiedades en cuanto a textura de un alimento (helados, bizcochos,...) dependen del tamaño, forma y distribución de las partículas coloidales que lo componen.

El estado multifásico de los alimentos se debe principalmente a la incompatibilidad termodinámica entre sus componentes principales. Las grasas tienden a formar una fase separada a causa de su interacción desfavorable con el agua. Debido a la tendencia de los principales componentes alimentarios a separarse en diferentes fases, especialmente en líquidos, los coloides alimentarios son inherentemente inestables. Su estabilidad frente a la separación de fases durante el almacenamiento depende del tipo de emulsionante o espumante presente en las interfases.

## **1.2. GLUTEN DE TRIGO**

### **1.2.1. Introducción**

El gluten es el principal componente del trigo y es el responsable de la calidad 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 proteico 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.

### **1.2.2. Composición del gluten**

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 gliadinas y gluteninas en conjunto son proteínas de baja polaridad y requieren valores de pH extremos para lograr una carga efectiva sobre su estructura molecular. Las gliadinas son proteínas monoméricas que forman sólo puentes de azufre intramoleculares, mientras que las gluteninas son proteínas poliméricas con

puentes de azufre intermoleculares, aunque también están presentes enlaces intramoleculares.

### **1.2.2.1. Gliadinas.**

Las gliadinas han sido separadas en alrededor de 50 proteínas diferentes. Sin embargo, no todos los cultivos presentan tanta variedad. Las proteínas de gliadina son proteínas monoméricas bastante pequeñas, con un peso molecular que va desde 30.000 a unos 100.000 Da. La principal característica de las gliadinas es que sus aislados resultan bastante pegajosos. Aparentemente, son las responsables de la cohesividad que presenta el gluten.

Mediante el uso de valores de pH ácidos se desarrolló un sistema de electroforesis a pH 3, empleado como método de referencia para separarlas según su movilidad decreciente en:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ - gliadinas.

Los estudios de secuenciación permitieron establecer la existencia de unidades repetitivas. La similitud de estas secuencias repetitivas les confiere alta homología, lo que determina propiedades fisicoquímicas similares y dificulta la separación y purificación de componentes individuales.

Desde el punto de vista químico, entre las gliadinas, se diferencian dos grandes grupos: a) las ricas en azufre, que contienen residuos de cisteína formando puentes disulfuro intracatenarios, representadas por las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - gliadinas, con masas moleculares entre 30 y 45 kDa; y b) las pobres en azufre, que no presentan residuos de cisteína en su estructura primaria, representadas por las  $\omega$ -gliadinas, con masas moleculares mayores, entre 50 y 60 kDa.

La estructura secundaria de las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - gliadinas se caracteriza por presentar giros  $\beta$  principalmente en el extremo N-terminal. Se piensa además que estas proteínas se encuentran en forma monocatenaria; la ausencia de estructura cuaternaria puede ser debida al efecto disociante de los disolventes utilizados para solubilizarlas.

En las  $\omega$ -gliadinas se observa que el 75% del total de los aminoácidos está constituido por glutamina y prolina; esto sumado al bajo contenido en aminoácidos básicos explica su baja movilidad electroforética en medios tipo gel; se observan además numerosos giros  $\beta$ , con una estructura secundaria de pseudohélice, conformación que facilitaría la acumulación de las gliadinas bajo una forma compacta en los cuerpos proteicos.

Debido a las interacciones hidrofóbicas establecidas entre residuos poco polares, las prolaminas requieren el empleo de disolventes de baja polaridad, como etanol acuoso al 70% (v/v) o soluciones conteniendo solventes orgánicos, ácidos o bases, agentes desnaturalizantes o detergentes para lograr una eficiente extracción.

Por otro lado, debe considerarse que los residuos de cisteína presentes en su estructura primaria, producen uniones covalentes intra o intercatenarias, mediante puentes disulfuro, estableciendo extensas mallas poliméricas de polipéptidos. Por este motivo, para permitir una buena recuperación de estas especies, es necesario la adición de agentes reductores (como el 2-mercaptoetanol o ditioneitol) en los solventes de extracción. En ciertas ocasiones, es necesaria la alquilación de los residuos cisteinilos para prevenir la reoxidación de los grupos sulfhidrilos y la reorganización de los enlaces disulfuros.

Desde el punto de vista genético, los tipos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  son codificados por genes a los diferentes cromosomas. Como resultado de duplicaciones y mutaciones ocurridas en dichos genes a lo largo de un extenso proceso evolutivo, las prolaminas expresadas constituyen un conjunto proteico heterogéneo pero a la vez de alta homología.

La complejidad del sistema proteico expresado en estos cereales se incrementa aún más por efecto del medio ambiente, pues la composición de las prolaminas es afectada tanto por el clima, como por la composición de los suelos (contenido de azufre, nitrógeno, fósforo,...) donde los cereales son cultivados. Esto determina variaciones sutiles en las fracciones proteicas dentro de una variedad dada.

### **1.2.2.2 Gluteninas.**

Las gluteninas tienen un tamaño mucho mayor que las gliadinas, teniendo un peso molecular medio de  $3 \times 10^6$  Da aproximadamente, y parecen ser las responsables de las propiedades elásticas del gluten (Hoseney & Rogers, 1990). Su composición química es similar a la de la gliadina (rica en prolamina y glutamina), aunque con un ligero descenso en el contenido de aminoácidos hidrofóbicos. Las gluteninas son proteínas poliméricas que constan de dos grupos principales de cadenas de polipéptidos: subunidades de elevado peso molecular o subunidades A (HMW-GS), con tamaño entre 80.000 y 120.000, y subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS), que comprenden dos subgrupos: las subunidades B (PM: 40.000-55.000) y las subunidades C (PM: 30.000-40.000). También se ha indicado la existencia de un tercer subgrupo en las LMW-GS, las subunidades D. La nomenclatura A, B, C y D está basada en la velocidad

electroforética en SDS-PAGE y representa un intento por clasificar los diferentes componentes de este grupo de proteínas.

Las determinaciones precisas de los pesos moleculares son dificultosas debido a su baja solubilidad y a su gran tamaño. (MacRitchie y Lafiandra, 1997)

Las subunidades de alto peso molecular, HMW-GS, consisten en tres dominios: un dominio central repetitivo, flanqueado por dos dominios no repetitivos (figura 1.2.2.2.1.). El dominio central varía considerablemente en longitud (desde 480 a 680 residuos, aproximadamente), lo que origina diferencias en los pesos moleculares de las proteínas. Los dominios no repetitivos consisten en 81-104 residuos y 42 residuos, respectivamente. Estos dominios contienen la mayoría o todos los residuos de cisteína, aunque es posible encontrar residuos de cisteína de forma aislada en los dominios repetitivos de algunas subunidades HMW-GS.

Las estructuras secundarias de las subunidades HMW-GS han sido estudiadas usando diferentes métodos, concluyendo que los dominios repetitivos son ricos en giros inversos  $\beta$ , mientras que los dominios no repetitivos parecen consistir predominantemente en estructuras  $\alpha$ -hélice (Tilley, 2001).

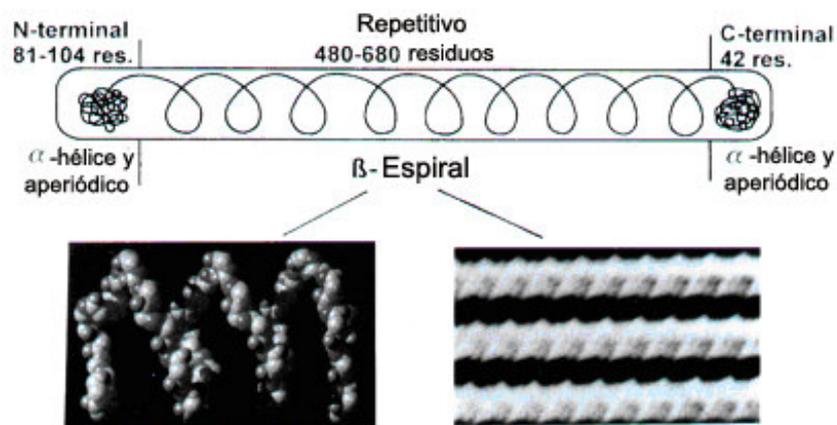


Figura 1.2.2.2.1. Estructura de las subunidades de alto peso molecular de las gluteninas

Las subunidades de bajo peso molecular, LMW-GS, forman un grupo complejo de proteínas que comparten la capacidad para formar puentes de azufre intermoleculares, lo que permite su incorporación en los polímeros de glutenina. Estas proteínas son heterogéneas, con presencia de secuencias de aminoácidos relacionadas con las  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\omega$ -gliadinas, así como secuencias con grupos específicos que son típicos de las LMW-GS. A partir de comparación secuencial de aminoácidos, análisis

bioquímicos y modelado molecular, se ha llegado a la conclusión de que los grupos específicos definidos como típicos de las LMW-GS contienen un número y una distribución determinada de residuos de cisteína que les confiere la capacidad de formar dos puentes de azufre intermoleculares con otras LMW-GS o con HMW-GS, contribuyendo así a la formación de los polímeros de glutenina.

A la inversa, el número y distribución de residuos de cisteína en las gliadinas les permite sólo formar puentes de azufre intramoleculares, por ello, son los componentes monoméricos del gluten. Sin embargo, mutaciones que afectan al número de residuos de cisteína presentes en las gliadinas pueden capacitarlas para formar puentes de azufre intermoleculares, participando así en la formación de los polímeros de glutenina.

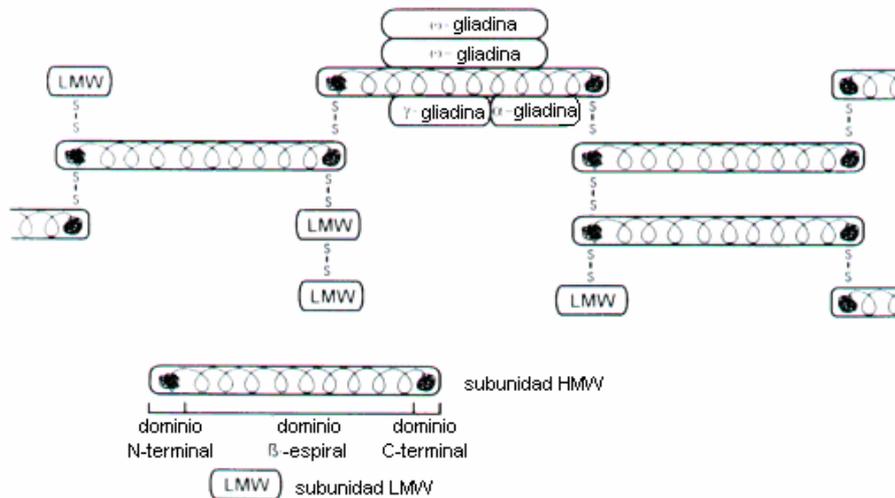


Figura 1.2.2.2.2. Estructura del gluten

No se conoce demasiado sobre su composición y organización genética, siendo necesaria más información para definir las contribuciones específicas de cada componente a las propiedades del gluten (D'Ovidio y Masci, 2004).

## **1.3. PROTEÍNAS DE SOJA**

### **1.3.1. Introducción**

Durante más de 2.000 años, se han consumido en la zona este de Asia alimentos tradicionales a base de soja, como el tofu o la leche de soja; en los países occidentales, en cambio, es a partir de los años sesenta cuando la soja ha empezado a atraer la atención, por tratarse de una fuente proteica vegetal de alta calidad y económica. Puede utilizarse como ingrediente en varios alimentos gracias a sus propiedades funcionales, como la absorción de agua y grasa, capacidad emulsionante, de formación de espumas, gelificante,... Además, es remarcable que la FDA (Foods and Drugs Administration) afirmara en 1999 que el consumo diario de 25 gramos de proteína de soja puede reducir el riesgo de un paro cardíaco (Fukushima, 2004).

El principal problema en la expansión de los productos derivados de proteínas de soja en los países occidentales son los fuertes aromas asociados a los mismos. Estos aromas se deben a la acción de las lipoxigenasas, las saponinas y las isoflavonas (Okubo y col. 1992). Otra de las características no deseables de la soja es su contenido en proteínas alergénicas, imposibles de retirar en su totalidad por los métodos convencionales. Actualmente, se están tratando de solucionar estos problemas ya sea por métodos naturales o bien mediante la ingeniería genética.

### **1.3.2. Proteínas de reserva de la soja**

Aproximadamente, el 90% de las proteínas de la soja existe como proteínas de reserva, principalmente  $\beta$ -conglucina y glicina. La  $\beta$ -conglucina (Koshiyama, 1965; Catsimpoolas y Ekenstam, 1969; koshiyama y Fukushima, 1976a) tiene un coeficiente de sedimentación de 7S, mientras que la glicina (Catsimpoolas y Ekenstam, 1969; Koshiyama y Fukushima, 1976b) lo tiene de 11S. Hay otros dos tipos de globulinas que tiene coeficientes de sedimentación 7S, conocidas como  $\gamma$ -conglucina y la globulina 7S básica. Sin embargo, estas dos 7S globulinas son componentes menores que se encuentran en muy bajo porcentaje. Las principales proteínas de reserva de la soja,  $\beta$ -conglucina y glicina, poseen una variedad de propiedades funcionales aprovechables para los alimentos; estas propiedades funcionales se deben a sus características físico-químicas que dependen de sus estructuras moleculares (Fukushima, 2004).

### 1.3.2.1. Estructuras básicas

La  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína y un trímero, que consiste en tres subunidades con una masa molecular de 150-200 kDa. Las principales subunidades son  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , y sus masas moleculares son 72, 68 y 52 kDa, respectivamente (Thanh y Shibasaki, 1977). Las secuencias de aminoácidos de estas subunidades son similares entre sí (Hirano, 1987). Cada una de las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  posee un residuo de cisteína (-SH) cerca del nitrógeno N-terminal, mientras que la subunidad  $\beta$  no posee ningún residuo de cisteína (Utsumi et al, 1997). En ninguna de las subunidades existe ningún residuo de cistina (-SS-). La  $\beta$ -conglucina muestra heterogeneidad molecular, identificándose seis especies moleculares como  $\alpha'\beta_2$ ,  $\alpha\beta_2$ ,  $\alpha\alpha'\beta$ ,  $\alpha_2\beta$ ,  $\alpha_2\alpha'$  y  $\alpha_3$  (Thanh & Shibasaki, 1978; Yamauchi et al., 1981). Otros estudios (Yamauchi et al, 1981) han encontrado otras especies de  $\beta_3$ . Los trímeros de  $\beta$ -conglucina pueden sufrir asociación o disociación en función del pH y de la fuerza iónica de la solución (Thanh y Shibasaki, 1979).

La glicina es un hexámero con una masa molecular de 300-380 kDa. Cada subunidad está compuesta por polipéptidos ácidos (~35 kDa) y básicos (~20 kDa), unidos por un enlace disulfuro (Staswick et al., 1984). En la glicina, hay cinco subunidades que se identifican como  $A_{1a}B_{1b}$  (53,6 kDa),  $A_2B_{1a}$  (52,4 kDa),  $A_{1b}B_2$  (52,2 kDa),  $A_5B_4B_3$  (61,2 kDa) y  $A_3B_4$  (55,4 kDa) y que se clasifican por homología en dos grupos: grupo I ( $A_{1a}B_{1b}$ ,  $A_2B_{1a}$ ,  $A_{1b}B_2$ ) y grupo II ( $A_5B_4B_3$ ,  $A_3B_4$ ) (Nielsen, 1985; Nielsen et al. 1989). Cada subunidad del grupo I tiene dos residuos de cisteína y tres de cistina, mientras que cada subunidad del grupo II tiene dos residuos de cisteína y dos de cistina (Utsumi et al, 1997). Las subunidades de glicina muestran polimorfismo, es decir, hay algunos cambios en la secuencia de aminoácidos para una misma subunidad entre diferentes cultivos de soja (Mori et al., 1981; Utsumi et al., 1987).

### 1.3.2.2. Propiedades físico-químicas

Las funciones físico-químicas que lleva a cabo las proteínas de soja en los sistemas alimentarios son: solubilidad, absorción y ligación de agua, viscosidad, gelificación, cohesión-adhesión, elasticidad, emulsificación, adsorción de grasas, ligación de flavor, capacidad de formar espumas, control del color,...; existe una notable diferencia entre las propiedades físico-químicas entre las proteínas de cultivos de soja diferentes.

Estas funciones físico-químicas de las proteínas dependen sustancialmente de sus estructuras tridimensionales. Las cadenas de polipéptido de las moléculas de proteína se despliegan durante el tratamiento térmico de la soja y como resultado los residuos de aminoácidos que se encontraban enterrados en el interior de la molécula, se exponen a la superficie. Los residuos –SH o hidrofóbicos ahora expuestos combinan las moléculas mediante reacciones de intercambio –SH,-SS o por interacciones hidrofóbicas, respectivamente. En este caso, es importante que estos residuos activos se encuentren presentes en un lugar accesible de la molécula. La tabla 1.3.2.2.1. muestra el número de grupos –SH y –SS en cada subunidad. El mayor número de grupos SH en la glicinina hace que los geles formados a partir de ésta sean más duros y más turbios en comparación con los resultantes a partir de la β-conglicinina, mientras que la mayor hidrofobicidad y facilidad a la hora de desplegarse de ésta última, le confiere una mayor capacidad emulsionante (Utsumi 1997).

	<b>Subunidad</b>	<b>Cisteína (-SH)</b>	<b>Cistina (-SS-)</b>
β-conglicinina	α	1	0
	α'	1	0
	β	0	0
Glicinina	AB	2	3
	A <sub>1a</sub> B <sub>1b</sub>	2	3
	A <sub>2</sub> B <sub>1a</sub>	2	3
	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub>	2	2
	A <sub>5</sub> A <sub>4</sub> B <sub>3</sub>	2	2

<sup>(1)</sup>Utsumi et al., 1997.

Tabla 1.3.2.2.1. Número de residuos de cisteína y cistina en cada subunidad de β-conglicinina y de glicinina<sup>(1)</sup>

### B.1. Solubilidad

Para obtener una funcionalidad óptima cuando se realiza una actividad emulsionante, espumante o gelificante, es necesaria una proteína altamente soluble. Las proteínas con baja solubilidad tienen unas propiedades funcionales y utilidades limitadas.

Existe una variedad de harinas de soja con distintas solubilidades en función del uso que se le piense dar. El tratamiento térmico, aunque necesario para eliminar sabores y componentes antinutricionales indeseables, insolubiliza rápidamente a las proteínas de soja. Así, la duración y la intensidad del tratamiento determinarán las propiedades funcionales de la proteína resultante.

El pH y la fuerza iónica del disolvente acuoso tienen un efecto bastante significativo sobre la solubilidad de las proteínas. Las proteínas de soja muestran el clásico perfil de solubilidad frente al pH, con un punto isoeléctrico en torno a 4,5 (Kinsella, 1979).

## B.2. Emulsificación

El aislado de proteína de soja actúa como un tensioactivo macromolecular a la hora de estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W) en productos alimenticios, como sopas, salsas o blanqueantes de café. A pesar de su importancia comercial, el conocimiento sobre las propiedades emulsionantes de las proteínas de soja es escaso en comparación con el existente sobre sus propiedades gelificantes. Kato y col. (1983) demostraron que la capacidad emulsionante de la  $\beta$ -conglucina es mucho mejor que la mostrada por la ovoalbúmina, y peor que la mostrada por la  $\kappa$ -caseína o la  $\beta$ -lactoglobulina.

Rivas y Sherman (1983a, 1983b, 1984a, 1984b) demostraron que la  $\beta$ -conglucina presenta mejores propiedades emulsionantes que la glicina y que la proteína de soja obtenida por precipitación con ácido.

La diferencia sustancial entre la  $\beta$ -conglucina y la glicina a la hora de reducir la tensión interfacial puede ser atribuida a sus características químicas y estructurales. La  $\beta$ -conglucina es más hidrofóbica y tiene menor peso molecular que la glicina, es por ello que puede adsorberse más rápidamente que ésta en la interface. Además, la redistribución de los aminoácidos de la glicina en la interface puede ser lenta, debido a la presencia de enlaces disulfuro inter e intramoleculares. La repulsión entre moléculas cargadas en la proximidad de la interfase puede también retardar la adsorción de la glicina en mayor medida, debido a su elevada carga neta.

Las propiedades emulsionantes de las proteínas están íntimamente ligadas a la conformación de las moléculas adsorbidas en la interfase aceite/agua y a las interacciones que entre ellas se producen. La desnaturalización interfacial de la  $\beta$ -conglucina y la glicina y la consiguiente interacción entre ellas puede ser un proceso complicado en comparación al que ocurre con proteínas monoméricas (Utsumi y col., 1997).

### 1.3.2.3. Estructuras tridimensionales

La secuencia de aminoácidos completa de las subunidades de las proteínas de reserva de la soja fue determinada a principios de los años ochenta, sin embargo, por problemas relacionados con su cristalización, hasta hace poco no ha sido posible un análisis de la estructura mediante rayos X. En la tabla 1.3.2.3.1. aparecen los contenidos en estructura secundaria de la  $\beta$ -conglucina y de la glicina, determinados por rayos X y por dicroísmo circular (DC).

	$\beta$ -conglucina		Glicina	
	Rayos X	DC	Rayos X	DC
$\alpha$ -hélice	10	5	8	5
$\beta$ -estructura	33	35	36	35
Estructura desordenada	57	60	56	60

<sup>(1)</sup>Fukushima, 2004

Tabla 1.3.2.3.1. Contenidos porcentuales de estructuras secundarias correspondientes a las moléculas de las proteínas de reserva de la soja<sup>(1)</sup>

## **1.4. PROTEÍNAS DE LA ALGARROBA**

### **1.4.1. Introducción**

El algarrobo (*Ceratonia siliqua*) es un árbol de origen mediterráneo (Avallone y col., 1997, Yousif y Alghzawi, 2000). En muchos países árabes se utiliza su fruto para preparar bebidas y dulces típicos. En los países occidentales se extraen las semillas de la vaina de la algarroba para confeccionar una harina que se tritura y tuesta y se la utiliza como sustituto del cacao (Yousif y Alghzawi, 2000). Estas semillas se utilizan también en la industria alimentaria por su contenido de gomas (Avallone y col., 1997).

La principal aplicación de la algarroba europea es la de obtención de goma garrofín (LGB). La harina de germen de algarroba se puede obtener como subproducto una vez que se ha separado el endospermo, del que se obtiene la LGB. Las harinas de algarrobas contienen proteínas en cantidad menor que las semillas de otras leguminosas como la soja. Es normal, ya que estas harinas son el resultado de la molienda de las vainas y de las semillas. El contenido proteico de las semillas es superior llegando a competir con los valores de la soja.

La composición química de la algarroba europea ha sido estudiada por algunos investigadores (Binder y col., 1959, Calixto y Canellas, 1982). Se la utiliza para la elaboración de edulcorante por su alto contenido de azúcar ( $\cong 50\%$ ). La harina de la vaina (Avallone y col., 1997) contiene un 45% carbohidratos, 3% proteína y 0.6% lípidos, mientras que la harina de germen y la de semilla contienen más lípidos y menos hidratos de carbono.

Debido a sus características la harina de algarroba se puede calificar como un ingrediente natural y saludable que puede reemplazar eficientemente en muchos alimentos al polvo de cacao.

### **1.4.2. Similitudes y diferencias con el gluten de trigo**

Existen diferentes estudios sobre el algarrobo (Avallone y col., 1997, Yousif y Alghzawi, 2000), aunque la mayoría se centran en la harina proveniente de la pulpa o de la vaina completa (90% de pulpa, 10% de germen), que no poseen un contenido tan elevado de proteína como el aislado utilizado en este estudio.

La mezcla de proteínas insolubles en agua que se aísla del germen de algarroba, obtenido como subproducto en la obtención de la goma de garrofín, se denomina “*caroubin*” (Wang y col., 2001; Feillet y col., 1998), y suponen el 50% del peso total de

la harina del germen. La caroubin es una mezcla de un gran número de proteínas de diferentes tamaños y grados de polimerización, con pesos moleculares que van desde más de un millón a varios miles. El 78% de la proteína tiene un peso molecular entre 65 y 1000 kDa (Feillet y col., 1998). Al hidratarse, la caroubin puede formar una masa, que presenta ciertas similitudes en cuanto a sus propiedades reológicas con la masa formada por el gluten de trigo. La composición de aminoácidos de la caroubin difiere del gluten en que contiene más arginina, ácido aspártico y lisina, y menos cistina, fenilalanina y prolina. Tanto en la proteína de algarroba como en el gluten de trigo existen altos niveles de ácido glutámico. Al añadir agua a la proteína, se consigue una masa homogénea antes con la caroubin que con el gluten. Además, la caroubin (3,17 g de agua/g de proteína) parece absorber más agua por unidad de peso que el gluten (1,86 g de agua/g de proteína) (Wang y col., 2001).

El aumento de temperatura parece tener un mayor efecto sobre la proteína del algarrobo que sobre el gluten, puesto que aquella absorbe más agua al calentarse; el aumento de la absorción de agua al calentar se explica debido a que un aumento de la temperatura hace que se rompan los puentes de hidrógeno, abriéndose la estructura secundaria de la proteína, haciéndose más accesibles grupos polares. El calentamiento de la proteína caroubin totalmente hidratada da lugar a un proceso de agregación irreversible, por el que se forma estructura lámina  $\beta$  a partir de estructura  $\alpha$ -hélice o desordenada.

Wang y col. (2001) mediante técnicas espectroscópicas analizaron la proteína del algarrobo, encontrando dos picos de misma intensidad correspondientes a estructuras  $\alpha$ -hélice y lámina- $\beta$ , que no se ven afectados de gran manera por la hidratación. Parece ser que la caroubin o proteína del algarrobo presenta una estructura más ordenada y estable que el gluten de trigo.

Debido a las similitudes que presentan el gluten y la proteína del algarrobo, se ha investigado la posible sustitución del gluten por la caroubin en la formulación de alimentos (Wang y col., 2001). El principal motivo para sustituir al gluten sería la intolerancia que ciertas personas presentan al gluten, no digiriendo alimentos en los que éste se encuentre presente (enfermedad celíaca).

## 1.5. CASEÍNA

### 1.5.1. Introducción.

Existen principalmente dos tipos de proteínas en la leche, que pueden ser separados en función de su solubilidad a pH 4,6 a 20°C. En estas condiciones, algunas de las proteínas precipitan; éstas son las caseínas. Las proteínas que permanecen solubles a pH 4,6 se conocen como proteínas del suero o serum. (Fox y Kelly, 2004)

Inicialmente, la caseína se utilizaba solamente con aplicaciones industriales (pegamentos, plásticos,...) y era esencialmente un subproducto de menor importancia económica. Hoy día, en cambio, es una de las principales proteínas alimentarias funcionales. Las principales aplicaciones de las caseínas son los análogos de quesos, como emulsionantes en productos cárnicos y varios alimentos dietéticos.

### 1.5.2. Heterogeneidad de las caseínas

La caseína no es una proteína homogénea. Mellander (1939) demostró mediante electroforesis que la caseína precipitada en su punto isoelectrico es heterogénea y consiste en tres proteínas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -caseínas, representando el 75, 22 y 3% del total de la caseína, respectivamente.

En realidad la  $\alpha$ -caseína es una mezcla de tres proteínas:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - y  $\kappa$ -caseínas. Las  $\alpha$ -caseínas son sensibles al calcio, mientras que las  $\kappa$ -caseínas no lo son, puesto que sólo tienen un residuo fosfato, el cual liga los cationes débilmente. (Fox y Kelly, 2004)

En la leche bovina se encuentran cuatro tipos diferentes de caseína,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , en una proporción aproximada de 4:1:4:1 (Swaisgood 1982; Dalgleish, 1997). Cada una de las caseínas presenta microheterogeneidad, por una o varias razones, por lo que las caseínas forman un grupo muy heterogéneo:

- Variación en el grado de fosforilación
- Variación en el grado de glicosidación en el caso de la  $\kappa$ -caseína
- Sustituciones de aminoácido controladas genéticamente, que conducen a polimorfismo genético
- Formación de polímeros con enlaces disulfuro en el caso de las  $\alpha_{s2}$ - y  $\kappa$ -caseínas, que contienen dos residuos de cisteína, que forman enlaces intermoleculares, lo que las hace menos flexibles que las  $\alpha_{s1}$ - y  $\beta$ -caseínas
- Proteólisis por proteínas (como la plasmina)

### 1.5.3. Propiedades moleculares

Las caseínas son proteínas bastante pequeñas, con una masa molecular de 20-25 kDa, lo que probablemente contribuye significativamente a su alta estabilidad. Las caseínas, especialmente la  $\beta$ -caseínas, tienen un alto contenido en prolina. La presencia de un elevado nivel de prolina previene la formación de  $\alpha$ -hélices, láminas- $\beta$  y giros- $\beta$ .

Son bastante solubles en agua, a pesar de su alto contenido en aminoácidos apolares. Esto se debe al alto contenido en grupos fosfato, al bajo nivel de aminoácidos azufrados y al alto contenido en carbohidratos de la  $\kappa$ -caseína (Chen, 2002). Además, son relativamente hidrofóbicas y tienen, en particular, una elevada hidrofobicidad superficial debido a sus estructuras abiertas. Diferentes estudios indican que las caseínas poseen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria (tienen poca estructura  $\alpha$ -hélice, elevados volúmenes hidrodinámicos y no presentan temperatura de desnaturalización), aunque algunos cálculos teóricos sugieren la posibilidad de que posean cierto grado de estructuración. Se ha sugerido que más que una ausencia de estructura secundaria, las caseínas poseen estructuras muy flexibles e inestables ('reomórficas'). Esta ausencia de estructuras secundarias y terciarias estables hace que las caseínas sean estables frente a agentes desnaturalizantes (calor o urea), y contribuye a su alta actividad superficial. Esto confiere a las caseínas unas buenas propiedades emulsionantes y espumantes.

Las estructuras primarias de las cuatro caseínas bovinas, y de sus principales variedades genéticas, son conocidas (Swaisgood, 2003). Estas estructuras primarias revelan que contienen muchos residuos de aminoácidos hidrofóbicos con cadenas laterales apolares. Una distribución desigual de estos aminoácidos resulta en terminaciones y zonas hidrofóbicas. Las  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas son proteínas anfipáticas, que poseen terminaciones hidrofílicas e hidrofóbicas y que, por tanto, son especialmente adecuadas para su uso como emulsionantes. Entre las diferentes fracciones, la  $\beta$ -caseína es la más hidrofóbica y la  $\alpha_{s2}$ -caseína es la más hidrofílica. (Chen, 2002).

### 1.5.4. Caseína micelar

Las caseínas en la leche existen como partículas coloidales (50-500 nm), que tienen una fuerte tendencia a formar grandes agregados macromoleculares. Incluso en solución, especies individuales de caseínas muestran una fuerte tendencia a asociarse consigo mismas; la  $\beta$ -caseína, que es una molécula anfipática con una cabeza hidrofílica

y una cola hidrofóbica, forma micelas como las formadas por los tensioactivos, con una concentración micelar crítica entre 0,3 y 0,7 mg/ml, dependiendo del pH, la fuerza iónica y la temperatura (Rollema 1992). Las  $\alpha_{s1}$ -caseínas forman largos polímeros de moléculas individuales, mientras que las  $\kappa$ -caseínas polimerizan vía interacciones entre terminaciones C-hidrofóbicas de moléculas individuales, y por enlaces disulfuro intermoleculares.

Las micelas de caseína tienen generalmente una forma esférica, con un diámetro en torno a 50-500 nm y una masa dentro del intervalo  $10^6$  a  $3 \cdot 10^9$  Da. Estas micelas tienen un alto grado de empaquetamiento y están altamente hidratadas, ligando alrededor de 2 g de agua por gramo de proteína. La porción seca de las micelas consiste en un 94% de proteína y un 6% de otros materiales, principalmente calcio y fosfato, con pequeñas cantidades de magnesio y citrato, y trazas de otros metales como zinc. La parte no proteica de las micelas, referida generalmente como fosfato cálcico coloidal (CCP), tiene una gran influencia en las propiedades y comportamiento de las micelas. Las  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - y  $\beta$ -caseínas precipitan a una concentración de calcio superior a 6mM; la insensibilidad de la  $\kappa$ -caseína al ión  $\text{Ca}^{2+}$  permite que, a pesar de que en la leche bovina hay una concentración en este ión de alrededor de 30mM, no se produzcan precipitaciones debido a que las  $\kappa$ -caseínas estabilizan al resto de las caseínas formando un tipo de estructura cuaternaria, lo que se conoce como ‘caseína micelar’.

#### **1.5.4.1. Estabilidad de las micelas**

Las micelas son estables a procesos de compactación, homogeneización y a la alta concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (hasta al menos 200 mM); sin embargo hay ciertos procesos que pueden desestabilizar o afectar las propiedades de las ‘caseínas micelares’. La mayoría de los productos lácteos se producen bien produciendo su desestabilización (quesos, leches fermentadas,...), bien previniéndola (productos congelados, secos o tratados térmicamente).

##### **a) Acidificación**

La disminución del pH de la leche tiene bastantes implicaciones para las propiedades físico-químicas de las ‘caseínas micelares’. Los cambios en las ‘caseínas micelares’ al bajar el pH son producidos en parte por los cambios en el contenido en CCP de las micelas. Las unidades de CCP pueden ser disueltas y separadas de las micelas mediante acidificación en frío, seguida de diálisis. El

mismo resultado se obtiene mediante la adición de una agente secuestrante (ej.: citrato, oxalato). Todo el CCP está disuelto a pH 4,9. A la inversa, el contenido en CCP de las 'caseínas micelares' puede aumentarse al aumentar el pH de la leche, y posterior diálisis.

Como resultado de la solubilización del CCP y de la disociación de las diferentes especies de caseínas, la reducción del pH resulta en una desintegración gradual de las 'caseínas micelares'. Eventualmente, debido a la reducción de carga neta negativa sobre las 'caseínas micelares' (que, por tanto, conduce a la reducción de las fuerzas repulsivas intermicelares), a la reducida hidratación de la caseína en el rango de pH 4,6-5,4 y al aumento de fuerza iónica del serum (al aumentar la concentración en iones calcio y fosfato), las fuerzas de agregación empiezan a dominar sobre la tendencia a la disociación, teniendo lugar la gelificación, que comienza normalmente alrededor de pH 5,2.

Por tanto, la agregación o gelificación de las caseínas ocurre cuando el pH se reduce a su punto isoeléctrico (4,6), bien por acidificación con un ácido mineral o bien por fermentación in situ de lactosa a ácido láctico por una bacteria. La precipitación de la proteína en su punto isoeléctrico es un proceso dependiente de la temperatura, que no ocurre a temperaturas por debajo de 5-8°C.

b) Hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína por enzimas proteolíticos (Coagulación rennet de la leche)

Desde hace bastante tiempo se sabe que el tratamiento de la leche con extractos que contienen NaCl provenientes del estómago de mamíferos neonatales ('rennets') produce su coagulación; El principal agente activo en la especie bovina es el enzima proteolítico, quimosina, con pequeñas cantidades de pepsina.

La quimosina coagula la leche en un proceso de dos etapas. En la primera etapa, el C-terminal hidrofílico de la  $\kappa$ -caseína (CMP) se separa por hidrólisis del enlace peptídico Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la región N-terminal y se difunde hacia el serum. Esta pérdida de la superficie de las micelas, las desestabiliza por una disminución del potencial de superficie (zeta) y por una pérdida de estabilización estérica.

Una vez hidrolizado un nivel crítico de  $\kappa$ -caseína (~80%), empieza la segunda etapa, no enzimática, de la coagulación, que ocurre sólo a temperaturas superiores a 18°C y en presencia de una concentración crítica de calcio. En esta etapa se produce una agregación de las micelas deficientes en CMP, primero en

cadenas y, finalmente, en condiciones quiescentes, en una red tridimensional tipo gel (Fox y Nelly, 2004).

La rennet caseína obtenida por este método es insoluble en agua o álcali, pero puede disolverse añadiendo agentes secuestrantes de calcio, como los polifosfatos. (Chen, 2002).

## 1.6. TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA

### 1.6.1. Introducción

Además de los estados termodinámicos clásicos (cristales, líquidos y gases), existen otros estados (mesomórficos) de gran importancia práctica. Los polímeros presentan una serie de particularidades a nivel molecular: pueden tener una estructura química irregular, y no cristalizar ni fundir, presentando otras transiciones de fase. Estas transiciones cambian las características sensoriales del polímero.

Virtualmente, todos los polímeros presentan una transición vítrea a una temperatura  $T_g$  por encima de la cual el polímero se reblandece. Esta transición está asociada microscópicamente con el comienzo de movimientos moleculares cooperativos de largo alcance. Aparte de estas transiciones, se dan otros cambios en algunas propiedades mecánicas, térmicas, dieléctricas y moleculares, como consecuencia de un cambio en los estados de la asociación molecular y su dinámica.

El estado vítreo de un polímero amorfo es el estado del sistema en el que el movimiento de las distintas cadenas se encuentra paralizado, de forma que sólo determinados movimientos locales, como rotaciones de grupos laterales, son posibles. La temperatura de transición vítrea (conocida también como *glass transition*) puede definirse como la temperatura a la que ocurre la transición desde este estado vítreo a otro estado gomoso en el que los movimientos moleculares son posibles. Esta temperatura puede medirse mediante diversas técnicas (reología, calorimetría, dilatometría). Debido a que la  $T_g$  se define cinéticamente, esta temperatura disminuirá con la escala de tiempo de la medida, es decir, aumentará al aumentar la frecuencia.

Existen aditivos, denominados plastificantes, que reducen el valor de la  $T_g$  de un polímero, aumentando su flexibilidad, permitiendo un procesado más fácil.

### 1.6.2. El agua como plastificante de biopolímeros

La adición de agua disminuye el valor de la temperatura de transición vítrea, al ser un plastificante bastante efectivo en los biopolímeros. Un plastificante se caracteriza por un bajo peso molecular y aumenta el volumen libre del sistema en una cantidad que depende de su fracción volumétrica y de la diferencia  $T - T_{gp}$ , donde  $T_{gp}$  es la temperatura de la glass transition del plastificante.

Existen modelos teóricos que relacionan la  $T_g$  de una mezcla homogénea con las concentraciones y propiedades termodinámicas de los componentes puros ( $T_g$  y/o  $\Delta C_p$ ,

cambio en la capacidad calorífica específica a la  $T_g$ ). El modelo de Gordon-Taylor (ecuación 1.6.2.1.) es aplicable a sistemas binarios (componente alimentario y agua u otro plastificante).

$$T_g = \frac{W_1 T_{g1} + kW_2 T_{g2}}{W_1 + kW_2} \quad (1.6.2.1.)$$

donde  $W$  es la fracción en peso,  $k$  es una constante, proporcional al efecto plastificante, y los subíndices 1 y 2 se refieren a los dos componentes de la mezcla.

Por el contrario, el modelo de Couchman-Karasz (ecuación 1.6.2.2) se ha utilizado para sistemas multicomponentes (por ejemplo, componente alimentario, agua y otro plastificante). La ecuación de Couchman-Karasz (Couchman y Karasz, 1978) interpreta el efecto plastificante del agua sobre varios biopolímeros partiendo de una base termodinámica, asumiendo una continuidad de la entropía configuracional en la  $T_g$ , además de una completa inmiscibilidad y la ausencia de toda cristalinidad o entrecruzamiento:

$$T_g = \frac{W_1 \Delta C_{p1} T_{g1} + W_2 \Delta C_{p2} T_{g2}}{W_1 \Delta C_{p1} + W_2 \Delta C_{p2}} \quad (1.6.2.2.)$$

donde  $W$  y  $\Delta C_p$  son, respectivamente, la fracción en peso y la diferencia entre las capacidades caloríficas entre los estados vítreo y gomoso en la  $T_g$ , y los subíndices 1 y 2 se refieren a los dos componentes de la mezcla. La ecuación de Couchman-Karasz es equivalente a la de Gordon-Taylor con  $k$  igual al cociente entre los incrementos de las capacidades caloríficas ( $\Delta C_{p2}/\Delta C_{p1}$ ). El modelo de Couchman-Karasz requiere el valor de  $\Delta C_p$  para el agua, lo cual es objeto de considerable debate, por lo que la ecuación de Gordon-Taylor es la que más se utiliza para el estudio de mezclas binarias.

### 1.6.3. Teorías de la temperatura de transición vítrea

Generalmente, las teorías que explican el estado vítreo están basadas bien en conceptos termodinámicos, o bien en el concepto del volumen libre. La función plastificante de diluyentes de bajo peso molecular se entiende más fácilmente mediante este último concepto. Por encima de la  $T_g$  el volumen libre aumenta linealmente con  $T_g$ .

*a) Teoría del volumen libre*

La teoría del volumen libre, desarrollada en un principio por Eyring, introduce este concepto para describir la viscosidad de los líquidos como una energía de activación para la velocidad de difusión. Aunque no hay ninguna regla establecida para calcular este volumen libre, estas cavidades o huecos son condiciones necesarias para el comienzo de un movimiento molecular coordinado. La teoría proporciona relaciones entre los coeficientes de expansión por debajo y por encima de la  $T_g$  y desarrolla ecuaciones que relacionan los movimientos viscoelásticos con las variables de tiempo y temperatura.

La ecuación de Williams-Landel y Ferry (WLF) es una relación analítica entre la viscosidad del polímero fundido y el volumen libre. Esta ecuación es muy general: no asume ninguna estructura química específica, aparte de la de un polímero amorfo lineal por encima de la  $T_g$ . La teoría cinética de la glass transition considera la respuesta molecular y macroscópica a lo largo del tiempo. Se dice que el material se encuentra en el estado vítreo si el número de huecos y sus respectivas posiciones espaciales se mantienen constantes y fijas, es decir, si las moléculas son incapaces de dejar su posición para ocupar uno de los huecos. Esta teoría cinética define la  $T_g$  como la temperatura a la que el tiempo de relajación para los movimientos de los distintos segmentos de la principal cadena polimérica es del mismo orden de magnitud que la escala de tiempo del experimento. Por tanto, esta teoría está relacionada con la velocidad a la que el sistema se aproxima al equilibrio, teniendo en cuenta los movimientos respectivos de los huecos y de las moléculas (Cesàro y Sussich, 2001).

*b) Teorías termodinámicas*

Las teorías termodinámicas introducen la noción de equilibrio y las condiciones para una verdadera transición de segundo orden, aunque a escalas de tiempo infinitamente largas. La teoría postula la existencia de una transición de segundo orden, a la que la transición vítrea se aproxima como a un límite, a medida que las medidas se llevan a cabo más lentamente. Esta teoría predice con éxito la variación de  $T_g$  con el peso molecular, la densidad de entrecruzamiento, contenido de diluyente y otras variables.

Aunque existen muchas teorías que tratan de explicar la vitrificación, ninguno de los modelos conceptuales propuestos ha descrito satisfactoriamente los fenómenos observados.

Se pueden enunciar las siguientes reglas empíricas, que combinan práctica y teoría:

- El valor experimental de  $T_g$  aparece progresivamente a temperaturas más bajas conforme el experimento se lleva a cabo a más bajas velocidades
- Un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio termodinámico es necesario en muchas reacciones simples
- Los cambios que ocurren en el estado conformacional de la cadena polimérica principal tienen lugar mucho más lentamente (cerca de la  $T_g$ ) que la mayoría de los otros procesos moleculares que a menudo se dan como ejemplo de simple equilibrio
- En caso de existir un verdadero valor de  $T_g$  en equilibrio, éste debe ser un valor menor que el observado en experimentos de corta duración

#### **1.6.4. Relajaciones moleculares por debajo de la $T_g$**

Aunque el estado vítreo se caracteriza por la ausencia de movimientos moleculares de gran escala, todavía son posibles movimientos locales (transiciones secundarias) por debajo de la  $T_g$ . Estos movimientos implican a movimientos parciales (oscilaciones o rotaciones parciales) de pequeños segmentos de la cadena polimérica, y no se detectan por métodos calorimétricos o dilatométricos, puesto que no producen un cambio en la energía o el volumen del sistema. Por ello, propiedades físicas de otro tipo deben ser estudiadas, principalmente por técnicas basadas en oscilaciones periódicas. Así, el comportamiento típicamente viscoelástico de los materiales poliméricos puede ser cuantificado por determinación de la componente elástica (de almacenamiento) y de la componente viscosa (de pérdidas). Medidas de estas cantidades en función de la temperatura, en el intervalo de frecuencias adecuado, muestran invariablemente picos de relajación a una temperatura de transición característica. Más de un proceso de relajación se detecta usualmente junto al proceso de transición vítrea mediante métodos dinámicos-mecánicos. Estas transiciones se indican mediante letras griegas: el símbolo  $\alpha$  se asigna a la transición vítrea y los símbolos  $\beta$  y  $\gamma$  a las transiciones que ocurren conforme la temperatura disminuye.

Experimentalmente se ha demostrado que la mayoría de las relajaciones secundarias en los polímeros vítreos son consecuencia de isomerizaciones que ocurren en la conformación de pequeñas secciones de las cadenas principales o de cadenas laterales. Su cinética puede ser descrita por un modelo según el cual las conformaciones estables están separadas por una barrera de potencial (comportamiento tipo Arrhenius).

Los movimientos moleculares que causan las relajaciones secundarias en los polímeros vítreos se han dividido en los siguientes tipos (Heijboer, 1976):

1. Movimientos locales de la cadena principal, asumiendo rotaciones de hasta seis grupos alrededor de los enlaces co-lineares en los dos extremos del segmento
2. Rotaciones de las cadenas laterales alrededor del enlace que une el grupo a la cadena principal
3. Movimientos internos alrededor de la cadena lateral
4. Movimientos moleculares del diluyente, o afectados por el mismo

Además de las relajaciones moleculares secundarias que tienen lugar por debajo de la  $T_g$ , un endotermo por debajo de la  $T_g$  se encuentra frecuentemente cuando los biopolímeros o carbohidratos son calentados en un calorímetro diferencial de barrido (Gidley y col., 1993). Cuando el material se calienta y enfría, este endotermo no aparece en el re-calentamiento inmediato, aunque aparecería manteniéndolo un tiempo a una temperatura por debajo de la  $T_g$ . Este endotermo se asocia frecuentemente a un evento de relajación entálpica (Farahnaky y col., 2005). Éste se debería a una redistribución de la estructura al calentar, que tiene lugar en un intervalo de temperaturas relativamente estrecho.

### **1.6.5. Técnicas para la medida de la $T_g$**

#### **1.6.5.1. Dilatometría**

La dilatometría, en la que la expansión de un sistema vítreo inmerso en un fluido no plastificante (como el mercurio) es medida en un intervalo de temperaturas, es uno de los métodos para medir la  $T_g$  (Sperling, 1986). El aumento en el volumen específico  $V$  (volumen por unidad másica,  $m^3kg^{-1}$ ) de un sistema vítreo con el aumento de la temperatura muestra, conforme se acerca a la temperatura de transición vítrea, un cambio apreciable en la pendiente que refleja la diferencia en el coeficiente de expansión térmica volumétrico  $\alpha$  ( $m^3kg^{-1}K^{-1}$ ) entre los estados vítreo y gomoso (Sperling, 1986).

Entre los problemas que puede presentar esta técnica se encuentra la usual inclusión de aire y la falta de control en las velocidades de calentamiento/enfriamiento (Farhat, 2004).

### 1.6.5.2. Calorimetría

Cuando un material es calentado desde su estado vítreo, un cambio en la entalpía  $H$  ( $\text{J kg}^{-1}$ ), semejante al que ocurre en el volumen específico descrito anteriormente, tiene lugar a la  $T_g$ , originando un cambio en la capacidad calorífica específica  $C$  ( $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ ), también referida como  $C_p$ , ya que en la mayoría de los estudios, se mantiene una presión aproximadamente constante.

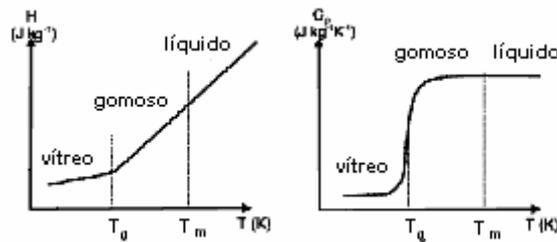


Figura 1.6.5.2.1. Cambios de la entalpía ( $H$ ) y la capacidad calorífica específica ( $C_p$ ) alrededor de la  $T_g$  (Farhat, 2004)

Estos cambios se utilizan a menudo para registrar la transición vítreo-gomoso mediante métodos como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), que es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de la  $T_g$  (Laye, 2002). La muestra, normalmente unos pocos miligramos, es sellada en un plato especial, usualmente de aluminio o de acero inoxidable.

Los termogramas de DSC se representan a menudo como una representación del flujo calorífico ( $dq/dt$  W) versus temperatura. Una calibración adecuada utilizando un material de capacidad calorífica específica conocida, como el zafiro, permite la representación de la capacidad calorífica específica absoluta versus la temperatura.

El valor de la  $T_g$  medida depende de la escala de tiempo del ensayo, que en el caso del DSC puede variarse a través de la velocidad de calentamiento. La mayoría de las determinaciones de la  $T_g$  mediante DSC se realizan a velocidades de calentamiento entre  $10\text{-}20^\circ\text{C}/\text{min}$  y normalmente la  $T_g$  aumenta linealmente con la velocidad de calentamiento (Kalichevsky y col., 1993; Mizuno y col., 1998)

A menudo el primer calentamiento de los sistemas vítreos, en función de su  $T_g$  y su historia térmica, presenta un endotermo, debido a la relajación entálpica asociada con el envejecimiento físico de los sistemas vítreos (Lourdín y col., 2002 Farhat). Como esta relajación entálpica generalmente no es reversible en la escala de tiempo de los ensayos de DSC, la temperatura de transición vítrea se caracteriza mejor a partir de un segundo calentamiento. El uso de técnicas de DSC modulado pueden evitar este

solapamiento entre los fenómenos reversibles (como la  $T_g$ ) y los no reversibles (relajación entálpica).

### 1.6.5.3.Reología

Las propiedades mecánicas de un sistema vítreo cambian en gran manera conforme la temperatura aumenta por encima de la  $T_g$ . A continuación se indican dos posibles técnicas para la determinación de la  $T_g$ :

#### *Análisis dinamo termomecánico, DMTA:*

El análisis dinámico mecánico es una de las técnicas reológicas más comúnmente utilizadas en la determinación de la  $T_g$  de polímeros a partir del cambio en sus propiedades viscoelásticas (relajación  $\alpha$ ) (Wetton, 1986; Price, 2002). La medida de los módulos de Young elásticos y de pérdidas ( $E'$  y  $E''$  o  $G'$  y  $G''$ ) a lo largo de un intervalo de frecuencias, normalmente 0,01 y 100 Hz, puede ser llevado a cabo en diferentes modos (*bending* o flexión, tensión, cizalla, compresión), siendo el *bending* el más utilizado. La temperatura de transición vítrea se toma usualmente como la temperatura a la que empieza el descenso en el módulo elástico o, más a menudo, como la temperatura a la que se produce un pico en la tangente de pérdidas,  $\tan \delta$  ( $\tan \delta = E''/E'$ ).

Una de las principales desventajas de esta técnica es que la muestra debe tener una geometría determinada, lo que para la mayoría de los alimentos requiere un prensado y/o corte que podría interferir con cualquier información relacionada con la historia térmica.

#### *Analizador de Transición de Fases (PTA):*

Para la medida de la  $T_g$  se puede utilizar un equipo basado en un reómetro capilar de cámara cerrada, conocido como PTA (*Phase Transition Analyser*), en el que la compresibilidad de materiales en forma de polvo es medida en función de la temperatura a una presión constante. El dispositivo registra el desplazamiento del pistón que aplica la presión sobre la muestra en función de la temperatura (figura 1.6.5.3.1.). El principio de la transición vítreo-gomoso se caracteriza por un desplazamiento pronunciado conforme las partículas vítreas pasan a ser más compresibles a la temperatura  $T_g$ .

Una vez superada la  $T_g$ , y ya compactada totalmente la muestra, se cambia la base cerrada por otra con un orificio de unos 2 mm de diámetro y se continúa el calentamiento, detectándose mediante el transductor de desplazamiento el flujo de la muestra a través del orificio cuando se alcanza la denominada temperatura de flujo,  $T_f$ .

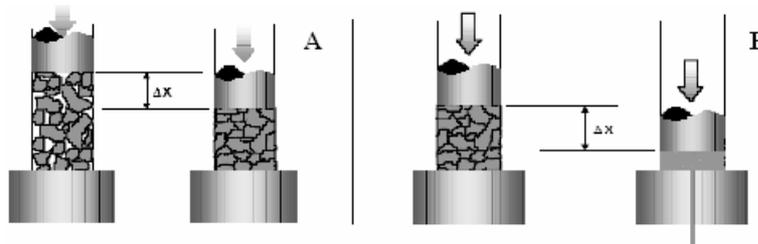


Figura 1.6.5.3.1. A) Compactación de la muestra durante la  $T_g$ ; B) Flujo durante la  $T_f$

La figura muestra un ejemplo del tipo de resultados obtenidos con el PTA: se registra el desplazamiento conforme se calienta la muestra. La  $T_g$ , indicada por el movimiento de la muestra, resulta de un ablandamiento del material y ocurre normalmente durante un intervalo de temperaturas. La  $T_g$  determinada por el PTA se corresponde con el punto medio entre el principio y el final del desplazamiento. La temperatura de flujo,  $T_f$  ( $T_m$  en la figura) indicada por el flujo de la muestra a través del orificio, es detectada por el transductor de desplazamiento (Plattner y col, 2001).

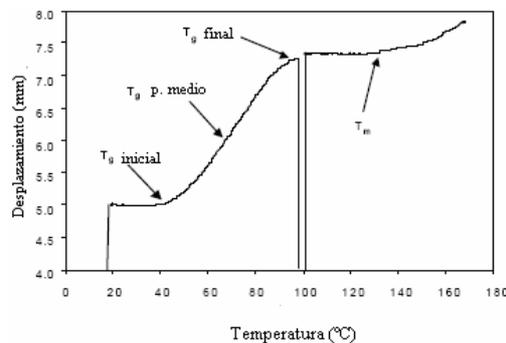


Figura 1.6.5.3.2. Resultado típico obtenido a partir del PTA

#### 1.6.5.4. Otras técnicas

Las técnicas anteriormente descritas son las más utilizadas, pero existen muchas otras técnicas que se han utilizado en el estudio de la transición vítrea, particularmente a través de su efecto sobre la relajación molecular y movilidad. Las más comunes son las basadas en medidas dieléctricas, en resonancia magnética nuclear (RMN) o en resonancia del spin del electrón (Farhat, 2004).

## 1.7. EMULSIONES

### 1.7.1. Características generales

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (normalmente, agua y aceite), uno de los cuales se encuentra disperso en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro. En la mayoría de los alimentos, los diámetros de las gotas suelen tener un orden entre 0,1 y 100  $\mu\text{m}$  (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996a, b). Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo con la distribución de las fases oleosa y acuosa. Un sistema en el que hay gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua o emulsión O/W (*Oil in Water*), como, por ejemplo, mayonesa, leche, crema, sopas o salsas. Un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como emulsión agua en aceite o emulsión W/O (*Water in Oil*), como por ejemplo, la margarina o la mantequilla. La sustancia que se encuentra en forma de gotas en la emulsión es lo que se conoce como fase dispersa o interna, mientras que la sustancia que conforma la fase en la que las gotas de esa fase interna se encuentran dispersas se denomina fase continua o externa. Además, existen emulsiones polifásicas o múltiples, llamadas así por contener la fase interna otra fase dispersa en ella (O/W/O o W/O/W).

La concentración de las gotas en una emulsión se describe usualmente en términos de fracción en volumen de la fase dispersa ( $\Phi$ ). El proceso por el cual dos líquidos inmiscibles pasan a formar una emulsión, o mediante el cual se reducen las gotas de una emulsión preexistente, se conoce como homogenización. En la industria alimentaria, este proceso se suele llevar a cabo utilizando dispositivos mecánicos denominados homogeneizadores, que someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica.

Es posible formar una emulsión por homogeneización de aceite y agua puros, pero las dos fases se separarán rápidamente, originando un sistema con dos capas, una superior de aceite (de menor densidad), y otra inferior de agua (de mayor densidad). Esto se debe a que las gotas tienden a la agregación cuando chocan entre sí, lo que conlleva a una completa separación de fases. La fuerza motora de ese proceso es el hecho de que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992), por lo que las emulsiones son sistemas *termodinámicamente inestables*. Sin embargo, es posible formar emulsiones *cinéticamente estables* (metaestables) durante un período de tiempo razonable (días,

semanas, meses o años) mediante la inclusión de sustancias conocidas como *emulsionantes y/o agentes espesantes* antes de la homogeneización. Los emulsionantes son moléculas superficialmente activas que se adsorben en la superficie de gotas recién formadas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que previene la agregación de las gotas. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas (es decir, tienen regiones polares y no polares en la misma molécula). Los emulsionantes más comunes en la industria alimentaria son proteínas anfifílicas, tensioactivos de bajo peso molecular y fosfolípidos. Los agentes espesantes son ingredientes utilizados para aumentar la viscosidad de la fase continua de la emulsión, aumentando la estabilidad al retardar el movimiento de las gotas. Los agentes espesantes más habituales en la industria alimentaria son los polisacáridos. Un estabilizante es cualquier ingrediente que puede ser utilizado para aumentar la estabilidad de una emulsión y, por tanto, puede ser ya un emulsionante o un agente espesante.

Se puede considerar la formación de una emulsión como un proceso que consta de tres etapas (Halling, 1981):

1. División de la fase interna en gotas
2. Adsorción de las moléculas de la sustancia emulsionante en la superficie interfacial recién creada
3. División de las gotas en otras más pequeñas, acompañada, en parte, de recoalescencia.

La formación de una emulsión puede ocurrir de diversas formas. Generalmente, se consigue mediante la aplicación de energía mecánica. En primer lugar la interfase debe ser deformada en una extensión tal que permita la formación de las gotas. Estas gotas son por lo general demasiado grandes, por lo que deben ser rotas en otras más pequeñas. Los dos pasos críticos en la emulsificación son la ruptura de gotas y su coalescencia, ambas favorecidas por una intensa agitación (Walstra y Smulders, 1997).

### **1.7.2. Principios físicos de la emulsificación**

El tamaño de las gotas producidas durante la emulsificación depende de un balance entre dos procesos físicos opuestos: ruptura y coalescencia de gotas. Durante el proceso de homogeneización, en las primeras etapas, se producen gotas de gran tamaño. Posteriormente, estas gotas se dividen en otras menores. La ruptura de las gotas está

determinada por un balance entre fuerzas interfaciales, que tienden a mantener a todas las gotas unidas, y las fuerzas de ruptura generadas en el homogeneizador, que tienden a mantenerlas separadas (Walstra, 1993).

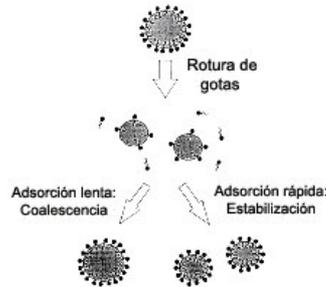


Figura 1.7.2.1. Balance entre rotura y coalescencia de gotas durante la emulsificación

Las gotas de una emulsión tienden a ser esféricas, debido a que esta forma minimiza el contacto, energéticamente desfavorable, entre las dos fases (Hunter, 1986; Everett, 1988). Tanto cambiar la forma de las gotas, como dividir las en otras más pequeñas, incrementa esta área de contacto, por lo que requiere la aplicación de energía. La fuerza interfacial responsable de mantener la gota con una forma esférica se debe a la Presión de Laplace ( $\Delta P_L$ ), que actúa a través de la interfase, hacia el centro de la gota, de manera que existe mayor presión dentro de la gota que fuera. Esta presión se define con la siguiente expresión:

$$\Delta P_L = \frac{4\gamma}{d} \quad (1.7.2.1.)$$

donde  $\gamma$  es la tensión interfacial entre el aceite y el agua y  $d$  es el diámetro de la gota.

Para romper una gota durante la emulsificación, es necesario aplicar una fuerza externa que sea significativamente superior a la fuerza interfacial (Walstra, 1996a) y que se prolongue el tiempo necesario para deformar y producir la ruptura (Stone, 1994; Karbsteins y Schubert, 1995).

Las fuerzas de ruptura que actúan sobre una gota durante la emulsificación dependen de las condiciones de flujo durante el proceso y del tipo de homogeneizador usado (Phipps, 1985; Walstra, 1993).

El perfil de flujo de una emulsión dentro de un homogeneizador es generalmente extremadamente complejo y, por lo tanto, difícil de modelizar matemáticamente

(Phipps, 1985). Es por este motivo que no es fácil calcular con precisión las fuerzas de ruptura que una gota experimenta durante la emulsificación. Sin embargo, es posible efectuar una simplificación considerando condiciones de flujo simples similares a aquellas que se producen en el emulsificador (Gopal, 1968; Walstra, 1983,1993; Williams y col., 1997).

La susceptibilidad de las gotas de la emulsión a la ruptura se caracteriza por el número de Weber ( $We$ ) que corresponde al cociente entre las fuerzas de ruptura y las fuerzas interfaciales (Walstra, 1983). Las gotas se rompen cuando el número de Weber excede un valor crítico (alrededor de la unidad) que depende de las características físicas de ambas fases.

### 1.7.3. Variables influyentes en la emulsificación

Para analizar el efecto de las variables sobre la emulsificación se puede realizar un control sobre una serie de parámetros clave, que determinen las propiedades de las emulsiones; entre ellos, se consideran el tamaño y la distribución de tamaños de gota de la emulsión resultante y sus propiedades reológicas (Halling, 1981).

Las principales variables relacionadas con el proceso de emulsificación son:

1. *Tipo y geometría del emulsificador.* Existen numerosos tipos de emulsificadores, cada uno más adecuado para una serie de aplicaciones y un rango de sistemas determinados, en función, principalmente de la viscosidad de ambas fases. El tipo de emulsificador empleado determina principalmente el tamaño y distribución de tamaños de gota de las emulsiones (McClements, 1999).

Por otra parte, la geometría de las turbinas o agitadores, afecta a la eficiencia n la ruptura de las gotas de aceite durante la emulsificación (Sánchez y col., 1998).

2. *Concentración y tipo de emulsionante.* La presencia de emulsionantes en el medio durante el proceso de emulsificación, favorece la ruptura de las gotas y conduce, generalmente, a un descenso del tamaño de gota de las emulsiones, ya que hace descender la tensión interfacial y previene la recoalescencia de las gotas. Estos fenómenos están determinados por las características y el tipo de emulsionante empleado.

La efectividad de un emulsionante en reducir el tamaño de gota, está determinada fundamentalmente por dos propiedades: su velocidad de adsorción en la interfase (Schubert y Armbruster, 1992) y la resistencia a la coalescencia de la capa

interfacial que forma, que depende de sus propiedades estructurales y físico-químicas (Walstra, 1983; McClements, 1999). Por otra parte, el proceso de adsorción en la interfase consta de dos etapas: difusión en el medio continuo y adsorción. Cada una de estas etapas está gobernada por una cinética distinta (Dagorn-Scaviner y col., 1987).

*3. Propiedades y composición de ambas fases.* La composición y las propiedades físico-químicas de las fases acuosa y oleosa influyen en el tamaño de gota obtenido durante la emulsificación (Phipps, 1985). Modificaciones en el tipo de aceite o de fase acuosa alteran la relación de viscosidades entre las fases dispersa y continua, de la que depende el tamaño mínimo de gota que se puede alcanzar en condiciones estacionarias con unas condiciones dadas (Braginsky y Belevitzkaya, 1996). Además, las propiedades reológicas de ambas fases juegan un papel decisivo en los mecanismos de flujo implicados durante la emulsificación, así como en la facilidad con que las gotas se rompen como consecuencia de una deformación aplicada por el emulsificador (McClements, 1999). Por otra parte, la tensión interfacial depende tanto del tipo de aceite, ya que éste puede contener diferentes tipos de impurezas superficialmente activas o diferente estructura molecular, como de la composición de la fase acuosa, que puede contener una amplia variedad de componentes, como minerales, ácidos, bases, azúcares, sales, burbujas de gas,... (Walstra, 1983; Banks y Muir, 1988).

*4. Fracción en volumen de fase dispersa.* Lógicamente, una gran fracción de fase dispersa necesita más energía para reducir el tamaño de gota, pero aunque este parámetro ejerce cierta influencia en el proceso de emulsificación y en la propiedades de la emulsión formada, el parámetro que influye más significativamente en éstos es la relación entre la concentración de emulsionante y la fracción en volumen de fase dispersa (Djakovic y Dokic, 1977; Halling, 1981).

*5. Energía aplicada.* En general, un aumento de la energía aplicada al sistema, produce un descenso del tamaño de gota, asociado con un aumento de la viscosidad de la emulsión y de sus propiedades viscoelásticas, lo que se traduce en una mayor estabilidad (Halling, 1981; Franco y col., 1995a, 1995b).

Sin embargo existen ocasiones en que un incremento de la energía aplicada sobre un valor crítico, puede producir el efecto contrario, debido a un excesivo calentamiento o exposición del sistema a elevadas presiones. Este hecho es particularmente relevante en el caso de emulsiones estabilizadas por proteínas y por

tensoactivos de bajo peso molecular que tienden a formar una estructura tipo gel en el medio continuo, en los que una agitación excesiva puede conducir a una destrucción de la estructura (Gallegos y col., 1996).

Por otra parte, al incrementar excesivamente la energía de emulsificación, se favorece en mayor grado el proceso de coalescencia que tiene lugar durante la emulsificación, simultáneamente a la ruptura de gotas (Franco y col., 1995b, 1998).

6. *Temperatura de emulsificación.* La temperatura influye en el proceso de emulsificación de diferentes formas. En principio, el uso de elevadas temperaturas genera tamaños de gota menores al aumentar la solubilidad del emulsionante y provocar una reducción en la tensión interfacial, aunque también puede producir el efecto contrario, ya que puede favorecer la recoalescencia de gotas ya formadas (Sánchez y col., 2000), favorecida por una disminución de la viscosidad de ambas fases (Gallegos y col., 1996) y un aumento de la movilidad de las gotas.

Por otra parte, en el caso de emulsiones estabilizadas mediante proteínas, un aumento de la temperatura afecta a la hidrofobicidad de éstas, induciendo un cierto grado de desnaturalización, favoreciendo consecuentemente la formación de interacciones entre gotas y mejorando las propiedades reológicas de las emulsiones (Franco y col., 1998).

7. *Tiempo de emulsificación.* Un aumento de la duración de la emulsificación en operaciones discontinuas, o del número de recirculaciones, en operaciones continuas, provoca un descenso del tamaño de gota, así como de la polidispersión de la distribución (Franco y col., 1995b), pero la velocidad con que esto ocurre desciende rápidamente. Esto es debido a que bajo unas determinadas condiciones de emulsificación, existe un cierto tamaño de gota que no puede reducirse, por lo que prolongar la emulsificación más tiempo, además de costoso, puede resultar ineficaz, ya que la película interfacial puede deteriorarse, provocando un descenso en la estabilidad de la emulsión recién formada. Además, un tiempo de emulsificación excesivo puede conducir a un calentamiento de la emulsión, provocando los efectos comentados en el anterior apartado.

8. *Protocolo de preparación.* La forma de añadir las fases y el emulsionante influyen en el proceso de emulsificación (Hall y Dawson, 1940). Así, algunos autores han demostrado que es posible emulsificar más cantidad de aceite si el mezclado se efectúa

de forma intermitente que si se realiza en continuo. Añadiendo lentamente esta fase, también se consiguen mejores resultados (Robinson, 1924).

Por tanto, la optimización del proceso de emulsificación debería realizarse en tres etapas. En primer lugar, la selección del equipo, el cual determina el mecanismo de ruptura de gotas. En segundo lugar, la elección de un emulsionante adecuado y en concentración óptima y, finalmente, optimización de las condiciones de procesado, tales como tiempo de residencia, velocidad de agitación o temperatura.

#### **1.7.4. Tipos de homogeneizadores**

Existen diferentes tipos de dispositivos de homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. Cada uno de estos dispositivos tiene sus propias ventajas y desventajas, y es más apropiado para uno u otro tipo de material. La elección de un homogeneizador particular depende de si la emulsión está siendo hecha a escala industrial o de laboratorio, del equipo disponible, del volumen de material a homogeneizar, la naturaleza de los materiales de partida, la distribución de tamaños de gota deseada, las propiedades físico-químicas requeridas del producto final, y el coste de la compra y el mantenimiento del equipo.

A continuación, se muestran los emulsificadores más empleados en la actualidad en la industria alimentaria:

##### *1. Mezcladores simples y agitadores*

Los líquidos a homogeneizar se sitúan en un recipiente adecuado, provisto de un agitador que rota a alta velocidad (típicamente de 20 a 2000 rpm).

Una rápida rotación del agitador genera una combinación de gradiente de velocidad longitudinal, rotacional y radial en los líquidos, que rompe la interfase, favorece que los líquidos se mezclen y divide las gotas formadas en otras menores (Fellows, 1988). En el mercado se encuentran disponibles un gran número de diferentes tipos para diferentes situaciones (paletas, hélices, turbinas,...).

En general estos homogeneizadores se emplean normalmente como premezcladores, puesto que producen emulsiones relativamente groseras, que a continuación se llevarían a otro dispositivo más efectivo. Sin embargo, son comunes a escala de laboratorio.

## 2. Molinos coloidales

Los molinos coloidales se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para homogeneizar líquidos de viscosidad media a alta.

Generalmente se utilizan para reducir el tamaño de gota de una emulsión ya formada, mediante agitación intensa a elevadas velocidades. La emulsión se alimenta al molino y fluye a través de un estrecho hueco a través de dos discos: un disco rotatorio (rotor) y otro estático (estator). La rápida rotación del rotor genera un esfuerzo de cizalla que provoca la ruptura de las gotas en otras de menor tamaño.

La intensidad del esfuerzo de cizalla se puede variar alterando el espesor del hueco entre el rotor y el estator, la velocidad de rotación o utilizando superficies rugosas o dentadas (Gopal, 1968).

## 3. Homogeneizadores de alta presión

Como los molinos coloidales, son más efectivos reduciendo el tamaño de las gotas de una emulsión ya formada que creando una emulsión directamente a partir de dos líquidos separados (Pandolfe, 1991, 1995).

Estos homogeneizadores disponen de una bomba que suministra la presión requerida y una válvula especial provista de un resorte que constituye un orificio por el que se hace pasar la mezcla a elevada presión (10-40 MPa) (Rees, 1967).

Al atravesar la válvula, la emulsión inicial experimenta una combinación de intensa cizalla y condiciones de flujo cavitacional y turbulento que provoca la ruptura de las gotas de gran tamaño en otras menores (Phipps, 1985). Para ello, se ha diseñado una gran variedad de válvulas para diferentes aplicaciones.

Algunos dispositivos comerciales emplean un proceso en dos etapas, donde la emulsión se hace pasar a través de dos válvulas consecutivas. Se utilizan ampliamente en planta piloto y a escala industrial pero rara vez en laboratorio y normalmente con sustancias poco viscosas ( $< 0,2 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ) (Rees, 1967).

## 4. Homogeneizadores ultrasónicos

Este tipo de emulsificadores emplea ondas ultrasónicas de elevada energía que genera intensos gradientes de cizalla y presión dentro del material, lo que hace que las gotas se rompan, debido principalmente a efectos cavitacionales.

Existen diferentes formas de generar ondas ultrasónicas: sistemas mecánicos, osciladores magnetostrictivos y osciladores de cristal piezoeléctrico. Generalmente, sólo se utilizan los sistemas mecánicos para generar emulsiones. Se usan frecuentemente en

estudios de laboratorio pero los resultados son poco reproducibles a escala superior (Walstra, 1983).

#### 5. Inyectores.

En estos dispositivos, la fase interna se inyecta directamente en la fase continua a través de un orificio cilíndrico donde se rompen las gotas (Richardson, 1950). Existen dos variantes: inyección a presión o sin ella. Se suelen emplear a escala de laboratorio.

En este caso, el tamaño y la distribución de tamaños de gota dependen de la velocidad de inyección, del tamaño y el diseño de la boquilla dispersante, de la viscosidad de ambas fases y de la tensión interfacial.

#### **1.7.5. Estabilidad de emulsiones**

El término “estabilidad de una emulsión” se refiere a la capacidad de una emulsión a resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo: cuanto más estable es una emulsión, menos cambian sus propiedades con el paso del tiempo. Una emulsión puede desestabilizarse a través de diferentes tipos de procesos físico-químicos, La desestabilización física resulta en una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas, como el cremado, la floculación, la coalescencia, la inversión de fases o la maduración de Ostwald; mientras que la oxidación o la hidrólisis son ejemplos comunes de desestabilización química.

Para que una emulsión sea cinéticamente estable debe tener una energía de activación significativamente mayor que la energía térmica del sistema ( $\kappa T$ ).

Anteriormente se comentó que si agua y aceite puros fueran agitados conjuntamente, una emulsión se formaría temporalmente, volviendo rápidamente a formarse dos fases separadas. Esto se debe a que la energía de activación entre el estado emulsionado y el estado no emulsionado es muy pequeña. Por lo que para crear una emulsión cinéticamente estable durante un período de tiempo razonablemente largo, es necesaria la presencia de un emulsionante o un agente espesante que origine una energía de activación suficientemente grande para prevenir la desestabilización. Por tanto, el papel que juegan los emulsionantes y los espesantes en la estabilidad de una emulsión es de gran importancia.

### 1.7.5.1. Fuerzas que actúan entre las partículas

- a) *Movimiento Browniano*. Este término hace referencia a un movimiento traslacional y rotacional caótico, provocado por la agitación térmica, inherente a las partículas. Conduce a una distribución al azar de las partículas y puede originar choques entre ellas, debido a los sucesivos acercamientos y alejamientos que desencadena.
- b) *Fuerzas gravitacionales*. Debido a la diferencia de densidad entre ambas fases y mediante la acción de fuerzas gravitacionales, se produce un movimiento ascendente de la fase de menor densidad, generándose un gradiente de concentración de esta fase a lo largo de la muestra, lo que provoca finalmente la ruptura de la emulsión mediante un proceso de desestabilización que se conoce como “cremado”.
- c) *Fuerzas hidrodinámicas*. Para que dos gotas vecinas se acerquen y se unan, deben superar la resistencia del fluido que las rodea, ya que éste debe excluirse del hueco entre las gotas, venciendo la fricción con la superficie de éstas, lo que hace que el coeficiente de difusión efectivo de las gotas por el medio continuo sea menor (Davis y col., 1989).
- d) *Interacciones de van der Waals*. Las interacciones intermoleculares de van der Waals tienen su origen en la atracción entre moléculas que han sido polarizadas electrónicamente o por orientación. Además de actuar entre moléculas individuales, éstas también puedan actuar entre cuerpos macroscópicos, que contengan un gran número de moléculas, tales como gotas de una emulsión (Hiemenz, 1986).
- e) *Interacciones hidrofóbicas*. Las interacciones hidrofóbicas se manifiestan cuando la superficie de las gotas tiene un cierto grado de carácter no polar, ya sea porque no estén cubiertas totalmente por emulsionante o porque el emulsionante tenga algunas zonas no polares expuestas en la fase acuosa. Consecuentemente, debido a que la interacción entre sustancias no polares y el agua es termodinámicamente desfavorable, el sistema intenta minimizar esta área de contacto mediante la agregación de gotas (Israelachvili y Wennerstrom, 1996; Alaimo y Kumonsinski, 1997).
- f) *Fuerzas electrostáticas interparticulares*. Las gotas de muchas emulsiones tienen superficies cargadas eléctricamente, debido a la adsorción de emulsionantes iónicos o que son susceptibles de ser ionizados (proteínas, polisacáridos o tensioactivos). Las partículas también pueden adquirir carga eléctrica por la adsorción en la interfase de pequeños iones o por fricción (Alexander y Johnson, 1949).

Normalmente, todas las gotas están estabilizadas por el mismo tipo de emulsionante, por lo que tienen la misma carga eléctrica. Consecuentemente, las interacciones electrostáticas entre gotas son repulsivas, por lo que juegan un papel

importante en la prevención del acercamiento de gotas y la desestabilización de las emulsiones.

Helmholtz (1879) introdujo el concepto de doble capa eléctrica, suponiendo que la carga en las partículas de un coloide se debía a una distribución desigual de los iones en la interfase partícula-agua. Si la partícula posee carga, los iones de carga opuesta existentes en un medio polar se alinean paralelamente formando una doble capa de cargas (figura 1.7.5.1.1.a.).

Gouy y Chapman (Gouy, 1909, 1910; Chapman, 1913) propusieron que la doble capa, debido a la movilidad de los iones es difusa (figura 1.7.5.1.1.b.), es decir que la capa iónica exterior posee una densidad eléctrica de forma que el potencial decrece exponencialmente con la distancia:

$$\Psi = \Psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (1.7.5.1.1.)$$

donde  $\psi_0$  es el potencial en la superficie y  $\kappa$  es el recíproco de la distancia desde la gota a un plano que contiene la mayor parte de la carga, de forma que el  $1/\kappa$  se puede considerar como el espesor de la doble capa difusa. El parámetro  $\kappa$  viene dado por la siguiente expresión:

$$\kappa = \sqrt{\frac{4\pi e^2 \sum n_i z_i^2}{\epsilon K T}} \quad (1.7.5.1.2.)$$

donde  $n_i$  es el número de especies con carga  $z_i$  por centímetro cúbico de disolución,  $T$  es la temperatura absoluta,  $K$ , la constante de Boltzmann,  $e$ , la carga elemental y  $\epsilon$ , la constante dieléctrica del medio.

Finalmente, Stern (1924) propuso un modelo en el que la doble capa está dividida en dos zonas, una de espesor aproximadamente igual al de un ión, que permanece fija a la superficie interfacial donde hay, por tanto, una caída marcada de potencial y una segunda difusa que se extiende hasta una cierta distancia, con un descenso gradual de potencial hacia la masa del fluido (figura 1.7.5.1.1.c.).

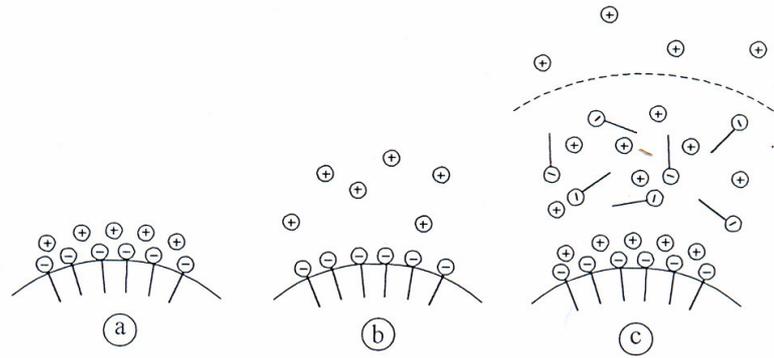


Figura 1.7.5.1.1. Representación de la doble capa eléctrica según (a) Helmholtz, (b) Gouy y Chapman, (c) Stern

### Teoría DLVO

La aproximación clásica para la descripción de las interacciones entre las gotas de una emulsión estabilizadas por su carga corresponde a la teoría DLVO, llamada así por los cuatro científicos que la propusieron: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (Hiemenz, 1986; Hunter, 1986; Derjaguin y col., 1987; Derjaguin, 1989). Esta teoría asume que la interacción global entre un par de gotas de una emulsión es el resultado de las interacciones atractivas de van der Waals y las interacciones repulsivas electrostáticas:

$$w(h) = w_{VDW}(h) + w_{\text{electrostáticas}}(h) \quad (1.7.5.1.3.)$$

Hamaker (1937) fue el primero en describir la energía potencial de atracción,  $w_{VDW}(h)$ , entre dos esferas de igual radio  $r$  separadas una distancia  $h$ , asumiendo que las fuerzas atractivas podrían computarse mediante la adición de las fuerzas de dispersión entre las moléculas de cada partícula:

$$w_{VDW}(h) = \frac{-A_{121}}{6} \left[ \left( \frac{2r^2}{h^2 + 4rh} \right) + \left( \frac{2r^2}{h^2 + 4rh + 4r^2} \right) + \ln \left( \frac{h^2 + 4rh}{h^2 + 4rh + 4r^2} \right) \right] \quad (1.7.5.1.4.)$$

donde  $A_{121}$  es la función de Hamaker para las gotas de emulsión (medio 1) separadas por un líquido (medio 2). El valor de la constante de Hamaker puede calcularse usando métodos matemático distintos, uno microscópico y otro macroscópico (Mahanty y

Ninham, 1976). Cuando las gotas se encuentran muy cerca ( $h \ll r$ ), la ecuación anterior puede ser simplificada considerablemente:

$$w_{VDW}(h) = \frac{-A_{121}r}{12h} \quad (1.7.5.1.5)$$

La constante de Hamaker depende de la naturaleza del medio continuo y de las partículas, fundamentalmente del número de átomos por unidad de volumen y de la polarizabilidad.

Normalmente, la energía atractiva calculada de esta forma está sobreestimada, fundamentalmente a largas distancias, debido al tiempo necesario para la propagación de la radiación electromagnética, resultando un debilitamiento de  $w_{VDW}(h)$ , conocido como efecto de retardación (Schenkel y Kitchener, 1960).

Análogamente, Hogg y col., (1966) propusieron la siguiente expresión analítica para el potencial de repulsión electrostático entre dos esferas del mismo radio:

$$w_{electrostático}(h) = \frac{\epsilon r_1 r_2}{4(r_1 + r_2)} \left[ 2\psi_{01}\psi_{02} \ln \frac{1+e^{-Kx}}{1-e^{-Kx}} + (\psi_{01}^2 + \psi_{02}^2) \ln(1-e^{-Kx}) \right] \quad (1.7.5.1.6)$$

donde  $K = \kappa(r_1+r_2)/2$  es el recíproco del espesor de la doble capa de Debye-Hückel,  $\epsilon$ , la constante dieléctrica del medio y  $\psi_{0i}$ , el potencial superficial de una esfera de radio  $r_i$ . La dependencia de estos potenciales con la distancia entre dos gotas se esquematiza en la figura 1.7.5.1.2..

Como se ilustra en esta figura, el potencial de interacción de van der Waals es siempre negativo, a todas las distancias, ya que se trata de una fuerza de tipo atractivo, mientras que el potencial de interacción electrostática siempre es positivo.

El potencial global exhibe un comportamiento más complejo, debido a que es la suma de dos interacciones opuestas, y puede ser atractiva a unas distancias y repulsivas a otras.

Cuando las gotas se encuentran separadas a una elevada distancia, no existe interacción efectiva entre ellas.

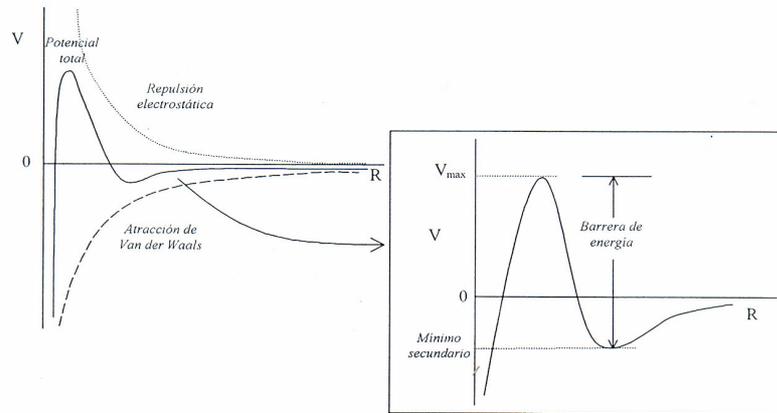


Figura 1.7.5.1.2.. Evolución del potencial entre gotas, de una emulsión donde las fuerzas dominantes son las atracciones de van der Waals y las repulsiones electrostáticas

Al disminuir progresivamente la distancia entre ellas, la atracción de van der Waals domina inicialmente y aparece un mínimo en el perfil del potencial, que se conoce como mínimo secundario. Si este mínimo es suficientemente pronunciado como para superar la energía térmica ( $V \gg KT$ ), las gotas flocculan formando agregados relativamente débiles. Estas partículas flocculadas pueden redispersarse fácilmente por medios mecánicos o por el reajuste de la concentración de electrolito, ya que en este caso la flocculación es reversible.

A una separación menor entre las gotas, las interacciones electrostáticas repulsivas dominan y aparece un máximo de potencial ( $V_{\max}$ ) que las gotas deben superar para acercarse aún más.

La magnitud de este máximo de potencial constituye la barrera energética para la coalescencia. Si ésta es pronunciada ni la energía cinética suministrada a las gotas ni el movimiento Browniano provocan la coalescencia. Si, por el contrario, es inferior a  $KT$ , el movimiento Browniano puede causar la unión de las gotas.

Si el máximo de potencial no es lo suficientemente elevado ( $V_{\max} \gg KT$ ) las gotas caen en otro mínimo de potencial, que se conoce como mínimo primario, aunque éste no es un mínimo en el sentido matemático de la palabra, puesto que  $dV/dR \rightarrow \infty$  cuando  $R \rightarrow 0$ . Cuando dos partículas se acercan lo suficiente para caer en el mínimo primario de potencial se produce una flocculación irreversible, dando lugar a la coalescencia.

La magnitud de  $V_{\max}$  es fácilmente modificable mediante la fuerza iónica; una fuerza iónica baja se corresponde con un potencial de barrera elevado y un mínimo secundario inexistente, por lo que la emulsión es estable (Cheng, 1987). Por el contrario, una fuerza iónica elevada da lugar a una inestabilidad por coalescencia ya que prácticamente no existe barrera energética. Por este motivo, muchas emulsiones estabilizadas electrostáticamente experimentan una pronunciada agregación de gotas cuando se añade sal a la fase acuosa (Hunt y Dalglish, 1994, 1995; Demetriades y col., 1997).

Por otra parte, la carga eléctrica de muchos emulsionantes depende del pH de la fase acuosa. Por ejemplo, la carga de gotas estabilizadas por proteínas, desciende al acercarse el pH a su punto isoeléctrico, lo que reduce la magnitud de las repulsiones electrostáticas. Este hecho justifica la tendencia de gotas de emulsiones estabilizadas mediante proteínas, a agregarse cuando el pH se ajusta cerca del punto isoeléctrico de las proteínas (Demetriades y col., 1997).

g) *Interacciones estéricas*. Las emulsiones pueden estabilizarse, además de mediante repulsiones electrostáticas entre las capas de emulsionante que rodean a las gotas, como se describe en el apartado anterior, mediante moléculas de emulsionante no cargadas superficialmente (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson y col., 1992).

Éste es el caso de emulsiones que contienen moléculas de naturaleza polimérica adsorbidas en la interfase, en las que las interacciones estéricas modifican la cinética de floculación (Heller y Pugh, 1954; Hirtzel y Rajagopalan, 1985).

Muchos de los emulsionantes empleados en la industria alimentaria son de naturaleza polimérica: las proteínas son polímeros de aminoácidos, los polisacáridos son polímeros de azúcares, muchos emulsionantes no iónicos tienen grupos polares que son polímeros de oxietileno..., por lo que las interacciones estéricas constituye un mecanismo de estabilización de emulsiones muy común.

La conformación de un emulsionante polimérico en la interfase depende del número, tipo y secuencia de monómeros en su cadena. En general, el emulsionante tiende a adoptar la conformación interfacial que minimiza la energía libre del sistema, que, en la práctica, está dominada por efectos hidrofóbicos (Damodaran, 1989). De esta forma, las pequeñas moléculas de emulsionante se disponen de forma que las cadenas hidrocarbonadas se introducen en la fase orgánica, orientando los grupos hidrofílicos hacia la fase acuosa.

Los polímeros flexibles forman segmentos situados paralelamente a la superficie interfacial y ciclos y colas perpendiculares a dicha superficie (Lyklema, 1968). Estas estructuras dotan a la gota de mayor estabilidad debido a que cuando las gotas se aproximan, la movilidad de las cadenas poliméricas se restringe, disminuyendo la entropía del sistema que tiende a oponerse mediante repulsión entre las gotas (figura 1.7.5.1.3.).

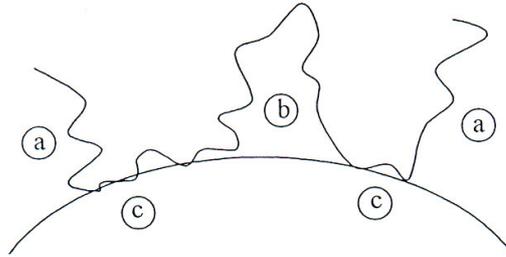


Figura 1.7.5.1.3. Disposición de los polímeros en la interfase: (a) colas, (b) ciclos, (c) cadenas

Finalmente, los polímeros compactos, como las proteínas globulares, inmediatamente después de la adsorción, tienden a adoptar una orientación que maximiza el contacto entre sus grupos hidrofóbicos y la fase orgánica (Damodaran, 1989; Dickinson y McClements, 1995; Dalgleish, 1996), modificando su conformación.

La presencia de moléculas de naturaleza polimérica adsorbidas en la superficie de las gotas afecta significativamente al potencial total de interacción, por lo que la energía potencial total calculada a partir de la teoría DLVO, debe modificarse incluyendo un tercer sumando que represente las interacciones estéricas

Las interacciones estéricas surgen cuando las gotas se acercan hasta el punto en que sus capas de emulsionante se superponen. Este tipo de interacción está dividida en dos contribuciones aditivas (Hiemenz, 1986; Hunter, 1986):

$$W_{\text{estéricas}} = W_{\text{elásticas}} + W_{\text{mezcla}} \quad (1.7.5.1.7.)$$

El primer término, el término elástico, tiene su origen en la comprensión de la capa superficial que se produce cuando dos gotas entran en contacto (figura 1.7.5.1.4.). La segunda contribución surge de la interpenetración de las cadenas poliméricas de dos gotas vecinas y se representa por el término de mezcla,  $W_{\text{mezcla}}$ .

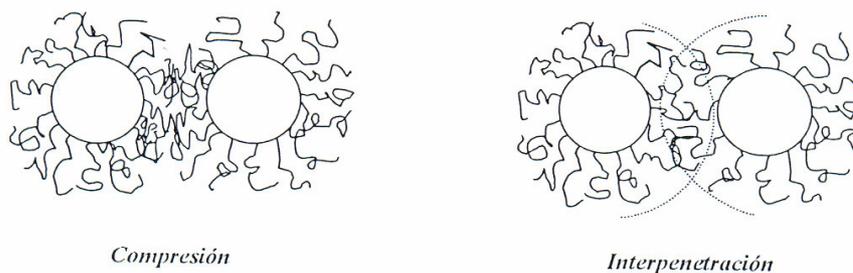


Figura 1.7.5.1.4.. Distintas formas de estabilización estérica por polímeros

Al disminuir progresivamente la distancia entre las gotas, el término que participa en primer lugar es el término de mezcla, ya que en este caso las gotas están lo suficientemente cerca como para que penetren unas capas de polímero en otras, pero sin que existe compresión de éstas. Las interacciones de mezcla pueden ser atractivas o repulsivas, dependiendo de la naturaleza del medio continuo y de la temperatura (Napper, 1977).

En cambio, las interacciones elásticas siempre son repulsivas. Por este motivo, al disminuir la distancia entre las gotas hasta el punto en que ambas componentes intervienen, la interacción total siempre es repulsiva (McClements, 1999).

Además, la presencia de macromoléculas en la interfase modifica el término de energía potencial relativo a las repulsiones electrostáticas,  $V_R$ , al producirse una redistribución de iones alrededor de las gotas y un aumento del espesor de la capa superficial (Tadros y Vincent, 1983). Por otra parte, las interacciones atractivas de van der Waals también aumentan a medida que aumenta el espesor de la doble capa.

Las condiciones necesarias para que la estabilización estérica sea efectiva se pueden resumir en tres puntos (Tadros y Vincent, 1983):

1. Recubrimiento total de la superficie de la partícula por el polímero. Si la concentración de polímero es insuficiente, un mismo polímero puede adsorberse a la superficie de dos gotas distintas, formando un puente que hace que las gotas floculen (Dickinson, 1989). Además, algunas de las regiones no polares quedarían expuestas a la fase acuosa, lo que conduciría a interacciones hidrofóbicas entre las gotas.

2. El polímero debe estar adsorbida a la partícula, pero con una serie de fragmentos en el seno de la fase continua, de forma que se consiga un espesor de película importante.
3. Los segmentos que sobresalen deben tener afinidad por la fase continua

### **1.7.5.2. Mecanismos de desestabilización**

#### **1.7.5.2.1. Separación Gravitacional**

En general, las gotas de una emulsión tienen diferente densidad que el líquido que actúa como fase continua, por lo que existe una fuerza gravitacional neta sobre las mismas. Si las gotas tienen menor densidad que la fase continua, tendrán tendencia a ascender. Este proceso, conocido como *cremado*, ocurre en las emulsiones O/W.

De forma contraria, si las gotas tienen mayor densidad que la fase continua, tienden a descender, conociéndose el proceso como *sedimentación*. Éste es el caso de las emulsiones W/O.

Normalmente, la separación gravitacional se considera con un efecto adverso sobre la calidad de las emulsiones alimentarias, puesto que influye sobre la opacidad o la textura de las mismas.

La velocidad a la que una partícula se eleva o desciende a lo largo de un líquido está determinada por el balance de fuerzas que actúan sobre ésta. Existen diferentes métodos para controlar la separación gravitacional: minimizar la diferencia de densidades, reducir el tamaño de gota, modificar la reología de la fase continua, aumentar la concentración de gotas o alterar el grado de floculación.

#### **1.7.5.2.2. Floculación**

La floculación es el proceso por el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado, en el que las gotas retienen su integridad individual. La floculación produce un aumento en la viscosidad de la emulsión y puede incluso conducir a la formación de un gel.

Existen varios mecanismos que pueden provocar el encuentro de dos partículas: el movimiento browniano, la separación gravitacional (puesto que las gotas grandes se encuentran a las pequeñas, con menor velocidad de ascensión, durante el proceso de cremado) y esfuerzos de cizalla que se producen durante el flujo de la emulsión durante su procesado o su transporte (Melik y Fogler, 1988; McClements, 1999).

La floculación de gotas puede afectar a la estabilidad de una emulsión de diferentes formas (Dickinson 1988a). En una emulsión diluida, la floculación conduce generalmente a un aumento del cremado, ya que los flóculos grandes se mueven más rápidamente bajo la influencia de la gravedad, que gotas dispersas individuales. En una emulsión concentrada, se puede producir una floculación extensiva de gotas, formando una red particular tipo gel débil, que puede eliminar el cremado por completo (Cao y col.,1990). Sin embargo, en este caso, es posible que se produzca el proceso de sinéresis, que en algunos productos alimentarios es incluso más indeseable que el cremado normal por gravedad (Dickinson,1989).

A concentraciones intermedias, son posibles ambas situaciones, dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre las gotas.

La floculación se puede inducir de diferentes formas (Dickinson, 1989):

1. En el caso de emulsiones estabilizadas mediante proteínas, ajustando el pH hasta su punto isoeléctrico, lo que disminuye la carga superficial neta y reduce la repulsión electrostática entre las gotas
2. Añadiendo exceso de electrolito, con el objeto de apantallar las repulsiones electrostáticas
3. En emulsiones estabilizadas por proteínas, reduciendo la afinidad de la proteína adsorbida por el medio continuo añadiendo, por ejemplo, alcohol, lo que convierte la repulsión estérica en atracción estérica
4. Mediante moléculas de polímeros con actividad superficial, que se adsorben en la interfase y favorecen la floculación por puentes entre dos o más gotas (Dickinson y col., 1989; Lips y col., 1991). Puede tratarse del mismo emulsionante o de otra sustancia añadida. Estas moléculas pueden adsorberse, tanto directamente a las superficies libres de las gotas, cuando la cantidad de emulsionante es insuficiente (Mulder y Walstra, 1974), como a las moléculas de emulsionantes adsorbidas que forman la película interfacial (Walstra, 1996b), cuando éste se encuentra en exceso. El resultado es una emulsión altamente estructurada tipo gel, con un comportamiento reológico con un marcado carácter elástico y una elevada viscosidad
5. En el caso de emulsiones estabilizadas por proteínas, este fenómeno se puede reforzar favoreciendo la desnaturalización de la proteína, por calentamiento (desnaturalización térmica)(Dickinson y Casanova, 1999) o mediante

hidrólisis enzimática (Matsumura y col., 1993; Dickinson y Yamamoto, 1996).

6. Añadiendo moléculas de polímeros que no se adsorben en la interfase, tales como polisacáridos neutros, para provocar floculación por agotamiento o “depletion” (Banks y Muir, 1988). Estos polisacáridos de elevado peso molecular, se usan generalmente como estabilizantes, elevando la viscosidad del medio continuo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la adición de polímeros solubles en agua determinadas concentraciones puede desestabilizar a la emulsión, acelerando la velocidad de cremado por un valor superior al que se podría predecir, en función de la viscosidad del medio continuo (Gunning y col., 1986; Hibbert y col., 1987; McClements, 2000).

Este fenómeno tiene su origen en la exclusión de partículas coloidales de la estrecha región que rodea a las gotas. La concentración de partículas coloidales en esta zona pasa a ser cero, concentrándose en la zona exterior a las gotas. Como consecuencia, existe una diferencia de presión osmótica que favorece el movimiento del disolvente de esta zona al medio continuo para compensar el gradiente de concentración. Por lo tanto, las gotas experimentan una fuerza de atracción que conduce a la agregación (Dickinson, 1989; McClements, 1999).

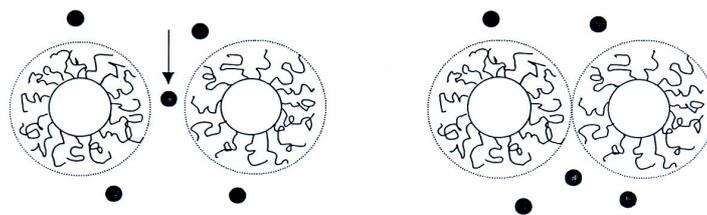


Figura 1.7.5.2.2.1. Mecanismo de floculación por agotamiento

Además de polisacáridos, el mismo emulsionante puede actuar como agente precursor de floculación por agotamiento, cuando se encuentra en exceso.

### 1.7.5.2.3. Coalescencia

La coalescencia es el proceso irreversible por el cual dos o más gotas de líquido se unen entre sí para formar una única gota de mayor tamaño. Es el principal

mecanismo por el que una emulsión se mueve hacia su estado más estable termodinámicamente, porque lleva consigo una disminución del área de contacto entre las fases acuosa y oleosa. La coalescencia hace que las gotas de una emulsión sufran cremado o sedimentación más rápidamente al aumentar su tamaño. En emulsiones O/W, la coalescencia conduce a la formación de una capa oleosa en la parte superior de la emulsión (*oiling off*). En las emulsiones W/O, conduce a la acumulación de agua al fondo del material.

Existen dos etapas relacionadas con la coalescencia de un par de gotas: drenado de la fase continua de la delgada película de líquido que se encuentra entre las gotas hasta que ésta alcanza un espesor crítico, seguido de una ruptura de la capa interfacial debido a alguna fluctuación o perturbación local (Dickinson, 1989). Una vez que se ha formado un hueco en la interfase, el líquido del interior de la gota fluye rápidamente a través del hueco, y las gotas se unen formando una sola gota de mayor tamaño. La velocidad de coalescencia depende, por tanto, de la probabilidad de que se produzcan dichos huecos. Esto puede ocurrir de diferentes formas, dependiendo del tipo de emulsionante utilizado y de las condiciones del medio. Por ejemplo, se pueden distorsionar espontáneamente monocapas de emulsionante debido a fluctuaciones térmicas, o se puede producir la ruptura química del emulsionante (por ejemplo, por hidrólisis química o enzimática de proteínas) o el desplazamiento del emulsionante de la superficie interfacial, por otro más activo superficialmente, pero menos resistente a la ruptura. El mecanismo que cobra más relevancia en cada caso depende de las condiciones de pH, fuerza iónica, interacciones entre los componentes, temperatura, agitación mecánica,... (McClements, 1999).

La coalescencia sólo puede ocurrir cuando las gotas están en íntimo contacto, por lo que dependerá de las fuerzas de corto alcance mucho más que la separación gravitacional o la floculación.

En emulsiones estabilizadas por proteínas, la coalescencia puede producirse por colisión de las gotas, por contacto prolongado entre las mismas o por la formación de un “agujero” en la membrana interfacial.

#### **1.7.5.2.4. Maduración de Ostwald**

La maduración de Ostwald es el proceso por el que gotas de gran tamaño crecen a expensas de otras más pequeñas, debido a transporte de masa de la fase dispersa desde una gota a otra a través de la fase continua (Kabalnov y Shchukin, 1992; Taylor, 1995).

Al contrario de lo que sucede con otros procesos de desestabilización, la velocidad a la que se produce la maduración de Ostwald aumenta al disminuir el tamaño de gota (Kabalnov y Shchukin, 1992). Sin embargo, hay que considerar que un aumento del tamaño de gota lleva asociado una aceleración de otros procesos de desestabilización, como el cremado. Este proceso también se favorece por un elevado grado de polidispersión de tamaños.

Este proceso es despreciable en la mayoría de las emulsiones alimentarias, porque las solubilidades mutuas de los triacilglicéridos y el agua son tan bajas que el transporte de masa es insignificante (Dickinson y Stainsby, 1982).

#### **1.7.5.2.5. Inversión de fases**

La inversión de fases es el proceso por el que un sistema pasa de ser una emulsión O/W a ser una emulsión W/O, o viceversa. En muchos alimentos, se trata de un proceso indeseable porque tiene efectos adversos sobre su apariencia, textura, estabilidad, y sabor. Puede considerarse que lo que realmente tiene lugar al producirse este fenómeno es una coalescencia de gotas de la fase dispersa y una re-emulsificación posterior.

Se piensa que la base físico-química de la inversión de fases es extremadamente compleja. En el momento en el que ocurre la inversión, conocido a menudo como punto de equilibrio, el sistema puede incluir zonas de emulsión O/W, emulsión W/O, emulsión múltiple, y fases bicontinuas. Puede ser inducida por tensioactivos o por cristalización de grasas.

Existe una relación entre el tipo de emulsión y la fracción en volumen de fase interna. La teoría de Ostwald (1910a, 1910b) supone que para  $\Phi = 0,74$ , la emulsión está agrupada lo más densamente posible, y sobrepasar este valor daría como resultado la inversión o rotura de la emulsión. En la práctica, este valor de fracción en volumen de fase interna puede ser algo más elevado, debido a que la deformabilidad de las gotas permite agruparlas más densamente. Además en emulsiones polidispersas, las gotas pequeñas pueden ocupar los intersticios que dejan las gotas grandes (Rahalkar, 1992)

#### **1.7.6.6. Estabilidad química y bioquímica**

Una de las formas más comunes de inestabilidad en los alimentos que contienen grasas es la oxidación lipídica (Nawar, 1996). La oxidación de lípidos conlleva la aparición de olores desagradables (“off-flavors”) y productos de reacción

potencialmente tóxicos. Se han desarrollado estrategias para retardar la oxidación de los lípidos como incorporar antioxidantes o como controlar las condiciones de almacenamiento.

Existe también un creciente interés en la influencia de las reacciones bioquímicas en las propiedades de las emulsiones alimentarias (Dalglish, 1996a). Muchos estudios se han llevado a cabo recientemente para determinar la influencia de ciertos enzimas en la estabilidad y propiedades físico-químicas de las emulsiones alimentarias (Agboola y Dalglish, 1996a, 1996b).

### **1.7.6. Tamaños de partícula**

Muchas de las propiedades más importantes de emulsiones alimentarias, como la vida media, apariencia, textura y flavor, vienen determinadas por el tamaño de las partículas que contienen (Dickinson y col., 1992).

Los distintos tamaños que se pueden encontrar en una emulsión no suelen ser uniformes, por lo que en todos los casos en los que existe una distribución estadística amplia la emulsión se denomina “polidispersa”, en contraposición a emulsiones “monodispersas” que son aquellas que tienen un tamaño uniforme de gota.

Una emulsión estable se corresponde generalmente con una distribución de tamaños poco dispersa y con un máximo situado en diámetros pequeños. A medida que se desestabiliza la emulsión, ésta tiende a presentar una curva de distribución más dispersa y con el máximo localizado en diámetros mayores (Mita y col., 1973; Dickinson, 1989).

Aunque las gotas de una emulsión suelen presentar formas algo irregulares, en general, se puede asumir que cuando la fracción de fase dispersa es inferior a 0,74, la geometría de las gotas es aproximadamente esférica; a partir de ese valor las gotas se distorsionan en forma de poliedros con caras parcialmente planas (Halling, 1981). En cualquier caso, puede aceptarse la geometría esférica si se emplean diámetros equivalentes como dimensión característica. De esta forma, el tamaño de una gota irregular puede definirse como el que tendría una esfera que tuviera la misma propiedad que dicha gota, como el área proyectada, el volumen, el área superficial, la velocidad de sedimentación,...

Las emulsiones constituidas por partículas pequeñas responden al esfuerzo de distintas formas. Así, gotas de aceite suspendidas en un fluido newtoniano como el agua, pueden interactuar para producir un comportamiento no newtoniano. La naturaleza de las interacciones entre gotas y, por tanto, el comportamiento reológico depende en gran medida de su tamaño. Las interacciones totales están gobernadas por el movimiento browniano e interacciones entre gotas. Entre 0'01-10  $\mu\text{m}$ , las fuerzas brownianas son lo suficientemente débiles como para que los esfuerzos de cizalla moderados puedan alterar el estado de equilibrio isotrópico al superar las fuerzas brownianas. Por otra parte, las fuerzas entre gotas son lo suficientemente fuertes como para influir en la mayoría de propiedades de la emulsión. En el caso de partículas mayores, debido a la escasa superficie específica libre para interactuar, esto no ocurre.

Entre los diámetros medios más utilizados para describir los resultados de distribuciones de tamaños de partículas en sistemas coloidales podemos destacar (Orr, 1983):

$$- D(1,0) = \sum \frac{d}{n} \text{ (Diámetro medio)} \quad (1.7.6.1.)$$

Consiste en el valor de la longitud media y es la suma de todos los diámetros (d) dividida por el número de partículas (n). En términos matemáticos se conoce como D[1,0], porque el diámetro en la parte superior está elevado a la potencia 1 y en la parte inferior a 0.

$$- D(4,3) = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \text{ (Diámetro medio del momento volumétrico)} \quad (1.7.6.2.)$$

$$- D(3,2) = \frac{\sum d^3}{\sum d^2} \text{ (diámetro medio de Sauter)} \quad (1.7.6.3.)$$

Se suele utilizar en aplicaciones en las que la superficie activa o área superficial es importante como en catálisis o combustión. Este diámetro es el más utilizado para el análisis de datos de distribuciones de tamaños de partículas en emulsiones alimentarias.

La uniformidad,  $U$ , es un parámetro representativo de la polidispersidad de la muestra. El parámetro uniformidad señala la desviación de los tamaños de gota de la mediana de la distribución:

$$U = \frac{\sum V_i |d(v,0.5) - d_i|}{d(v,0.5) \sum V_i} \quad (1.7.6.4.)$$

donde  $V_i$  y  $d_i$  son la frecuencia volumétrica relativa y el diámetro medio para la clase de tamaño  $i$ ,  $d(v,0.5)$  es la mediana de la distribución.

### 1.7.6.1. Determinación experimental del tamaño de gota

La obtención de datos experimentales de tamaños de gota es una tarea compleja debido a los pequeños tamaños que se encuentran normalmente y a la baja estabilidad que presentan las emulsiones ante una manipulación severa. No obstante, nuevos avances en electrónica, informática,... han conducido al desarrollo de técnicas experimentales que permiten determinar los tamaños y distribución de tamaños con bastante exactitud.

En la actualidad los más empleados son:

1. Microscopía. El ojo humano no puede distinguir objetos menores de  $100 \mu\text{m}$  (Aguilera y Stanley, 1990), por lo que es necesario servirse de técnicas microscópicas para poder observar objetos pequeños (Aguilera y Stanley, 1990; Kalab y col., 1995; Smart y col., 1995). Existen diferentes técnicas que pueden proporcionar información sobre la estructura, dimensiones y organización de los componentes de las emulsiones alimentarias: microscopía óptica, microscopía de láser confocal (CSLM), microscopía electrónica (de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)) y microscopía de fuerza atómica.
2. Instrumentos que determinan cambios en la resistencia eléctrica. El número de partículas de un diámetro dado se determina suspendiendo la emulsión en un electrolito que la conduce a través de una apertura entre dos electrodos. La resistencia eléctrica entre éstos se modifica cuando la partícula atraviesa la apertura. Este cambio se convierte en una diferencia de potencial directamente proporcional al tamaño (Kinsman, 1962; Walstra y Oortwijn, 1962; Walstra y col., 1969)

3. Técnicas que basan su funcionamiento en el fenómeno de la dispersión de la luz láser. En éstos la muestra a analizar se dispersa previamente en un medio transparente a la longitud de onda del haz de luz analizador y se coloca entre éste y una lentes receptoras. Al incidir la luz sobre las gotas es dispersada en un rango continuo de ángulos que se relacionan con los diámetros de gota (Dickinson y Stainsby, 1982; Hunter, 1986; Everett, 1988). Esta técnica es adecuada para determinar tamaños de gotas comprendidos entre 0,1 y 1000  $\mu\text{m}$ , por lo que permite caracterizar las gotas de la mayoría de las emulsiones.
4. Otras técnicas menos usuales, son las turbidimétricas, que realizan medidas en términos de áreas proyectadas (Walstra y Oortwijn, 1975), las técnicas que se basan en medidas de transmisión de rayos X (Hendrix y Orr, 1972), de difracción de luz láser (Aksel y Teipel, 1994), de sedimentación (Hunter, 1986, 1993),...

## 1. 8. CONCEPTOS BÁSICOS DE REOLOGÍA

La Reología, término propuesto por Bingham, se conoce como la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales. Esta definición fue aceptada cuando se fundó la Sociedad Americana de Reología (ASR) en 1929.

Tradicionalmente, los materiales deformables se clasificaban en dos grupos: sólidos elásticos y fluidos viscosos (líquidos y gases). Hoy sabemos que entre estos dos casos límite, existe un amplio espectro de tipos de materiales con diferentes comportamientos, que son el objeto de estudio de la Reología.

La reología como ciencia independiente ha sufrido un acusado desarrollo en la segunda mitad del siglo XX debido al interés que a nivel industrial suscitan materiales plásticos, soluciones de polímeros, fluidos biológicos,... cuyo comportamiento dinámico no puede explicarse mediante las leyes clásicas.

### 1.8.1. El tensor esfuerzo

El esfuerzo o tensión es una magnitud que se define como una fuerza por unidad de superficie, teniendo por lo tanto unidades de presión. El esfuerzo al que se somete externamente un material puede aplicarse de distintas formas: como una compresión o como un esfuerzo cortante o de cizalla.

Referidas a un espacio euclídeo tridimensional, las magnitudes de las que deriva el esfuerzo (fuerza y superficie) son vectores de tres componentes, por lo que para definir completamente el esfuerzo es necesario especificar nueve componentes. Por ello, el esfuerzo es un tensor de segundo orden, que en forma matricial se representa de la siguiente forma:

$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.8.1.1.)$$

En el tensor esfuerzo, el primer subíndice se refiere a la orientación del plano sobre el que la fuerza actúa, y el segundo indica la orientación de dicha fuerza. Como consecuencia de la condición de equilibrio entre pares de fuerzas el tensor es simétrico ( $\sigma_{ij} = \sigma_{ji}$ ), por lo tanto sólo seis de las nueve componentes son independientes.

En general, sobre un elemento material cualquiera pueden actuar dos tipos de esfuerzos:

- *Esfuerzos normales*, referidos a la componente en dirección perpendicular a la superficie considerada, y
- *Esfuerzos de cizalla o cortantes*, que son las componentes tangenciales a dichas superficies (Darby, 1976; Dealy, 1982), como puede observarse en la figura 1.8.1.1.

El tensor esfuerzo total puede descomponerse en la suma de un tensor isótropo,  $\sigma$ , y uno anisótropo,  $\tau_{ij}$  (Dealy, 1982):

$$\sigma_{ij} = \sigma \delta_{ij} + \tau_{ij} \quad (1.8.1.2.)$$

donde  $\delta_{ij}$  es el tensor unitario o delta de Kronecker:

$$\delta_{ij} = 1 \text{ si } i=j \quad \text{y} \quad \delta_{ij} = 0 \text{ si } i \neq j. \quad (1.8.1.3.)$$

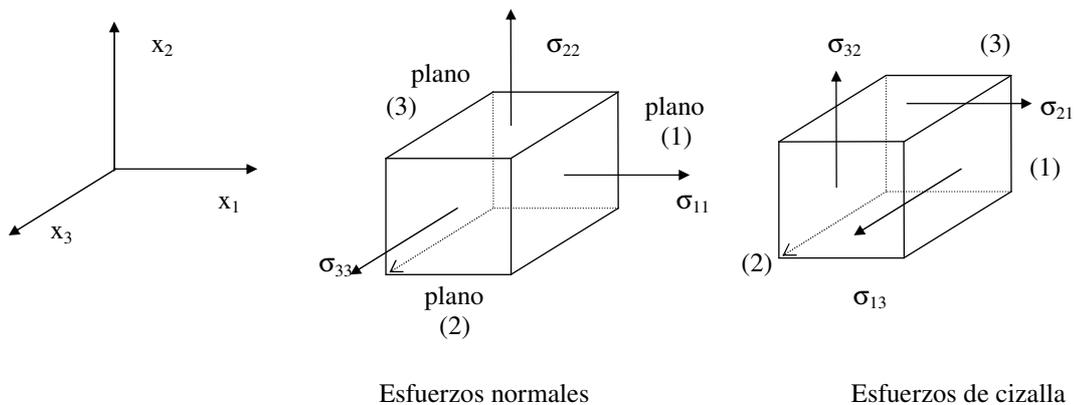


Figura 1.8.1.1.. Componentes del tensor esfuerzo

El esfuerzo isótropo,  $\sigma$ , es perpendicular a todas las superficies del material sobre el que actúa y con la misma magnitud en todas las direcciones. El esfuerzo isótropo provocará un cambio de volumen en el elemento, pero no un cambio de forma.

El esfuerzo anisótropo puede tener componentes normales (correspondientes a esfuerzos normales) o componentes tangenciales (correspondientes

a esfuerzos de cizalla). Así, cuando un esfuerzo anisótropo actúa sobre un elemento material tiene como resultado un cambio en la forma, pero no en volumen.

La componente del esfuerzo normal anisótropo no puede medirse directamente, en cambio sí pueden medirse las componentes del esfuerzo total normal:

$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} -P + \tau_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & -P + \tau_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & -P + \tau_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.8.1.4.)$$

Al considerar diferencias de esfuerzos normales se elimina la contribución de la presión en las componentes del esfuerzo total:

$$\begin{aligned} \sigma_{xx} - \sigma_{yy} &= (-P + \tau_{xx}) - (-P + \tau_{yy}) = \tau_{xx} - \tau_{yy} = N_1 \\ \sigma_{yy} - \sigma_{zz} &= (-P + \tau_{yy}) - (-P + \tau_{zz}) = \tau_{yy} - \tau_{zz} = N_2 \end{aligned} \quad (1.8.1.5.)$$

Hay que señalar que, si el material es incompresible, sólo los esfuerzos cortantes y las diferencias entre esfuerzos normales que actúan en direcciones diferentes tienen significación reológica. Un esfuerzo isótropo no provoca cambios en un material incompresible, ya que no puede modificar su volumen. Esto posibilita la sustitución de los componentes del esfuerzo total  $\sigma_{ij}$ , por los componentes del esfuerzo desviatorio,  $\tau_{ij}$ :

$$\sigma_{11} - \sigma_{22} = \tau_{11} - \tau_{22} \quad (1.8.1.6.)$$

$$\sigma_{22} - \sigma_{33} = \tau_{22} - \tau_{33}$$

$$\sigma_{ij} = \tau_{ij} \text{ si } i \neq j$$

### 1.8.2. Tensor deformación y tensor velocidad de deformación

La deformación,  $\gamma$ , y la velocidad de deformación,  $\dot{\gamma}$ , son la expresión matemática de la respuesta de un material al esfuerzo aplicado sobre él. La deformación es una medida cuantitativa de la extensión con la que un elemento de material ha sido deformado. La magnitud de esa deformación está determinada por el desplazamiento relativo de los puntos, y es por tanto una magnitud adimensional. Como las dos magnitudes que lo definen son vectores con tres componentes en el espacio

tridimensional, la deformación y la velocidad de deformación son también tensores de segundo orden con nueve componentes.

La deformación,  $e_{ij}$ , es un tensor simétrico, por lo tanto, puede definirse una deformación isótropa  $\bar{e}$  y otra anisótropa  $\gamma_{ij}$ , definiéndose como:

$$e_{ij} = e\delta_{ij} + \gamma_{ij} \quad (1.8.2.1.)$$

donde  $\delta_{ij}$  es el tensor unitario o delta de Kronecker.

La componente isótropa indica un cambio de volumen (dilatación o compresión) sin cambio de forma. El tensor  $\gamma_{ij}$ , tensor de deformación desviatoria, representa la deformación anisótropa y refleja un cambio de forma sin cambio de volumen.

El vector velocidad de deformación se obtiene por derivación con respecto al tiempo del tensor deformación:

$$\dot{e}_{ij} = d(e_{ij})/dt \quad (1.8.2.2.)$$

### 1.8.3. Caracterización reológica de un material

La caracterización reológica de un material consiste en encontrar la relación, en forma de ley matemática, que existe entre el esfuerzo aplicado y la respuesta dinámica resultante en forma de deformación o velocidad de deformación (Darby, 1976). Dicha expresión matemática puede ser de dos tipos:

*Ecuación constitutiva.* La ecuación constitutiva o ecuación reológica de estado relaciona todas las componentes del esfuerzo (volumétrico o desviatorio) y de la deformación. Es una característica única del material y representa el comportamiento reológico más general, definiéndolo para cualquier tipo de deformación o flujo.

*Función del material.* Es una relación entre ciertos componentes del esfuerzo y la deformación siendo un caso especial de ecuación constitutiva; expresándose como ecuación empírica resultante de un ajuste de datos experimentales.

### 1.8.4. Cizalla simple

La cizalla simple es uno de los casos más elementales de deformación. Considérese un material contenido entre dos placas paralelas, una inferior que está inmóvil y otra superior que se desplaza en su propio plano una distancia  $x$  al estar sometida a una fuerza  $F$  que actúa paralela a la placa (Dealy, 1982). Cada elemento estará sometido a la misma deformación, que vendrá dada por:

$$\gamma = dx / dy \quad (1.8.4.1.)$$

donde  $\gamma$  es la deformación por cizalla, siendo  $dx$  el desplazamiento de la superficie superior del elemento con respecto a la superficie inferior en la dirección  $x$  y  $dy$  la altura del elemento. Como la deformación es uniforme e independiente del tamaño de las placas, puede representarse en función de la distancia entre placas  $h$  y del desplazamiento de la placa superior  $x$ , así:

$$\gamma = x / h \quad (1.8.4.2.)$$

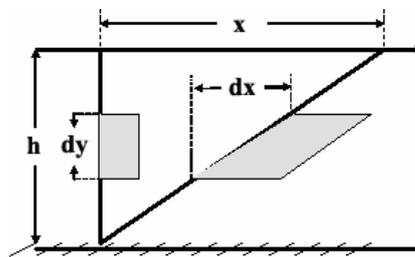


Figura 1.8.4.1. Deformación por cizalla simple

Generalmente, para el estudio de fluidos, se somete el material a una cizalla continua aplicando una fuerza constante  $F$  en la dirección  $x$ , que alcanza una velocidad constante  $v$ . De tal forma la velocidad de un elemento material se caracteriza por:

$$dv = dx / dt \quad (1.8.4.3.)$$

Así, la velocidad de cizalla o velocidad de deformación por cizalla se define como:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\left(\frac{dx}{dy}\right)}{dt} = \frac{d\left(\frac{dx}{dt}\right)}{dy} = \frac{dv}{dy} \quad (1.8.4.4.)$$

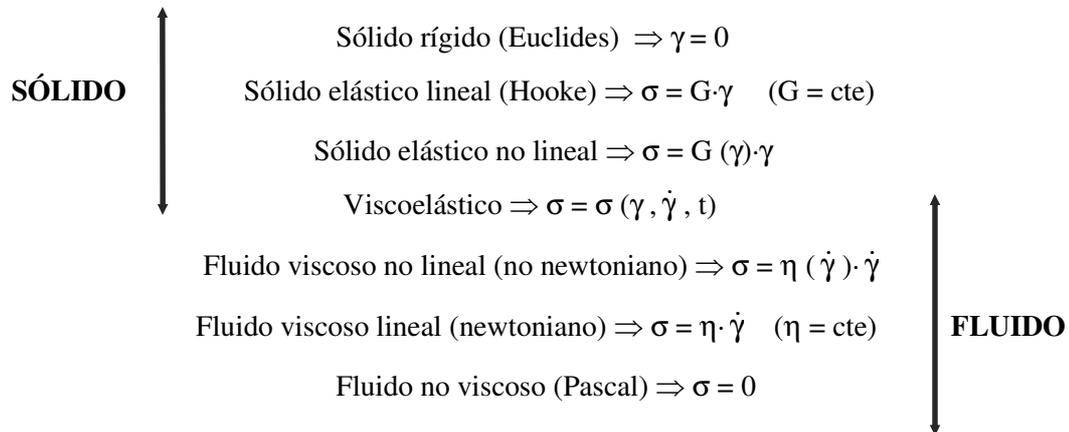
o por la siguiente expresión:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\left(\frac{x}{h}\right)}{dt} = \frac{\left(\frac{dx}{dt}\right)}{h} = \frac{v}{h} \quad (1.8.4.5.)$$

Esto indica que la velocidad de deformación es constante a través del material.

### 1.8.5. Clasificación de los distintos comportamientos reológicos

Los materiales se pueden clasificar reológicamente con respecto a la relación existente entre el esfuerzo aplicado y la deformación o velocidad de deformación en cizalla simple (Darby, 1976), como puede observarse a continuación:



Una clasificación más correcta debe tener en cuenta que un material puede presentar un comportamiento u otro dependiendo de la magnitud del esfuerzo o de la deformación aplicada, así como de la historia de cizalla previa.

#### 1.8.5.1. Comportamiento en flujo estacionario. Fluidos newtonianos

Los fluidos newtonianos son aquellos en los que los valores de esfuerzo cortante y velocidad de cizalla mantienen una relación de proporcionalidad directa, cumpliendo la denominada ley de Newton de la viscosidad:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1.8.5.1.1.)$$

donde  $\eta$  es una propiedad reológica del material denominada viscosidad dinámica o newtoniana, que sólo depende de la naturaleza del material y de las condiciones de presión y temperatura.

La viscosidad se puede definir como una medida de la intensidad de disipación de energía necesaria para mantener la deformación continua de un fluido, y su unidad en el Sistema Internacional es Pascal por segundo (Pa·s).

Para que un fluido sea newtoniano debe cumplir que la viscosidad no varíe con la velocidad ni el tiempo de cizalla, sean nulas las dos diferencias de esfuerzos normales y que el esfuerzo sea nulo inmediatamente después de que cese la cizalla.

Presentan comportamiento newtoniano los sistemas con estructura sencilla, como el agua, aceites minerales, disoluciones diluidas de polímeros,...

**1.8.5.2. Comportamiento en flujo estacionario. Fluidos no newtonianos**

Cualquier fluido cuyo comportamiento reológico no pueda ser descrito mediante la ecuación 1.8.5.1.1. se define como no newtoniano. Presentan este comportamiento disoluciones que contienen macromoléculas, emulsiones, suspensiones concentradas, cristales líquidos y fases micelares, etc. (Asada y Onogi, 1983; Ahuja, 1984; Marrucci, 1984; Gallegos y col., 1988a).

Se pueden realizar medidas de  $\tau$  y  $\dot{\gamma}$  en flujos en cizalla estacionaria, definiéndose el cociente entre ambas magnitudes como viscosidad aparente:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \tau / \dot{\gamma} \tag{1.8.5.2.1}$$

Los fluidos no newtonianos se pueden clasificar por la forma en la que  $\sigma$  varía con  $\dot{\gamma}$  (curva de flujo) o en términos de la variación de la viscosidad aparente con  $\dot{\gamma}$  (curva de viscosidad) (Darby, 1976). En la figura 1.8.5.2.1. se presentan las curvas de flujo y viscosidad características de este tipo de fluidos. Según la evolución de la viscosidad con la velocidad de cizalla, se clasifican como pseudoplásticos, dilatantes o fluidos plásticos.

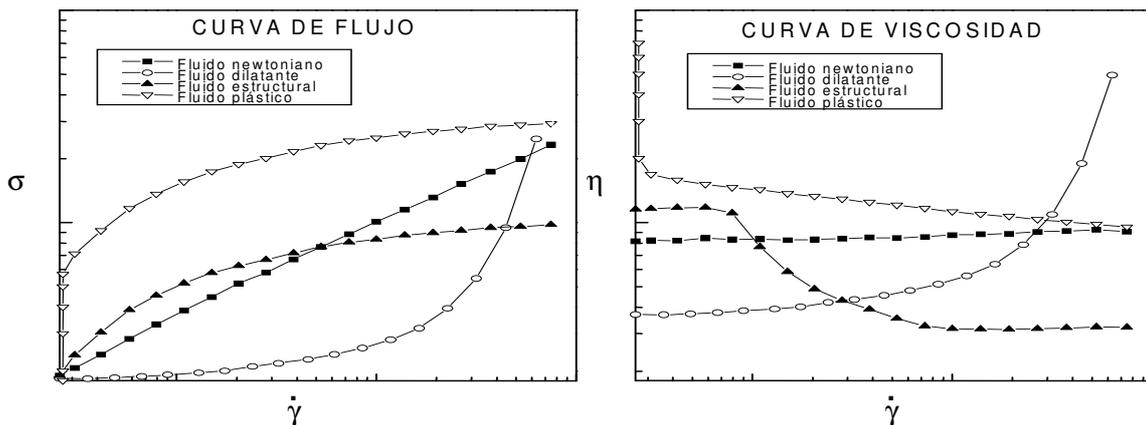


Figura 1.8.5.2.1. Curvas de flujo y viscosidad

*a) materiales pseudoplásticos*

Estos materiales muestran un descenso en viscosidad aparente según aumenta la velocidad de deformación. Algunos ejemplos característicos son las fases micelares de

disoluciones de tensioactivos, polímeros y sus disoluciones, suspensiones, emulsiones, etc. (Madiedo y col., 1994a; Hudson y Ferguson, 1994; Martín y col., 1994).

Un ejemplo muy extendido de pseudoplasticidad es el comportamiento estructural relacionado con un cambio en la estructura del material al aumentar  $\dot{\gamma}$ , caracterizado por tres zonas bien diferenciadas (Reiner, 1960). El comportamiento es newtoniano a bajas velocidades de deformación con una viscosidad constante  $\eta_0$  en la primera zona. La zona intermedia posee características pseudoplásticas en la que se produce una disminución de viscosidad. A altas velocidades de deformación presenta un comportamiento newtoniano caracterizado por una viscosidad límite  $\eta_\infty$ . Las diferentes regiones se relacionan con cambios en la estructura del material al aumentar la velocidad de deformación.

En la figura 1.8.7.3. se observa el resultado de aplicar una determinada cizalla a una dispersión. Así, las partículas contenidas en el líquido se orientan en la dirección del flujo, mientras que las moléculas en forma de cadena se desenredan, estiran y orientan paralelas a la dirección del flujo. Aquellas partículas que poseen forma esférica pueden deformarse adquiriendo una forma alargada y las que forman agregados pueden separarse.

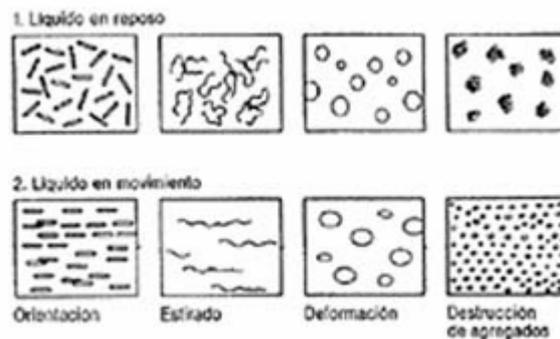


Figura 1.8.7.3. Dispersiones en estado de reposo y al fluir por un tubo.

#### b) materiales dilatantes

Estas sustancias muestran un aumento de la viscosidad aparente al aumentar la velocidad de deformación, experimentando una dilatación al someterse a dichos esfuerzos cortantes. Algunas suspensiones concentradas de partículas sólidas, proteínas y ciertas disoluciones de polímeros y detergentes presentan este comportamiento (Ferguson y Kembrowski, 1991).

*c) materiales plásticos*

La plasticidad es un fenómeno que presentan aquellas sustancias que se comportan como sólidos elásticos, almacenando una cierta cantidad de esfuerzo, cuando se someten a una cierta cantidad de esfuerzo menor que un cierto valor  $\sigma_0$ , denominado esfuerzo umbral. El material tiene el comportamiento de un fluido cuando el esfuerzo supera el esfuerzo umbral, aunque si el valor del esfuerzo es inferior al del esfuerzo umbral se comporta como un sólido elástico.

Como ejemplos de esta situación se encuentran pastas, suspensiones, emulsiones, grasas, pinturas, cristales líquidos, etc. (van Wazer y col., 1963; Yoshimura y col., 1987; Cheng, 1986).

En 1985 Barnes y Walters cuestionaron la existencia real del umbral de fluencia como propiedad reológica (Barnes y Walters, 1985; Barnes 1992). Se matiza la definición de este concepto como “el esfuerzo de cizalla por debajo del cual no se observa flujo bajo las condiciones experimentales utilizadas”. Si se utilizaran reómetros capaces de medir velocidades de deformación del orden de  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  podría apreciarse como fluyen materiales aparentemente plásticos. No obstante, la utilidad práctica del umbral de fluencia sigue vigente en la práctica industrial.

**1.8.5.2.1. Comportamiento dependiente del tiempo de cizalla**

Si el ajuste de la estructura del flujo a cambios en la velocidad de deformación requiere un período de tiempo significativo, se encontrará que la viscosidad medida en un experimento en cizalla simple no varía sólo con la velocidad de deformación, sino también con el tiempo (Lapasin, 1980; Beneyto y col., 1980; Rizvi, 1981; Quemada y col., 1984).

$$\eta = \eta (\dot{\gamma}, t) \tag{1.8.5.2.1.1.}$$

Existen una serie de fenómenos reológicos dependientes del tiempo tales como:

–*Tixotropía*: cuando la viscosidad disminuye con el tiempo de cizalla, pero al cesar la cizalla, la viscosidad recupera su valor inicial (Groves y Ahmad, 1976). Se presenta en pinturas, productos alimentarios y cosméticos, medicamentos, etc.

–*Antitixotropía*: cuando la viscosidad aumenta con el tiempo de cizalla y tras el cese de la cizalla se recupera con el tiempo la viscosidad inicial.

–*Reopexia*: se produce un aumento de la viscosidad por recuperación estructural del sistema cuando es acelerada por vibraciones de ciertas características.

–*Reodestrucción*: es un descenso de la viscosidad con el tiempo pero sin que se produzca una recuperación completa con el tiempo de la viscosidad inicial al cesar la cizalla.

–*Tixotropía irreversible*: es una disminución de la viscosidad con el tiempo sin que se produzca recuperación de viscosidad alguna tras el cese de la cizalla.

Existen diversas técnicas experimentales para evaluar este tipo de comportamiento reológico, denominadas medidas de flujo transitorio.

La más extendida tradicionalmente consiste en aumentar de forma lineal y progresiva la velocidad de cizalla y posteriormente hacerla descender, también de forma gradual. En los casos en que la muestra presenta un comportamiento dependiente del tiempo las dos curvas no coinciden, originándose un ciclo de histéresis. El área de este ciclo es una medida del grado de tixotropía del sistema.

Actualmente se emplea en mayor grado el estudio de la variación del esfuerzo a una velocidad de cizalla constante, finalizando cuando éste alcanza un estado estacionario.

La característica más destacable que presentan los fluidos que exhiben este comportamiento es que aparece un esfuerzo máximo o sobreesfuerzo, seguido de un descenso del esfuerzo hasta alcanzar el estado estacionario (figura 1.8.5.2.1.1.) (Kokini y Dickie, 1981).

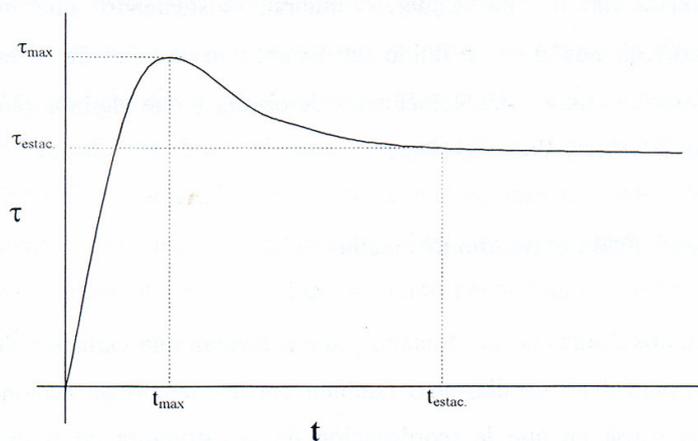


Figura 1.8.5.2.1.1. Curva característica de un ensayo de flujo transitorio a velocidad de cizalla constante

Esta variación característica del esfuerzo de cizalla con el tiempo, a velocidad de cizalla constante, se puede justificar mediante cambios estructurales en el material

(tixotropía), pero también hay autores que lo atribuyen a la viscoelasticidad del material, o a ambos simultáneamente (Gallegos y Franco, 1999a).

### **1.8.5.3. Concepto de viscoelasticidad**

Un sólido elástico ideal es aquel que al retirarle el esfuerzo aplicado recupera su forma original. Por el contrario, un líquido viscoso puro disipa toda su energía mecánica en forma de calor. Existen efectos de memoria que se manifiestan principalmente en experimentos en los que el fluido es sometido a tensiones dependientes del tiempo tales como relajación, oscilación, etc. El estudio de estos efectos de memoria característicos de materiales cuyo comportamiento es intermedio entre sólido y líquido se conoce con el nombre de viscoelasticidad (Darby, 1976). Así un fluido viscoelástico es aquel que posee componentes viscosas y elásticas.

Los esfuerzos son función, no sólo de la deformación instantánea, sino también de la historia de la deformación (fluidos con memoria). El estudio de la viscoelasticidad implica establecer relaciones entre el esfuerzo, la deformación y el tiempo. Cuando el esfuerzo y la deformación son infinitesimales y las relaciones entre ambas magnitudes en función del tiempo se pueden describir mediante ecuaciones diferenciales lineales de coeficientes constantes, el comportamiento se denomina viscoelástico lineal. La relación entre la deformación y el esfuerzo es sólo función del tiempo y no de la magnitud del esfuerzo (Darby, 1976).

#### **1.8.5.3.1. Viscoelasticidad lineal**

##### **Modelos Analógicos**

Un acercamiento clásico a la descripción de la respuesta de materiales que exhiben propiedades viscosas y elásticas está basado en la analogía existente con la respuesta de ciertos elementos mecánicos (Darby, 1976; Ferry, 1980; Tschoegl, 1989).

Existen modelos viscoelásticos elaborados por combinación de elementos mecánicos que simulan propiedades viscosas y elásticas, representando comportamientos viscoelásticos lineales. Como los materiales reales presentan conducta no lineal para grandes deformaciones, los modelos que a continuación se detallan explican acertadamente situaciones con pequeñas amplitudes de desplazamiento, y no son adecuados para predecir una deformación continua o el flujo de materiales reales.

El muelle representa el comportamiento elástico. La fuerza (esfuerzo) que se aplica sobre él es directamente proporcional al desplazamiento de éste (deformación):

$$\sigma = G \gamma \quad (1.8.5.3.1.1.)$$

donde  $G$  es una constante característica del material denominada módulo de Young.

Analógicamente el amortiguador hidráulico representa el comportamiento viscoso. En él, la fuerza (esfuerzo) aplicada es proporcional a la velocidad de extensión (velocidad de deformación):

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (1.8.5.3.1.2.)$$

Existe una gran diversidad de modelos que pueden ser descritos a partir de las diferentes combinaciones de los dos elementos mecánicos. A continuación se consideran los más importantes.

### **Modelo de Maxwell**

En este apartado se introduce la ecuación constitutiva de la viscoelasticidad lineal a partir del modelo de Maxwell, un modelo que a pesar de su sencillez, contiene todos los fundamentos conceptuales. Consta de un muelle y un amortiguador hidráulico colocados en serie como se observa en la figura 1.8.5.3.1.1. (Maxwell, 1867).

El esfuerzo en ambos elementos es el mismo, mientras que la deformación total es la suma de la deformación elástica,  $\gamma_s$ , y la deformación del fluido,  $\gamma_d$ :

$$\gamma = \gamma_s + \gamma_d \quad (1.8.5.3.1.3.)$$

Diferenciando respecto al tiempo y sustituyendo los valores de las velocidades de deformación elástica y viscosa por sus equivalentes en función del esfuerzo, módulo de elasticidad y viscosidad, se obtiene:

$$\sigma + \lambda \frac{d\sigma}{dt} = \eta \dot{\gamma} \quad (1.8.5.3.1.4.)$$

donde  $\lambda$  es el tiempo de relajación y queda definido como:  $\lambda = \eta / G$ .

Para una situación estacionaria, la ecuación 1.8.5.3.1.4. se transforma en la correspondiente a un fluido newtoniano. Si el esfuerzo varía rápidamente la componente elástica será preponderante.

### Modelo de Voigt

Este modelo consta de un amortiguador hidráulico y un muelle colocados en paralelo (Voigt, 1892). El esfuerzo total aplicado es la suma de las componentes elásticas y viscosas:

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_d \quad (1.8.5.3.1.5.)$$

El modelo queda definido por la ecuación diferencial:

$$\frac{\sigma}{G} = \lambda' \dot{\gamma} + \gamma \quad (1.8.5.3.1.6.)$$

en la cual  $\lambda'$  es el tiempo de retardación y queda definido como:  $\lambda' = \eta / g$ .

El modelo representa el comportamiento de un sólido viscoelástico, ya que después de aplicarle un esfuerzo siempre retornará a la posición inicial de equilibrio.



Figura 1.8.5.3.1.1. Representación del modelo de Maxwell y Voigt respectivamente

### Modelo de Maxwell generalizado

En este caso el material posee una distribución de tiempos de relajación (Thomson, 1888; Wiechert, 1951). Eligiendo una distribución de tiempos de relajación adecuados se puede describir el comportamiento de fluidos reales.

El modelo consiste en la combinación en paralelo de un número determinado de elementos de Maxwell individuales, cada uno con un tiempo de relajación diferente (figura 1.8.5.3.1.2.). Para uno de los elementos colocados en paralelo:

$$\sigma_i + \lambda_i \frac{d\sigma_i}{dt} = \eta_i \dot{\gamma} \quad (1.8.5.3.1.7.)$$

$$\text{donde: } \sigma = \sum_{i=1}^n \sigma_i \quad \text{y} \quad \eta = \sum_{i=1}^n \eta_i = \sum_{i=1}^n \lambda_i G_i$$

siendo  $n$  el número de elementos de Maxwell individuales.

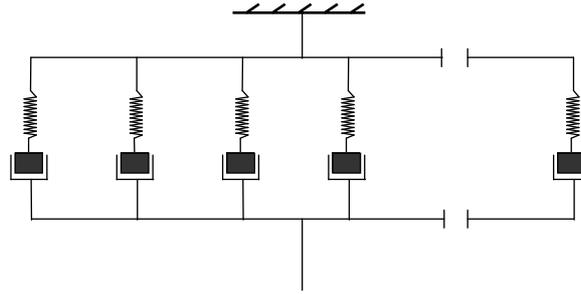


Figura 1.8.5.3.1.2. Esquema del modelo de Maxwell generalizado

### Modelo de Voigt generalizado

De forma análoga al modelo anterior se pueden tener  $n$  elementos de Voigt colocados en serie (figura 1.8.5.3.13.) y en lugar de un único tiempo de retardación se obtendrá una distribución de tiempos de retardación (Ferry, 1980).

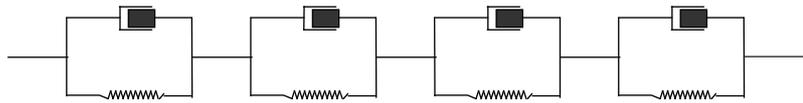


Figura 1.8.5.3.1.3. Esquema del modelo de Voigt generalizado

Además de los modelos citados anteriormente, existen un gran número de modelos obtenidos a partir de la combinación de los dos modelos básicos.

### Ensayos de viscoelasticidad lineal

Existen principalmente tres tipos distintos de ensayos que pueden ser desarrollados para medir las propiedades fundamentales del material.

#### 1. Relajación del esfuerzo

El ensayo consiste en la aplicación sobre el material de una deformación constante, y observar la variación del esfuerzo en función del tiempo:

$$G(t) = \sigma(t) / \gamma \quad (1.8.5.3.1.8.)$$

donde  $G(t)$  es el módulo de relajación en cizalla y describe la relajación del esfuerzo después de la deformación aplicada (Rehage, 1994). En el caso de un sólido elástico de Hooke se alcanza rápidamente una situación de equilibrio que queda definida por el módulo de rigidez en equilibrio,  $G_e$ . Para un líquido viscoso la relajación se produce instantáneamente.

## 2. Fluencia (“Creep”) y recuperación

El ensayo consiste en la aplicación instantánea de un esfuerzo constante que es mantenido, observando la variación de la deformación en función del tiempo (fluencia). Posteriormente se estudia la respuesta de la deformación tras el cese del esfuerzo aplicado (recuperación):

$$J(t) = \gamma(t) / \sigma \quad (1.8.5.3.1.10.)$$

donde  $J(t)$  es la función capacitancia.

En el caso de un sólido elástico se alcanza instantáneamente una situación donde  $J(t)$  no varía con el tiempo, obteniéndose un valor de equilibrio  $J_e$ . Los líquidos viscosos puros originan una función lineal:

$$J(t) = t / \eta \quad (1.8.5.3.1.11.)$$

Los materiales viscoelásticos presentan un comportamiento intermedio, cuadrático a tiempos pequeños y lineal a tiempos elevados, ajustándose la parte lineal a la ecuación:

$$J(t) = J_e^o + t / \eta \quad (1.8.5.3.1.12.)$$

donde  $J_e^o$  es la capacitancia de flujo estacionario, que ofrece una medida de la elasticidad de los fluidos viscoelásticos.

En el caso de la recuperación, esta es total en el caso de los sólidos elásticos, en los viscosos puros es nula y en los viscoelásticos se obtiene una recuperación parcial:

$$\gamma_r = \sigma_o J_e^o \quad (1.8.5.3.1.13.)$$

## 3. Ensayos dinámicos

Un tipo de ensayo muy empleado que proporciona un método no destructivo para la determinación de las propiedades elásticas y viscosas de un material (Elliot y Ganz, 1977), consiste en la aplicación de una deformación por cizalla sinusoidal, representada por una función seno o coseno:

$$\gamma = \gamma_o \cos(\omega t) \quad (1.8.5.3.1.14.)$$

estudiándose la respuesta del sistema en forma del esfuerzo oscilatorio que desarrolla. Este esfuerzo varía con la misma frecuencia,  $\omega$ , pero existe un desfase  $\delta$  respecto a la deformación comprendido entre 0 y  $\pi/2$  radianes. Para sólidos elásticos ideales el desfase es cero mientras que para líquidos viscosos el desfase es  $\pi/2$ .

Se puede expresar el esfuerzo y la deformación en términos de sus equivalentes complejas:

$$\gamma(\omega t) = \gamma_0 e^{j\omega t} = \gamma_0 [\cos(\omega t) + j \sin(\omega t)] = \gamma'(\omega) + j\gamma''(\omega) \quad (1.8.5.3.1.15.)$$

$$\sigma(\omega t) = \sigma_0 e^{j(\omega t + \delta)} = \sigma_0 [\cos(\omega t + \delta) + j \sin(\omega t + \delta)] = \sigma'(\omega) + j\sigma''(\omega) \quad (1.8.5.3.1.16.)$$

donde  $\sigma_0$  y  $\gamma_0$  son las amplitudes del esfuerzo y la deformación,  $\delta$  es el ángulo de fase entre ellos, las primas representan la parte real y las dobles primas representan la parte imaginaria de las cantidades complejas. Si se considera el instante en que el vector deformación coincide con el eje real ( $\omega t = n\pi$ ). Entonces la relación entre esfuerzo y deformación puede expresarse como en la figura 1.11.1., donde:

$$\sigma' = \sigma_0 \cos \delta \quad \text{y} \quad \sigma'' = \sigma_0 \sin \delta \quad (1.8.5.3.1.17.)$$

representan la componente elástica y viscosa respectivamente.

Se define el módulo de cizalla complejo  $G^*$ , como la relación entre el esfuerzo oscilatorio y la deformación oscilatoria:

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma(\omega t)}{\gamma(\omega t)} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos \delta + j \sin \delta) = G'(\omega) + jG''(\omega) \quad (1.8.5.3.1.18.)$$

La primera componente está en fase con la deformación, denominada módulo de almacenamiento, que describe las propiedades elásticas de la muestra. La segunda componente está en desfase, denominada módulo de pérdidas, relacionada con las propiedades viscosas y es proporcional a la energía disipada como calor. La tangente del ángulo de desfase se designa como tangente de pérdidas:

$$\tan \delta = \sigma'' / \sigma' = G'' / G' \quad (1.8.5.3.1.19.)$$

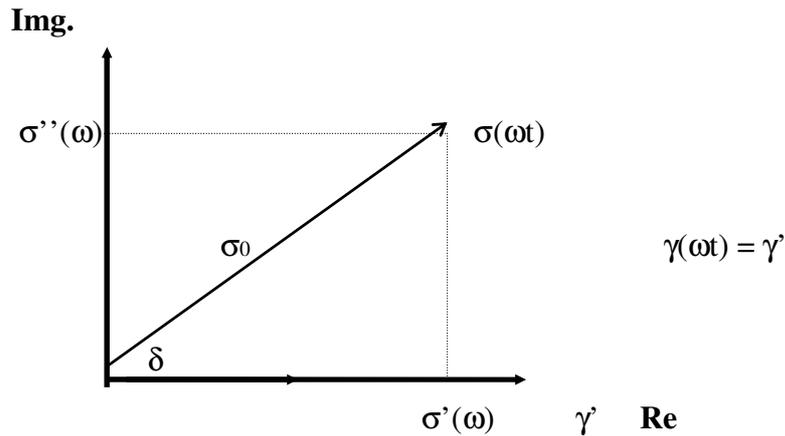


Figura 1.8.5.3.1.4. Representación del esfuerzo y deformación en coordenadas imaginarias

Se puede definir el valor de las distintas funciones del material para:

- sólidos elásticos lineales:  $G^* = G$ ;  $G' = G$ ;  $G'' = 0$ ;  $\delta = 0$
- fluido viscoso lineal:  $G^* = j\omega\eta$ ;  $G' = 0$ ;  $G'' = \eta\omega$ ;  $\delta = \pi / 2$
- materiales viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$  serán distintas de cero, y serán funciones de la frecuencia.

Se define la capacitancia dinámica o compleja como el recíproco del módulo complejo:

$$J^* = \frac{1}{G^*(\omega)} = \frac{\gamma(\omega t)}{\sigma(\omega t)} = J'(\omega) + j J''(\omega) \quad (1.8.5.3.1.20.)$$

correspondiendo  $J'$  a la capacitancia de almacenamiento y  $J''$  a la capacitancia de pérdidas.

Para fluidos viscoelásticos es común definir un parámetro equivalente como es la viscosidad compleja:

$$\eta^*(\omega) = \frac{\sigma(\omega t)}{\dot{\gamma}(\omega t)} = \eta'(\omega) - j \eta''(\omega) \quad (1.8.5.3.1.21.)$$

donde las componentes real e imaginaria son respectivamente:

$$\eta' = G'' / \omega \quad \text{y} \quad \eta'' = G' / \omega. \quad (1.8.5.3.1.22.)$$

### Principio de superposición de Boltzmann

Si  $\gamma(t)$  es una función representativa de una causa que actúa sobre un sistema y  $\sigma(t)$  define el efecto resultante; al producirse una variación en la causa  $\Delta\gamma$  ocurrente a un tiempo  $t'$  produce un efecto  $\Delta\sigma$  un tiempo más tarde  $t$ :

$$\Delta\sigma(t) = \Psi(t - t') \Delta\gamma(t') \quad (1.8.5.3.1.23.)$$

siendo  $\Psi(t - t')$  una propiedad del sistema que relaciona causa y efecto denominada función influencia.

El principio de superposición de Boltzmann se basa en que una serie de cambios en alguna causa que actúa sobre un sistema lineal, cada uno ocurrente a diferentes tiempos, contribuirán acumulativamente al efecto resultante de esta causa algún tiempo más tarde. El efecto total será una combinación lineal de estas contribuciones separadas (Darby, 1976):

$$\sigma(t) = \sum_i \Delta\sigma_i = \sum_i \Psi(t - t'_i) \Delta\gamma(t'_i) \quad (1.8.5.3.1.24.)$$

Si el cambio en la causa se produce continuamente la suma puede ser substituida por una integral:

$$\sigma(t) = \int_{\gamma(-\infty)}^{\gamma(t)} \Psi(t - t') d\gamma(t') = \int_{-\infty}^t \Psi(t - t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad (1.8.5.3.1.25.)$$

### Ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal en cizalla simple

Cuando la causa es la deformación por cizalla y el efecto es el esfuerzo cortante, la función influencia es el módulo de relajación, función decreciente de  $(t - t')$ :

$$\sigma(t) = \int_{\gamma(-\infty)}^{\gamma(t)} G(t - t') d\gamma(t') = \int_{-\infty}^t G(t - t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad (1.8.5.3.1.26.)$$

Integrando por partes esta ecuación y para materiales con memoria débil, esta expresión resulta:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t - t') \gamma(t') dt' \quad (1.8.5.3.1.27.)$$

donde  $m(t - t')$  es la función memoria, cuya relación con el módulo de relajación es:

$$m(t - t') = dG(t - t') / dt' \quad (1.8.5.3.1.28.)$$

Ambas expresiones son denominadas ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal en cizalla simple. En forma tensorial, resultaría la ecuación de Lodge:

$$[\sigma] = \int_{-\infty}^t m(t-t') [C^{-1}](t') dt' \quad (1.8.5.3.1.29.)$$

donde  $[C^{-1}]$  es el tensor simétrico, que contiene información sobre los tres principales ejes de deformación y sobre las magnitudes de las tres principales relaciones de deformación.

Por el contrario si la causa es el esfuerzo y el efecto es la deformación por cizalla, entonces:

$$\gamma(t) = \int_{\sigma(-\infty)}^{\sigma(t)} J(t-t') d\sigma(t') = \int_{-\infty}^t J(t-t') \dot{\sigma}(t') dt' \quad (1.8.5.3.1.30.)$$

donde  $J(t-t')$  es la capacitancia.

Las ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal engloban las expresiones diferenciales obtenidas a partir de modelos analógicos. Así, para un fluido de Maxwell:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G e^{-(t-t')/\lambda} \dot{\gamma}(t') dt' \quad (1.8.5.3.1.31.)$$

y en este caso concreto:

$$G(t-t') = G e^{-(t-t')/\lambda} \quad (1.8.5.3.1.32.)$$

Estas expresiones son denominadas ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal en cizalla simple (Darby, 1976; Larson, 1988; Tschoegl, 1989).

Los modelos y funciones viscoelásticas definidas anteriormente presuponen una respuesta lineal del sistema. Así, los modelos se han formulado combinando elementos lineales y las funciones viscoelásticas se han definido de forma que la relación entre deformación y esfuerzo no fuese función de la magnitud de éste o viceversa. Pero puede no existir dicha linealidad entre el esfuerzo aplicado y la deformación (Ferry, 1980). Por lo tanto las funciones viscoelásticas anteriores sólo son adecuadas para velocidades de deformación de pequeña magnitud.

### Espectros de relajación y retardación

Anteriormente quedó reflejado que un fluido representado por un modelo de Maxwell generalizado puede ser caracterizado por una serie discreta de tiempos de relajación  $\lambda_i$  y módulos de relajación  $G_i$ . Esta representación de los valores se denomina espectro discreto de relajación. Cuando el número de elementos se incrementa sin límite, el resultado es un espectro continuo de tiempos de relajación,  $H(\lambda)$ . Así:

$$G(t) = G_e + \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) e^{-t/\lambda} d \ln \lambda \quad (1.8.5.3.1.33.)$$

siendo  $G_e = 0$  para un líquido viscoelástico.

Para un número infinito de elementos de Voigt, de forma análoga, se obtiene el espectro continuo de tiempos de retardación  $L(\lambda')$ :

$$J(t) = J_g + \int_{-\infty}^{\infty} L(\lambda') (1 - e^{-t/\lambda'}) d \ln \lambda' + \frac{t}{\eta_0} \quad (1.8.5.3.1.34.)$$

Puede considerarse relativamente sencilla la obtención de las funciones viscoelásticas a partir de los espectros de relajación y retardación [Ferry, 1980]. Por el contrario, es complicado el cálculo de las funciones  $H(\lambda)$  y  $L(\lambda')$  a partir de los datos experimentales, aunque se han desarrollado métodos aproximados que permiten ese cálculo (Ferry, 1980; Tschoegl, 1989). Recientemente, se ha demostrado que se pueden obtener espectros de relajación y retardación de una forma más exacta mediante la aplicación del método de regularización de Tikhonov (Groetsch, 1984), como se ha demostrado en polímeros (Weese, 1992) y emulsiones (Madiedo, 1996). Este método consiste en la minimización de funciones que relacionan el espectro con los valores experimentales de una función viscoelástica lineal dada. Así, si el espectro de relajación es calculado a partir del módulo de almacenamiento,  $G'(\omega)$ , a partir del módulo de pérdidas,  $G''(\omega)$ , o a partir del módulo de relajación,  $G(t)$ , las siguientes funciones deberían ser minimizadas:

$$\Gamma(\nu) = \sum_{i=1}^n \left[ \left( G'_{i \text{ exp}} - G_e - \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \frac{\omega_i^2 \lambda^2}{1 + \omega_i^2 \lambda^2} d \ln \lambda \right)^2 \right] + \nu \|\mathbb{E}(H(\lambda))\|^2 \quad (1.8.5.3.1.35.)$$

para el cálculo de  $H(\lambda)$  a partir de  $G'(\omega)$ .

$$\Gamma(\nu) = \sum_{i=1}^n \left[ \left( G_{i \text{ exp}} - \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \frac{\omega_i \lambda}{1 + \omega_i^2 \lambda^2} d \ln \lambda \right)^2 \right] + \nu \|\Xi(H(\lambda))\|^2 \quad (1.8.5.3.1.36.)$$

para el cálculo de  $H(\lambda)$  a partir de  $G''(\omega)$ .

$$\Gamma(\nu) = \sum_{i=1}^n \left[ \left( G_{i \text{ exp}} - \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \exp((-t_i)/\lambda) d \ln \lambda \right)^2 \right] + \nu \|\Xi(H(\lambda))\|^2 \quad (1.8.5.3.1.37.)$$

para el cálculo de  $H(\lambda)$  a partir de  $G(t)$ .

En estas ecuaciones (1.8.5.3.1.34, 1.8.5.3.1.35 y 1.8.5.3.1.36), el parámetro  $\nu$  se denomina factor de regularización, y  $\Xi$  es un operador para el que, normalmente, se utiliza la segunda derivada respecto al tiempo de relajación.

### 1.8.5.3.2. Viscoelasticidad no lineal

Como ya se ha mencionado previamente, cuando la deformación o el esfuerzo aplicados superan un determinado valor, aparecen desviaciones significativas del comportamiento viscoelástico lineal y la relación entre el esfuerzo aplicado a un material y la deformación producida es función de la magnitud del esfuerzo o viceversa.

Para este caso (más cercano a las modificaciones estructurales que estos fluidos experimentan durante su procesado, envasado o uso), las funciones viscoelásticas descritas con anterioridad no son válidas.

Ensayos no lineales son, por ejemplo, las curvas de flujo, tanto en estado estacionario como transitorio, relajación o fluencia viscosa cuando las funciones son dependientes del valor del esfuerzo o deformación aplicados o la medida de esfuerzos normales.

Las ecuaciones constitutivas integrales no lineales deben reflejar la influencia del valor del esfuerzo o deformación.

En algunos casos existe la posibilidad de desglosar el módulo de relajación no lineal en dos funciones distintas, una dependiente de la deformación y otra del tiempo:

$$G(\gamma, t) = G(t) h(\gamma) \quad (1.8.5.3.2.1.)$$

Siendo  $G(\gamma, t)$  el modelo de relajación no lineal y  $h(\gamma)$  la función amortiguación, “damping”, que representa a los efectos no lineales. En este caso la ecuación constitutiva que predice el esfuerzo resulta:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t-t')h(\gamma)\gamma(t, t')dt' \quad (1.8.5.3.2.2.)$$

que es la forma genérica de la ecuación K-BKZ característica por la factorización del módulo de relajación no lineal y que en cizalla simple coincide con la denominada ecuación de Wagner.

### Manifestación de esfuerzos normales

Como se menciona en el apartado dedicado al tensor esfuerzo, existen dos tipos de esfuerzos que pueden actuar sobre un elemento material, los esfuerzos normales, en dirección perpendicular a un plano material y los esfuerzos cortantes o de cizalla, en dirección tangencial a dicho plano.

Las funciones reológicas utilizadas para cuantificar estos esfuerzos son la primera y la segunda diferencia de esfuerzos normales:

$$N_1 = \sigma_{11} - \sigma_{22} \quad (1.8.5.3.2.3.)$$

$$N_2 = \sigma_{22} - \sigma_{33} \quad (1.8.5.3.2.4.)$$

y los denominados primer y segundo coeficientes de esfuerzos normales, que se obtienen dividiendo  $N_1$  y  $N_2$  por  $\gamma^2$ :

$$\Psi_1 = \frac{N_1}{\gamma^2} \quad (1.8.5.3.2.5.)$$

$$\Psi_2 = \frac{N_2}{\gamma^2} \quad (1.8.5.3.2.6.)$$

Durante el flujo de líquidos viscoelásticos se producen algunos fenómenos que se atribuyen al hecho de presentar diferencias de esfuerzos normales no nulas, como son el efecto Barus o Merrington, consistente en un hinchamiento post-extrusión de la vena de fluido o el efecto Weissenberg o elevación exagerada a lo largo del eje de rotación en un flujo rotacional.

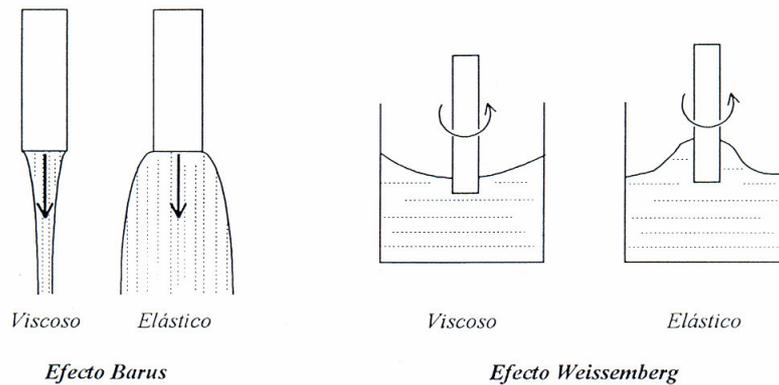


Figura 1.8.5.3.2.1. Efectos de los esfuerzos normales sobre líquidos viscoelásticos

### 1.8.6. Viscosidad extensional

Aunque la mayoría de los estudios reológicos se llevan a cabo mediante flujos de cizalla simple, en la realidad los líquidos experimentan a menudo flujos de naturaleza extensional o elongacional, pudiendo existir una gran diferencia entre su viscosidad extensional y su viscosidad de cizalla.

En el flujo extensional, los elementos de un fluido son estirados. Un buen ejemplo de este tipo de flujo se encuentra ilustrado en la figura 1.8.6.1., donde aparece un material que pasa a través de un tubo de pequeña longitud. Inicialmente, un elemento característico del fluido se mueve a lo largo de la mitad del primer tubo mediante flujo extensional, sin estar sometido a cizalla. Este elemento tiene que estirarse y deformarse para poder entrar en el tubo de menor diámetro. Una vez dentro de este tubo más pequeño, deja de estirarse; cuando sale del tubo pequeño, este elemento experimenta compresión a lo largo de eje de flujo y trata de recuperar su forma original. Si esa misma gota deformable se suspendiera en un líquido en cizalla simple, la deformación no sería tan grande (figura 1.8.6.2.) y tendría lugar durante el flujo una rotación a una velocidad, en radianes por segundo, igual a la mitad de la velocidad de cizalla. Por esto, los flujos de cizalla se conocen como flujos *débiles*, mientras que los flujos extensionales se denominan flujos *fuertes*. Es evidente, que el flujo extensional no es rotacional, puesto que el elemento característico estudiado no sufre ninguna rotación durante la deformación.

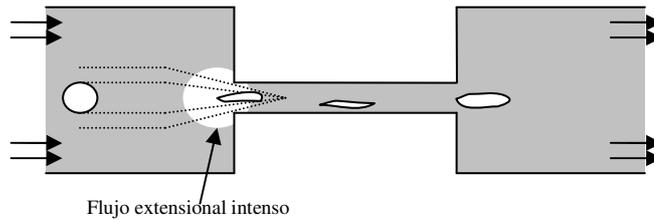


Figura 1.8.6.1.. La deformación de una gota desde un tubo de mayor diámetro a otro de menor diámetro, donde la región de entrada está dominada por el flujo extensional

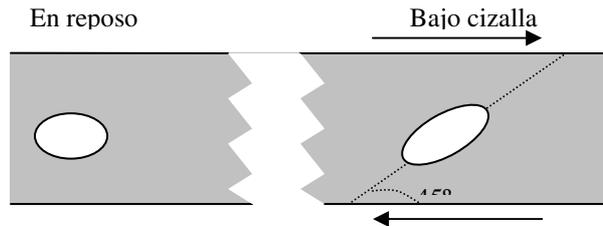


Figura 1.8.6.2. Movimiento de una gota en flujo de cizalla

Básicamente, hay tres tipos de flujo extensional (figura 1.8.6.3.): uniaxial, planar y biaxial. Durante el flujo uniaxial, el material se extiende en una dirección, con la correspondiente reducción en las otras direcciones. En el flujo extensional planar, una lámina aplanada del material se extiende en una dirección, con el correspondiente descenso en el espesor, mientras que la anchura permanece constante. El flujo extensional biaxial se considera normalmente como un flujo que produce una tensión radial en objetos en forma de disco.

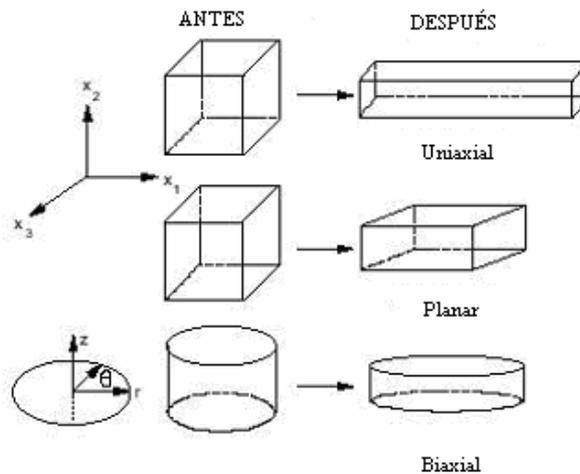


Figura 1.8.6.3. Flujo extensional uniaxial, planar y biaxial

### Flujo extensional uniaxial

Una de las formas más simples del flujo extensional es el flujo extensional uniaxial. Éste es el que resultaría si pudiéramos tirar de un filamento de líquido (figura 1.8.6.4.), originando un gradiente de velocidad que estaría en la dirección del flujo. Esto es bastante diferente a lo que ocurre durante un flujo de cizalla, en el cual el gradiente de velocidad tiene lugar en una dirección perpendicular a la dirección de flujo. De la misma forma en que hay un esfuerzo y una velocidad de deformación en el flujo por cizalla, existen un esfuerzo extensional (también conocido como tensión),  $\sigma_e$ , y una velocidad de extensión,  $\dot{\epsilon}$ , de forma que su cociente permite obtener la viscosidad extensional uniaxial,  $\eta_e$ .

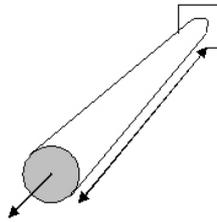


Figura 1.8.6.4. Diagrama para flujo extensional uniaxial, donde la tensión  $\sigma = F/A$ , y la velocidad de extensión,  $\dot{\epsilon} = V/L$

Entre las viscosidades extensional y de cizalla puede establecerse la siguiente relación para fluidos no newtonianos a bajas deformaciones (Dealy, 1994; Walters, 1975; Petrie, 1979):

$$\lim_{\dot{\epsilon}_h \rightarrow 0} \eta_E(\dot{\epsilon}_h) = 3 \lim_{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \eta(\dot{\gamma}) \quad (1.8.6.1.)$$

Para grandes deformaciones, no se han obtenido relaciones válidas para fluidos no newtonianos. La ecuación 1.8.6.1. se define para fluidos newtonianos de la siguiente manera:

$$\eta_E = 3\eta \quad (1.8.6.2.)$$

Además de esto, la principal diferencia entre la viscosidad extensional y de cizalla queda patente cuando se considera una suspensión diluida de fibras. Si el líquido sobre el que se encuentra suspendida la fibra se somete a cizalla, ésta se alinearía en la dirección del flujo, causando sólo una mínima perturbación sobre el líquido que la rodea. Por el contrario, si esa misma suspensión se somete a un flujo extensional, las

fibras se alinearían de la misma forma, pero presentando ahora una máxima resistencia al flujo, ya que el líquido sobre el que se encuentran suspendidas las fibras, al someterse a elongación, trata de estirarlas. Esto quedaría reflejado en la viscosidad de la suspensión, que disminuiría conforme las fibras se alinean con el flujo de cizalla, mientras que aumentaría conforme se alinean con el flujo extensional. (figura 1.8.6.5).

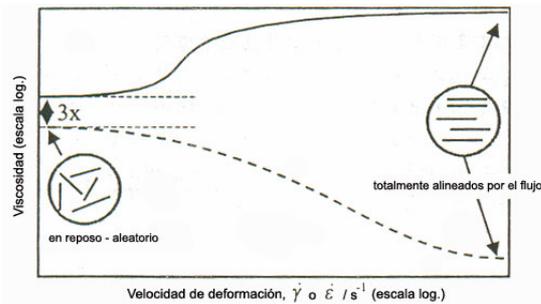


Figura 1.8.6.5. Las viscosidades de cizalla (línea de puntos) y extensional (línea continua) de una suspensión diluida de fibras, comparadas a velocidades de deformación comparables

En el caso de que la concentración de las fibras sea muy elevada, habría bastantes contactos entre las distintas fibras, siendo el número de estos contactos los que dominan la viscosidad.

### El número de Trouton

Trouton estableció una relación matemática entre la viscosidad extensional y la viscosidad de cizalla (Trouton, 1906), que denominó coeficiente de tracción viscosa. Actualmente, los datos de las viscosidades extensional y de cizalla son frecuentemente comparados mediante un cociente adimensional conocido como el número de Trouton ( $N_{Tr}$ ):

$$N_{Tr} = \frac{\text{viscosidad extensional}}{\text{viscosidad de cizalla}}$$

En todos los casos este cociente empieza en 3 para pequeñas velocidades de deformación, y entonces, en un punto crítico, empieza a aumentar.

Debido a que las viscosidades extensional y de cizalla son funciones de diferentes velocidades de deformación, se necesita un método de comparación que elimine cualquier tipo de ambigüedad. Jones y col. (1987), basándose en consideraciones del comportamiento de fluidos viscoelásticos e inelásticos, propusieron la siguiente ecuación para el cálculo del número de Trouton para flujo uniaxial:

$$(N_{Tr})_{uniaxial} = \frac{\eta_E(\dot{\epsilon}_h)}{\eta(\sqrt{3}\dot{\epsilon}_h)} \quad (1.8.6.3.)$$

Las viscosidades de cizalla son determinadas a velocidades de cizalla iguales a  $\sqrt{3}\dot{\epsilon}_h$  para flujo extensional uniaxial.

Altos valores del número de Trouton va acompañado de altos grados de elasticidad. Los sistemas coloidales donde no hay partículas en la microestructura que se puedan alinear presentan siempre un valor del número de Trouton igual a 3 (comportamiento elástico pobre).

El hecho de que el número de Trouton se acerque finalmente a un valor constante significa que las curvas de viscosidad extensional y de cizalla son paralelas en ese intervalo, y si el comportamiento se ajusta a la ley de la potencia, entonces el índice de ésta es el mismo en los dos casos.

### 1.8.7. Reometría capilar

Los viscosímetros de tubo son muy útiles para la obtención de datos reológicos. Estos instrumentos pueden dividirse en tres categorías: capilares de vidrio, para medidas de viscosidad cinemática, reómetros capilares y reómetros capilares de alta presión. En todos los casos se establece una diferencia de presión para producir un flujo. En este trabajo se ha utilizado un reómetro capilar de alta presión.

Los capilares de alta presión son conducidos mediante pistones o mediante gases. Los datos que mide un reómetro capilar son la caída de presión y la velocidad de flujo volumétrico. La caída de presión se determina a través de unos transductores de presión. En los capilares de alta presión, las velocidades de flujo se calculan asumiendo que el flujo volumétrico en el pistón y en el capilar son equivalentes.

Este reómetro permite la obtención de resultados de viscosidad extensional y de cizalla al mismo tiempo. La figura 1.8.7.1. muestra el comportamiento ideal de materiales con alta concentración de unidades que se puedan alinear, entre las que hay puntos de contacto o formación de entramados. La curva superior se corresponde con la viscosidad extensional, mientras que la inferior se corresponde con la viscosidad de cizalla. Existe una deformación crítica a la que la viscosidad extensional empieza a aumentar. Este comportamiento ideal puede explicarse de la siguiente forma: durante el flujo de cizalla y extensional las partículas o las cadenas poliméricas se alinean en la dirección del flujo. En el caso del flujo extensional, el material que está siendo estirado

trata a su vez deformar mediante estiramiento las partículas alineadas y el aumento de la viscosidad extensional está relacionado con la resistencia que oponen esas partículas a estirarse. Al contrario, en el flujo por cizalla la muestra puede moverse con menos resistencia cuando las partículas están alineadas; en esta situación, la viscosidad de cizalla disminuirá, mientras que la viscosidad extensional aumentará. La viscosidad extensional aumentará hasta que los entramados empiecen a romperse. En este momento, se observará una disminución en la viscosidad extensional.

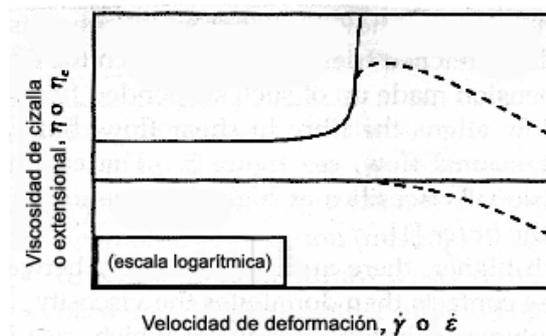


Figura 1.8.7.1. Viscosidad extensional y de cizalla de un entramado polimérico; los efectos dinámicos aparecen como líneas sólidas, y los efectos de pérdidas como líneas discontinuas (Barnes, 2000)

### Ecuación de Rabinowitsch-Mooney

Para el desarrollo de la ecuación de Rabinowitsch-Mooney es necesario asumir varias condiciones: el flujo es laminar y regular; los efectos terminales no son considerables; el fluido es incompresible; las propiedades no son funciones de la presión o el tiempo; la temperatura es constante; no hay deslizamiento en las paredes del tubo, es decir, la velocidad del fluido es cero en la pared; y las componentes de las velocidades radial y tangencial son cero.

En primer lugar, para la obtención de la ecuación de un viscosímetro de tubo es necesario realizar un balance de fuerzas. Se considera un fluido que fluye a través de un tubo horizontal de longitud  $L$  y radio interno  $R$ .

Una caída de presión ( $\delta P$ ) sobre una longitud fija ( $L$ ) es la causante del flujo.



Figura 1.8.7.2. Fluido en una geometría tipo tubo

El balance de fuerzas, igualando el esfuerzo de cizalla causante del flujo con el esfuerzo de cizalla resultante de la resistencia al flujo (por parte del fluido) en un tubo de longitud L, considerando un radio r y longitud L conduce a

$$(\delta P)\pi r^2 = \sigma 2\pi r L \quad (1.8.7.1.)$$

que puede ser resuelta para el esfuerzo de cizalla:

$$\sigma = f(r) = \frac{(\delta P)\pi r^2}{2\pi r L} = \frac{(\delta P)r}{2L} \quad (1.8.7.2.)$$

Esta ecuación describe la variación del esfuerzo de cizalla a lo largo del tubo desde cero en el centro (r=0) a un valor máximo en la pared (r=R), donde la ecuación puede ser escrita como:

$$\sigma_p = \frac{(\delta P)R}{2L} \quad (1.8.7.3.)$$

Es necesaria la introducción de un elemento diferencial de flujo para el desarrollo de las ecuaciones para la velocidad de cizalla. Esto se consigue mediante la consideración de un flujo laminar y regular de un fluido que se mueve a través de un anillo localizado entre r y r + dr:

$$dQ = u 2\pi r dr \quad (1.8.7.4.)$$

donde u es la velocidad lineal en r. La velocidad del flujo volumétrico total se determina mediante la siguiente integración:

$$Q = \int_0^Q dQ = \pi \int_0^R u 2r dr \quad (1.8.7.5.)$$

integrando por partes, es posible escribir:

$$Q = 2\pi \left[ \left[ \frac{r^2}{2} u \right]_0^R - \int_0^R \frac{r^2}{2} du \right] \quad (1.8.7.6.)$$

Asumiendo que no hay deslizamiento, por lo que la velocidad del fluido en la paredes sería cero, matemáticamente u=0 a r=R, entonces, el primer término de esta ecuación sería cero.

$$Q = -\pi \int_0^R r^2 du = -\pi \int_0^R r^2 \frac{du}{dr} dr = -\pi \int_0^R r^2 \dot{\gamma} dr \quad (1.8.7.7.)$$

Sustituyendo  $r = \frac{\sigma}{\sigma_w} R$ ,  $dr = \frac{R}{\sigma_w} d\sigma$  y la velocidad de cizalla aparente

$\Gamma = \frac{4Q}{\pi R^3}$ , se obtiene:

$$\Gamma = \frac{4}{\sigma_w^3} \int_0^{\sigma_w} \sigma^2 \dot{\gamma} d\sigma \quad (1.8.7.8.)$$

A partir de la solución de esta última integral se obtiene la ecuación de Rabinowitsch-Mooney:

$$\dot{\gamma}_w = \frac{3}{4} \Gamma + \frac{1}{4} \sigma_w \frac{d\Gamma}{d\sigma_w} \quad (1.8.7.9.)$$

que puede ser reescrita de forma más simple como sigue:

$$\dot{\gamma}_w = \frac{3n'+1}{4n'} \Gamma \quad (1.8.7.10.)$$

donde  $n' = \frac{d(\ln \sigma_w)}{d(\ln \Gamma)}$  es la pendiente de  $\ln \sigma_w$  versus  $\ln \Gamma$  en cualquier punto.

Si el comportamiento de un fluido se ajusta a un modelo potencial, la pendiente de la derivada es una línea recta y  $n'=n$ . Esta ecuación es una forma conveniente de la ecuación de Rabinowitsch-Mooney, porque el comportamiento potencial se observa frecuentemente en fluidos alimentarios.

### Corrección de los resultados

En los viscosímetros de tubo pueden ocurrir numerosos errores de medida. Algunos son aplicables de forma general, mientras que otros se aplican sólo a sistemas específicos.

Las pérdidas de energía debida a divergencia del fluido al final del capilar son pequeñas y usualmente despreciables, pero las pérdidas en la entrada pueden ser muy significativas y deben ser evaluadas. La corrección del efecto de entrada tiene en cuenta la pérdida de presión debida a contracción brusca que tiene lugar en la apertura del viscosímetro de tubo (entrada de la boquilla). Esta pérdida es el resultado de una convergencia repentina y a pérdidas en la energía cinética. Este problema puede ser evaluado experimentalmente utilizando tubos con diferente relación longitud-diámetro (L/D) (Bagley, 1957). Se recogerían datos de la caída de presión total versus la velocidad de flujo para cada tubo. La caída de presión versus L/D se representa para

cada velocidad de flujo y las líneas se extrapolarían a L/D cero. Este tipo de representaciones se denominarían representaciones de Bagley (figura 1.8.7.3.).

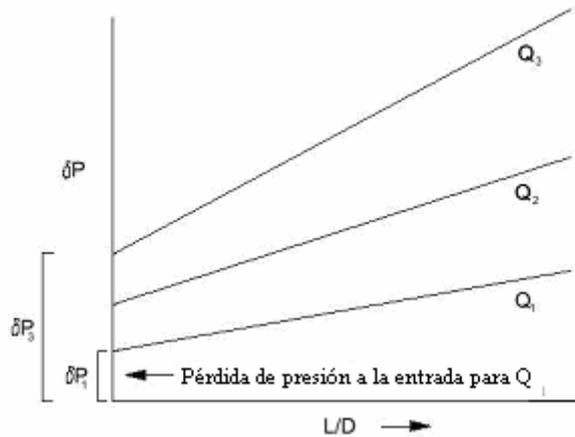


Figura 1.8.7.3. Representación de Bagley

La pérdida de presión resultante es el efecto de entrada para una velocidad de flujo y un diámetro de tubo determinado. Para lograr una mayor precisión, el mismo procedimiento debe realizarse para cada diámetro en consideración usando diferentes tubos (al menos, tres) con el mismo diámetro y diferentes longitudes.

Las pérdidas de presión a la entrada también han sido evaluadas mediante la sustracción de los datos obtenidos durante el flujo a través de un orificio (L=0). Estos cálculos se han hecho con un orificio y un capilar del mismo diámetro, utilizando datos tomados a velocidades de flujo volumétrico equivalentes.

La pérdida de presión a la entrada se utiliza para corregir los valores de caída de presión medidos con el reómetro:

$$\delta P = \delta P_m - \delta P_{en} \quad (1.8.7.11.)$$

donde  $\delta P_m$  es la caída de presión medida, y  $\delta P_{en}$  es la pérdida de presión a la entrada. Los valores corregidos de  $\delta P$  son utilizados para el cálculo del esfuerzo de cizalla en la pared.

### Flujo extensional a través de una boquilla convergente

El flujo hacia una boquilla convergente implica una pérdida de energía debida a la cizalla y una pérdida adicional debida a la extensibilidad (estiramiento) del fluido. El flujo convergente es difícil de controlar porque depende de las propiedades del fluido. Además, no es puramente extensional, sino que es una combinación de deformaciones

extensionales y de cizalla. A continuación se describirá cómo se pueden separar la caída de presión en la entrada en dos componentes: una debida a la cizalla y otra debida a la extensión.

*Ecuaciones de Cogswell*

Cogswell (1972) asumió que la caída de presión a la entrada en un área de flujo convergente, desde un depósito circular hasta una boquilla capilar estaba compuesta por dos componentes, uno relacionado con el flujo de cizalla y otro relacionado con el flujo extensional (figura. 1.8.7.4.):

$$\delta P_{en} = \delta P_{en,S} + \delta P_{en,E} \tag{1.8.7.11.}$$

Se asume la ausencia de deslizamiento en la pared.

La caída de presión debida a la cizalla puede ser deducida considerando la caída diferencial de presión, basada en la forma potencial de la ecuación de la velocidad de flujo, a lo largo de una longitud  $dl$  en un radio  $r$  (figura 1.8.7.5.):

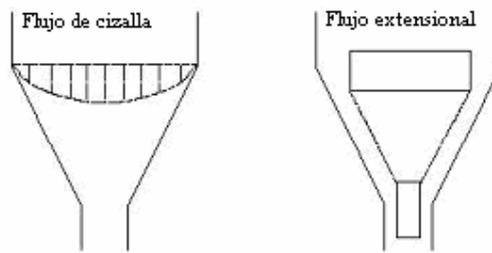


Figura 1.8.7.4. Componentes del flujo de cizalla (mostrando perfil de velocidades) y extensional, como consecuencia de la caída de presión durante la convergencia

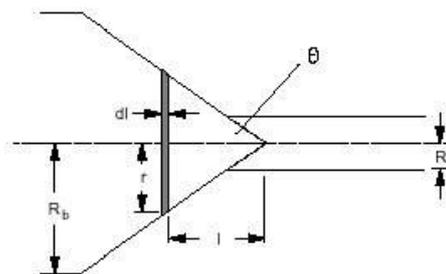


Figura. 1.8.7.5. Geometría para el flujo convergente desde un depósito de radio  $R_b$  a una boquilla capilar de radio  $R$

$$d(\delta P_{en,S}) = \frac{Q^n}{r^{3n+1}} \left( \frac{3n+1}{\pi n} \right)^n 2Kdl \tag{1.8.7.12.}$$

Sustituyendo  $r/l = \tan\theta$ ,  $dl = dr/\tan\theta$  en esta ecuación,

$$d(\delta P_{en,S}) = \frac{Q^n}{r^{3n+1}} \left( \frac{3n+1}{\pi n} \right)^n \frac{2K}{\tan \theta} dr \quad (1.8.7.13.)$$

integrando entre la boquilla (R) y el depósito (R<sub>b</sub>):

$$\int_0^{\delta P_{en,S}} d(\delta P_{en,S}) = \int_R^{R_b} \frac{Q^n}{r^{3n+1}} \left( \frac{3n+1}{\pi n} \right)^n \frac{2K}{\tan \theta} dr \quad (1.8.7.14.)$$

que conduce a :

$$\delta P_{en,S} = \Gamma^n \left( \frac{3n+1}{4n} \right)^n \frac{2K}{3n \tan \theta} \left( 1 - \frac{R}{R_b} \right)^{3n} \quad (1.8.7.15.)$$

donde  $\Gamma=4Q/(\pi R^3)$ , es la velocidad de cizalla aparente en la pared de la boquilla.

La velocidad volumétrica media en cualquier sección de corte de la boquilla

es:

$$\bar{u} = \frac{Q}{\pi r^2} = \frac{Q}{\pi l^2 \tan^2 \theta} \quad (1.8.7.16.)$$

Esta ecuación puede ser derivada para obtener la velocidad de deformación extensional media a cada sección de corte:

$$\dot{\epsilon}_E = -\frac{d\bar{u}}{dl} = \frac{-(-2Q)}{\pi l^3 \tan^2 \theta} = \frac{Q \tan \theta}{\pi r^3} \quad (1.8.7.17.)$$

Al contrario que lo que ocurría con la velocidad de cizalla, esta expresión no depende de la forma del perfil de velocidades. La caída de presión diferencial, debida a la disipación de energía extensional, puede ser escrita en término del esfuerzo extensional medio que actúa sobre un anillo:

$$(d\delta P_{en,E}) \pi r^2 = \sigma_E (\pi(r+dr)^2 - \pi r^2) \quad (1.8.7.18.)$$

como  $(dr)^2$  es despreciable:

$$(d\delta P_{en,E}) = 2\sigma_E \frac{dr}{r} \quad (1.8.7.19.)$$

Si la relación potencial entre el esfuerzo medio y la velocidad de deformación media,  $\sigma_E = K_E (\dot{\epsilon}_E)^m$ , es válida, es posible escribir la caída de presión debida al flujo extensional como una función del radio:

$$(d\delta P_{en,E}) = 2K_E \left( \frac{2Q \tan \theta}{\pi r^3} \right)^m \frac{dr}{r} \quad (1.8.7.20.)$$

Cuando se integra esta ecuación entre el radio del capilar (R) y el radio del depósito (R<sub>b</sub>), se obtiene la componente de la pérdida de presión a la entrada debida al flujo extensional:

$$(d\delta P_{en,E}) = \Gamma^m \left( \frac{2K_E}{3m} \right) \left( \frac{\tan \theta}{2} \right)^m \left( 1 - \left( \frac{R}{R_b} \right)^{3m} \right) \quad (1.8.7.21.)$$

Esta ecuación puede escribirse en forma logarítmica:

$$\ln(d\delta P_{en,E}) = m \ln \Gamma + \ln \left[ \left( \frac{2K_E}{3m} \right) \left( \frac{\tan \theta}{2} \right)^m \left( 1 - \left( \frac{R}{R_b} \right)^{3m} \right) \right] \quad (1.8.7.22.)$$

que puede ser usada en un análisis de regresión para el cálculo de m a partir de la pendiente de la línea, y K<sub>E</sub> a partir del punto de corte. Valores de K<sub>E</sub> y m pueden ser usados para calcular la viscosidad extensional media:

$$\eta_E = K_E (\dot{\epsilon}_{E,R})^{m-1} \quad (1.8.7.23.)$$

donde  $\dot{\epsilon}_{E,R}$  es la velocidad de deformación extensional media en la boquilla (donde r=R)

$$\dot{\epsilon}_{E,R} = \frac{\Gamma \tan \theta}{2} \quad (1.8.7.24.)$$

Utilizando las ecuaciones anteriores, se puede calcular la viscosidad extensional a partir de los datos para la presión a la entrada de la boquilla, de la siguiente forma:

1. Determinar la pérdida total de presión a la entrada ( $\delta P_{en}$ ) utilizando el procedimiento de Bagley presentado anteriormente. Además, determinar los parámetros reológicos del flujo de cizalla (K, n) utilizando para ello métodos estándares en la reometría capilar. Aunque puede ser conveniente encontrar las propiedades de cizalla a partir de los resultados del capilar, cualquier técnica reológica puede ser utilizada para calcular K y n.

2. Determinar la caída de presión en la convergencia debida al flujo de cizalla,  $\delta P_{en,S}$ .
3. Sustraer ésta de la  $\delta P_{en}$  determinada en el paso 1, para obtener así la componente de la caída de presión a la entrada debida al flujo extensional,  $\delta P_{en,E}$ .
4. Utilizar la ecuación. 1.8.7.22. en análisis de regresión para evaluar  $m$  y  $K_E$ . Calcular la velocidad de deformación y la viscosidad extensional a partir de las ecuaciones 1.8.7.23 y 1.8.7.24, respectivamente.

Las ecuaciones precedentes describen el comportamiento de forma aceptable para boquillas con ángulos de hasta  $45^\circ$  aproximadamente (Gibson, 1988).

Cogswell (1972) formuló expresiones para el esfuerzo extensional medio neto y para la deformación extensional neta para boquillas de entrada plana como:

$$\sigma_E = \frac{3}{8}(n+1)\delta P_{en} \quad (1.8.7.25.)$$

y

$$\varepsilon = \frac{4\eta\Gamma^2}{3(n+1)\delta P_{en}} \quad (1.8.7.26.)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad de cizalla aparente, basada en una relación potencial:

$$\eta = K\Gamma^{(n-1)}$$

La viscosidad extensional media se determina fácilmente:

$$\eta_E = \frac{\sigma_E}{\dot{\varepsilon}_E} = \frac{9(n+1)^2(\delta P_{en})^2}{32\eta\Gamma^2} \quad (1.8.7.27.)$$

Esta ecuación es apropiada para hacer una rápida comparación entre fluidos.

## **1.9. Reología de emulsiones**

### **1.9.1. Generalidades**

El conocimiento de las propiedades reológicas de las emulsiones es importante por varias razones (Sherman, 1970, Dickinson y Stainsby, 1982; Race, 1991; Rao y col., 1995; Rao, 1995). Muchos de los atributos sensoriales de las emulsiones alimentarias están directamente relacionados con sus propiedades reológicas, como la cremosidad o la fluidez. Información sobre la reología de los alimentos es utilizada por los ingenieros a la hora de diseñar las operaciones del proceso que dependen del modo en que el alimento fluye a lo largo de un tubo o de la manera en que se comporta cuando se agita.

Las emulsiones alimentarias son materiales complejos composicional y estructuralmente, que pueden mostrar un amplio intervalo de comportamientos reológicos, desde fluidos de baja viscosidad (como la leche o zumos) a sólidos bastante duros (como la margarina refrigerada). Las propiedades reológicas de una emulsión dependen del tipo y concentración de los ingredientes que contiene y de las condiciones de procesado y almacenamiento (McClements, 1999).

Muchas emulsiones están constituidas estructuralmente por una red tridimensional, originada por un proceso de floculación extensiva de gotas. Cuando se someten a un esfuerzo de cizalla suficientemente elevado, tiene lugar una ruptura de su estructura interna. Las medidas reológicas realizadas bajo estas condiciones se corresponden con respuestas no lineales.

Con el objeto de obtener información estructural de interés, es útil realizar medidas tanto en la región lineal, donde el esfuerzo es tan pequeño que no produce ruptura estructural, como en la región no lineal, más acorde con las condiciones de flujo y deformación a las que las emulsiones se someten en la práctica.

### **1.9.2. Comportamiento de flujo en estado estacionario**

Una de las características más importantes de una emulsión es su comportamiento de flujo viscoso, ya sea desde un punto de vista técnico como en relación a las propiedades físicas y estructurales del producto final y a la función a la que está destinada.

Se ha comprobado que emulsiones muy diluidas ( $\Phi < 0,01$ ) muestran un comportamiento newtoniano, que depende fundamentalmente de la fracción de fase

dispersa. Einstein derivó una ecuación que relacionaba la viscosidad de una suspensión de esferas rígidas con fracción en volumen de fase dispersa:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_c} = 1 + 2,5\phi \quad (1.9.2.1.)$$

donde  $\eta_c$  es la viscosidad de la fase continua.

Esta ecuación asume que el líquido es newtoniano, que las partículas son rígidas y esféricas, que no hay interacciones partícula-partícula, que no hay deslizamiento en la interfase aceite/agua y que los efectos del movimiento Browniano son despreciables.

Al aumentar la fracción en volumen de fase dispersa, la relación entre ésta y la viscosidad se convierte en una función cada vez más compleja, como la siguiente, que tiene en consideración las interacciones hidrodinámicas entre las gotas (Batchelor, 1977):

$$\eta = \eta_0 (1 + a\Phi + b\Phi^2 + c\Phi^3 + \dots) \quad (1.9.2.2.)$$

donde los coeficientes se pueden determinar experimental o teóricamente. Esta ecuación es válida para emulsiones ligeramente concentradas ( $\Phi \leq 0,2$ ), no floculadas, donde las únicas interacciones entre gotas que existen son las hidrodinámicas.

También es necesario tener en cuenta el tamaño de gota, ya que la viscosidad generalmente aumenta al disminuir éste, y la polidispersión de tamaños (Rahalkar, 1992). Uno de los modelos propuestos que relacionan el tamaño de gota y la fracción de fase dispersa es el propuesto por Sherman (1983):

$$\eta_{(\Sigma_i)} = \eta_c \left[ \prod_{i=1}^n \exp\left(\frac{\phi_i}{1 - k_i \phi_i}\right) \right] \quad (1.9.2.3.)$$

siendo  $\Phi_i$  la fracción de fase dispersa en volumen de cada diámetro.

Sin embargo, la mayoría de las emulsiones concentradas muestran un comportamiento no newtoniano. Este comportamiento se ha relacionado tanto con la floculación de gotas de fase dispersa como con las características no newtonianas de la fase continua (Pal, 1992). Las curvas de flujo corresponden generalmente a las de un fluido estructural, aunque dependiendo de la fracción en volumen de fase dispersa es

posible que no puedan observarse todas las regiones que caracterizan a este tipo de comportamiento (Pal y Rhodes, 1989; Otsubo y Prud'homme, 1994; Partal y col., 1994). La variación de la viscosidad con la velocidad de cizalla o el esfuerzo ha sido descrita generalmente mediante diversos modelos, como los de Wilkinson o Carreau (Pal, 1992; Franco y col., 1995b, 1998b). Estas curvas de flujo son el resultado de una dramática ruptura estructural que puede atribuirse tanto a un proceso irreversible (coalescencia entre gotas), como a uno reversible (defloculación, deformación de gotas,...) (Figoni y Shoemaker, 1983).

Consecuentemente, las relaciones entre viscosidad y fracción en volumen en fase dispersa de este tipo de emulsiones debe incluir la influencia de la velocidad de cizalla.

Un método propuesto para describir la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla y la fracción en volumen de fase dispersa simultáneamente, es el propuesto por Partal y col. (1994). Este método se basa en la superposición de curvas de flujo de emulsiones con diferente fracción en volumen de fase dispersa, empleando un factor de superposición empírico,  $a(\Phi)$ . La relación entre este factor de superposición y la fracción en volumen, se puede describir por una ecuación del tipo Frankel-Acrivos:

$$\frac{1}{a(\phi)} = \left[ \left( \frac{\phi_m}{\phi_0} \right)^{1/3} - 1 \right] \cdot \left[ \frac{(\phi/\phi_m)^{1/3}}{1 - (\phi/\phi_m)^{1/3}} \right] \quad (1.9.2.4.)$$

donde  $\Phi_0$  es la fracción en volumen de referencia.

### 1.9.3. Viscoelasticidad lineal

La mayoría de las emulsiones alimentarias se comportan como líquidos viscoelásticos. Su respuesta en ensayos de fluencia (Creep) ha sido descrita usando diversos modelos analógicos, como el modelo de Kelvin-Voigt, con dos tiempos de relajación característicos, descrito anteriormente. Este modelo se ha usado para caracterizar el comportamiento de fluencia de una amplia variedad de emulsiones (Rivas y Sherman, 1983a, 1983b; Gladwell y col., 1985, 1986; Madiedo y col., 1994b).

Los primeros autores que realizaron ensayos oscilatorios demostraron que la evolución de los módulos de pérdida y de almacenamiento con la frecuencia es extremadamente dependiente de la concentración de la emulsión, condiciones de

procesado y naturaleza del emulsionante usado (Gallegos y col., 1992a; Tadros, 1993; Barnes, 1994; Franco y col., 1998a).

Por ejemplo, en la respuesta de mayonesas comerciales (Bower y col., 1999) se ha encontrado que el módulo de almacenamiento presenta valores mayores que el módulo de pérdidas en un amplio intervalo de frecuencias, con un mínimo en este último a frecuencias intermedias, y una región “plateau” de  $G'$  (figura 1.9.3.1.(a)). Este comportamiento corresponde a emulsiones extensamente floculadas, donde las interacciones entre las gotas de la fase dispersa conducen a la formación de una red estructural.

Por el contrario, en emulsiones O/W no floculadas o débilmente floculadas, se ha demostrado que incluso en sistemas concentrados, el módulo de pérdidas presenta valores superiores al módulo de almacenamiento hasta frecuencias que pueden ser cercanas a unos 10 rad/s (figura 1.9.3.1.(b)) (Tadros, 1990, 1993; Bower y col., 1999).

Estos resultados se explican en base a que, a pequeñas fracciones de fase dispersa, la separación entre gotas es mayor que el doble del espesor de la capa adsorbida y por lo tanto las interacciones repulsivas entre éstas son relativamente débiles, por lo que la emulsión muestra un carácter predominantemente viscoso. A mayores fracciones de fase dispersa, la separación entre gotas es menor, por lo que las capas adsorbidas se comprimen, conduciendo a fuertes repulsiones estéricas, mostrando la emulsión una respuesta predominantemente elástica (Tadros, 1993).

En la respuesta de otros sistemas, como algunos estabilizados con sucroéster de alto HLB, aparecen tres regiones características; una región pseudoterminal a bajas frecuencias con una tendencia a un cruce entre ambas funciones viscoelásticas, una región “plateau” intermedia y el comienzo de una región de transición a elevadas frecuencias (figura 1.9.3.1.(c)) (Franco y col., 1995c, 1997; Guerrero y col., 1996).

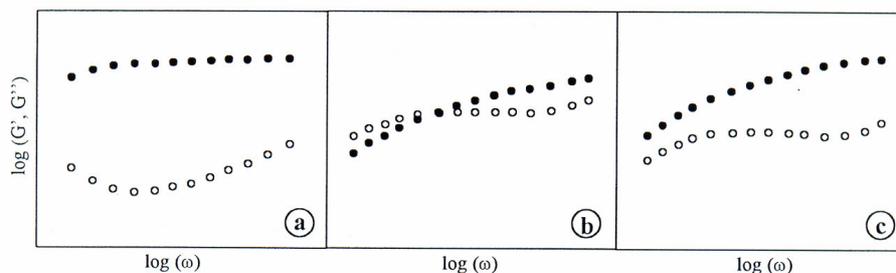


Figura 1.9.3.1. Distintos comportamientos que presentan las emulsiones en ensayos dinámicos ( $\bullet$   $G'$ ,  $\circ$   $G''$ )

En el espectro de relajación lineal de estas emulsiones pueden distinguirse como máximo tres zonas cuando éste se representa en escala doblemente logarítmica. Una primera zona correspondiente a bajos tiempos de relajación, en la que el espectro disminuye de forma continua que corresponde a la zona de transición. Una segunda zona, correspondiente a la zona “plateau” a valores intermedios de tiempos de relajación, en la que el espectro o bien permanece prácticamente constante o bien aumenta con el tiempo de relajación. Finalmente, a partir de un determinado tiempo de relajación denominado tiempo de relajación terminal, el espectro vuelve a disminuir potencialmente (figura 1.9.3.2.).

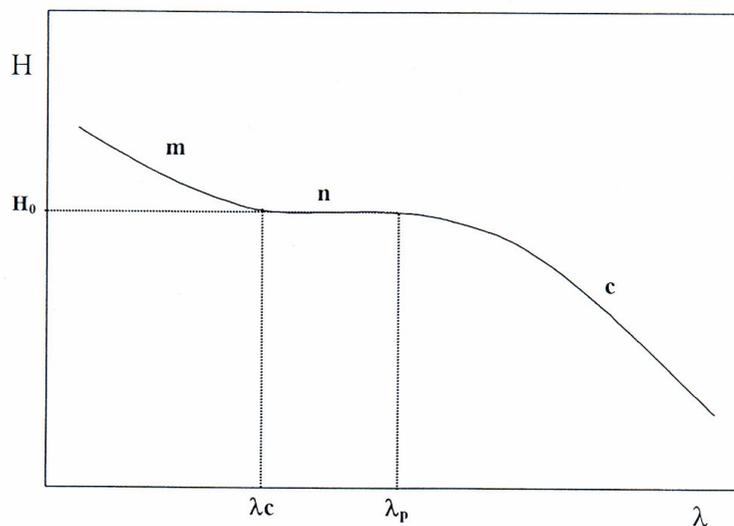


Figura 1.9.3.2. Representación típica de un espectro de relajación

Existen varios modelos empíricos que describen satisfactoriamente las tres regiones experimentales que aparecen en el espectro de relajación lineal de estas emulsiones, como el que se presenta a continuación, adaptación del modelo De Rosa y Winter (1994):

$$H(\lambda) = A \left[ \left( \frac{\lambda}{\lambda_c} \right)^m + \left( \frac{\lambda}{\lambda_p} \right)^n \right] \quad \text{para } \lambda_{\min} < \lambda < \lambda_p \quad (1.9.3.1)$$

$$H(\lambda) = A \left( \frac{\lambda}{\lambda_p} \right)^c \quad \text{para } \lambda_p < \lambda < \lambda_{\max} \quad (1.9.3.2)$$

donde  $\lambda_c$  y  $\lambda_p$  son los tiempos de relajación característicos para el comienzo de las regiones plateau y pseudoterminal respectivamente,  $\lambda_{\max}$  y  $\lambda_{\min}$  son los recíprocos de las frecuencias mínimas y máximas conseguidas experimentalmente, m, n y c son los exponentes de las potencias de las tres regiones y A es una constante empírica. Este modelo se ha aplicado satisfactoriamente a emulsiones modelo del tipo de las salsas para ensalada (Franco y col., 1995b, 1997).

Otros autores (Madiedo y Gallegos, 1997) han propuesto un modelo empírico distinto que describe las tres regiones del espectro de relajación de emulsiones O/W estabilizadas con una mezcla de dos sucroésteres con diferentes valores de HLB:

$$H(\lambda) = \frac{\alpha\lambda^m + \beta\lambda^n}{1 + \left(\frac{\lambda}{\lambda_p}\right)^p} \quad (1.9.3.3.)$$

En este modelo, m, n y p son respectivamente, las pendientes de las zonas de transición, plateau y pseudoterminal,  $\lambda_p$  es el tiempo de relajación pseudoterminal y los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  están relacionados mediante las siguientes expresiones:

$$\alpha = \frac{H_0 m}{(m-n)\lambda_0^m} \quad (1.9.3.4.)$$

$$\beta = \frac{1}{\lambda_0^n} \frac{nH_0}{(n-m)} \quad (1.9.3.5.)$$

donde  $H_0$  es el valor mínimo del espectro de relajación, que aparece entre las regiones plateau y de transición y  $\lambda_0$  es el tiempo de relajación que corresponde a este mínimo. Este modelo contempla una suave transición entre las regiones plateau y pseudoterminal, en contraste con el modelo BSW-CW.

La aparición de dos o tres regiones en el espectro de relajación también depende de las condiciones de procesado y del emulsionante empleado (Gallegos y col., 1992a; Guerrero y col, 1996).

Otro parámetro de gran interés, característico de cada material es el módulo “plateau”,  $G_N^0$ , que se define como la extrapolación de la contribución de los

entrecruzamientos a  $G'$  a altas frecuencias (Baumgaertel y col., 1992). Este parámetro aparece por primera vez en reología de polímeros y se relaciona con la formación de entrelazamientos entre las cadenas poliméricas (Ferry, 1980; De Rosa y Winter, 1994). Haciendo una analogía, el módulo plateau se relaciona en reología de emulsiones con la formación de una red estructural formada a partir de una floculación extensiva de gotas de aceite (Franco y col., 1995b, 1998a), que puede dar lugar a un entramado elástico tipo gel.

El módulo plateau se puede estimar como el valor de  $G'$  a la frecuencia en que se encuentra un mínimo en la evolución de la tangente de pérdidas (Wu, 1989):

$$G_N^0 = [G']_{\text{tg } \delta \rightarrow \text{mínimo}} \quad (1.9.3.6.)$$

Debido a la presencia de estos entrelazamientos que proporcionan un alto grado de estructuración interna a emulsiones extensamente floculadas, las siguientes relaciones entre la viscosidad de flujo estacionario y la viscosidad en cizalla oscilatoria, que se encontraron en el caso de líquidos poliméricos, no se cumplen, como demostraron Bistany y Kokini (1983).

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta'(\omega) \Big|_{\dot{\gamma}=\omega} \quad (1.9.3.7.)$$

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta^*(\omega) \Big|_{\dot{\gamma}=\omega} \quad (1.9.3.8.)$$

La ecuación 1.9.3.7. se conoce como la regla de Cox-Merz (Cox y Merz, 1958) y se aplica a elevadas velocidades de cizalla y frecuencias, mientras que la ecuación 1.9.3.8. posee mayor validez a bajos valores de velocidades de cizalla y frecuencias.

#### **1.9.4. Viscoelasticidad no lineal**

Diferentes autores han estudiado el comportamiento de flujo transitorio de emulsiones alimentarias en condiciones no lineales (Figoni y Shoemaker, 1983; Campanella y Peleg, 1987; Gallegos y col., 1988b, 1992b). Todos ellos encontraron la existencia de un sobreesfuerzo seguido de una caída del esfuerzo de cizalla hasta un valor de equilibrio de éste. Este comportamiento se ha justificado desde dos puntos de

vista diferentes: tixotropía y viscoelasticidad no lineal. Desde el punto de vista de la tixotropía, algunos autores han intentado describir este comportamiento utilizando un modelo cinético, suma de dos funciones cinéticas de primer orden, donde las constantes cinéticas se relacionan con dos procesos inducidos por la cizalla, defloculación y coalescencia de gotas de aceite (Figoni y Shoemaker, 1983; Gallegos y col., 1988).

Sin embargo, teniendo en cuenta que estos ensayos transitorios pueden considerarse una respuesta viscoelástica no lineal, otros autores (Campanella y Peleg, 1987; Gallegos y col., 1992b; Gallegos y Franco, 1995; Partal, 1995) han aplicado eficazmente una variante del modelo integral de Wagner (Wagner, 1976) que se puede representar por la siguiente ecuación:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t-t')h(\gamma)\dot{\gamma}(t,t')dt' \quad (1.9.4.1.)$$

En general, los autores citados han demostrado que el modelo de Wagner modificado, introduciendo la ecuación de Soskey-Winter en la función amortiguación (ecuación 1.16.4.2.) (Soskey y Winter, 1984), predice de forma aceptable el comportamiento de flujo transitorio de emulsiones aceite/agua y el comportamiento de flujo estacionario, aunque presenta ciertas deficiencias en los casos en los que la acción de la cizalla induce significantes cambios estructurales (Gallegos y Franco, 1999a).

$$h(\gamma) = \frac{1}{a + \gamma^b} \quad (1.9.4.2.)$$

Ensayos de relajación del esfuerzo tanto dentro como fuera del intervalo viscoelástico lineal, proporcionan información de interés en el estudio del comportamiento viscoelástico no lineal de las emulsiones, fundamentalmente como medio para obtener los valores de la función amortiguación  $h(\gamma)$ , relacionada directamente con el grado de destrucción estructural que se produce por la acción de la cizalla (Franco, 1995).

### 1.9.5. Microestructura y reología de emulsiones

A continuación se describen los parámetros estructurales que ejercen una mayor influencia en la reología de las emulsiones (Barnes, 1994; McClements, 1999):

### *Concentración de fase dispersa*

En general, la viscosidad de una emulsión aumenta con la concentración de fase dispersa. En el apartado 1.9.2. se presentan diversas ecuaciones que relacionan la viscosidad y la fracción en volumen de fase dispersa, distinguiendo entre emulsiones diluidas y concentradas.

La mayoría de las emulsiones diluidas presentan un comportamiento newtoniano. Sin embargo, a partir de una concentración crítica de fase dispersa, las gotas están altamente empaquetadas, de manera que debido a la proximidad entre las gotas entran en juego una serie de interacciones interparticulares, que determinan la dependencia de la viscosidad con la concentración de fase dispersa. Consecuentemente, emulsiones concentradas manifiestan un comportamiento no newtoniano y viscoelástico.

### *Tamaño y distribución de tamaños de gota*

El tamaño de gota afecta a la reología de la emulsión de diferentes formas. La viscosidad de emulsiones diluidas es independiente del tamaño de gota cuando no existen interacciones atractivas o repulsivas entre éstas (Pal y col., 1992; Pal, 1996). En cambio, en el caso de emulsiones concentradas, la naturaleza y la intensidad de las interacciones interparticulares dependen de éste.

En general, el área interfacial disponible para las interacciones entre gotas es mayor al disminuir su tamaño, por lo que existe una tendencia generalizada a aumentar, tanto la viscosidad como las propiedades viscoelásticas de las emulsiones, al disminuir el tamaño de gota, como consecuencia de un aumento de las interacciones entre éstas (Sánchez y col., 2000).

Aunque es necesario tener presente que al disminuir el tamaño de gota y consecuentemente, aumentar el área interfacial, es mayor la cantidad de emulsionante requerido para cubrir toda esta interfase. Si el emulsionante no se encuentra en exceso, esta reducción en el tamaño de gota puede conducir a una menor estabilidad de la emulsión (Barnes, 1994).

Por otra parte, en emulsiones que contienen gotas no floculadas, la máxima fracción de empaquetamiento depende de la polidispersidad de tamaños. Las gotas son capaces de empaquetarse más eficazmente cuando son polidispersas, ya que las gotas pequeñas rellenan los huecos que dejan las grandes y, por lo tanto, la viscosidad de una

emulsión concentrada polidispersa es menor que la emulsión monodispersa con la misma fracción en volumen de gotas, ya que una mayor eficiencia en el empaquetamiento genera una menor resistencia estructural al flujo y por tanto, una menor viscosidad (Moros, 2000).

De igual forma, el empaquetamiento de gotas es mayor si éstas son deformables, ya que se adaptan mejor a los huecos que si son rígidas, por lo que una mayor deformabilidad de gotas genera emulsiones menos viscosas.

Asimismo, en estudios realizados con emulsiones concentradas estabilizadas con un tensioactivo no iónico de bajo peso molecular, se ha encontrado un comportamiento más clásico, caracterizado por mayores valores del módulo de almacenamiento y una zona plateau en el espectro mecánico más desarrollada, en emulsiones con distribuciones de tamaños de gotas monomodales, respecto a emulsiones con distribuciones bimodales, independientemente del tamaño de gota (Sánchez y col., 1998, 2000).

#### *Interacciones interparticulares*

La naturaleza y la magnitud relativa de las interacciones entre las gotas de una emulsión, tanto atractivas (van der Waals, hidrofóbicas,...), como repulsivas (principalmente, estéricas y electrostáticas), determinan, además de su estabilidad, su comportamiento reológico.

De esta forma, un pequeño incremento en las fuerzas de van der Waals que implique una atracción débil entre las gotas es deseable si conduce a la formación de un entramado estructural que estabiliza la emulsión y aumenta su viscosidad y su viscoelasticidad. Sin embargo, fuerzas de van der Waals más intensas conducen a la formación de agregados individuales, lo que es indeseable. En el límite (con fuerzas de van der Waals causando floculación extrema) el sistema puede desestabilizarse en dos fases, teniendo lugar la separación entre agregados y el líquido circundante, lo que conduce a una menor viscosidad y a veces a un comportamiento newtoniano.

Por otra parte, cuando las partículas en una emulsión diluida están eléctricamente cargadas, una doble capa de iones rodea a cada partícula. Cuando se cizalla, esa doble capa se deforma, produciéndose un incremento de energía de disipación y como consecuencia un incremento de viscosidad. Este efecto, denominado

“primer efecto electroviscoso” (Booth, 1950) es generalmente pequeño y no significativo, especialmente para sistemas con una baja constante dieléctrica.

En emulsiones más concentradas, la doble capa puede interactuar o solaparse y las repulsiones mutuas pueden causar un incremento de la viscosidad. Este hecho es conocido como “segundo efecto electroviscoso” (Harmsen y col., 1953). En general, un aumento de la interacción de la doble capa conduce a un producto viscoso y viscoelástico y, en definitiva, estable.

Por otra parte, la presencia de estabilizantes estéricos en la interfase normalmente conduce a productos de elevada viscosidad y/o viscoelasticidad.

En el caso de emulsiones estabilizadas mediante proteínas, las cadenas proteicas que se encuentran adsorbidas en la interfase de diferentes gotas y en el medio continuo pueden interactuar, formando una red interna interparticular y proporcionando a la emulsión un comportamiento de tipo gel débil, de elevada viscosidad y viscoelasticidad. La formación de estas interacciones se puede favorecer modificando la fuerza iónica, con el objeto de reducir las repulsiones electrostáticas (Hunt y Dalgleish, 1994; Demetriades y col., 1997), aumentando la temperatura para inducir un cierto grado de desnaturalización de las proteínas y así elevar la atracción hidrofóbica entre éstas (Dickinson y Casanova, 1999), o ajustando el pH hasta un valor cercano a su punto isoeléctrico.

En general, cuando se reduce el pH en emulsiones estabilizadas por proteínas, aumenta el diámetro de gota y disminuye la viscosidad y los valores de las funciones viscoelásticas, lo que se relaciona con una baja velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase, debido a un cierto grado de desnaturalización de la proteína (Waniska y Kinsella, 1985). Sin embargo, cuando el pH se encuentra cerca del punto isoeléctrico de la proteína, se obtienen los mayores valores de viscosidad y de las funciones viscoelásticas (Franco y col., 2000), debido a que la velocidad de adsorción y empaquetamiento de la proteína en la interfase es máxima, al disminuir la repulsión electrostática entre dichas macromoléculas (Halling, 1981), a pesar de los mayores diámetros de gota que se alcanzan.

#### *Viscosidad de ambas fases.*

Los efectos que producen las viscosidades de las fases continua y dispersa en la viscosidad global de la emulsión no son totalmente independientes. En algunos casos la

capa superficial que rodea a las gotas hace que éstas se comporten como esferas rígidas, en cuyo caso, la reología de la fase dispersa ejerce una influencia insignificante en la reología de la emulsión (Tadros, 1994; Walstra, 1996b). En otros casos, la contribución de la película interfacial en el comportamiento reológico global puede llegar a ser predominante (Oosterbroek y Mellema, 1981).

Pero, en general, las propiedades reológicas que influyen de mayor forma en las propiedades de las emulsiones son las relativas a la fase continua. De hecho, en muchos casos, la viscosidad de la emulsión es directamente proporcional a la viscosidad de la fase continua. Sin embargo, la inmovilización de flóculos de la fase dispersa o la adsorción de una cantidad significativa de emulsionante en la interfase es suficiente para alterar la viscosidad efectiva de la fase continua.

De esta forma, cualquier factor que influya en el comportamiento reológico de las fases y, más específicamente, sobre el grado de interacción entre ellas, ejerce una influencia significativa sobre las propiedades reológicas de la emulsión (Darby, 1984).

#### **1.9.6. Efectos indeseables que se producen en ensayos reológicos con emulsiones**

Las emulsiones, al igual que cualquier sistema disperso, pueden presentar, en reómetros y viscosímetros, efectos que conducen a resultados erróneos. Para reducir estos errores, es necesario, por ejemplo, elegir el hueco correcto entre ambas partes, que debe ser del orden de 20 veces superior al diámetro de las unidades que constituyen a la muestra, pero no demasiado elevado, para asegurar una cizalla homogénea en todo el material, evitar fenómenos de deslizamiento entre la muestra y las paredes del sistema sensor, controlar que todas las medidas hayan sufrido la misma historia térmica y de cizalla previa, evitar que se produzca expulsión de muestra a elevadas velocidades de cizalla debido a efectos centrífugos, evitar el secado de ésta,... (Sherman, 1970; Hunter, 1989; Pal y col., 1992; Schram, 1994). Entre estos errores, el fenómeno más común y más relevante en este tipo de sistemas, es el deslizamiento o “wall-slip”.

Se ha demostrado que un gran número de emulsiones pueden mostrar efectos de deslizamiento (Yoshimura y Prud’homme, 1988a, 1988b; Barnes y Carnali, 1990; Pal, 1990, 1997; Plucinski y col., 1998). Este fenómeno tiene su origen en desplazamiento de la fase dispersa de las paredes del sistema sensor, por lo que aparece una capa de emulsión en contacto con éstas, de composición ligeramente diferente al resto que actúa como lubricante. Como consecuencia se obtienen valores de viscosidad aparente

menores que los reales (Barnes, 1995). En el caso de las emulsiones, este efecto está favorecido por la deformabilidad de las gotas y el cremado (Gallegos y Franco, 1999b).

Durante los últimos años, este fenómeno ha sido objeto de estudio extensamente por numerosos autores (Yoshimura y Prud'homme, 1988a, 1988b; Barnes, 1995; Franco y col., 1998b; Goshawk y col., 1998; Plucinski y col., 1998). Todos ellos confirman la existencia de deslizamiento en emulsiones O/W en condiciones de flujo estacionario, aunque surge una cierta controversia cuando se analiza este fenómeno en experimentos oscilatorios de pequeña amplitud.

Así, Ma y Barbosa Cánovas (1995) sostienen que no se encuentra evidencia de aparente deslizamiento en ensayos de cizalla oscilatorios, lo que corroboran diversos autores (Diogo, 1995; Franco y col., 1998b; Plucinski y col., 1998). Por el contrario, Goshawk y col. (1998) encontraron que diversas funciones viscoelásticas dinámicas presentaban valores inferiores al disminuir la separación entre platos a un valor dado de frecuencia, en ensayos oscilatorios realizados con un sistema sensor de platos paralelos, lo que es indicativo de la existencia de deslizamiento.

Sin embargo, en todos los casos se ha encontrado que el deslizamiento en las paredes del sistema sensor conduce a intervalos de viscoelasticidad lineal menores.

En la figura 1.9.6.1. se muestra un ejemplo típico de una curva de flujo que muestra deslizamiento. Se ha demostrado que este efecto se aprecia en mayor grado si se representa la viscosidad frente al esfuerzo que si se hace frente a la velocidad de cizalla (Franco y col., 1998b). Como se aprecia en la figura, puede aparecer en la curva de flujo una región pseudonewtoniana falsa como consecuencia del deslizamiento.

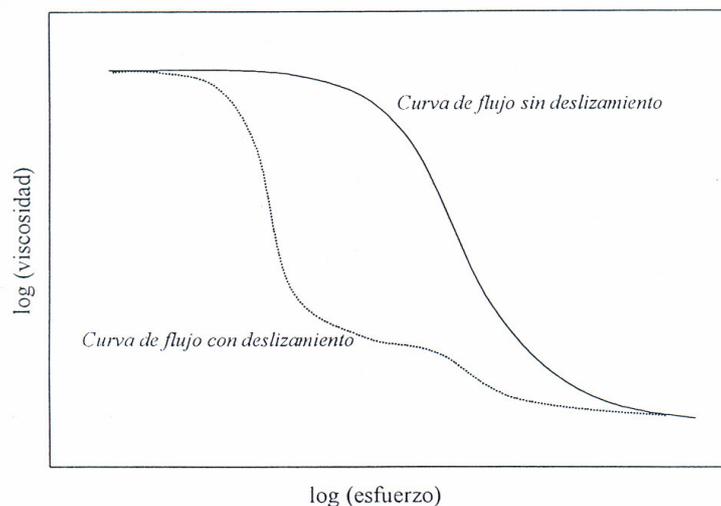


Figura 1.9.6.1. Curva de flujo esquemática obtenida con un sensor placa-placa con superficie lisa (curva con deslizamiento) y rugosa (curva sin deslizamiento)

Como diversos autores han demostrado (Franco y col., 1998b), la magnitud de este fenómeno depende de la composición de la emulsión, ya que ésta influye en las interacciones interparticulares. De esta forma, emulsiones compuestas por gotas grandes o suspendidas en un medio continuo de baja viscosidad, son más vulnerables al deslizamiento que aquellas constituidas por gotas pequeñas, dispersas en un medio continuo altamente estructurado (tipo gel) o que presentan un alto grado de floculación extensiva.

En general, para cualquier sistema disperso, el método que se emplea en la actualidad en mayor grado para evitar este efecto, es el uso de sistemas sensores con superficies rugosas (White y col., 1991; Buscall y col., 1993; Gregory y Mayers, 1993; Mas y Magnin, 1994).



## **CAPÍTULO 2.**

# **EXPERIMENTAL**

## **CAPÍTULO 2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. Materiales empleados**

La presente tesis doctoral consta de dos partes bien diferenciadas: una primera parte, en la que se estudia la temperatura de transición vítrea de las proteínas y sus propiedades de flujo a diferentes contenidos en agua mediante un reómetro capilar; y una segunda parte en la que se estudia a fondo la capacidad emulsionante de las proteínas, mediante la variación de múltiples parámetros. No obstante, estas dos partes se encuentran relacionadas por el estudio que en las dos se realiza de diferentes propiedades (físicoquímicas, funcionales,...) de dos proteínas vegetales, como el gluten de trigo y las proteínas de la soja. Además, en la primera parte se incluye el estudio de una proteína no vegetal, como la caseína, concretamente la caseína obtenida por coagulación de la leche por un enzima proteolítico (quimosina); y en la segunda parte se estudia las propiedades emulsionantes de otra proteína vegetal, un aislado de algarroba.

A continuación, se detalla la ficha técnica de las diferentes fuentes proteicas utilizadas.

#### **2.1.1. Gluten de trigo**

Se ha empleado un aislado proteico de trigo, gluten, conocido comercialmente como “Glutenflor Supervital”, de la firma RIBA, S.A. (Barcelona, España). A continuación se resume su ficha técnica:

**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 - 6,7
Residuo sobre 100 micras	15 a 17%

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Gérmenes totales	50000/g máx.
Levaduras	500/g máx.
Mohos	500/g máx.
Coliformes	100/g máx.
E. Coli	Ausencia en 1 g
Salmonella	Ausencia en 25 g

**2.1.2. Aislado de proteína de soja**

El aislado proteico de soja empleado, conocido comercialmente como “SUPRO 500E”, de la firma Protein Technologies International (Bélgica), ha sido suministrado por Proanda, S.L. (Sevilla). Su ficha técnica se presenta en la siguiente tabla:

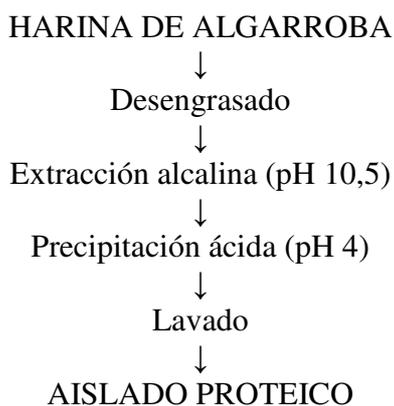
<b>SUPRO 500E: Ficha Técnica</b>	
<u>ESPECIFICACIONES</u>	
Humedad	máx. 6%
Materia Proteica	mín. 90%
Grasas	máx. 1 %
Cenizas	máx. 4,5%
pH	6,9 - 7,3
<u>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</u>	
Aerobios	10 000/g máx.
Levaduras/mohos	100/g máx.
Coliformes	10/g máx.
E. Coli	Ausencia
Salmonella	Ausencia

### 2.1.3. Aislado proteico de harina de algarroba

Se ha empleado harina de algarroba, de nombre comercial “Caratina”, de la firma Alimcarat (Mallorca, España). La ficha técnica se puede resumir en el siguiente cuadro:

<b>CARATINA: Ficha Técnica</b>	
<u>ESPECIFICACIONES</u>	
Humedad	0,5 - 2,5%
Materia Proteica	46,47%
Fibra bruta	5 - 6,5%
Azúcares solubles	6,5 - 7%
Otros carbohidratos	25 - 27 %
Grasas	6 - 7%
Cenizas	6 - 6,5%

A partir de esta harina de algarroba, se ha obtenido un aislado proteico mediante un proceso que se resume en el siguiente esquema:



La composición de este aislado proteico de algarroba, que es el que ha sido finalmente utilizado en este estudio, se resume en la siguiente tabla:

<b>AISLADO DE ALGARROBA: Ficha Técnica</b>	
<b><u>ESPECIFICACIONES</u></b>	
Humedad	2,79 - 2,84%
Materia Proteica	96,30%
Fibra bruta	0,94 - 0,97%
Hidratos de carbono	0,25 – 0,30%
Grasas	0,58 – 0,59%
Cenizas	1,45 - 1,77%

#### **2.1.4. Caseína rennet**

La caseína rennet empleada ha sido suministrada por Kerry Foods Ltd (High Protein Milk Extract, Reino Unido). Su ficha técnica se resume a continuación:

**CASEÍNA RENNET: Ficha Técnica****ESPECIFICACIONES**

Materia Proteica	91,00%
Lactosa	0,50%
Grasas	1,00%
Cenizas	7,80%
pH	7,10

**2.2. Preparación de las muestras****2.2.1. Sistemas proteína-agua**

En la primera parte de este trabajo, se han estudiado sistemas proteína-agua, a diferentes concentraciones. A continuación, se detallarán las diferentes formas de preparación de la muestra en función de la técnica empleada.

**Reometría Capilar**

Las muestras que se han utilizado en el reómetro capilar para el estudio de sus propiedades de flujo, extensionales y de cizalla, se han preparado añadiendo la cantidad de agua correspondiente a la adecuada cantidad de muestra proteica, utilizando un homogeneizador (Kenwood Chef, Reino Unido) para asegurar la homogeneidad de la mezcla resultante. En el caso de las muestras con gluten de trigo, debido a que éste forma una masa viscoelástica característica difícil de homogeneizar, ha sido necesario proceder a la congelación de una primera mezcla agua-gluten mediante su inmersión en nitrógeno líquido y posterior molienda de la mezcla utilizando para ello un molino Knifeter 1095 (Foss Tecator, Hoganas, Suecia).

**Medidas de la Temperatura de Transición Vítre**

La temperatura de transición vítrea se ha medido a través de tres técnicas diferentes: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*), Analizador de Transición de Fases (PTA, *Phase Transition Analyser*) y Análisis dinámico termomecánico (DMTA, *Dynamic Mechanical Thermal Analysis*). En los siguientes subapartados se especifica cómo se ha llevado a cabo la preparación de las muestras para cada una de las técnicas.

### Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La medida de la Temperatura de Transición Vítrea mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el analizador de transición de fase (PTA) se ha realizado a diferentes contenidos en agua, siempre menores al 30% en peso. Para preparar estas muestras, unos quince gramos de la proteína en forma de polvo se han equilibrado a diferentes humedades relativas, utilizando para ello distintas sales, cuyas disoluciones saturadas se sabe que originan una determinada humedad relativa a equilibrarse en el ambiente. Las sales utilizadas, con la correspondiente humedad relativa generada aparecen en la siguiente tabla:

<i>Sal</i>	<i>Humedad Relativa (HR), %</i>
MgCl <sub>2</sub>	32,8
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	52,8
KI	68,9
NaCl	75,3
KNO <sub>3</sub>	93,7

Tabla 2.2.1.1.

Para conseguir una humedad relativa de 0%, las muestras se han equilibrado sobre pentóxido de fósforo, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; mientras que para obtener una humedad del 100%, las muestras se han equilibrado directamente sobre agua.

Las muestras han sido almacenadas sobre las disoluciones saturadas a temperatura ambiente durante al menos siete días., cuando ya no hay cambios en el peso de la muestra.

### Analizador de Transición de Fase (PTA)

Las muestras analizadas con el PTA siguen un modo de preparación idéntico al indicado en el subapartado anterior para el DSC.

### Análisis Dinámico Termomecánico (DMTA)

Para el análisis de las muestras proteicas ha sido necesaria la formación de pequeñas tiras; para ello, se ha hidratado la proteína en forma de polvo hasta que contuviera un 17% de agua, sometiéndola a una humedad relativa del 100% durante una

noche; posteriormente, se ha prensado durante unos 10-20 minutos en un molde bajo una presión de unos  $3,1 \cdot 10^3$  Pa y a una temperatura entre 60 y 70°C, hasta conseguir una lámina de un espesor entre 0,5 y 1 mm. Las muestras han sido entonces cortadas en unas tiras con unas dimensiones de 20x8x1 mm. Esas tiras han sido entonces almacenadas sobre disoluciones saturadas de distintas sales, las mismas que se han utilizado para la preparación de las muestras que se han analizado mediante DSC y PTA, que permiten la obtención de diferentes humedades relativas, dando lugar a muestras con distintos contenidos en agua. Al igual que las muestras utilizadas con DSC o PTA, estas tiras han sido almacenadas al menos una semana antes de realizar alguna medida, hasta conseguir un contenido aproximadamente constante en agua.

Antes de cada medida, la muestra ha sido bañada en un aceite de silicona (Dow Corning, EEUU), para impedir una gran pérdida de agua durante la medida.

En todos los casos, los contenidos en agua se han obtenido secando la muestra en un horno a una temperatura de 105°C hasta conseguir un peso constante.

### **2.2.2. Emulsiones**

La segunda parte de la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de las propiedades emulsionantes de tres proteínas vegetales, provenientes del trigo, la soja y la algarroba. El protocolo seguido durante el proceso de emulsificación se especifica a continuación, así como la adecuación de las muestras (emulsiones) para la medida de la distribución de tamaños de gota mediante el analizador Mastersizer X (Malvern Instruments, Reino Unido).

La medida de las propiedades reológicas y de flujo mediante los correspondientes reómetros y el uso de la técnica microscopía confocal no requieren ningún tipo de preparación o adecuación de la emulsión.

### **Emulsificación**

Las emulsiones aceite en agua, O/W, preparadas a partir de una fase continua, que contiene la proteína vegetal que actuará como emulsionante, y una fase oleosa, para la que se ha utilizado un aceite de girasol comercial, se han obtenido mediante un dispositivo de emulsificación basado fundamentalmente en el principio rotor-estator.

Durante la operación de emulsificación, el rotor y el estator, situados coaxialmente el uno respecto al otro, no se encuentran en contacto. La alta velocidad relativa resulta en fuerzas de cizalla de muy alto orden, además de otros efectos físicos.

El dispositivo presenta un control de velocidad que permite una gran variabilidad. La turbina rotor-estator a escala de laboratorio utilizada, el Ultra Turrax T50 (Ika, Alemania), tiene una potencia de 700 W y un control integrado, que aseguran una velocidad constante durante el proceso de emulsificación a pesar de los cambios de viscosidad (condición importante para la reproducibilidad de los experimentos).

La principal ventaja de este método es el gran aporte de energía que tiene lugar. La generación de interfase por formación de gotas y posterior reducción de tamaños se produce gracias al aporte de energía mecánica. El principal inconveniente del Ultra Turrax es el de no registrar la evolución del par de torsión durante el proceso.

El elemento dispersante utilizado en el Ultra Turrax T50 se denomina S50N-G45F.

El procesado de las emulsiones en el Ultra Turrax T50 se ha llevado a cabo respetando siempre el siguiente protocolo: primero, se dispersa la proteína en agua, asegurando la homogeneidad agitando con el Ultra Turrax a velocidad mínima (4000 rpm) y un corto período de tiempo. Después, se añade la cantidad necesaria de HCl o NaOH para obtener el pH buscado. La fase continua se encuentra preparada una vez que se añaden unas gotas de una disolución 1:1 al 0.2% (V/V) de sorbato/benzoato como conservante frente al ataque microbiano. Durante la emulsificación la fase continua está en un bote de cristal inmerso en un baño termostático a 20 °C, mientras que el aceite de girasol se va adicionando a partir de un embudo de decantación.



Figura 2.2.2.1.. Dispositivo de emulsificación empleado

### **Medida de la Distribución de Tamaños de Gota**

Para la medida de la distribución de tamaños de gota, la emulsión ya formada se diluye en una proporción 1:19 con una disolución tampón 0,05M Tris-HCl con pH 8, que tiene un tensioactivo aniónico, SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), en una concentración del 1%. Este tensioactivo consigue eliminar los posibles flóculos de la muestra, al retirar a la proteína de la interfase, y situarse él en la misma. Una vez diluida con la disolución de SDS, la muestra se introduce en el baño del Mastersizer X para la obtención de parámetros característicos de la microestructura como el diámetro de Sauter.

## **2.3. Técnicas experimentales**

### **2.3.1. Sistemas proteína-agua**

En los siguientes subapartados se van a detallar las diferentes técnicas empleadas en el estudio de los sistemas proteína-agua preparados.

#### **Reometría Capilar**

Para el estudio de las propiedades de flujo extensionales y de cizalla de los sistemas proteína-agua preparados se ha empleado un reómetro capilar de doble carga Rosand RH7 (Rosand Flowmaster RH7, Bohlin Instruments) (figura 2.3.1.1.). La muestra se colocó simultáneamente a través de una boquilla convergente tipo capilar (l: 32mm;  $\Phi$ : 0,5mm;  $\theta$ : 90°), así como de una boquilla convergente tipo orificio (l: 0mm;

$\Phi$ : 0,5mm;  $\theta$ : 90°). Una vez colocadas las muestras en el reómetro, se han equilibrado durante unos 10 minutos. A continuación ha tenido lugar la extrusión de la muestra a diferentes temperaturas. La extrusión ha sido llevada a cabo a velocidades del pistón de 2, 5,63, 15,9, 44,7, 126, 355 y 1000 mm/s. La presión se ha registrado en función de la velocidad del pistón.

Ha sido necesaria aplicar la corrección de Bagley (Bagley, 1957) para corregir los efectos terminales, debidos a la pérdida de presión que tiene lugar en las zonas terminales del capilar. Las propiedades de cizalla han sido determinadas en la pared, y la corrección de Rabinowitsch ha sido aplicada asumiendo un modelo potencial.

Las ecuaciones de Cogswell (1972) han sido utilizadas para determinar el esfuerzo y la deformación extensional.

Los parámetros obtenidos en los ensayos de reometría capilar han sido ajustados a una ecuación potencial, tal y como se ha realizado en estudios anteriores (Harper, 1981; Colonna y col., 1989; Singh y col., 1999):

$$\sigma = m \dot{\gamma}^n \quad (2.3.1.1.)$$

donde  $\sigma$  es el esfuerzo extensional o de cizalla,  $\dot{\gamma}$  es la velocidad extensional o de cizalla,  $n$  es el índice de flujo y  $m$  es el coeficiente de consistencia (Brydson, 1981).

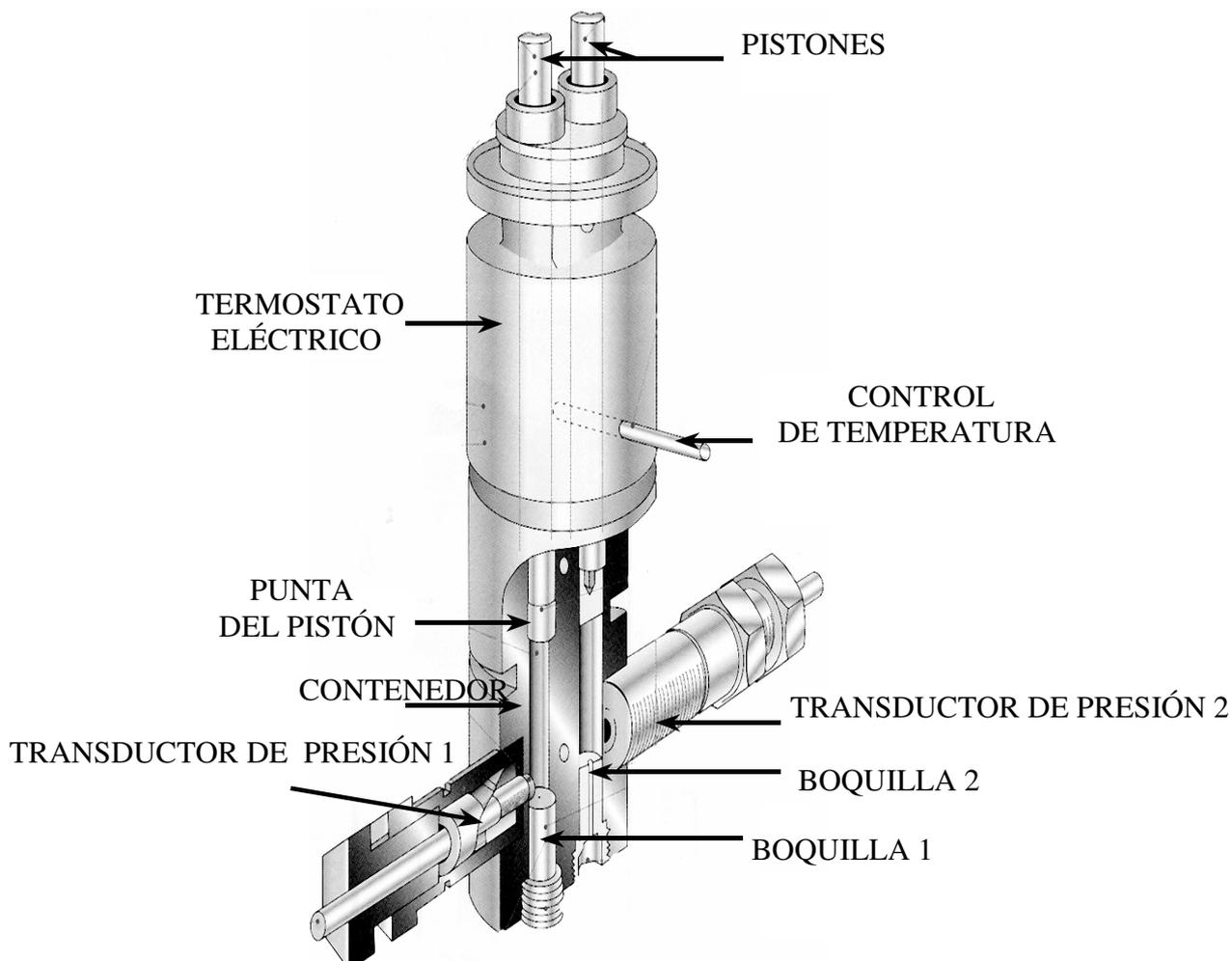


Figura 2.3.1.1. Representación esquemática de las principales partes componentes del reómetro capilar utilizado

### Medidas de la Temperatura de Transición Vítre

La temperatura de transición vítrea de las muestras se ha determinado a partir de las siguientes técnicas:

#### Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las medidas calorimétricas se han llevado a cabo mediante el uso de un calorímetro DSC-7 de la firma Perkin Elmer. Como referencia, se ha utilizado un plato de acero inoxidable vacío. La muestra ha sido calentada una primera vez a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta  $180^{\circ}\text{C}$ ; después, ha sido enfriada hasta  $-60^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y calentada

una segunda vez a 10°C/min hasta 180°C. Por último, la muestra ha sido enfriada hasta una temperatura de 20°C a 50°C/min.

La temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , ha sido determinada como la temperatura correspondiente al punto medio del cambio de la capacidad calorífica observado durante el segundo calentamiento.

Para la predicción de la  $T_g$  de mezclas a partir de las  $T_g$  de los componentes se ha utilizado la ecuación empírica de Gordon-Taylor (1952):

$$T_g = \frac{W_1 T_{g1} + k W_2 T_{g2}}{W_1 + k W_2} \quad (2.3.1.2.)$$

donde  $W$  es la fracción másica de cada componente,  $T_g$  es la temperatura de transición vítrea en grados Kelvin y  $K$  es una constante del sistema inversamente proporcional al efecto plastificante del diluyente (1) en la proteína (2). Este modelo es aplicable a sistemas bicomponentes (componente alimentario y agua u otro plastificante) y se ha comprobado su utilidad para el ajuste de datos obtenidos con la técnica de DSC para el almidón, la maltosa o maltodextrinas (Roos y Karel, 1991) y para proteínas cereales (de Graaf y col., 1993; Kokini y col., 1995; Madeka & Kokini, 1996).

Para sistemas multicomponentes, la ecuación de Couchman-Karasz (1978) (C-K) ha sido utilizada:

$$T_g = \frac{W_1 \Delta C_{p1} T_{g1} + W_2 \Delta C_{p2} T_{g2}}{W_1 \Delta C_{p1} + W_2 \Delta C_{p2}} \quad (2.3.1.3.)$$

Esta ecuación necesita el valor de  $\Delta C_p$  del agua, lo que ha sido objeto de cierta polémica (Kalichevsky y col., 1992). La ecuación G-T es equivalente a la ecuación C-K si  $K = \Delta C_{p2} / \Delta C_{p1}$  (ec. 2.3.1.4), y  $\Delta C_p$  es el cambio en la capacidad calorífica observado a la  $T_g$ . Los valores utilizados para  $T_{g1}$  y  $\Delta C_{p1}$  del agua son 134 K (-139°C) y 1,94 Jg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>, respectivamente (Sugisaki y col., 1968; Kalichevsky y col., 1993). Los valores de  $\Delta C_{p2}$  para la proteína seca (caseína, soja y gluten) han sido calculados a partir de la ecuación 2.3.1.4.

### DMTA (Análisis dinámico termomecánico)

El DMTA (Rheometric Scientific, Piscataway, EEUU) ha sido siempre utilizado con la muestra en el modo de flexión en simple cantilever (figura 2.3.1.2.), en el que un extremo de la muestra se encuentra sujeto a un marco rígido, mientras que el otro extremo se encuentra sujeto a un vástago móvil, que le transmite el movimiento encargado de deformar la muestra.

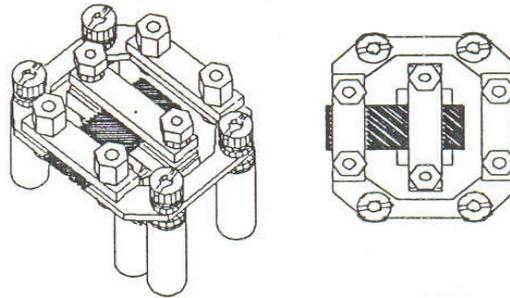


Figura 2.3.1.2. Modo de flexión en simple cantilever

Los ensayos se han llevado a cabo a una frecuencia de 1 Hz y a una deformación de 0,03%, dentro de la región lineal. La velocidad de calentamiento ha sido de 3°C/min. Las medidas dinamo mecánicas se han realizado en un intervalo de temperaturas de -100°C a 150°C.

La temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , se ha determinado en este trabajo a partir del máximo en el módulo  $E''$ , puesto que su valor se encuentra entre la temperatura a la que  $E'$  desciende y la temperatura a la que  $\tan\delta$  presenta un pico, que son los otros dos valores de temperatura que podrían ser considerados como el valor de la  $T_g$ .

Para cada contenido en agua se han tenido dos replicados, obteniendo una temperatura de transición vítrea promedio.

### PTA (Analizador de transición de fases)

El PTA de la firma Wenger (EEUU) es un reómetro capilar de cámara cerrada. Su principal diferencia con un reómetro capilar se encuentra en que éste extrusiona a cizalla constante, mientras que el PTA lo hace a presión constante.

En el presente estudio las medidas de la temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , y de la temperatura de flujo,  $T_f$ , se han realizado a una velocidad de calentamiento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  y mediante la aplicación de una presión de 15 MPa.

La  $T_g$  se ha determinado, con la parte inferior cerrada (sin orificio), como el punto medio entre el inicio y el final del desplazamiento del pistón conforme aumenta la temperatura cuando se aplica una presión constante sobre la muestra. La temperatura de flujo,  $T_f$ , se ha determinado, con la parte inferior abierta con un orificio de unos 2mm de diámetro, a partir del desplazamiento del pistón, cuando la muestra empieza a fluir a través del orificio.

#### **2.3.2. Emulsiones**

A continuación se detallan las diferentes técnicas empleadas en la caracterización de las emulsiones estudiadas.

##### **Distribución de tamaños de gota: Mastersizer X**

La estabilidad, reactividad química, opacidad, fluidez y fuerza de un material se encuentran afectadas por el tamaño y las características de las partículas que lo conforman. Es por ello que la medida del tamaño de partícula es un parámetro de extrema importancia para la industria.

Las medidas de tamaño y distribución de gotas se han llevado a cabo al día siguiente de la preparación de las emulsiones utilizando el Mastersizer X, de la firma Malvern Instruments (Reino Unido). Todos los equipos de difracción de partículas de Malvern están basados en el principio de dispersión de luz láser. Se trata de un sistema no óptico, puesto que el cálculo del tamaño de las partículas se consigue sin obtener una imagen de la partícula.

Un experimento de dispersión de láser consiste en dos etapas que tienen por objetivo medir el ángulo de dispersión característico de las partículas de la muestra. La medida tiene lugar en dos etapas para así poder sustraer de la medida realizada a la muestra de interés la contribución de otros factores, como la luz del día, el reflejo de superficies ópticas,...

La mayor ventaja de la difracción de láser respecto a técnicas basadas en el recuento de partículas a partir de una imagen es que con cada experimento se miden de 100 a 1000 partículas en un tiempo corto, alrededor de 5 segundos.

El dispositivo experimental básico está compuesto por dos módulos: el MSX 17, unidad de preparación de la muestra, y el Mastersizer X, verdadera unidad de medida, donde se encuentra todo el sistema de lentes y la fuente de luz láser (He-Ne). El equipo está conectado a un ordenador que tiene un software disponible (“MastersizerX” versión 1.2b), que se encarga de realizar los cálculos necesarios para obtener los diámetros medios, curvas de frecuencia de distribuciones y demás parámetros de ajuste.

Una dispersión de la emulsión es el paso previo a la realización de la medida. Para ello, se prepara una mezcla emulsión-disolución SDS (1:19) para eliminar los flóculos que pudieran quedar en la dispersión.

Agua destilada ha sido el medio dispersante utilizado en todos los casos y para el registro de la dispersión del láser se han empleado dos lentes (45 mm y 100 mm), en función del tamaño de las gotas de la emulsión preparada: la lente de 45 mm detecta tamaños de gota dentro del intervalo 0.1-80  $\mu\text{m}$ , mientras que la lente de 100 mm lo hace dentro del intervalo 0.5-180  $\mu\text{m}$ .

Las medidas se han realizado a temperatura ambiente al día siguiente de la preparación de la emulsión.

### **Caracterización reológica**

La caracterización reológica de las emulsiones se ha realizado, en todos los casos, mediante ensayos dinámicos en el intervalo de viscoelasticidad lineal. Por otra parte se han realizado medidas de flujo transitorio de los sistemas con pH 2 estabilizados con un 1% de proteína y procesados a 6000 rpm y a 20°C, y se ha llevado a cabo un estudio de sus propiedades viscoelásticas no lineales mediante ensayos de relajación del esfuerzo. También se han realizado rampas de temperatura sobre estas emulsiones, así como de las preparadas a pH 10.

Todos los ensayos reológicos se efectuaron al día siguiente de la preparación de las emulsiones.

Las medidas reológicas, salvo las rampas de temperatura, se han llevado a cabo a 20 °C y se ha mantenido un tiempo de espera de 15 minutos previo al inicio de la medida. Con el fin de asegurar una misma historia termoreológica y evitar la

coagulación de las proteínas y el secado de la muestra durante la medida, se ha añadido aceite de vaselina en las inmediaciones del sensor y se ha rodeado con una cubierta diseñada en el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla específicamente para este fin.

Como elementos básicos de los dispositivos encargados de medir las propiedades reológicas de las emulsiones se pueden señalar: *una línea de aire*, que mantiene la presión necesaria para reducir la fricción entre las partes móviles de la cabeza de medida y centrar su eje interno; *un termostato*, que mantiene constante la temperatura durante en ensayo; y *el reómetro* que es el equipo donde se realiza la medida, aplicando la velocidad o el esfuerzo de cizalla que corresponda en cada caso y registrando la respuesta de la muestra. Colocado el sistema sensor que corresponda en el reómetro y sobre él la emulsión que se va a estudiar, la adquisición de datos se realiza a través de un ordenador personal con el programa que controla la medida y permite almacenar y tratar los resultados obtenidos.

#### *Ensayos viscoelásticos dinámicos*

Para determinar los valores de esfuerzo de cizalla que delimitan el intervalo viscoelástico lineal de las emulsiones se han realizado barridos de esfuerzo a 1 Hz de frecuencia; posteriormente, se han realizado barridos de frecuencia entre 0,00316 y 14,7 Hz a un valor de esfuerzo constante comprendido dentro dicho intervalo.

Todos los ensayos de cizalla oscilatoria, tanto los barridos de frecuencia como los de esfuerzo, se han llevado a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado RS150 de la firma Thermo-Haake GmbH (Karlsruhe, Alemania), realizándose al menos un replicado de cada ensayo. Los datos técnicos del reómetro se especifican en la siguiente tabla:

<b>Datos Técnicos del reómetro RS 150</b>	
Torque Máximo	150 mNm
Torque Mínimo	0.0002 mNm
Máxima velocidad CS	1200 rpm
Mínima velocidad CS	$10^{-7}$ rpm
Máxima velocidad CR	1100 rpm
Mínima velocidad CR	0.01 rpm
Mínima frecuencia	0.0001 Hz
Máxima frecuencia	100 Hz
Resolución de la deformación	$6 \times 10^{-7}$ rad
Fuerza normal	4 N
Autogap	sí
Termogap	sí
Multionda	sí
Control de Microesfuerzo	sí

Tabla 2.3.2.1. Especificaciones técnicas del reómetro RS-150

Con el fin de eliminar el efecto de deslizamiento que, como ya se ha demostrado en repetidas ocasiones, presentan emulsiones de este tipo (Barnes, 1994; Franco y col., 1998, Bower y col., 1999), se ha utilizado sensores de superficie rugosa. El sensor usado ha sido un sistema placa-placa de 35 mm de diámetro, de superficie rugosa.

#### *Ensayos de cizalla estacionaria*

Los ensayos transitorios se han realizado en un reómetro de la firma TA Instruments (EEUU), modelo ARES (Advanced Rheometric Expansion System).

Se ha empleado un sensor tipo placa-placa de superficie estriada, con objeto de eliminar los efectos de deslizamiento (PPR25).

En los ensayos transitorios se han aplicado velocidades de cizalla constantes, de valores  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ , 0,1, 1,  $10 \text{ s}^{-1}$  y se ha estudiado la evolución del esfuerzo resultante con el tiempo. Los tiempos del ensayo aparecen recogidos en la siguiente tabla, asegurándose que en todos los casos es tiempo suficiente para que el valor de la pendiente del esfuerzo respecto al tiempo sea inferior a un 1%, aceptándose ésta como condición de flujo estacionario.

$\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	t <sub>ensayo</sub> (min)
10 <sup>-4</sup>	60
10 <sup>-3</sup>	30
10 <sup>-2</sup>	30
0,1	15
1	15
10	15

Tabla 2.3.2.2.

#### *Ensayos de relajación del esfuerzo*

Los ensayos de relajación del esfuerzo se han realizado en el mismo dispositivo que los de cizalla transitoria, descrito en el apartado anterior.

Se han realizado medidas de relajación del esfuerzo tanto dentro como fuera del intervalo viscoelástico lineal. Para ello, se han determinado previamente los valores de deformación que limitan ese intervalo mediante barridos de deformación. Posteriormente se ha realizado una medida de relajación del esfuerzo donde se ha aplicado un valor de deformación incluido en este intervalo y otras con valores de deformación del 5, 10, 20, 50, 100 y 200 %. El tiempo de ensayo ha sido 15 minutos.

#### *Rampas de temperatura*

Las rampas de temperatura se han realizado en un reómetro ARES (TA Instruments, EEUU), al igual que los ensayos de cizalla transitoria y de relajación del esfuerzo.

En el caso de las emulsiones estabilizadas con 1% de soja o de gluten (75% aceite, 6000 rpm, pH 2/4/6/10) las rampas de temperatura han seguido el siguiente protocolo:

- 1) *tramo 1*: subida desde 20°C a 70°C, a una velocidad de 0,75°C/min o de 5°C/min
- 2) *tramo 2*: isoterma a 70°C, durante 3000 segundos
- 3) *tramo 3*: bajada desde 70°C a 20°C, a una velocidad de 0,75°C/min o de 5°C/min
- 4) *tramo 4*: isoterma a 20°C, durante 600 segundos

Al igual que el resto de medidas, la muestra se encuentra inmersa en aceite de vaselina durante la medida, para evitar en la medida de lo posible el secado de la misma.

### *Microscopía confocal*

Con el fin de estudiar la microestructura de las emulsiones preparadas, se han efectuado medidas de microscopía confocal (CLSM).

Las emulsiones preparadas con el Ultra-Turrax T50 se situaron sobre un porta adecuado y se procedió a su observación a través de un microscopio True Confocal Scanner (TCS) SP2 de Leica (Barcelona, España), utilizándose el objetivo más potente (x100) y un láser de Argón, con una longitud de onda de 488 nm, para la excitación de la muestra. No ha sido necesaria la utilización de ningún marcador fluorescente puesto que las proteínas vegetales estudiadas presentan autofluorescencia (referencia gluten).

La microscopia confocal fue una importante invención durante la década de los ochenta, que permite la observación de finas secciones ópticas en muestras de cierto grosor, a las que deja inalteradas. La microscopia confocal (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) permite una reconstrucción tridimensional de la muestra. El proceso de obtención de la imagen se puede esquematizar en la siguiente figura:

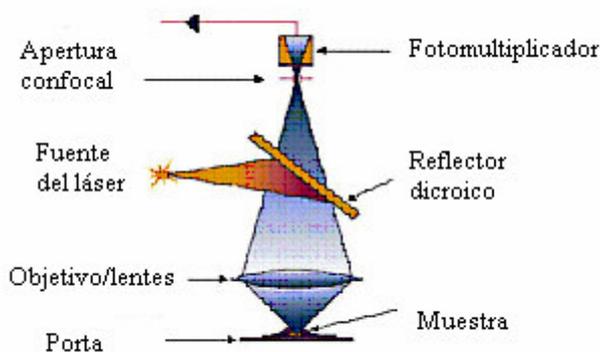


Figura 2.3.2.1. Principal recorrido del láser en un CLSM.

El microscopio confocal incorpora dos diafragmas: un diafragma de iluminación localizado tras la fuente luminosa, denominado pinhole de excitación, cuya utilidad es eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal de interés,

umentando con ello la claridad y resolución de la imagen; y un diafragma de detección, de tamaño variable situado delante del fotodetector, denominado pinhole de emisión.

La fuente de luz es un láser que produce una luz coherente de alta intensidad de una longitud de onda determinada. Entre el láser y el divisor de luz (“beam splitter”), que dirige la luz hacia el objetivo, se encuentra el pinhole de excitación, que produce un haz de luz suficientemente estrecho. El objetivo proyecta este pinhole hacia el plano focal de la muestra. Si se produce fluorescencia, se obtiene un punto de la imagen (pixel). De esta forma, mediante un escaneo adecuado se obtiene una imagen de, normalmente, 512x512 pixeles. Después de la transmisión, sólo ese pixel es detectado por el fotomultiplicador, debido a que el pinhole de emisión se encuentra en una posición confocal (conjugada) al pinhole de excitación.

Las aplicaciones de la microscopía confocal son muy variadas y abarcan campos tan distantes como estudios de biomedicina, estudios en alimentos o de materiales. Gracias al desarrollo de nuevas sondas fluorescentes y de nuevos sistemas de detección, la diversificación en campos de estudio y nuevas aplicaciones está en continuo crecimiento.

## 2.4. Sistemas preparados

### 2.4.1. Sistemas proteína-agua

#### Reometría Capilar

En el estudio de las propiedades de flujo de los sistemas proteína-agua del gluten, la soja y la caseína mediante el reómetro capilar se han preparado sistemas con diferentes composiciones, recogidas en la siguiente tabla:

<b>% proteína</b>	<b>% agua</b>
25	75
30	70
35	65
40	60
45	55

Tabla 2.4.1.1.

Para cada uno de los sistemas preparados, se han realizado ensayos a diferentes temperaturas: 75, 85, 95, 120 y 140°C. Mediante la medida del contenido en agua de la muestra antes y después de cada ensayo, se ha llevado un control de la posible pérdida de agua durante la medida.

**Medidas de la temperatura de transición vítrea**

La temperatura de transición vítrea de las tres proteínas se ha medido utilizando las diferentes técnicas antes presentadas (DSC, DMTA, PTA). Además el PTA permite la obtención de la denominada temperatura de flujo. Para cada proteína y con cada técnica, la  $T_g$  (y la  $T_f$ , en el caso del PTA) se ha medido a diferentes contenidos en agua; las medidas del contenido en agua se han hecho por triplicado. En la siguiente tabla aparece recogido el porcentaje de agua de cada uno de los sistemas a los que se le ha medido la  $T_g$ :

Tabla 2.4.1.2.

Proteína	% Agua	
	DSC/PTA	DMTA
Gluten	1,59 ± 0,08	3,97 ± 0,96
	7,64 ± 0,12	10,48 ± 0,44
	9,06 ± 0,05	11,71 ± 0,20
	11,10 ± 0,08	12,66 ± 0,48
	12,48 ± 0,07	14,66 ± 0,50
	18,57 ± 0,11	21,16 ± 0,85
	22,13 ± 0,72	25,88 ± 0,12
Soja	1,27 ± 0,17	8,14 ± 0,88
	6,51 ± 0,06	10,61 ± 0,80
	9,60 ± 0,21	13,74 ± 0,86
	12,62 ± 0,17	15,88 ± 1,43
	13,90 ± 0,20	17,02 ± 0,70
	20,81 ± 0,23	26,55 ± 0,59
	28,51 ± 0,61	33,97 ± 0,20
Caseína	5,16 ± 0,10	3,66 ± 0,63
	8,76 ± 0,03	9,90 ± 0,22
	10,56 ± 0,36	12,86 ± 0,42
	12,66 ± 0,20	14,03 ± 0,42
	13,68 ± 0,14	14,78 ± 0,74
	20,19 ± 0,13	23,25 ± 1,24
	28,19 ± 0,26	29,21 ± 0,96

### **2.4.2. Emulsiones**

Se han preparado emulsiones concentradas aceite en agua estabilizadas con tres proteínas vegetales: gluten de trigo, soja y algarroba, con una concentración de aceite de girasol similar a la que presentan las mayonesas comerciales.

Se han estudiado diferentes variables, relacionadas con el procesado de la emulsión, con su formulación o con su post-procesado. Como se ha indicado anteriormente, se ha llevado a cabo una caracterización reológica de las muestras y una medida de la distribución de tamaños de gota de fase dispersa. De algunas de las emulsiones se ha realizado un estudio de las propiedades viscoelásticas no lineales, así como un estudio de la microestructura a partir de fotografías obtenidas por microscopía.

Las diferentes variables de estudio son las siguientes:

- Temperatura de procesado
- Velocidad de rotación del elemento emulsificador
- Concentración de aceite
- Concentración de proteína
- Concentración de electrolito
- pH
- Rampas de temperatura

#### **Influencia de la temperatura de procesado**

Para el estudio de la influencia de la temperatura durante el procesado se han preparado emulsiones a una velocidad de 6000 r.p.m. con una concentración de proteína del 1%, y de aceite de girasol del 75%; el pH de la fase continua se ajusta a 2 mediante la adición de ácido clorhídrico, HCl. Manteniendo estas condiciones fijas, la temperatura durante el procesado, controlada por un baño termostático en el que se encuentra inmerso el vaso mientras se va formando la emulsión, se ha variado entre 20, 40, 50 y 60°C.

### **Influencia de la velocidad de rotación del elemento emulsificador**

En el caso del estudio de la influencia de la velocidad de rotación de la turbina rotor estator, ésta se ha variado entre 4000, 6000, 8000 y 10000 r.p.m.. El resto de variables se ha mantenido invariables en todos los casos: 1% de proteína, 75% de aceite, pH 2 de la fase continua, y una temperatura de procesado de 20°C.

### **Influencia de la concentración de aceite**

En emulsiones con una concentración fija de proteína (1%), procesadas a 6000 r.p.m. y 20°C, la concentración de la fase oleosa se ha variado entre 65, 70, 75 y 80% para estudiar su influencia sobre las propiedades reológicas y microestructura de la emulsión final. El pH de la fase continua de todas las emulsiones se ha mantenido en 2.

### **Influencia de la concentración de proteína**

Se ha estudiado la influencia de la concentración de proteína presente en la emulsión, para ello, se han preparado emulsiones al 75% de aceite con concentraciones variables entre 0'125, 0'25, 0'5, 1, 2 y 3%, y se ha mantenido fijas el resto de los parámetros (pH 2, 6000 r.p.m., 20°C). Para este estudio se han completado las técnicas reológicas y de distribución de tamaños de gota con la técnicas microscopía confocal.

### **Influencia de la concentración de electrolito**

Además de las variables anteriores, se han preparado a 20°C y a una velocidad de procesado de 6000 r.p.m., emulsiones, a pH 2, con 1% de proteína y 75% de aceite, con distintas concentraciones de cloruro sódico, para estudiar la posible influencia del electrolito presente en la fase continua en la emulsión final.

### **Influencia del pH**

Para poder conocer la influencia que el pH de la fase continua tiene sobre las propiedades finales de la emulsión se han preparado emulsiones a diferentes pH, con una concentración de aceite y de proteína (75% y 1%, respectivamente), y unas condiciones de procesado (6000 r.p.m., 20°C) fijas. Las emulsiones se han preparado a valores de pH extremos ácido (2) y básico (10). Algunas de las emulsiones se han

preparado además a valores de pH intermedios (3, 4, 5, 7, 8), en función de su punto isoeléctrico, pI.

De las emulsiones con valores de pH extremos (2 y 10) se han realizado fotografías mediante microscopía confocal.

También se ha estudiado el efecto que sobre la reología y la microestructura de la emulsión tiene la modificación del pH una vez formada la misma. Para ello, se ha añadido HCl o NaOH según el caso, a la emulsión, homogeneizando el sistema con el mismo Ultra Turrax T50 con el que se llevó a cabo la emulsificación, a una velocidad de 4000 r.p.m. durante dos minutos. El pH de las emulsiones se ha llevado desde pH 2 y 10 hasta un pH final de 4 o de 6, más cercano al pH de las emulsiones comerciales. Al evaluar estos resultados, es necesario considerar la posible influencia de la energía impuesta durante la homogeneización, después de modificar el pH.

### **Influencia de la temperatura de medida**

Se ha estudiado la influencia que la temperatura puede tener en las medidas reológicas en el reómetro de esfuerzo controlado RS150. La temperatura de medida ha variado entre 5, 20, 30 y 40°C; el resto de condiciones se ha mantenido constante en este estudio: 6000 r.p.m., 1% de proteína, 75% de aceite, pH 2 y una temperatura de procesado de 20°C.

### **Rampas de temperatura**

Las rampas de temperatura se han realizado sobre emulsiones de diferentes pH (2, 4, 6, 10) con 1% de proteína y 75% de aceite, y preparadas a 20°C y 6000 r.p.m. El protocolo de las rampas ya se ha indicado en el apartado dedicado a las técnicas experimentales.

#### **2.4.2.1. Estudio estadístico**

Con el fin de evaluar la influencia de las variables estudiadas, se ha realizado un estudio estadístico sobre algunos parámetros, relacionados con las propiedades reológicas y estructurales de la emulsión final. Para ello, se han preparado cinco lotes de

una emulsión de composición fija (75% de aceite vegetal y 1% de gluten de trigo), pH 2, utilizando en todos los casos el mismo protocolo de preparación (6000 r.p.m. y 20°C).

### Distribución de tamaños de gota

Como parámetros representativos de las distribuciones de tamaño se han elegido dos tipos de diámetros medios: el diámetro de Sauter,  $d(3,2)$  y el volumétrico,  $d(4,3)$ . Estos diámetros se definen según las expresiones 1.7.6.2. y 1.7.6.3.

Como parámetro representativo de la polidispersidad de la muestra se ha elegido la uniformidad, U (1.7.6.4.).

En la tabla 2.4.2.1.1. se recogen los valores medios del diámetro de Sauter, el volumétrico y la uniformidad, así como el intervalo de confianza, para cinco de las emulsiones ya descritas en el apartado anterior.

	Media $\pm$ Intervalo de confianza		
	$d(3,2)$	$d(4,3)$	U
<i>Lote 1</i>	5,61 $\pm$ 0,07	11,9 $\pm$ 0,5	0,51 $\pm$ 0,02
<i>Lote 2</i>	4,11 $\pm$ 0,14	10,8 $\pm$ 0,8	0,63 $\pm$ 0,02
<i>Lote 3</i>	4,00 $\pm$ 0,26	10,1 $\pm$ 0,8	0,60 $\pm$ 0,03
<i>Lote 4</i>	4,67 $\pm$ 0,19	12,0 $\pm$ 1,2	0,65 $\pm$ 0,07
<i>Lote 5</i>	3,58 $\pm$ 0,08	9,2 $\pm$ 0,67	0,56 $\pm$ 0,02

Tabla 2.4.2.1.1. Valores de las medias e intervalos de confianza de los parámetros de distribución de tamaños de gota de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C

El análisis de varianza efectuado con el parámetro  $d_{32}$  muestra diferencias significativas entre lotes, fundamentalmente debido a los distintos valores obtenidos con el lote 1. Por ello, se presentan los coeficientes de variación intralote e interlote. Sólo en aquellas variables que impliquen un cambio de lote habrá de tenerse en cuenta el coeficiente de variación interlote. En el resto se considerará el coeficiente de variación intralote.

	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>d(3,2)</b>	34,01	4,54 10 <sup>-5</sup>
<b>d(4,3)</b>	3,76	0,052
<b>U</b>	3,45	0,06

Tabla 2.4.2.1.2. Análisis de varianza del diámetro de Sauter, diámetro volumétrico y uniformidad para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C

	<b>Intralote (%)</b>	<b>Interlote (%)</b>
<b>d(3,2)</b>	3,00	14,9
<b>d(4,3)</b>	6,1	11,4
<b>U</b>	4,9	9,7

Tabla 2.4.2.1.3. Valores de los coeficientes de variación para los parámetros de distribución de tamaños de gota de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C

### Parámetros viscoelásticos

Para el análisis estadístico de un parámetro representativo de las propiedades viscoelásticas de la emulsión, se ha elegido el módulo plateau,  $G_N^0$ , por ser éste independiente de la frecuencia (1.9.3.6.).

	<b>Media ± Intervalo de confianza</b>		
	$G_N^0$ (Pa)	$\tau_c$ (Pa)	$\gamma_c$
<b>Lote 1</b>	430 ± 9	46,25 ± 9,41	0,11 ± 0,01
<b>Lote 2</b>	400 ± 10	54,56 ± 0,01	0,11 ± 0,02
<b>Lote 3</b>	410 ± 23	54,56 ± 0,02	0,11 ± 0,02
<b>Lote 4</b>	421 ± 11	76,44 ± 34,67	0,14 ± 0,05
<b>Lote 5</b>	436,6 ± 0,14	37,9 ± 0,02	0,10 ± 0,01

Tabla 2.4.2.1.4. Valores de las medias e intervalos de confianza de los parámetros viscoelásticos de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C

Asimismo, se ha realizado un análisis de varianza para establecer estadísticamente si existen diferencias significativas en los valores de  $G_N^0$ ,  $\tau_c$  y  $\gamma_c$  para distintos lotes. La determinación de un determinado factor se considera significativa cuando la probabilidad,  $p$ , para ese factor es menor de 0,05. La probabilidad se determina a partir de la relación,  $F$ , entre el cuadrado medio de las desviaciones y el residual del cuadrado medio de las desviaciones.

	<b>F</b>	<b>p</b>
$G_N^0$	2,40	0,14
$\tau_c$	1,25	0,37
$\gamma_c$	0,99	0,47

Tabla 2.4.2.1.5. Análisis de varianza del módulo plateau, esfuerzo crítico y deformación crítica para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C

Por tanto, los valores del módulo plateau, el esfuerzo crítico y la deformación crítica no son significativamente diferentes al nivel 0,05.

Al igual que en el caso anterior, se ha realizado el cálculo de las medias y de los intervalos de confianza, así como de los coeficientes de variación inter e intralote.

	<b>Intralote (%)</b>	<b>Interlote (%)</b>
$G_N^0$	2,2	4,2
$\tau_c$	6,1	11,4
$\gamma_c$	11,6	36,8

Tabla 2.4.2.1.6. Valores de los coeficientes de variación para los parámetros viscoelásticos de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite vegetal y 1% (p/p) de gluten de trigo preparadas a 6000 r.p.m. y 20°C



**CAPÍTULO 3 .**  
**SISTEMAS**  
**PROTEÍNA-AGUA**

## CAPÍTULO 3. SISTEMAS PROTEÍNA-AGUA

### 3.1. Introducción

La respuesta de las macromoléculas alimentarias a la adición de agua es de gran importancia en el estudio de su comportamiento en sistemas alimentarios. Ésta es importante tanto en sistemas de alto contenido en agua, en los que la capacidad del sistema macromolecular para retener agua es crítica, como en sistemas de bajo contenido en agua, en los que la migración de agua entre dos fases puede ser un factor que limite la preservación del producto (Mitchell, 1997). El comportamiento de las proteínas al ser hidratadas es básico para el conocimiento de su funcionalidad dentro de un alimento.

En este capítulo se va a estudiar la influencia de la presencia del agua sobre la temperatura de transición vítrea de tres proteínas (gluten, caseína, soja) mediante diferentes técnicas, así como las propiedades de flujo, a diferentes temperaturas, de sistemas proteicos con un contenido en agua variable. La utilización de una proteína como la caseína en este trabajo centrado fundamentalmente en el estudio de diferentes propiedades funcionales de proteínas vegetales se justifica al ser ésta una proteína profusamente estudiada, y que, por tanto, merece ser considerada como referencia.

### 3.2. Resultados y discusión

#### 3.2.1. Temperatura de transición vítrea

##### 3.2.1.1. Determinación de la temperatura de transición vítrea

El agua puede considerarse como una sustancia plastificante que favorece la movilidad de las macromoléculas. La temperatura de transición vítrea o *glass transition* ( $T_g$ ) proporciona una pieza clave para el entendimiento cuantitativo del papel del agua como promotora del movimiento.

Un cristal presenta un orden molecular similar al de un líquido, pero con una movilidad molecular enormemente reducida. En el caso de un polímero vítreo (*glassy*), no hay rotación, durante el tiempo de observación, entre los enlaces que mantienen unidos los monómeros que conforman el polímero. El esqueleto del polímero permanece rígido, por tanto, y la consistencia del sistema es muy alta. La  $T_g$ , por encima

de la cual el esqueleto del polímero empieza a moverse, puede ser medida mediante diferentes técnicas. Debido a que la  $T_g$  se define cinéticamente, ésta disminuirá con el tiempo de medida, o lo que es lo mismo, aumentará al aumentar la frecuencia del ensayo.

La determinación de la  $T_g$  en proteínas no globulares es generalmente un proceso simple. Sin embargo, en el caso de proteínas globulares, el proceso es bastante más complejo. Sólo en sistemas en los que la proteína se encuentra hidratada puede determinarse la  $T_g$  mediante DSC y técnicas reológicas (Sartor y col., 1994; Ferrari y col., 1997; Brownsey y col., 2003; Tsereteli y col., 2000; Farahnaky y col., 2005).

En las figura 3.2.1.1.1. aparecen las respuestas recogidas por métodos calorimétricos (DSC) durante la primera etapa de calentamiento para las tres proteínas estudiadas, gluten, soja y caseína, a un único contenido en agua comparable para las tres proteínas ( $12,7\pm 1\%$ ). Los tres termogramas muestran un pico endotérmico durante el primer calentamiento en el DSC, justamente por encima de la temperatura de transición vítrea.

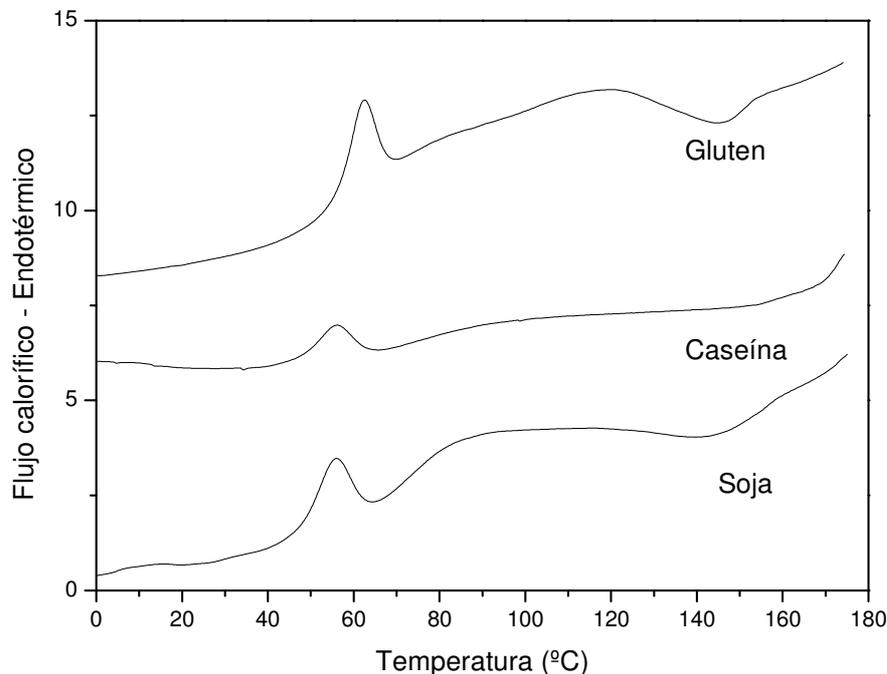


Figura 3.2.1.1.1. Termograma obtenido para las proteínas estudiadas durante la primera etapa de calentamiento a una velocidad de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Este pico endotérmico aparece a menudo en el primer calentamiento de sistemas vítreos, en función de su historia térmica y de su  $T_g$ ; el pico endotérmico aparece a una temperatura entre la temperatura de almacenamiento de la muestra y la temperatura a la que la transición desde un estado vítreo a gomoso (glass-rubber) ha tenido lugar; este pico se debe probablemente a una relajación entálpica asociada a un efecto conocido como envejecimiento físico de los sistemas vítreos (Lourdin y col., 2002; Farhat, 2004), bastante estudiado en el caso de los polímeros sintéticos (Hay, 1993; Drozdov, 2001; Toufeili y col., 2002). Este efecto se encuentra asociado con un cambio en las propiedades del material, incluido su comportamiento mecánico y difusional. Estos cambios tienen importantes consecuencias prácticas en cuanto a la estabilidad de un material vítreo (Lourdin y col., 2002). El fenómeno de la relajación entálpica es frecuentemente irreversible durante la escala de tiempo del ensayo calorimétrico de DSC. Para evitar que el solapamiento entre los fenómenos térmicos reversibles (como la transición vítrea) e irreversibles (como la relajación entálpica) impidan una buena caracterización de la transición vítrea, ésta se determina normalmente a partir de un segundo calentamiento, en el que sólo aparecen los fenómenos reversibles. La existencia de este pico endotérmico ha sido atribuida en algún caso a mecanismos de desnaturalización en las proteínas, procesos ya detectados por otros autores en proteínas alimentarias. Como ya es conocido, la desnaturalización térmica de proteínas aparece en los termogramas como un pico endotérmico irreversible, a valores de temperatura que dependen del tipo de proteína y de las condiciones del medio (pH y fuerza iónica). Sin embargo, los cambios entálpicos detectados para la desnaturalización de proteínas provocan valores de incrementos de entalpía muy superiores a los asociados a fenómenos de relajación entálpica.

En la figura 3.2.1.1.2. se presentan los resultados correspondientes a la segunda etapa de calentamiento obtenidos tras la primera etapa seguida de un período de enfriamiento rápido a 50°C/min.

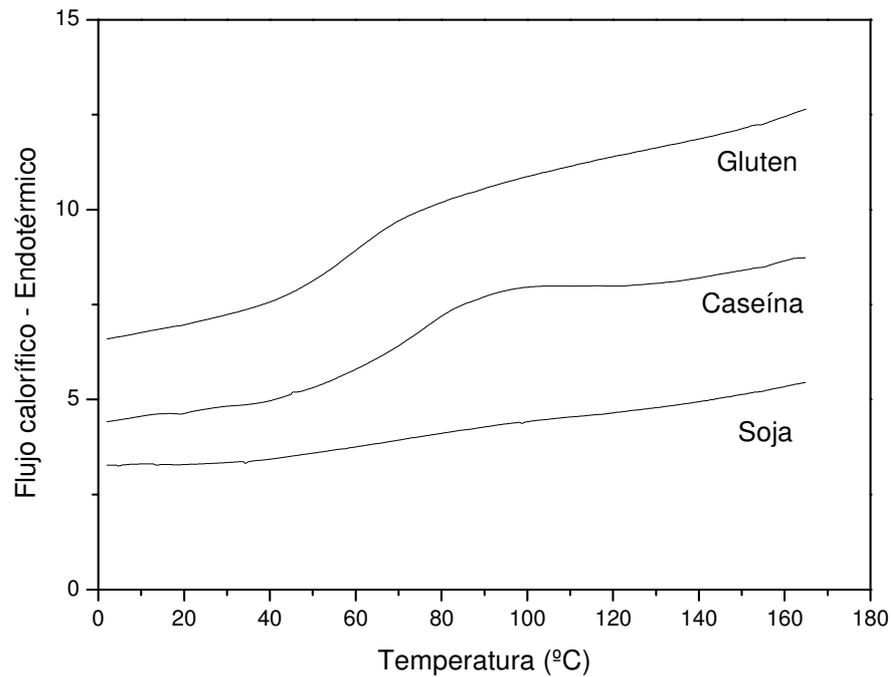


Figura 3.2.1.1.2. Termograma obtenido para las proteínas estudiadas durante la segunda etapa de calentamiento a una velocidad de 10°C/min

La temperatura correspondiente al punto medio del cambio en la capacidad calorífica durante el segundo calentamiento es la que se toma como temperatura de transición vítrea. Tal como puede observarse en la figura 3.2.1.1.2., este cambio es menos evidente para el caso del aislado proteico de soja que para las otras dos proteínas, gluten y caseína. La amplitud de la transición en el caso de la soja podría explicarse por el hecho de que el aislado proteico de soja utilizado es básicamente una mezcla de dos sistemas proteicos (7S y 11S). Morales y Kokini (1997) han indicado que, por ejemplo, para un contenido en agua del 15%, la temperatura de transición vítrea de la globulina de soja 11S es alrededor de 40°C más alta que la de la globulina 7S.

Otra técnica utilizada para la medida de la temperatura de transición vítrea ha sido el análisis de transición de fases (PTA). En la figura 3.2.1.1.3. se recoge el desplazamiento del pistón en función de la temperatura en el PTA para las tres proteínas estudiadas para una presión de 150 bares y una velocidad de calentamiento de 5°C/min. A medida que la muestra empieza a reblandecerse, el movimiento del pistón se hace mayor. La transición vítrea tiene lugar durante un intervalo de temperaturas, y la temperatura de transición vítrea se toma como aquella en la que la derivada de la representación desplazamiento-temperatura se hace máxima. En esta figura puede apreciarse como el gluten presenta una densidad inicial mayor que la de la soja o la caseína, así como un menor grado de compresión conforme se produce el aumento de la temperatura. Esto parece sugerir que incluso en el estado vítreo, el gluten es más deformable que las otras dos proteínas.

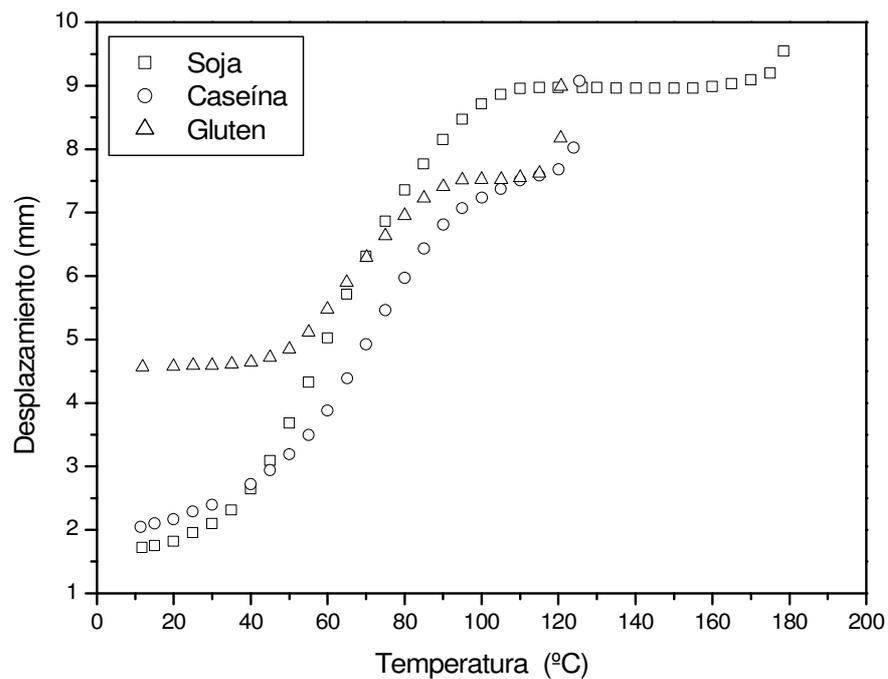


Figura 3.2.1.1.3. Curvas desplazamiento-temperatura obtenidas con la técnica PTA. Los contenidos en agua son: soja (9,60% p/p), caseína (10,56% p/p) y gluten (9,06% p/p).

La transición vítrea también puede ser detectada mediante ensayos térmico-dinamomecánicos (DMTA) (figura 3.2.1.1.4.). Así, de la observación de las respuestas de los módulos  $E'$ ,  $E''$  y  $\tan\delta$  en función de la temperatura cuando la muestra es sometida a un ensayo de flexión con una frecuencia y deformación constantes dentro del

intervalo viscoelástico lineal, la temperatura de transición vítrea se puede calcular como la temperatura a la que se produce un descenso crítico en  $E'$ , o a la que  $\tan\delta$  o  $E''$  presentan un máximo. En el caso de los polímeros sintéticos, la temperatura de transición vítrea se define a partir de la posición del pico de  $\tan\delta$ . Normalmente, ese pico se encuentra a una temperatura superior a la del comienzo del descenso en  $E'$ . En el presente estudio la temperatura a la que  $E''$  presenta un máximo es la considerada como temperatura de transición vítrea, puesto que se encuentra entre la temperatura a la que  $E'$  disminuye y la temperatura a la que  $\tan\delta$  presenta el pico. Debe recordarse, no obstante, que al tratarse de una transición de segundo orden, el valor de la  $T_g$  depende de la frecuencia a la que se realice el ensayo. Por ello, todos los ensayos de DMTA han sido realizados a frecuencia constante (1 Hz). Los valores de  $T_g$  obtenidos a partir de este ensayo serán utilizados con fines comparativos exclusivamente.

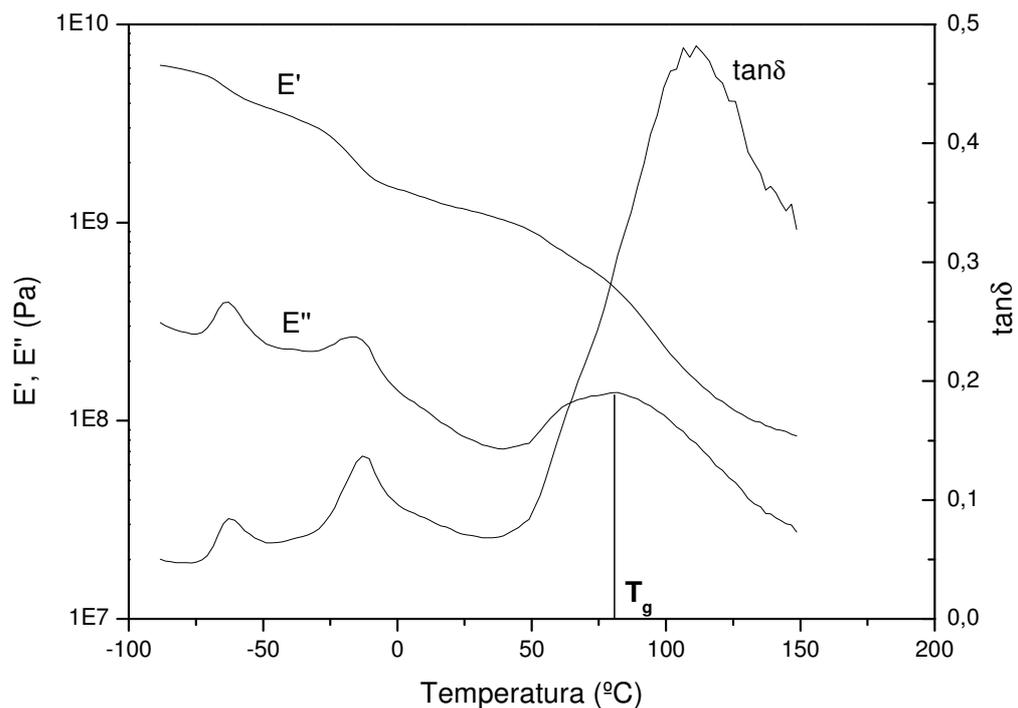


Figura 3.2.1.1.4. Evolución de  $E'$ ,  $E''$  y  $\tan\delta$  a partir del DMTA para la soja a una frecuencia de 1 Hz y una velocidad de calentamiento de 3°C/min, a un contenido en agua igual a 13,7%

Las figuras 3.2.1.1.5.a., 3.2.1.1.5.b. y 3.2.1.1.5.c. muestran la evolución de  $E'$ ,  $E''$  y  $\tan\delta$  con la temperatura para las tres proteínas a un único y comparable contenido en agua ( $12,7\pm 1\%$ ). Independientemente del contenido en agua, para las tres proteínas

se observa un pico de la variable de  $\tan\delta$  alrededor de  $-60^\circ\text{C}$ , como se puede observar en la figura 3.2.1.1.4. para la soja a una humedad relativa de 52,8%. Kalichevsky y col. (1992) también encontraron transiciones a bajas temperaturas, por debajo de la  $T_g$ , no detectables mediante otras técnicas, como el DSC o el PTA, llegando a la conclusión de que estas transiciones pueden ser debidas al comienzo de movimientos de corto alcance, anteriores a la transición vítrea, mientras que ésta indica el comienzo de movimientos de la cadena principal (de largo alcance). Otros autores (Di Gioia y col., 1999) han encontrado dos relajaciones débiles a  $-65^\circ\text{C}$  y a  $-25^\circ\text{C}$  en los resultados del DMTA, atribuyéndolas a relajaciones secundarias de las proteínas. Existen evidencias a partir de un buen número de técnicas de un tipo de transición vítrea en todos los sistemas polipéptido-agua a una temperatura que ronda los 200 K, siendo posible que esta relajación mecánica sea compatible con esas evidencias. A pesar de que esta transición puede ser relevante en cuanto al almacenamiento a bajas temperaturas de materiales biológicos, no influye sobre las principales respuestas reológicas del material. En el caso de los polímeros sintéticos, la caída en  $E'$  es del orden de  $\sim 10^3$  Pa desde el estado vítreo (*glassy*) hasta el plateau del estado gomoso (*rubbery*). Para los biopolímeros, esta caída es normalmente de un solo orden de magnitud. El gluten muestra un descenso en  $E'$  de  $\sim 10^2$  Pa y muestra además un pico para  $\tan\delta$  considerablemente mayor que el encontrado para la soja o la caseína. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los encontrados por Kalichevsky y col. (1993a), que han comparado los valores de  $\tan\delta$  y de  $E'$  para el gluten, la caseína, el caseinato, la ovoalbúmina y la gelatina en las proximidades de las temperatura de transición vítrea. Para un contenido en agua del 15%, han encontrado para el gluten una caída en  $E'$  de aproximadamente  $10^2$  Pa y un valor para el máximo en  $\tan\delta$  cercano a 0,75. Además estos autores obtuvieron, mediante DMTA, una temperatura de transición vítrea para el gluten mucho menor que para la caseína o el caseinato, lo que concuerda con los resultados presentados. De las proteínas estudiadas por Kalichevsky y col. (1993b), sólo la gelatina presentaba un descenso de  $E'$  comparable al del gluten, mostrando un mayor pico de  $\tan\delta$  ( $\sim 0,9$ ), y presentando una temperatura de transición vítrea, obtenida a partir del pico en  $\tan\delta$ , con un valor intermedio entre la del gluten y la caseína.

Esta caída relativamente grande en  $E'$  de  $10^2$  Pa ha sido también encontrada para el gluten seco por Pouplin y col. (1999), quienes además han indicado un valor para el máximo de  $\tan\delta$  igual a 0,75, comparable al valor obtenido en la figura 3.2.1.1.5.c. (0,8). Estos valores son superiores a los encontrados para la mayoría de los

sistemas biopolímero-agua. Sin embargo, es conveniente añadir que Pouplin y col. (1999) indicaron que el máximo de  $\tan\delta$  variaba con el contenido en agua, obteniendo un valor absoluto para  $E'$  de  $10^2$  Pa, menor que el mostrado en la figura 3.2.1.1.5.a. para la muestra de gluten que contiene 11,7% de agua.

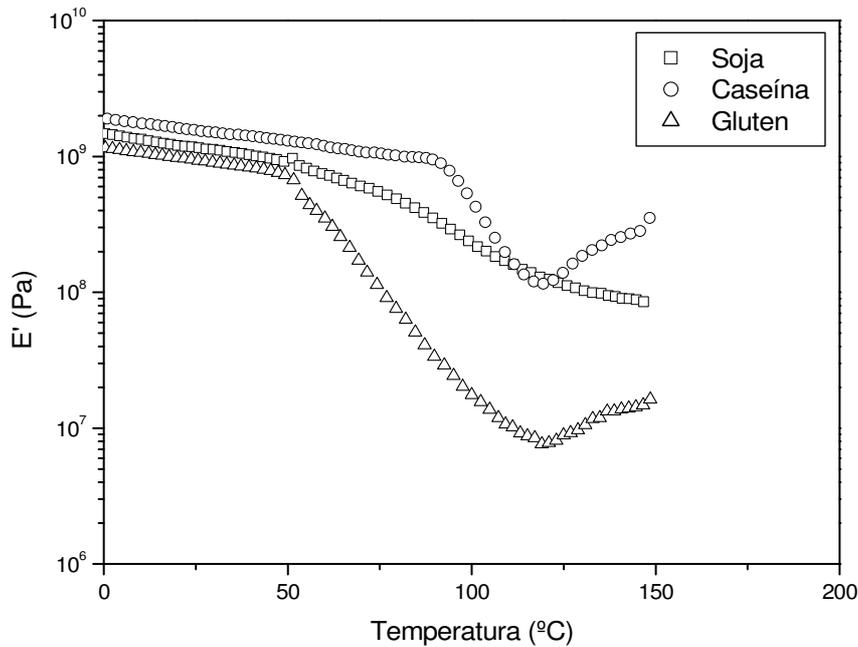


Figura 3.2.1.1.5.a. Evolución de  $E'$  a partir del DMTA para las tres proteínas estudiadas a una frecuencia de 1 Hz y una velocidad de calentamiento de  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ . Los contenidos en agua son: soja (13,7% p/p), caseína (12,9% p/p) y gluten (11,7% p/p).

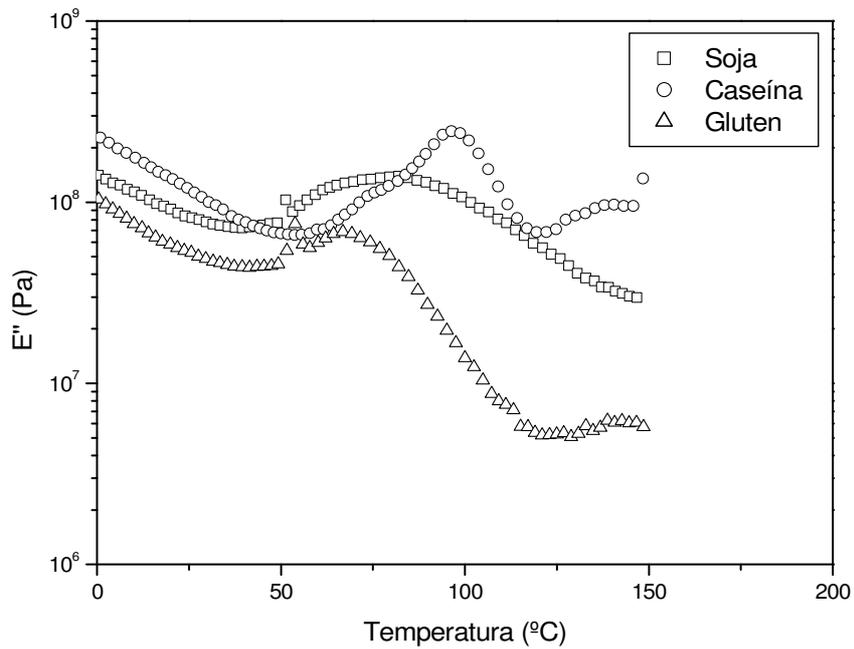


Figura 3.2.1.1.5.b. Evolución de E'' a partir del DMTA para las tres proteínas estudiadas a una frecuencia de 1 Hz y una velocidad de calentamiento de 3°C/min. Los contenidos en agua son: soja (13,7% p/p), caseína (12,9% p/p) y gluten (11,7% p/p).

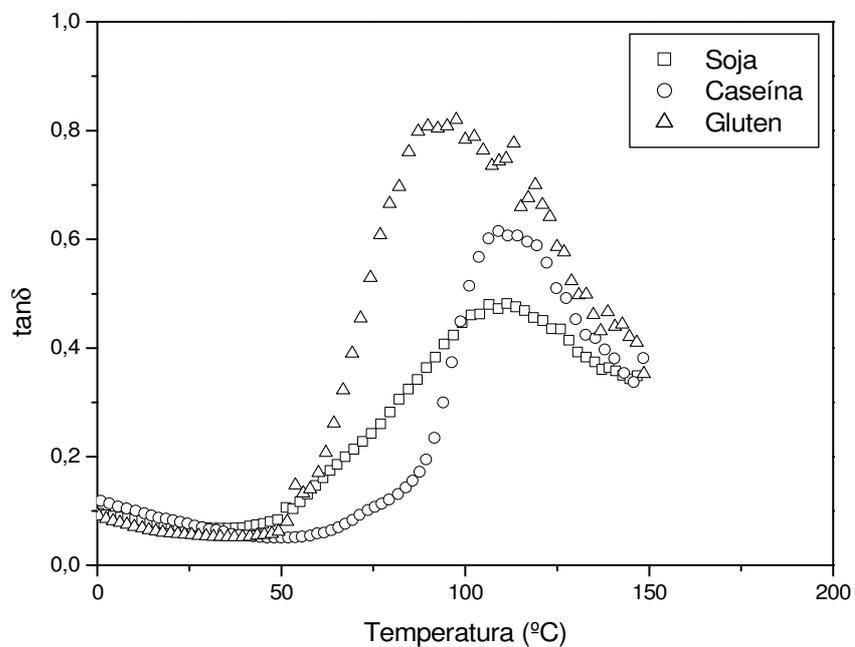


Figura 3.2.1.1.5.c. Evolución de tanδ a partir del DMTA para las tres proteínas estudiadas a una frecuencia de 1 Hz y una velocidad de calentamiento de 3°C/min. Los contenidos en agua son: soja (13,7% p/p), caseína (12,9% p/p) y gluten (11,7% p/p).

En la tabla 3.2.1.1.1. aparecen las  $T_g$  obtenidas mediante DMTA para las tres proteínas a un contenido en agua similar, y al igual que ocurre con las otras dos técnicas empleadas, la caseína es la proteína que presenta mayores valores de  $T_g$ , siendo el gluten el que presenta los valores menores.

Proteína	$T_g$ (DSC) (K)	$T_g$ (PTA) (K)	$T_g$ (DMTA) (K)
Gluten	332,6	347,9	339,3
Soja	343,2	352,6	353,8
Caseína	342,7	355,6	368,9

Tabla 3.2.1.1.1. Valores de la temperatura de transición vítrea para las tres proteínas estudiadas mediante DSC, PTA y DMTA a una humedad relativa igual a 52,8%

Por tanto, para un contenido en agua similar, los valores de la  $T_g$  son menores para el gluten, siendo similares para las otras dos proteínas, salvo con la técnica de DMTA, para la que se obtienen valores muy diferentes para cada proteína.

### 3.2.1.2. Influencia del contenido en agua sobre la $T_g$

Una vez se han obtenido los valores para la temperatura de transición vítrea de las tres proteínas a diferentes contenidos en agua, se comparan los resultados obtenidos con las tres técnicas utilizadas (figuras 3.2.1.2.1., 3.2.1.2.2. y 3.2.1.2.3.).

Slade y Levine (1993) y LeMeste y col. (1995) han indicado que la mayoría de los biopolímeros de alto peso molecular comparten una evolución similar de la  $T_g$  con el agua, que podría resumirse de forma práctica de la siguiente forma: (a)  $T_g$  para el biopolímero seco igual a  $200 \pm 50^\circ\text{C}$ . (b) La  $T_g$  disminuye en  $10 \pm 5^\circ\text{C}$  por porcentaje de agua (p/p). (c) La  $T_g$  se aproxima a la temperatura ambiente a  $20 \pm 5\%$  de agua. (d) La  $T_g'$ , temperatura de transición vítrea especial de sistemas concentrados por congelación se aproxima a  $-10 \pm 5^\circ\text{C}$  cuando la concentración de agua es de 25-30%.

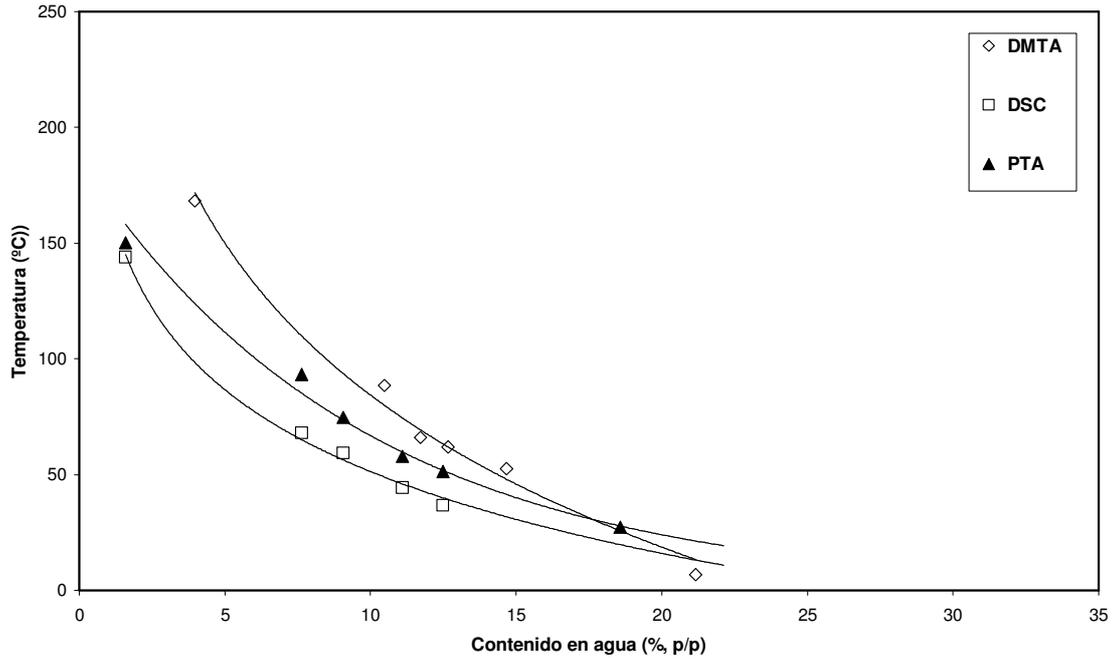


Figura 3.2.1.2.1. Influencia del contenido en agua sobre la  $T_g$  medida utilizando DSC, DMTA y PTA para el gluten

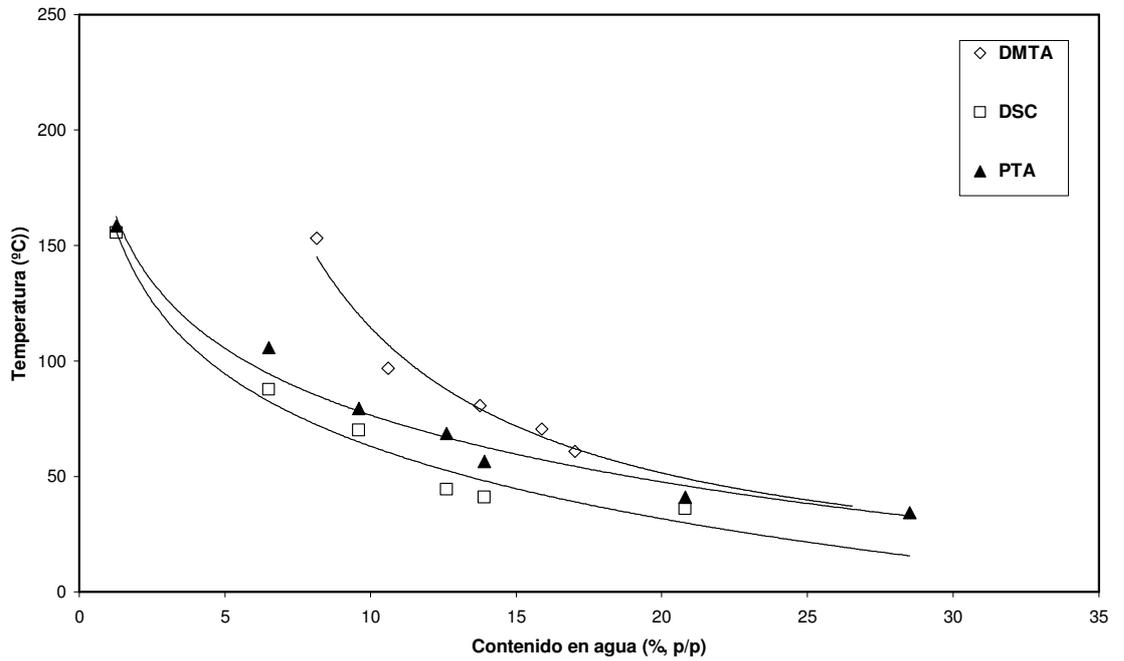


Figura 3.2.1.2.2. Influencia del contenido en agua sobre la  $T_g$  medida utilizando DSC, DMTA y PTA para la soja

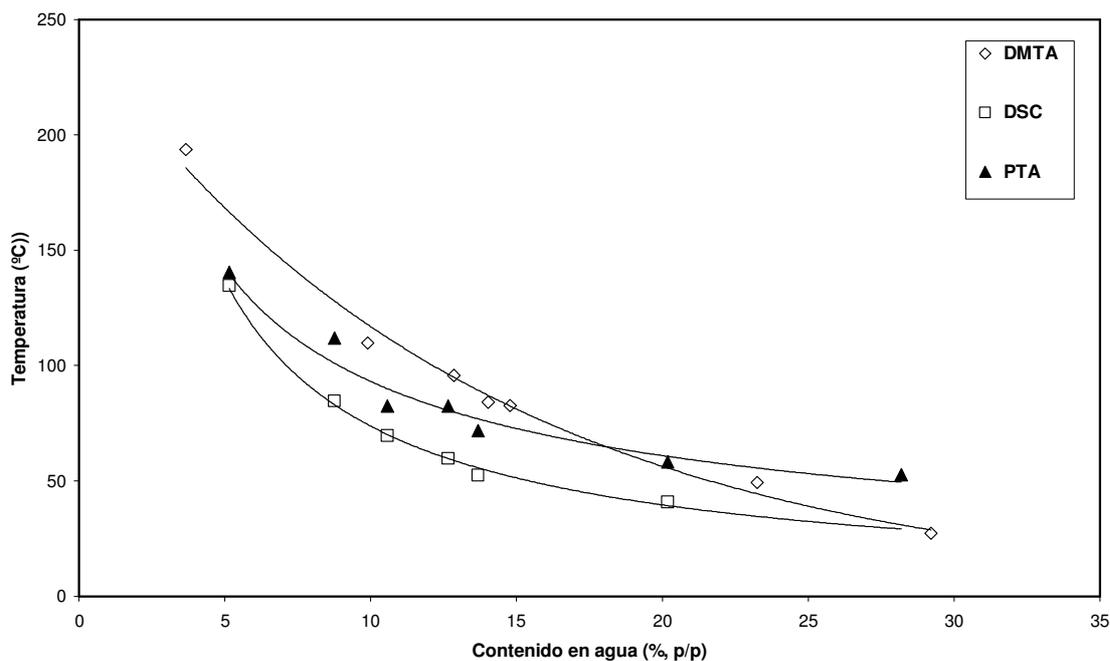


Figura 3.2.1.2.3. Influencia del contenido en agua sobre la  $T_g$  medida utilizando DSC, DMTA y PTA para la caseína

Bajo los criterios de medida adoptados, los valores de  $T_g$  obtenidos mediante las diferentes técnicas siguen el orden  $T_g$  [DMTA] >  $T_g$  [PTA] >  $T_g$  [DSC]. Kalichevsky y col. (1992) han indicado también un mayor valor para la temperatura de transición vítrea obtenida a partir del DMTA a 1 Hz que para la obtenida mediante DSC, aunque las diferencias entre ambas eran menores que en el presente estudio. Sin embargo, al menor contenido en agua, los valores obtenidos mediante DMTA parecen inusualmente altos, lo que podría explicarse por pérdida de agua no controlada a temperatura elevada (>150°C). Debe tenerse en cuenta que los valores de  $T_g$  obtenidos mediante DMTA dependen del método empleado para su determinación y de la frecuencia empleada para los ensayos de flexión oscilatoria. Así, el uso de frecuencias menores conducen a valores de  $T_g$  menores. El gluten presenta los valores menores de  $T_g$  para todos los contenidos en agua estudiados y con todas las técnicas utilizadas, mientras que la caseína es la que presenta los valores mayores.

Los valores de la  $T_g$  obtenidos mediante DSC para las tres proteínas estudiadas han sido ajustados a la ecuación de Gordon-Taylor:

$$T_g = \frac{W_1 T_{g1} + kW_2 T_{g2}}{W_1 + kW_2}$$

donde W es la fracción en peso, k es una constante, proporcional al efecto plastificante del agua, y los subíndices 1 y 2 se refieren a los dos componentes de la mezcla.

En la tabla 3.2.1.2.1. se muestran los resultados del ajuste. La temperatura de transición vítrea encontrada para el gluten seco se encuentra en sintonía con los valores que se pueden encontrar en la bibliografía, considerando el error experimental (433,15 K, Hosene y col., 1986; 435 K, Kalichevsky y col., 1992; 412-448 K para las diferentes subunidades del gluten, Noel y col., 1995; 436 K, Sartor & Johari, 1996; 423 K, Cherian & Chinachoti, 1996; 460 K, Pouplin y col., 1999; 448 K, Micard y col., 2001; 400,75 K, Toufeili y col., 2002). El valor para  $T_g$  obtenido a partir del mejor ajuste a la ecuación de Gordon-Taylor para la caseína seca es algo superior a los valores obtenidos por Kalichevsky y col. (1993a) ( $T_g = 417,15$  K) y por Mizuno y col. (1999) ( $T_g = 408,15$  K). Los resultados de la soja se corresponden con los encontrados en la bibliografía (387,15 (7S)-433,15(11S), Morales & Kokini, 1997; 423,15-473,15 K (mediante DMA), Ogale y col., 2000).

Proteína	$T_g$ (K)	K	$\Delta C_p$ [ $k=\Delta C_{p2}/\Delta C_{p1}$ ] ( $J g^{-1} K^{-1}$ )
Gluten	434,9	$4,93 \pm 0,61$	0,394
Soja	445,0	$4,42 \pm 0,79$	0,439
Caseína	479,4	$4,97 \pm 0,73$	0,391

Tabla 3.2.1.2.1. Valores de los parámetros de la ecuación de Gordon-Taylor para las tres proteínas estudiadas

La elevada temperatura de transición vítrea que se obtiene en ausencia de plastificantes (agua, en este caso) puede explicarse por la presencia de una cantidad significativa de interacciones polímero-polímero, por una alta densidad de puentes de hidrógeno, o por interacciones hidrofóbicas o iónicas (Pouplin y col., 1999).

A partir de la técnica PTA es posible obtener, además de la temperatura de transición vítrea, la temperatura de flujo ( $T_f$ ), que es la temperatura a partir de la cual la muestra empieza a fluir por un orificio situado en la parte inferior del dispositivo, una vez que se ha determinado la  $T_g$ . En las figuras 3.2.1.2.4., 3.2.1.2.5. y 3.2.1.2.6. se

comparan los valores de  $T_f$  y  $T_g$ , ambos medidos a una presión de 150 bares para las tres proteínas de estudio a diferentes contenidos en agua. Se puede observar cómo el gluten, que es la proteína que presenta la menor temperatura de transición vítrea, también empieza a fluir a temperaturas mucho más bajas que las otras dos proteínas. Así, por ejemplo, a un contenido en agua igual a 15%, la  $T_f$  del gluten se encuentra alrededor de 75°C, comparada con la  $T_f$  encontrada alrededor de 140°C o de 120°C para la soja y la caseína, respectivamente. Otro aspecto a señalar es la diferencia de temperatura constante entre las temperaturas de transición vítrea y de flujo para las tres proteínas. Esta diferencia es de ~37°C para el gluten, ~39°C para la caseína y ~75°C para la soja. Este resultado sugiere una fuerte relación entre la transición vítrea y la capacidad de las proteínas para fluir. La mayor diferencia entre los valores de  $T_g$  y  $T_f$  para la soja puede estar relacionado con la transición más prolongada que se ha encontrado para esta proteína en los resultados de DSC, así como en los resultados de DMTA ( $E'$ ). Así, el sistema no comienza a fluir hasta que no se alcanza una movilidad suficiente de las cadenas de biopolímeros y para ello debe haber finalizado el proceso de transición vítreo-gomoso.

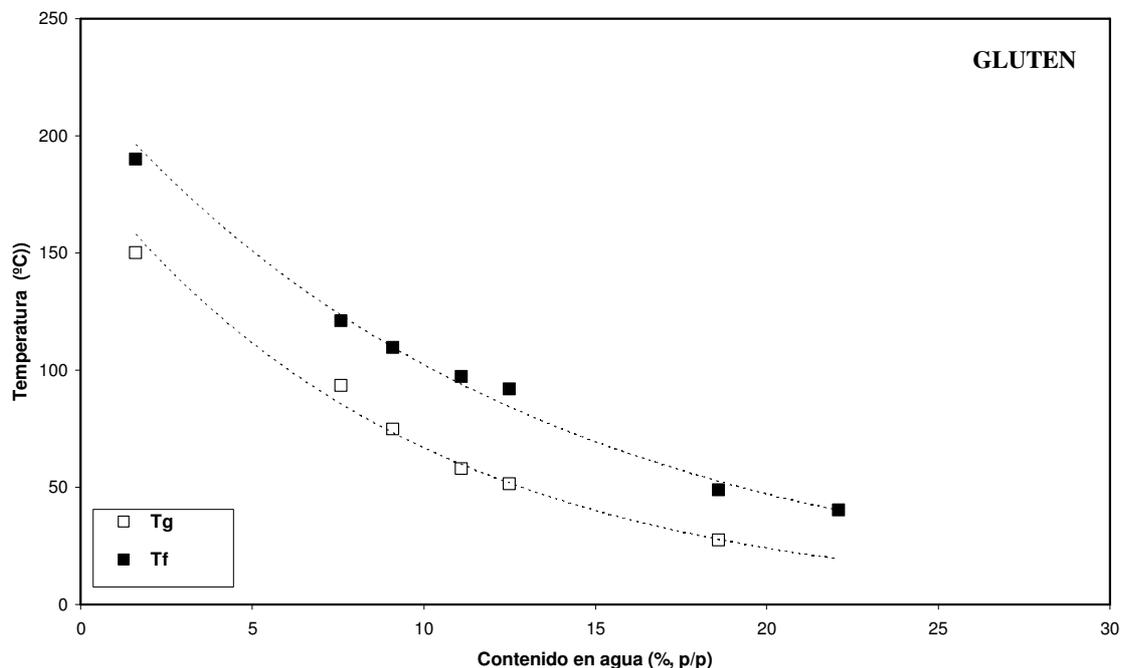


Figura 3.2.1.2.4. Influencia del contenido en agua sobre la  $T_g$  y la  $T_f$  para el gluten, obtenidas a una presión de 150 bares y a una velocidad de calentamiento de 5°C/minuto.

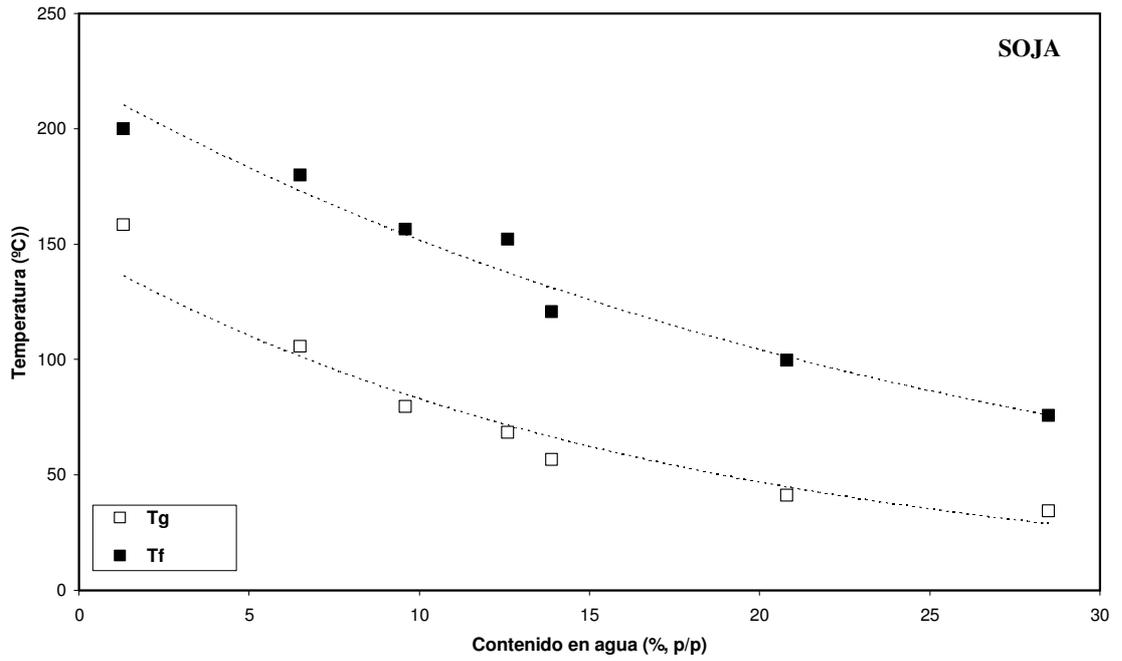


Figura 3.2.1.2.5. Efectos del contenido en agua sobre la  $T_g$  y la  $T_f$  para la soja. La  $T_g$  y la  $T_f$  han sido obtenidas a una presión de 150 bares y a una velocidad de calentamiento de 5°C/minuto

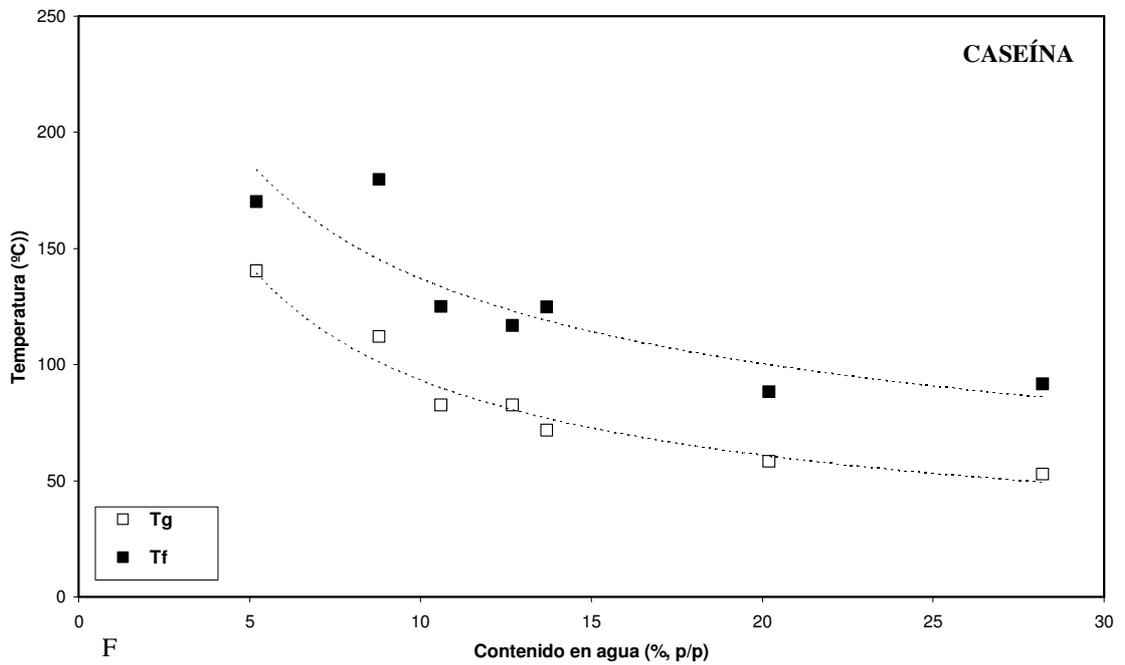


Figura 3.2.1.2.6. Efectos del contenido en agua sobre la  $T_g$  y la  $T_f$  para la caseína. La  $T_g$  y la  $T_f$  han sido obtenidas a una presión de 150 bares y a una velocidad de calentamiento de 5°C/minuto

### 3.2.2. Reometría capilar

#### 3.2.2.1. Influencia de la concentración de agua

Puesto que se trata de sistemas proteicos a los que se les añade una cantidad variable de agua, nos referiremos a concentración de humedad.

En las figuras 3.2.2.1.1., 3.2.2.1.2., 3.2.2.1.3. y 3.2.2.1.4. aparecen los resultados que muestran la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla y extensional en el reómetro capilar para los valores extremos estudiados de contenido en agua (25% y 45% p/p) y temperatura (75°C y 120°C). Las tres proteínas muestran un comportamiento similar, con una disminución en los valores de las viscosidades de cizalla y extensional conforme aumenta la velocidad de deformación (“*shear thinning*” y “*extensional thinning*”) para todas las condiciones estudiadas. Las viscosidades de cizalla son más sensibles a cambios en el contenido en agua que las viscosidades extensionales; las viscosidades extensionales son mucho más elevadas que las de cizalla, con un cociente de Trouton de 10 a 70. Sin embargo, presentan velocidades de deformación mucho menores; la región en la que se han registrado las viscosidades de cizalla coincide con la región de registro de la viscosidad extensional en torno a velocidades de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$ . A altas temperaturas, esta región común se extiende en un mayor intervalo de velocidades.

En todos los casos, la viscosidad obtenida en el capilar a las menores velocidades de cizalla es mucho menor para el gluten que para la soja y la caseína. En cambio, estas dos proteínas tienen valores muy próximos. Esta diferencia entre el gluten y las otras dos proteínas es máxima para las condiciones que más se acercan a la temperatura de transición vítrea (75°C y 25% de agua), en las que el gluten tiene una viscosidad de cizalla entre uno y dos órdenes de magnitud menor que la soja y la caseína. Estos resultados concuerdan con los valores para la temperatura de flujo medidos mediante la técnica PTA. Así, por ejemplo, para un contenido en agua del 20%, el valor de la  $T_f$  para el gluten es alrededor de 50°C menor que para las otras dos proteínas. La temperatura de transición vítrea es también menor para el gluten que para la soja y la caseína, como se ha visto anteriormente. La proteína de soja es la que siempre ofrece los valores más altos de la viscosidad extensional, si se compara con las otras proteínas. Esta diferencia es mayor para la temperatura más baja. Si ordenamos las proteínas estudiadas de mayor a menor viscosidad en los sistemas estudiados

tendríamos: soja > caseína > gluten. Este orden coincide con el que tendríamos si las ordenamos de mayor a menor  $T_f$  medida con el PTA, o de mayor a menor  $T_g$ , medida con las tres técnicas utilizadas (PTA, DMTA y DSC).

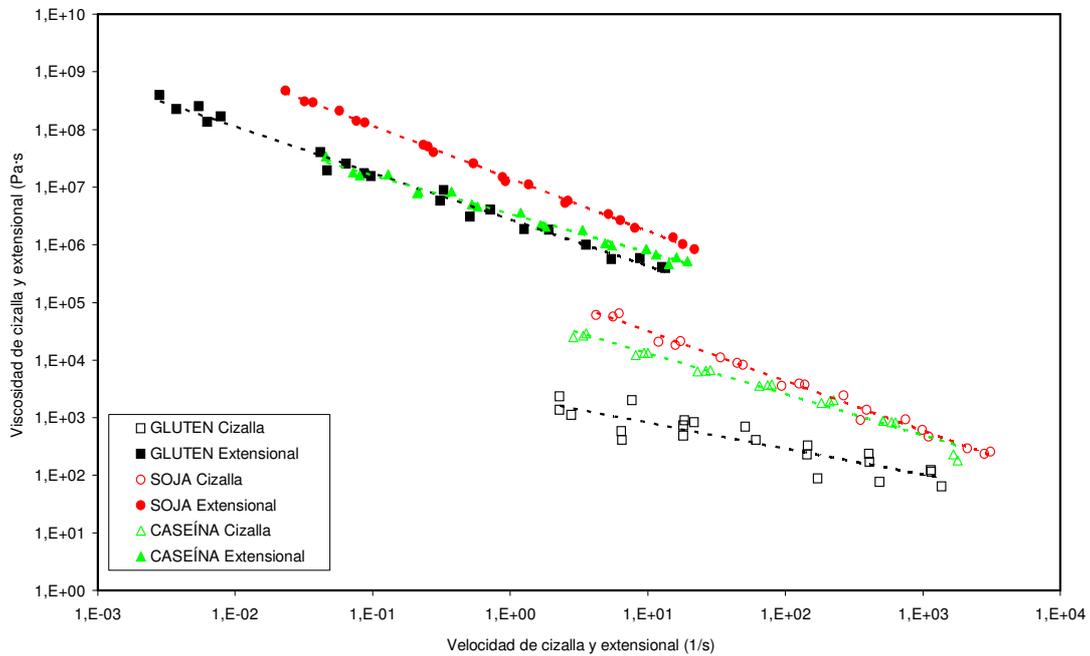


Figura 3.2.2.1.1. Viscosidad de cizalla y extensional de las proteínas estudiadas con un contenido en agua de **25%** (p/p) y a una temperatura de **75°C**

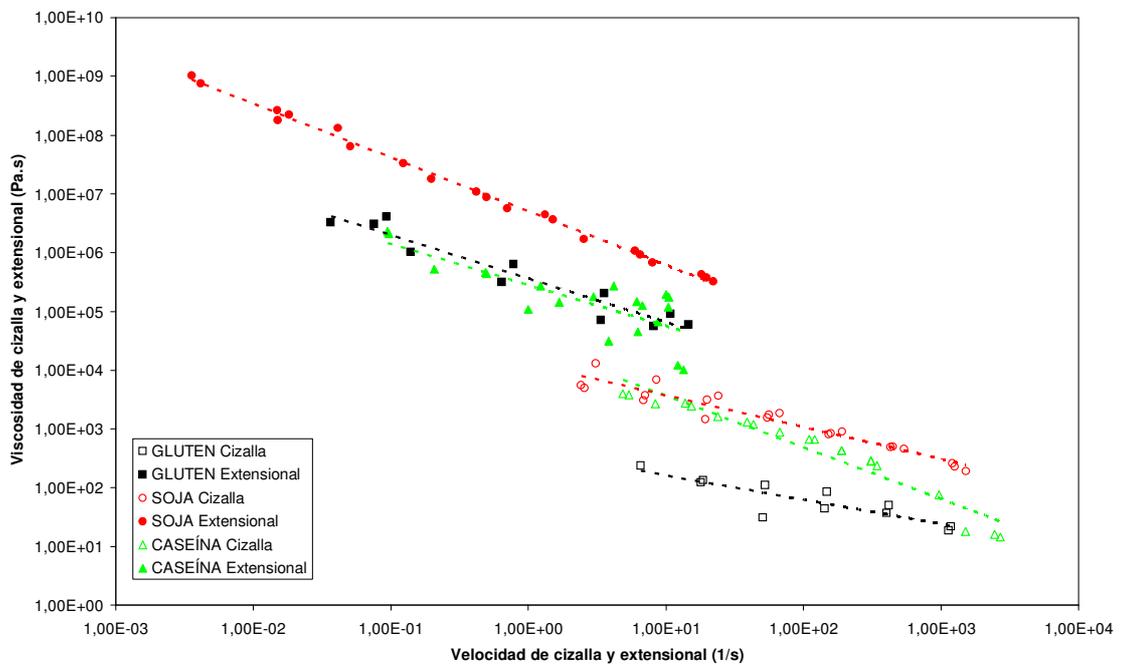


Figura 3.2.2.1.2. Viscosidad de cizalla y extensional de las proteínas estudiadas con un contenido en agua de **45%** (p/p) y a una temperatura de **75°C**

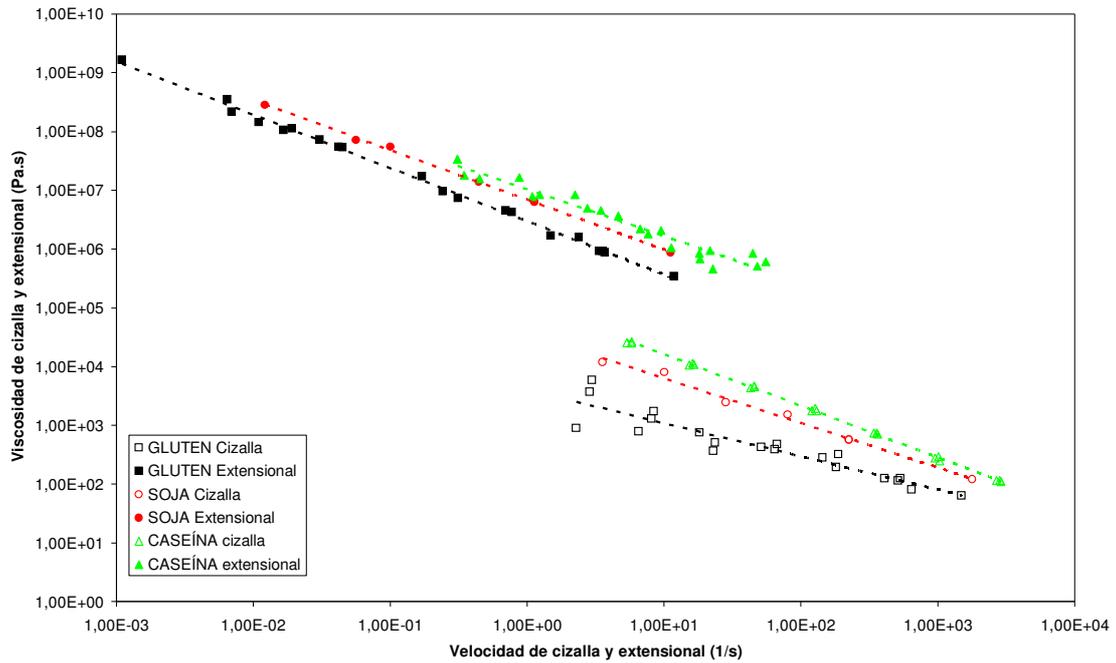


Figura 3.2.2.1.3. Viscosidad de cizalla y extensional de las proteínas estudiadas con un contenido en agua de 25% (p/p) y a una temperatura de 120°C

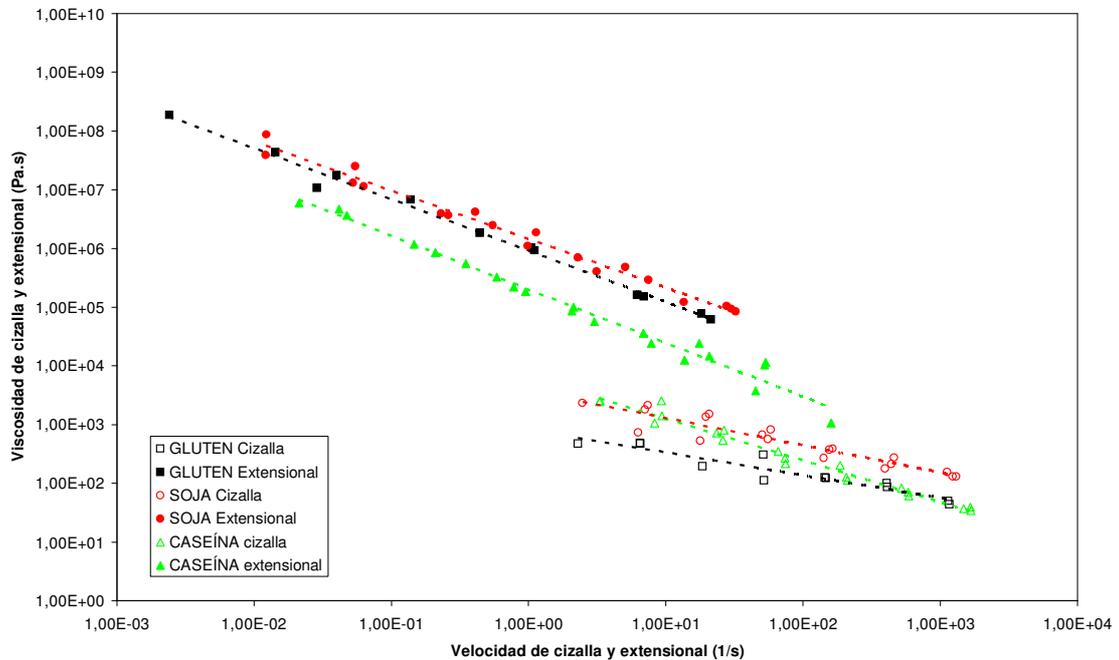


Figura 3.2.2.1.4. Viscosidad de cizalla y extensional de las proteínas estudiadas con un contenido en agua de 45% (p/p) y a una temperatura de 120°C

Todos los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración de agua se han podido ajustar a un modelo potencial de la forma:

$$\eta(\dot{\gamma}) = K_{ciz} \dot{\gamma}^{m-1} \quad (3.2.2.1.1.)$$

$$\eta(\dot{\epsilon}) = K_{ext} \dot{\epsilon}^{m-1} \quad (3.2.2.1.2.)$$

donde  $K_{ciz}$  y  $K_{ext}$  son los índices de consistencia, obtenidos en reometría de cizalla y extensional, respectivamente, mientras que  $m$  y  $n$  son los correspondientes índices de flujo.

En las figuras 3.2.2.1.5. y 3.2.2.1.6. se representan los índices de flujo, resultantes del ajuste a las ecuaciones 3.2.2.1.1. y 3.2.2.1.2., en las mismas condiciones establecidas anteriormente. Mientras que en las figuras 3.2.2.1.7. y 3.2.2.1.8. aparecen representados los valores de las viscosidades de cizalla y extensional frente al contenido de agua a una velocidad de referencia de  $10 \text{ s}^{-1}$  para una temperatura de  $95^\circ\text{C}$ .

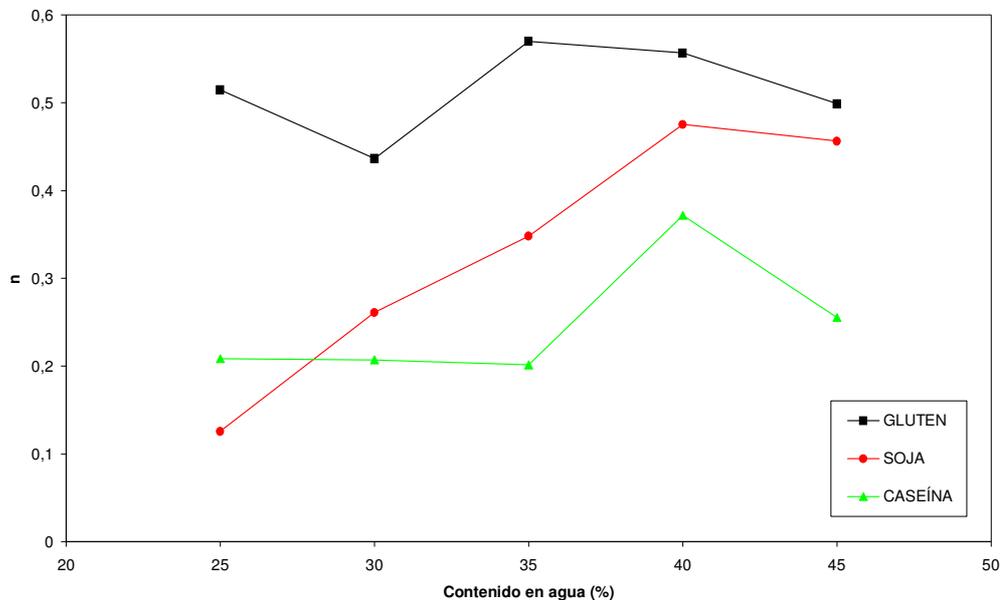


Figura 3.2.2.1.5. Índice de flujo de cizalla de las proteínas estudiadas a una temperatura igual a  $95^\circ\text{C}$  frente a la concentración de agua

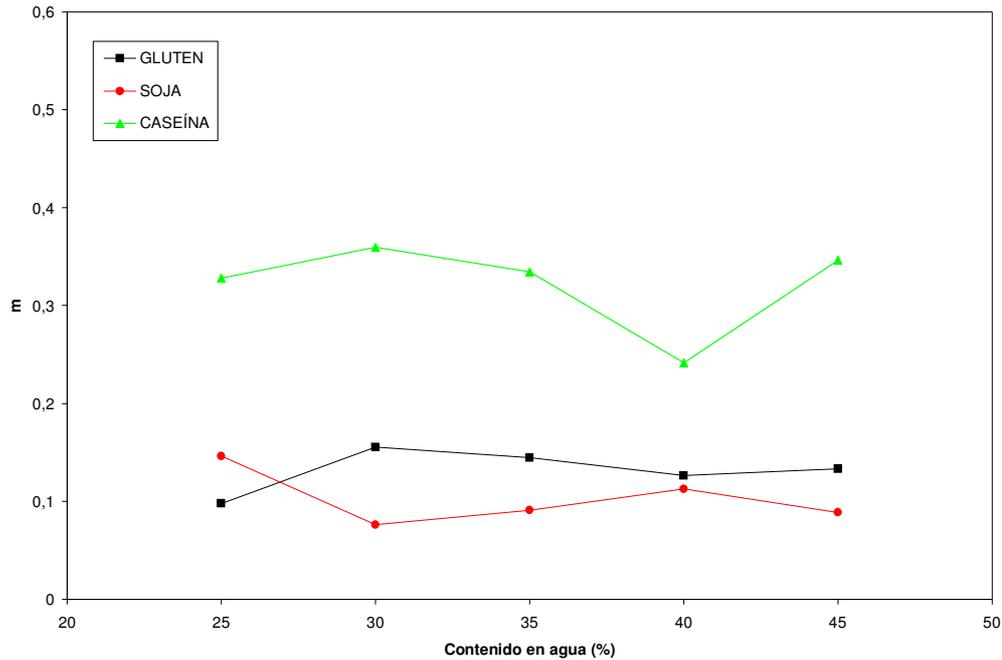


Figura 3.2.2.1.6. Índice de flujo extensional de las proteínas estudiadas a una temperatura igual a 95°C frente a la concentración de agua

La forma en que el índice de flujo depende del contenido de agua en ensayos de cizalla es diferente para cada proteína. El gluten presenta los mayores valores del índice de flujo y por tanto es la proteína que presenta menor sensibilidad a la cizalla. Además ésta no varía significativamente con el contenido de agua.

Por el contrario, la soja, que presenta los mayores valores de viscosidad de cizalla es la proteína que muestra una mayor dependencia entre índice de flujo y contenido de agua.

La caseína presenta un comportamiento intermedio con un incremento moderado de los valores de  $n$  con la concentración de agua.

Sin embargo, en flujo extensional, el índice de flujo obtenido a la temperatura de 95°C no experimenta variaciones significativas con el contenido de agua para ninguna de las tres proteínas estudiadas.

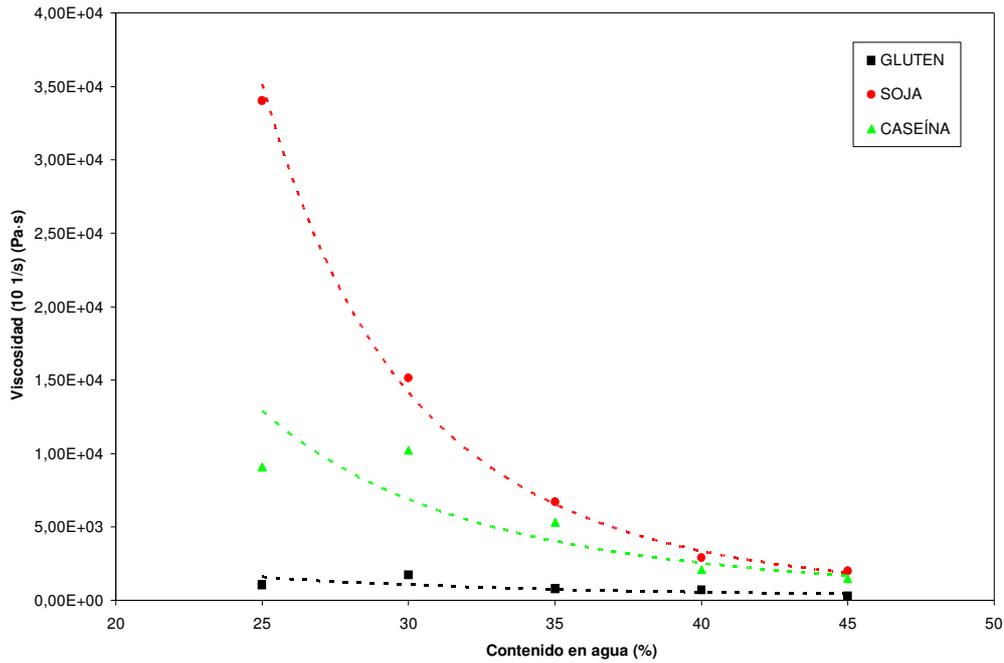


Figura 3.2.2.1.7. Viscosidad de cizalla a una velocidad de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$  de las proteínas estudiadas a una temperatura igual a  $95^\circ\text{C}$  frente a la concentración de agua

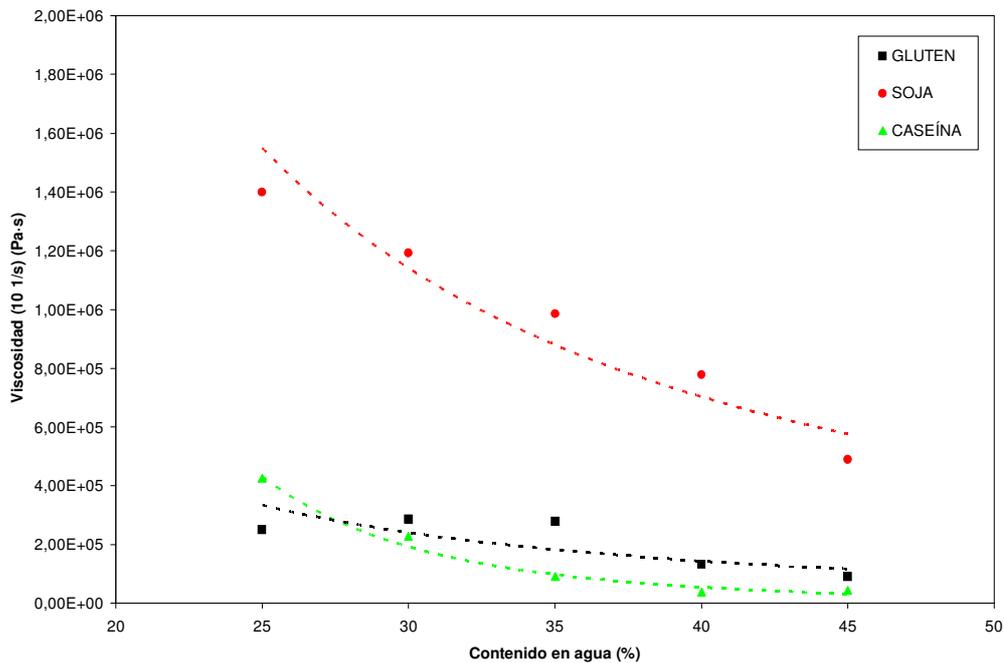


Figura 3.2.2.1.8. Viscosidad extensional a una velocidad de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$  de las proteínas estudiadas a una temperatura igual a  $95^\circ\text{C}$  frente a la concentración de agua

A partir de las figuras 3.2.2.1.7. y 3.2.2.1.8., resulta evidente que la dependencia de la concentración de agua sobre la viscosidad de cizalla y extensional es más importante para la soja que para la caseína y el gluten.

Tanto la viscosidad de cizalla como la viscosidad extensional experimentan un notable descenso cuando aumenta el contenido en agua para las tres proteínas utilizadas, lo cual viene a confirmar el efecto plastificante del agua sobre las mismas descrito a partir de la evolución de la temperatura de transición vítrea (obtenida a partir de DSC, DMTA o PTA) y de la temperatura de flujo (obtenida a partir de los ensayos del PTA).

### **3.2.2.2. Influencia de la temperatura**

En las figuras 3.2.2.2.1., 3.2.2.2.2., 3.2.2.2.3. se representan las curvas de flujo en cizalla y extensional en función de la temperatura para los diferentes sistemas con un contenido en agua igual a 35% (p/p).

Como se mencionó anteriormente, las curvas de flujo en cizalla y extensional siguen un comportamiento pseudoplástico que puede ajustarse a un modelo potencial (ecuaciones 3.2.2.1.1. y 3.2.2.1.2.).

Puede observarse una diferencia de comportamiento en la respuesta de las propiedades de flujo del gluten frente a la temperatura con respecto a las otras dos proteínas. Tanto para la caseína como para la soja, un aumento de la temperatura da lugar a una disminución, en mayor o menor grado, de las propiedades de flujo en cizalla y extensional. En cambio, en los sistemas que contienen gluten puede observarse un claro aumento de viscosidad extensional con la temperatura para una concentración de agua del 35% (p/p). La viscosidad de cizalla, por el contrario, presenta una tendencia a disminuir con la temperatura, a pesar de que los resultados muestran una mayor dispersión.

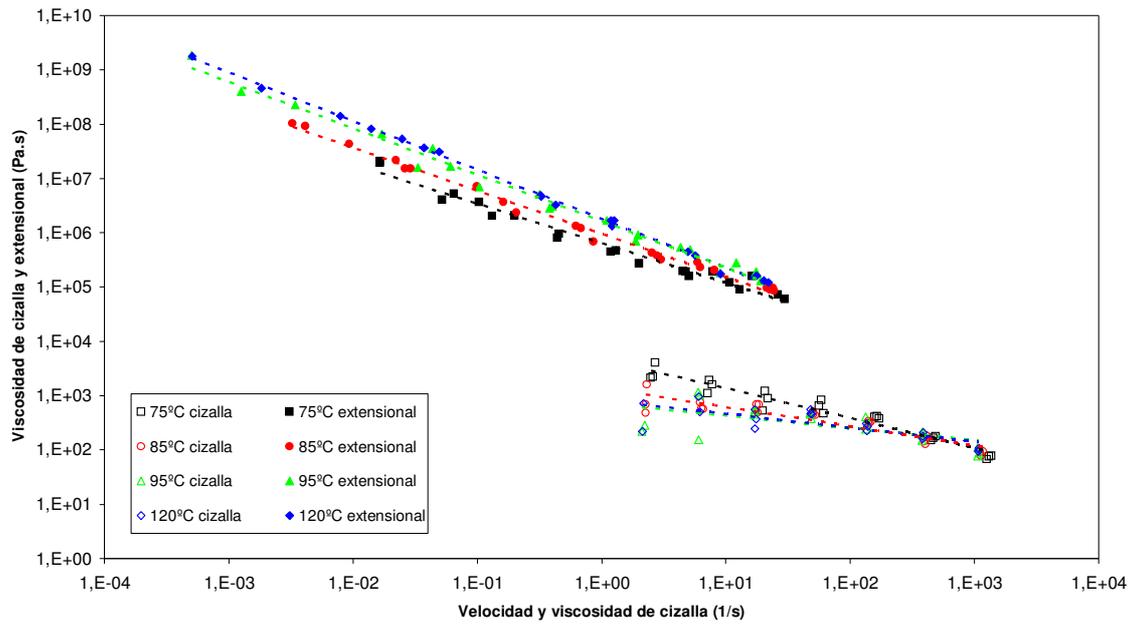


Figura 3.2.2.2.1. Viscosidad extensional y de cizalla de sistemas gluten-agua con un contenido en agua de 35% (p/p) a diferentes temperaturas

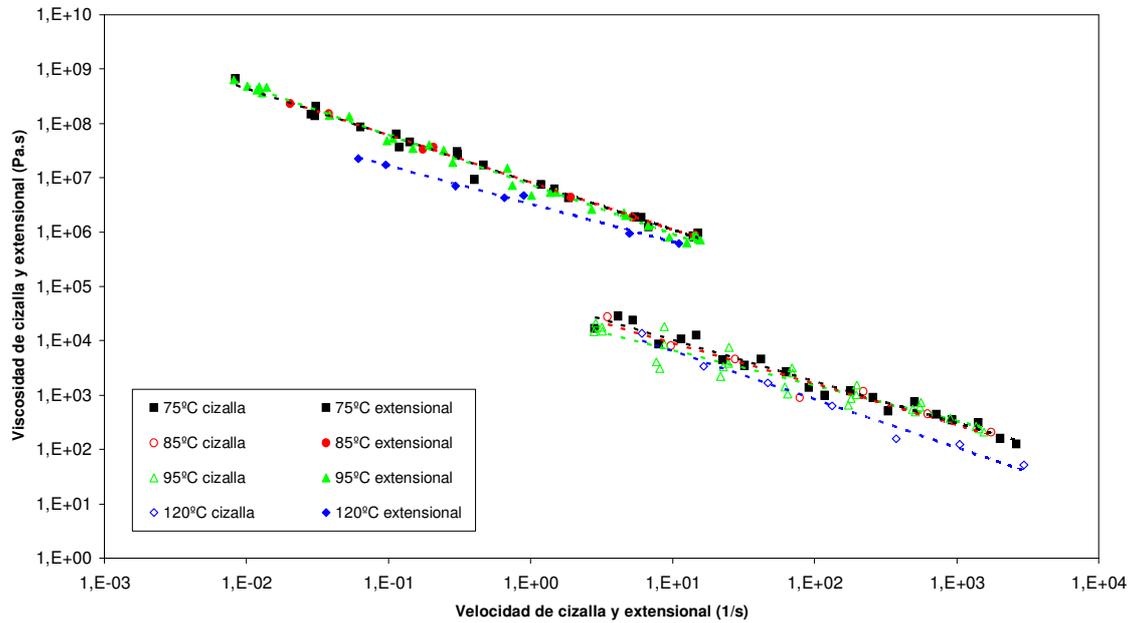


Figura 3.2.2.2.2. Viscosidad extensional y de cizalla de sistemas soja-agua con un contenido en agua de 35% (p/p) a diferentes temperaturas

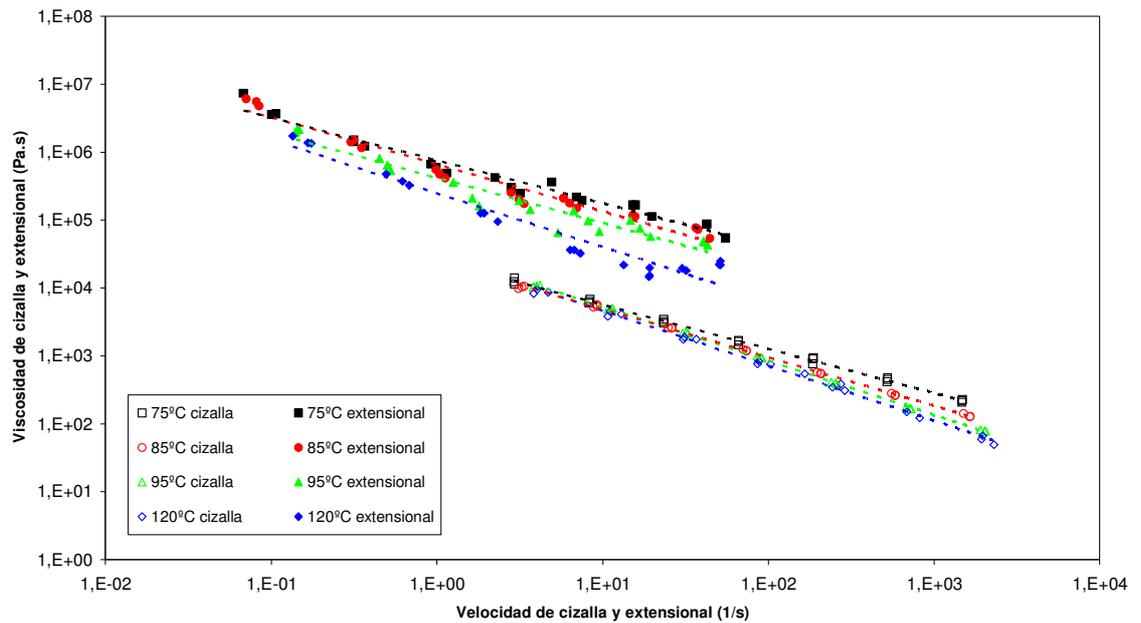


Figura 3.2.2.2.3. Viscosidad extensional y de cizalla de sistemas caseína-agua con un contenido en agua de **35%** (p/p) a diferentes temperaturas

El aumento de la viscosidad extensional con la temperatura puede estar relacionado con el hecho de que esta viscosidad se encuentra más asociada a los distintos efectos de los enlaces covalentes y entramados moleculares, puesto que un aumento de temperatura puede favorecer la formación de puentes de disulfuro en el gluten (Weegels y Hamer, 1998; Morel y col., 2000).

El ajuste potencial a las ecuaciones 3.2.3.1.1. y 3.2.3.1.2. para los flujos de cizalla y extensional, respectivamente, permite la obtención de gráficas como 3.2.2.2.4., 3.2.2.2.5., 3.2.2.2.6. y 3.2.2.2.7., en las que se representan las viscosidades de cizalla y extensional a una velocidad de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$  y los índices de consistencia frente a la temperatura.

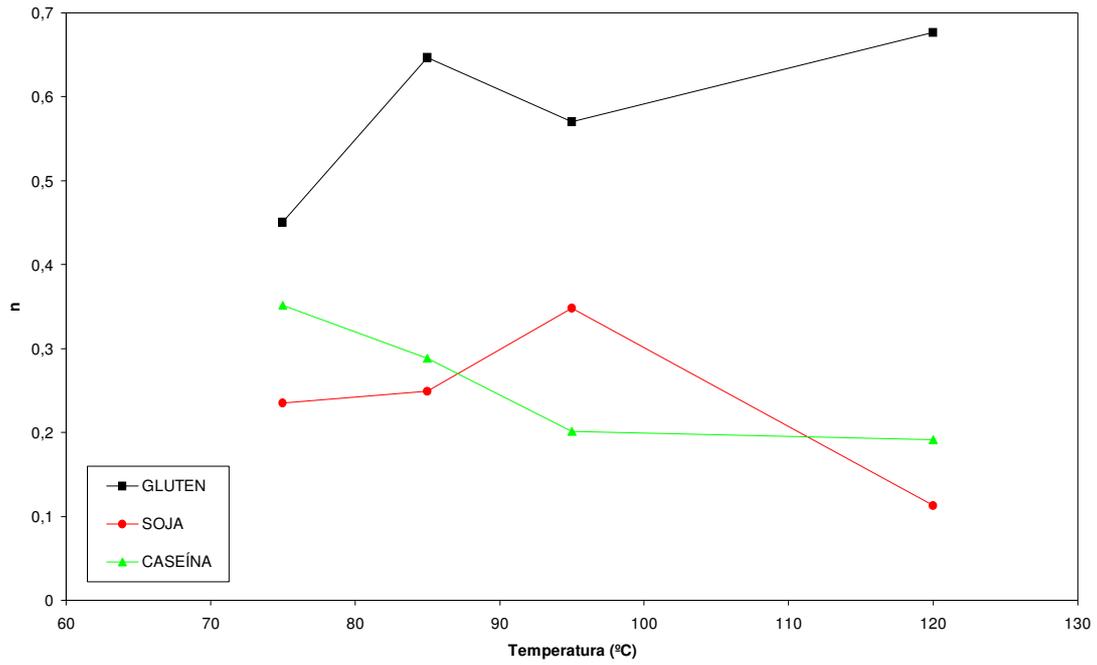


Figura 3.2.2.4.. Índices de flujo de cizalla de las proteínas estudiadas a una concentración de agua igual a 35% (p/p) frente a la temperatura

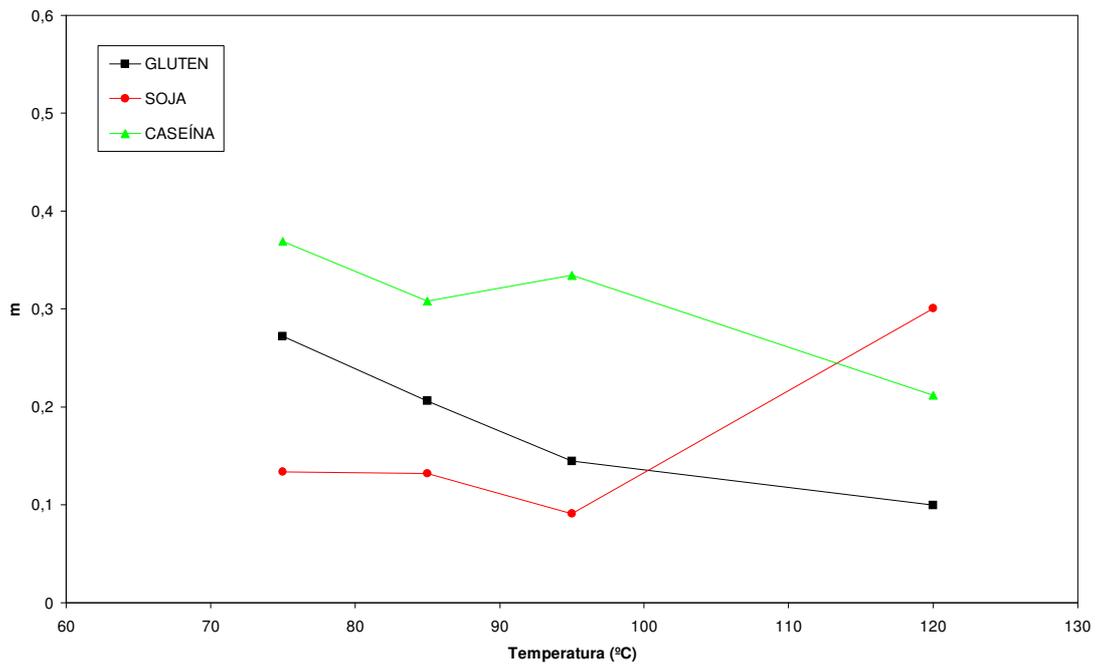


Figura 3.2.2.5.. Índices de flujo extensional de las proteínas estudiadas a una concentración de agua igual a 35% (p/p) frente a la temperatura

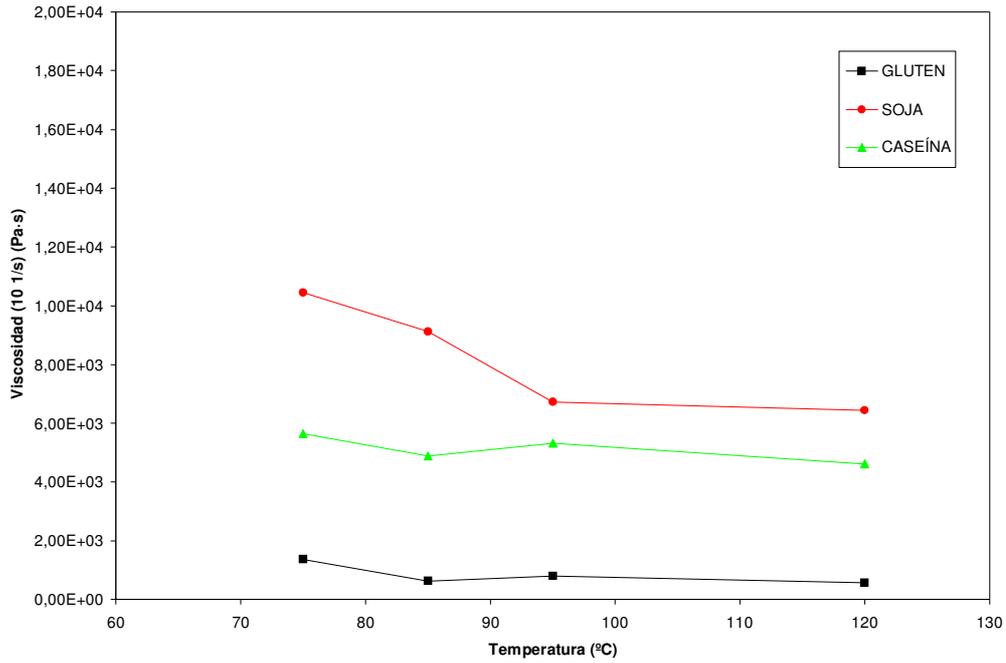


Figura 3.2.2.2.6.. Viscosidad de cizalla a una velocidad de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$  de las proteínas estudiadas a una concentración de agua igual a 35% (p/p) frente a la temperatura

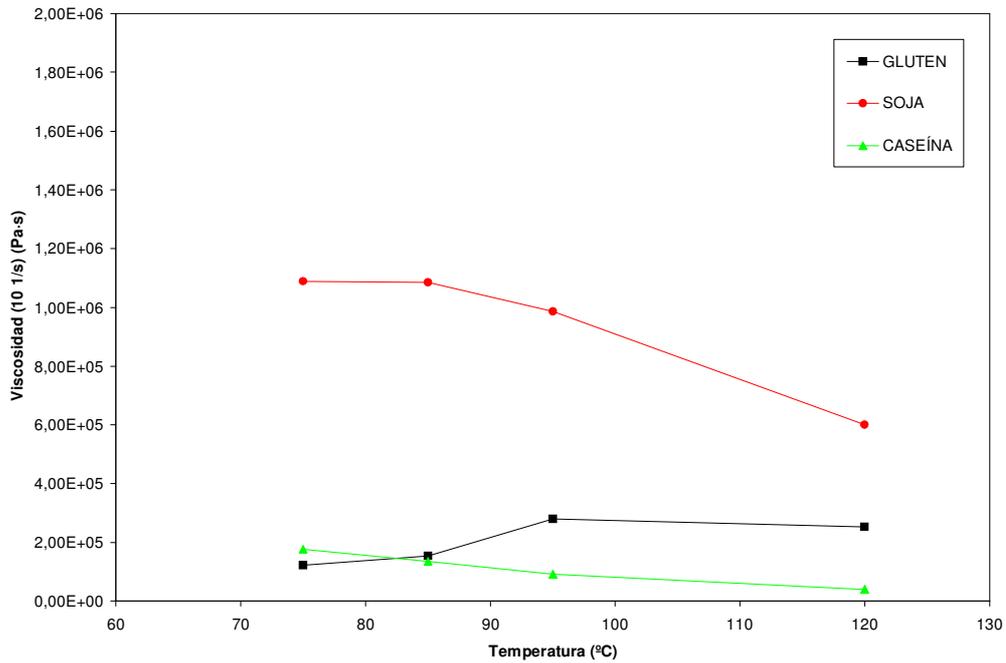


Figura 3.2.2.2.7.. Viscosidad extensional a una velocidad de deformación de  $10 \text{ s}^{-1}$  de las proteínas estudiadas a una concentración de agua igual a 35% (p/p) frente a la temperatura

El resultado más destacable corresponde al caso del gluten, en el que los valores del índice de flujo extensional disminuyen con la temperatura mientras que los del índice de flujo de cizalla aumentan.

### 3.2.2.3. Influencia del tipo de proteína

Teniendo en cuenta que las variables velocidad de deformación y contenido de agua han dado lugar a sendos ajustes a ecuaciones potenciales y exponenciales, respectivamente, y que la influencia de la temperatura sobre la viscosidad suele representarse por una ecuación tipo Arrhenius, puede realizarse un ajuste conjunto de los valores de la viscosidad en función de estas tres variables.

Así, se proponen las siguientes ecuaciones para flujo en cizalla y extensional, respectivamente:

$$\eta = k_{0,cizalla} \cdot \exp^{\Delta E_{cizalla}/RT} \cdot \exp^{-aMC} \cdot \left(\frac{\dot{\gamma}}{10}\right)^{n-1} \quad (3.2.2.3.1.)$$

$$\eta = k_{0,extensional} \cdot \exp^{\Delta E_{extensional}/RT} \cdot \exp^{-bMC} \cdot \left(\frac{\dot{\epsilon}}{10}\right)^{m-1} \quad (3.2.2.3.2.)$$

(Colonna y col., 1989)

donde  $\eta$  es la viscosidad,  $k_0$  es la viscosidad a  $10 \text{ s}^{-1}$  del sistema cuando el contenido de agua tiende a cero y la temperatura a infinito,  $\Delta E$ , la energía de activación,  $MC$ , el contenido en agua de la muestra,  $R$ , la constante de los gases universales,  $T$ , la temperatura absoluta,  $\dot{\gamma}$  y  $\dot{\epsilon}$ , la velocidad de cizalla y extensional, respectivamente,  $n$  y  $m$ , índices de flujo, y  $a$  y  $b$ , unas constantes. En la tabla 3.2.2.3.1. están recogidos los diferentes parámetros a partir del modelo propuesto para el flujo de cizalla del gluten, la soja y la caseína. A partir de estos valores, podemos deducir que el gluten, en general, muestra una viscosidad de cizalla menos dependiente de la velocidad de cizalla, de la temperatura y del contenido en agua que las otras dos proteínas. Así, la energía de

activación es notablemente inferior a las otras dos proteínas, lo que podría relacionarse con el efecto casi despreciable que tiene la temperatura sobre el valor de la viscosidad de cizalla.

Proteína	$K_0$ (Pa)	n	$\Delta E$ (kJ/mol)	a
Gluten	8302,63	0,45	5,70	4,96
Soja	35,93	0,34	30,3	5,83
Caseína	2,14	0,27	29,8	8,04

Tabla 3.2.2.3.1. Valores de los parámetros de la ecuación 3.2.2.3.1. correspondiente a la viscosidad de cizalla para los sistemas estudiados

En la tabla 3.2.2.3.2. aparecen los valores de los parámetros del modelo de Colonna y col. para el ajuste de las viscosidades extensionales, mostrándose las mismas tendencias encontradas con las viscosidades de cizalla en cuanto a la dependencia de la viscosidad con T y MC, aunque con una diferencia más importante entre las energías de activación de la soja y la caseína. Los índices de flujo, en cambio, son muy similares para las tres proteínas, siendo más bajos que los valores correspondientes a cizalla, lo cual indica una mayor dependencia de la viscosidad extensional con la velocidad de deformación. Como se ha comentado antes, la soja presenta siempre los valores más altos para la viscosidad extensional, si se comparan con los obtenidos para las otras dos proteínas, siendo la diferencia mayor para la temperatura más baja (75°C). Los valores de la viscosidad extensional para el gluten y la caseína se encuentran muy próximos a 75°C; pero, a 120°C, la viscosidad extensional del gluten se acerca a la de la soja, mientras que la caseína sigue presentando los menores valores.

Proteína	$K_0$ (Pa)	m	$\Delta E$ (kJ/mol)	b
Gluten	148738,25	0,17	3,02	6,78
Soja	0,35	0,16	42,5	7,38
Caseína	23368,95	0,21	14,8	8,69

Tabla 3.2.2.3.2. Valores de los parámetros de la ecuación 3.2.2.3.2. correspondiente a la viscosidad extensional para los sistemas estudiados

### 3.2.3. Relación entre $T_g$ y $\eta$

La viscosidad extensional está relacionada con la caída de presión que tiene lugar entre los extremos del capilar, y estará influenciada por parámetros como la resistencia molecular a la elongación y el grado de entramado entre las moléculas. La viscosidad extensional no parece estar relacionada con la temperatura de transición vítrea de la misma forma que sí lo está la viscosidad de cizalla. Podría sugerirse que el cociente de Trouton más alto de lo esperado obtenido para el gluten podría estar relacionado con sus propiedades extensionales (Breuillet y col., 2002), al aumentar el valor de la viscosidad cuando aumenta la deformación.

Si se estudian los resultados obtenidos con el reómetro capilar, es de particular interés la viscosidad de cizalla tan baja encontrada para los sistemas con gluten, si se comparan con las otras dos proteínas. La viscosidad a muy bajas velocidades de cizalla ( $\eta_0$ ) se encuentra relacionada con el módulo de relajación del esfuerzo  $G(t)$  mediante la expresión

$$\eta = \int G(T,t) dt \quad (3.2.3.1.)$$

donde  $T$  es la temperatura. La dependencia de  $G'$  con la frecuencia forma una imagen especular de la dependencia de  $G$  con el tiempo, correspondiéndose bajos valores de tiempo con altos valores de frecuencia (Ferry, 1980). Si se asume que esta superposición tiempo-temperatura se mantiene, entonces se tendría que una baja viscosidad estaría relacionada tanto con una baja temperatura de transición vítrea, como con un bajo valor de  $G$  o  $G'$  en el estado gomoso (*rubbery*), así como con una transición y una región gomosa estrechas en términos de tiempo o temperatura.

En el caso de un polímero sintético de alto peso molecular, al aumentar la temperatura tendrá lugar la transición vítrea, evidenciada por una caída en el módulo elástico,  $E'$ , desde unos  $10^3$  Pa hasta un valor definido por la densidad de interacciones no específicas entre cadenas. La transición vítrea puede definirse por un pico en la tangente de pérdidas,  $\tan\delta$ . La altura de este pico está relacionada de forma cuantitativa con la fracción en volumen del material que sufre la transición, de forma que para un polímero completamente amorfo la altura del pico es  $\sim 1,0$ , y la amplitud de la transición es normalmente  $10\text{-}20^\circ\text{C}$  (Wetton, 1986). La transición vítrea en polímeros sintéticos también se caracteriza por un cambio en la capacidad calorífica entre  $1,0$  y  $2,0 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Los estudios realizados sobre biopolímeros en los que el agua actúa como plastificante muestran unas transiciones invariablemente más pequeñas y anchas que las esperadas para un polímero sintético ideal de alto peso molecular. Así, por ejemplo, la caída del módulo  $E'$  es generalmente sólo de un orden de magnitud y la altura del pico suele ser menor a  $0,5$  (Kalichevsky y col., 1993b). Los cambios en la capacidad calorífica a la temperatura de transición vítrea son generalmente menores a  $0,4 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Para el caso de biopolímeros que tienen hidrógeno intermolecular es difícil detectar un cambio en la capacidad calorífica. La relación entre la estructura del polisacárido y la temperatura de transición vítrea determinada calorimétricamente ha sido discutida ampliamente por Bizot y col. (1997), que consideran el aumento en la  $T_g$  con varios tipos de

inmovilización de cadenas poliméricas. Para los polisacáridos con uniones 1-4 no es posible observar calorimétricamente una transición vítrea posiblemente por la existencia de puentes de hidrógeno específicos entre residuos (Gidley y col., 1993). Otras interacciones que contribuyen a inmovilizar el polímero aumentarían, en principio, el valor de la  $T_g$ . Estas interacciones provendrían de: cristalización, la presencia de estructura secundaria ordenada (como  $\alpha$ -hélice o de hoja plegada  $\beta$ , en las proteínas), enlaces covalentes, como los puentes de azufre, e interacciones intercatenarias específicas y no covalentes, conocidas a veces como hiperentramados (*hyperentanglements*) (Morris, 1981). Si las muestras son almacenadas a temperaturas superiores a la  $T_g$ , la transición vítrea que presentarían sería de mayor amplitud y de menor tamaño. Todos estos efectos aumentarían la viscosidad.

La baja viscosidad de cizalla del gluten respecto de las otras dos proteínas unida al alto valor de  $\tan\delta$  y al bajo valor del módulo en la región gomosa sugiere que las interacciones inmovilizantes son menores en este sistema proteína-agua que en la mayoría del resto de biopolímeros, pudiendo afirmarse que su comportamiento se asemeja al de un polímero sintético ideal. Esto no tiene una explicación clara. Un posible motivo sería la mayor hidrofobicidad que presenta el gluten, mostrada por su insolubilidad en agua. Otra posibilidad habría que buscarla en las diferencias en el contenido en los residuos prolina + hidroxiprolina de las proteínas. Estos residuos no son compatibles con la mayoría de las estructuras ordenadas ( $\alpha$ -hélice, hoja plegada  $\beta$ ) y, por tanto, pueden constituir otro factor que contribuiría a una estructura desordenada y extendida, antes que a una estructura ordenada y compacta (Mohammed y col., 2000). En la siguiente tabla aparecen recogidos los contenidos en estos residuos de las tres proteínas de estudio:

Proteína	Prolina+hidroxiprolina g/16 g Nitrógeno
<sup>1</sup> Caseína	10,6
<sup>2</sup> Gluten	11,8
<sup>3</sup> Soja	5,5

<sup>1</sup>Fox, 1992 ; Morr y Ha, 1993

<sup>2</sup>Kinsella, 1982

<sup>3</sup>Pearson, 1982 ; Fox, 1992

Tabla 3.2.3.1.

Si se dispone las proteínas de viscosidad de cizalla más alta a más baja, la secuencia obtenida sería soja > caseína > gluten, que sería la misma secuencia que se

obtendría si las disponemos con los residuos prolina + hidroxiprolina en orden creciente. Además, esta relación sería consistente con el alto valor de  $\tan\delta$  y el gran descenso en el módulo de almacenamiento encontrado para la gelatina (Kalichevsky y col., 1993b) durante la transición vítrea, puesto que la gelatina posee un elevado contenido de estos residuos (Mohammed y col., 2000). Esta secuencia, sin embargo, no se aplica a los resultados para la viscosidad extensional. Se piensa que la viscosidad extensional se encuentra más relacionada con los efectos de los enlaces covalentes y de lo entramados entre cadenas, mientras que la viscosidad de cizalla parece estar más ligada al efecto lubricante y plastificante de pequeñas moléculas, como el agua (Breuillet y col., 2002).

Es necesario apuntar que la gran cantidad de factores que contribuyen a la inmovilización de la cadena de polipéptido hace una interpretación detallada difícil de conseguir. Así, por ejemplo, Mizuno y col. (2000) demostraron que un entrecruzamiento de la caseína por la transglutaminasa producía un aumento en la temperatura de transición vítrea, como era de esperar, pero en cambio con la soja se producía un descenso en la  $T_g$ , que fue atribuida a una reducción en la estructura secundaria hoja plegada  $\beta$ , asociada a la reacción de entrecruzamiento. Otro factor que ha complicado aún más la interpretación de los resultados ha sido el hecho de que las altas temperaturas utilizadas hayan podido resultar en un entrecruzamiento adicional. En estudios del gluten realizados con DSC a bajos contenidos en agua se han observado regiones exotérmicas indicativas de este fenómeno, que han sido discutidos en detalle por Sartor y Johari (1996). Este comportamiento del gluten de trigo puede explicarse a través del intercambio entre los grupos disulfuro-tiol y la por oxidación del grupo tiol que tienen lugar durante el calentamiento, lo que conduce a un aumento de enlaces covalentes por puentes disulfuro en el gluten (Weegels y Hamer, 1998; Morel y col., 2000). El aumento de la viscosidad extensional del gluten a 120°C con el contenido en agua puede ser un argumento favorable. Además de los puentes disulfuro, que pueden ser reversibles, hay otra posibilidad de interacciones covalentes (Mohammed y col., 2000), como las uniones por tirosina (Tilley y col., 2001). Esto podría explicar el aumento del módulo  $E'$  a altas temperaturas en los ensayos de DMTA para la caseína y el gluten (figura 3.2.1.1.5.a.), aunque esto también podría deberse a la pérdida de agua. Pouplin y col. (1999), al estudiar el comportamiento del gluten a bajo contenidos en agua, sólo observó valores relativamente altos de  $\tan\delta$ , mostrados en este estudio en la figura 3.2.1.1.5.c., para muestras secas, plastificadas con un poliol o a contenidos en

agua superiores a 15%. A menores contenidos en agua, los valores de  $\tan\delta$  eran bajos, lo que sugería inmovilización, quizá causada por hidrógeno intermolecular mediada por los muy bajos niveles de agua, aunque esto necesitaría una mayor investigación.

Del estudio realizado sobre los sistemas proteína-agua tanto con las técnicas DSC, DMTA y PTA, como con el reómetro capilar de doble carga empleado, es posible sacar la conclusión de que el gluten presenta una viscosidad mucho menor que la soja o la caseína, lo que estaría relacionado, al menos parcialmente, a su menor temperatura de transición vítrea y la implicación de más cantidad de proteína en la movilización que tiene lugar durante la transición vítrea. Estos resultados han sido mostrados no sólo por técnicas como DSC, DMTA o reometría capilar, sino también mediante la medida de  $T_g$  y  $T_f$  con el analizador de transición de fases (PTA). Este efecto podría tener consecuencias no sólo en procesos de extrusión, sino también en la utilización del gluten en la formulación de productos de panadería.

### 3.3. Conclusiones

1. La evolución de la temperatura transición vítrea para las tres proteínas (gluten, soja, caseína) con el contenido en agua resulta independiente de la técnica utilizada (DSC, PTA, DMTA). Estos resultados ponen de manifiesto el efecto plastificante de las moléculas de agua, ya que la temperatura de transición vítrea disminuye al aumentar el contenido de humedad.
2. Los valores de la temperatura de transición vítrea presentados por la caseína rennet son los mayores, siendo el gluten el que presenta los menores valores de  $T_g$ .
3. Los valores para la temperatura de transición vítrea obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para diferentes humedades relativas han sido ajustados a la ecuación de Gordon-Taylor, resultando unos valores iguales para la temperatura de transición vítrea de la caseína, soja y el gluten próximos a los encontrados en la bibliografía, en estado seco.

4. Mediante la utilización de un reómetro capilar, se han obtenido valores de viscosidad de cizalla y extensional para el gluten, la soja y la caseína. Aunque los resultados obtenidos para la viscosidad extensional no permiten distinguir una tendencia clara, la soja es la que presenta los mayores valores de viscosidad de cizalla en el intervalo de velocidades de cizalla estudiado, mientras que el gluten presenta los menores valores.
  
5. Se ha establecido una relación entre la temperatura de transición vítrea y la viscosidad. Así, el gluten de trigo presenta los valores de temperatura de transición vítrea y viscosidad más bajos. Esto podría explicarse en base a los cambios que tienen lugar cuando la temperatura a la que se somete la proteína supera el valor de  $T_g$  (aumento del volumen libre, descenso de la viscosidad, aumento del calor específico, aumento de la expansión térmica).

**CAPÍTULO 4.**  
**PROCESADO**  
**DE**  
**EMULSIONES**

## CAPÍTULO 4. PROCESADO DE EMULSIONES

### 4.1. Introducción

A partir de este capítulo, el presente trabajo se centrará en las propiedades emulsionantes de proteínas vegetales, empezando por un estudio sobre la influencia que tienen las diferentes condiciones de procesado, como la temperatura o la velocidad de rotación del dispositivo emulsificador empleado, sobre las propiedades reológicas y la microestructura de las emulsiones resultantes. Varios autores han estudiado anteriormente el efecto de las variables de procesado sobre emulsiones estabilizadas con proteínas y/o tensioactivos (Gallegos y col., 1996; Franco y col., 1997; Sánchez y col., 1998). Así, se ha encontrado que las variables de procesado influyen sobre parámetros estructurales, como la reología de la fase continua, la distribución de tamaños de gota, las interacciones entre las partículas,... Todo ello conduce a diferencias importantes en el comportamiento reológico de las emulsiones producidas (Franco y col., 1995).

### 4.2. Resultados y Discusión

#### 4.2.1. Temperatura de procesado

Como primer paso en el estudio de las propiedades reológicas de las emulsiones, se han realizado ensayos dinámicos de barrido de esfuerzo (figura 4.2.1.1.) a frecuencia constante (6,28 rad/s), con el objeto de determinar el intervalo viscoelástico lineal. Para ello, y a partir de estos resultados, se realiza una representación de la deformación frente al esfuerzo (figura 4.2.1.2.); la desviación de la tendencia lineal ( $r < 0,999$ ), permite la obtención de los valores de los parámetros esfuerzo crítico ( $\tau_c$ ) y deformación crítica ( $\gamma_c$ ), por encima de los cuales se considera que la muestra deja de encontrarse dentro del intervalo viscoelástico lineal. El conocimiento de estos parámetros permite, posteriormente, asegurar la linealidad durante la medida en los ensayos dinámicos de barrido de frecuencia, al realizarse a valores de esfuerzo y deformación constantes inferiores a  $\tau_c$  y  $\gamma_c$ .

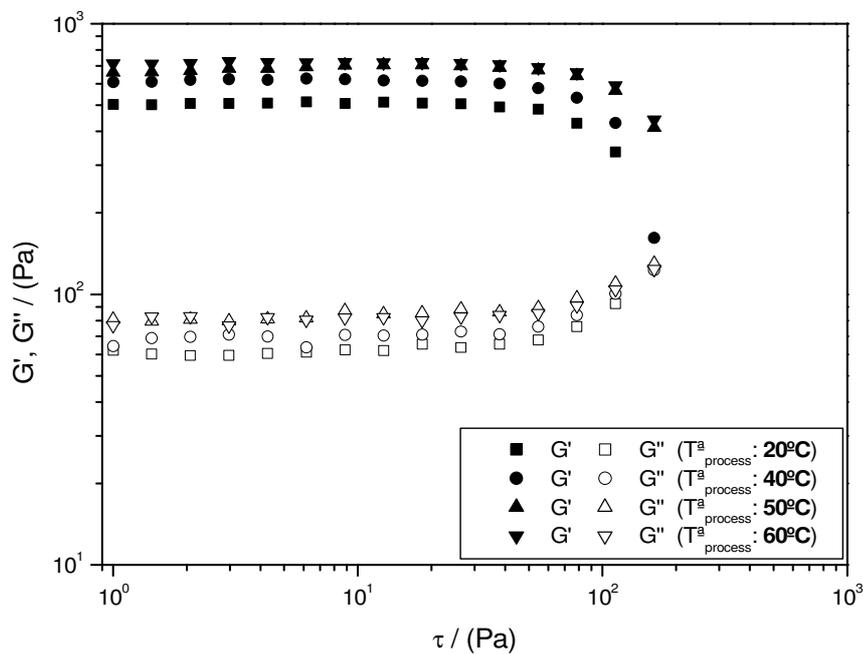


Figura 4.2.1.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,8 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, procesadas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60°C)

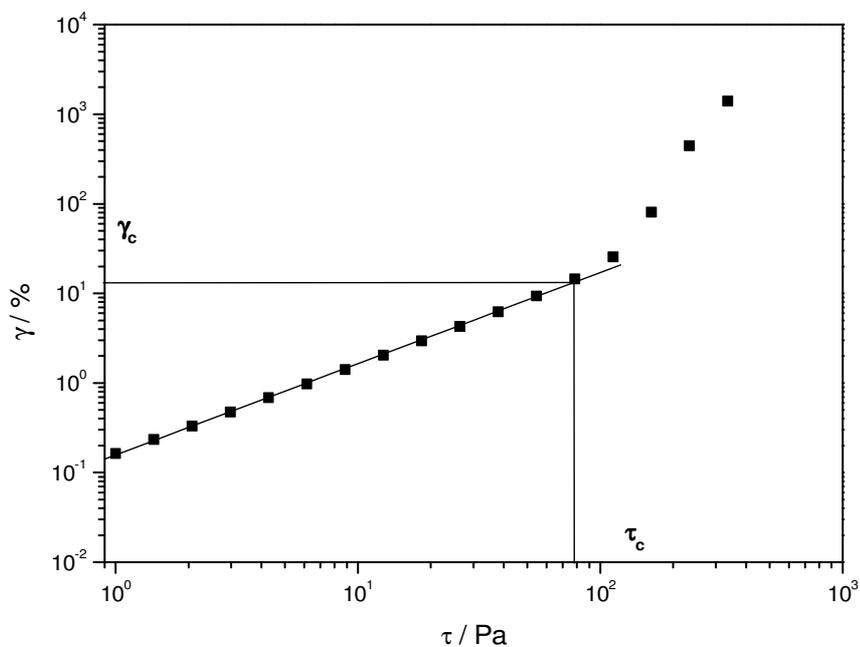


Figura 4.2.1.2. Determinación del esfuerzo crítico y deformación crítica para una emulsión que contiene 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten y procesada a 40°C

Durante los barridos de esfuerzo, todos los sistemas estudiados presentan una evolución de los módulos  $G'$  y  $G''$  caracterizada por la existencia de dos zonas: (i) una zona, a valores pequeños del esfuerzo, en la que los valores de  $G'$  y  $G''$  se mantienen constantes, independientes del esfuerzo aplicado, correspondiéndose ésta al intervalo viscoelástico lineal, (ii) y otra zona, por encima de un valor del esfuerzo y la deformación críticos, en la que  $G'$  desciende, mientras que, por lo general,  $G''$  aumenta ligeramente con el esfuerzo hasta alcanzar un valor máximo. Hay casos en los que ambas funciones descienden al aumentar el esfuerzo. Varios autores (Princen, 1983; Mason y col., 1996; Lequeux y col., 1997) han tratado de explicar esta evolución en base a una reordenación estructural producida durante el barrido de esfuerzo.

En la tabla 4.2.1.1. aparecen recogidos los parámetros críticos ( $\tau_c$ ,  $\gamma_c$ ) para las emulsiones de gluten procesadas a diferentes temperaturas. La tendencia general es la de una ampliación del intervalo viscoelástico lineal cuando aumenta la temperatura a la que se procesa la emulsión.

Una vez conocidos los valores del esfuerzo crítico y de la deformación crítica para cada emulsión, se ha estudiado la evolución de los parámetros viscoelásticos lineales ( $G'$  y  $G''$ ) con la frecuencia (figura 4.2.1.3.), obteniéndose un espectro mecánico característico de emulsiones altamente floculadas, en el que el módulo de almacenamiento,  $G'$ , se encuentra siempre por encima del módulo de pérdidas,  $G''$ , en todo el intervalo de frecuencias estudiado. Este comportamiento es representativo de un carácter predominantemente elástico. Generalmente, es posible distinguir en este espectro tres zonas características: (i) una zona pseudo-terminal a bajas frecuencias, que muestra una tendencia al cruce de las dos funciones viscoelásticas, (ii) una zona intermedia, en la que  $G'$  se mantiene prácticamente constante, y en la que  $G''$  presenta un mínimo, y (iii), por último, el principio de una zona de transición a altas frecuencias. La mayoría de las emulsiones estudiadas en este trabajo tienen un espectro mecánico localizado en la segunda zona. Esta zona, en la que aparece un mínimo en la evolución del módulo de pérdidas, acompañado de una zona de pendiente nula o ligeramente positiva del módulo de almacenamiento, se conoce como zona “plateau” en reología de polímeros (Ferry, 1980) y se relaciona con un comportamiento de tipo gel (Richardson y Ross-Murphy, 1981a, 1981b). Esta respuesta es propia de emulsiones estabilizadas con proteínas, en las que se desarrolla un entramado elástico, debido a un proceso de floculación extensiva de las

gotas de fase dispersa (Dickinson, 1989; Gallegos y Franco, 1999a, Franco y col., 2000). Esta zona plateau puede ser caracterizada por un parámetro conocido como módulo plateau,  $G_N^0$ , que puede aproximarse al valor del módulo de almacenamiento para el cual la tangente de pérdidas presenta un mínimo (Wu, 1989):

$$G_N^0 = [G']_{tg\delta \rightarrow \text{mínimo}} \quad (4.2.1.1.)$$

Como puede observarse en la figura 4.2.1.3., se produce un aumento inicial de ambas funciones viscoelásticas,  $G'$  y  $G''$ , a medida que la temperatura de procesado aumenta de 20 a 40°C. Este efecto es menos importante a las temperaturas más elevadas, no apreciándose diferencias significativas en el intervalo de temperaturas comprendido entre 40 y 60°C.

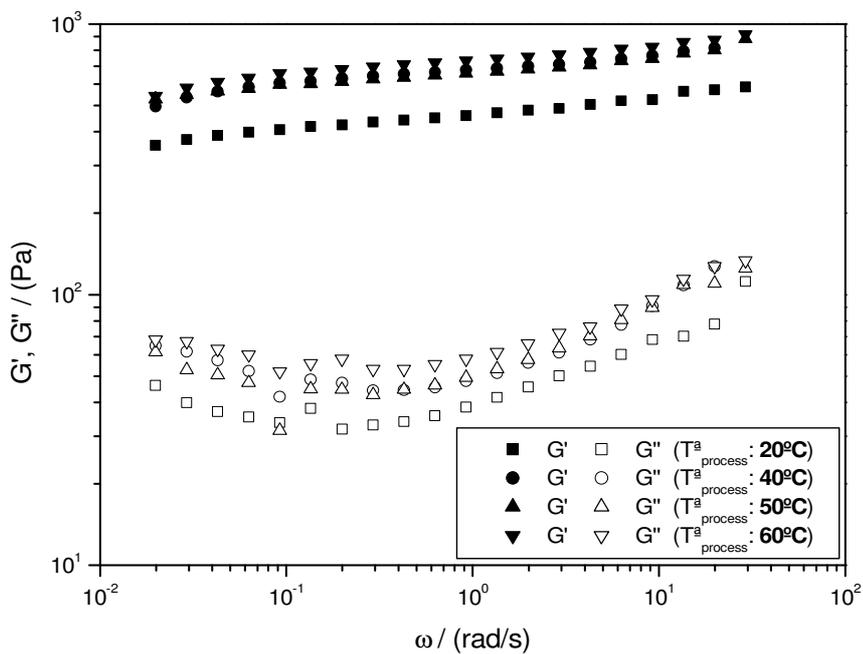


Figura 4.2.1.3. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, procesadas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60°C)

En la figura 4.2.1.4. se representan las curvas de distribución de tamaños de gota obtenidas experimentalmente, expresadas como porcentaje de volumen de gotas con un diámetro dado. Se puede apreciar que todas las curvas tienen un amplio grado de polidispersión. A todas las temperaturas de procesado estudiadas, se han obtenido distribuciones bimodales, caracterizadas por un máximo secundario a diámetros relativamente elevados, y un máximo primario a diámetros inferiores. No existe una gran dependencia del diámetro de las gotas con la temperatura, apreciándose solamente una diferencia notable a una temperatura igual a 50°C, para la cual se obtienen los menores valores del diámetro de Sauter ( $d_{32}$ ) y volumétrico ( $d_{43}$ ).

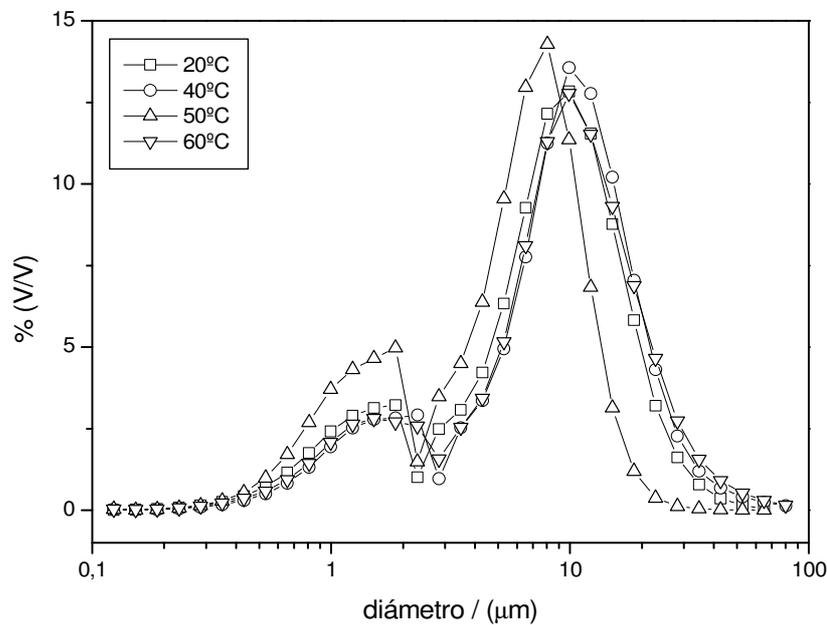


Figura 4.2.1.4. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten y procesadas a diferentes temperaturas

$T^a_{\text{proc}}$	$D_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{43}$ ( $\mu\text{m}$ )	U	$\tau_c$ (Pa)	$\gamma_c$ (%)	$G^0_N$ (Pa)
<b>20</b>	3,97	10,38	0,620	54,6	11,20	424,50
<b>40</b>	3,82	9,66	0,627	78,5	14,50	607,2
<b>50</b>	2,94	6,84	0,573	112,9	13,50	599,75
<b>60</b>	3,59	9,84	0,684	112,9	12,00	658,25

Tabla 4.2.1.1. Valores de parámetros reológicos y microestructurales de las emulsiones estudiadas en función de la temperatura de procesado

Si se representa un parámetro representativo de la distribución de las gotas de aceite, como el diámetro de Sauter ( $d_{32}$ ), y un parámetro característico de la reología lineal de las emulsiones, como el módulo plateau ( $G^0_N$ ), frente a la variable de estudio (temperatura de procesado) se obtiene una gráfica como la que aparece en la figura 4.2.1.5. En esta gráfica se puede observar de forma más clara la evolución de la distribución de tamaños y el módulo plateau con la temperatura. La dependencia de la distribución de tamaños de gota con la temperatura no es tan evidente como la presentada por el módulo plateau. La relación entre diámetro de gota y temperatura de procesado puede ser explicada en términos del balance entre dos efectos inducidos por las fuerzas de cizalla que tienen lugar durante el proceso de emulsificación: rotura y coalescencia de gotas. El primer efecto favorece el descenso del tamaño de las gotas, lo cual podría explicar el claro descenso del diámetro a 50°C, lo que produce un mayor valor en las propiedades viscoelásticas; mientras que la coalescencia parece tener más importancia a temperaturas más altas, originando mayores tamaños de gota. Aún así, el módulo plateau no disminuye, sino que aumenta con la temperatura en todo el intervalo de temperaturas estudiado. Este comportamiento que resulta inusual a las temperaturas más elevadas puede atribuirse a las modificaciones que experimentan las moléculas de proteína de gluten a partir de 50°C. Por encima de esta temperatura, se produce una reorganización de enlaces covalentes entre subunidades de glutenina y, posiblemente, de gliadinas (puente de disulfuro intermoleculares) que conduce a un crecimiento considerable del tamaño del polímero de glutenina (Lefevbre y col., 1994; Guerrieri, 2004).

Así, la temperatura induce coalescencia durante la reorganización, pero a su vez produce un reforzamiento del entramado estructural, favorecido por el crecimiento del tamaño de las subunidades poliméricas de glutenina. En este entramado participan subunidades situadas tanto en la interfase como en la fase continua de la emulsión final.

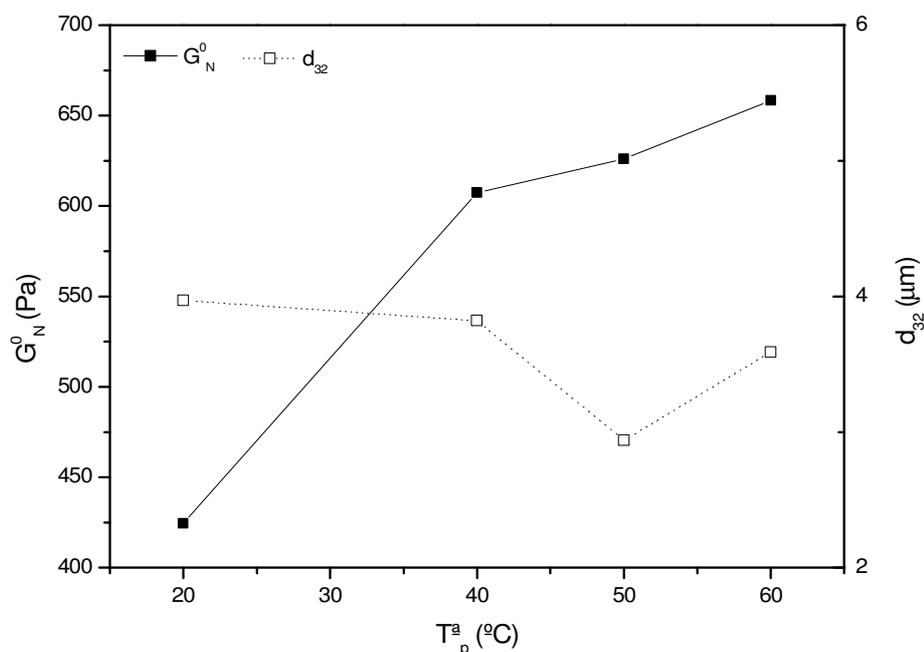


Figura 4.2.1.5. Módulo plateau,  $G_N^0$ , y diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente a la temperatura de procesado en emulsiones estabilizadas con gluten

## 4.2.2. Velocidad de rotación del elemento emulsificador

En la figura 4.2.2.1. aparecen los barridos de esfuerzo realizados sobre las emulsiones procesadas a diferentes velocidades de rotación (4 000, 6 000, 8 000, 10 000 r.p.m.) estabilizadas por un 1% de gluten de trigo, o por 1% de aislado de soja. A partir de estos resultados y junto con los valores de los parámetros críticos que pueden determinarse (figura 4.2.2.2.), se concluye que un aumento en la energía impuesta al sistema durante el procesado da lugar a un aumento del valor del esfuerzo crítico, alcanzándose también unos mayores valores para los módulos de almacenamiento y de pérdidas. Esto ocurre con las dos proteínas, gluten y soja, presentando esta última unos valores de ambos módulos algo superiores a los del

gluten. La variación de la deformación crítica no es clara. En el caso de la soja no parece existir una gran dependencia de la deformación crítica con la velocidad de rotación, mientras que en el caso del gluten, hay un primer aumento y una posterior estabilización en los valores de  $\gamma_c$ .

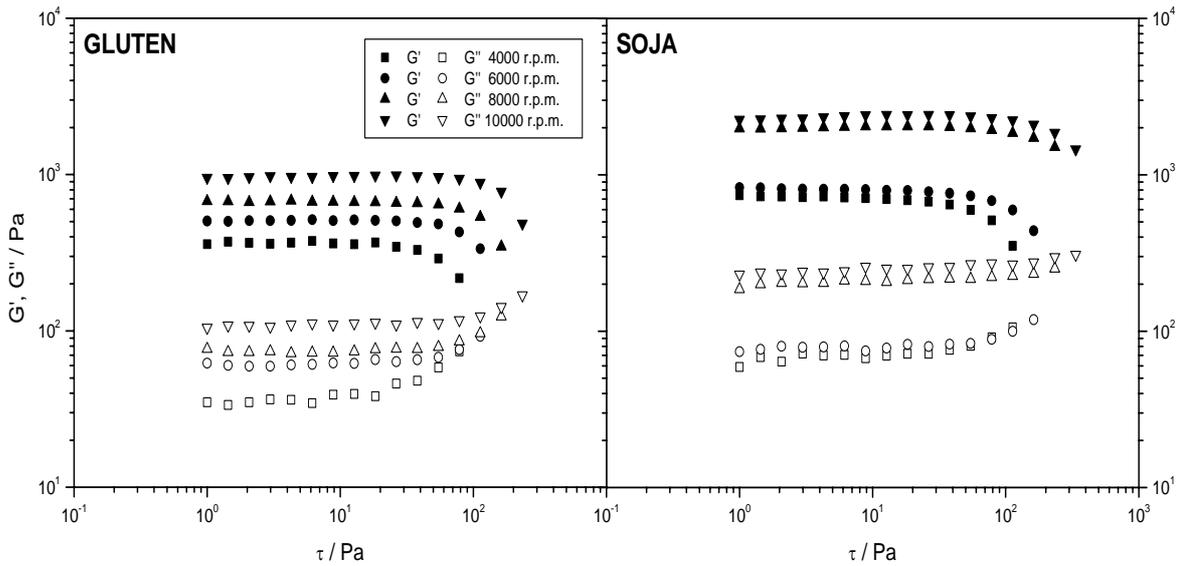


Figura 4.2.2.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten (izq.) o de soja (dcha.), procesadas a diferentes velocidades (4 000, 6 000, 8 000, 10 000 r.p.m.)

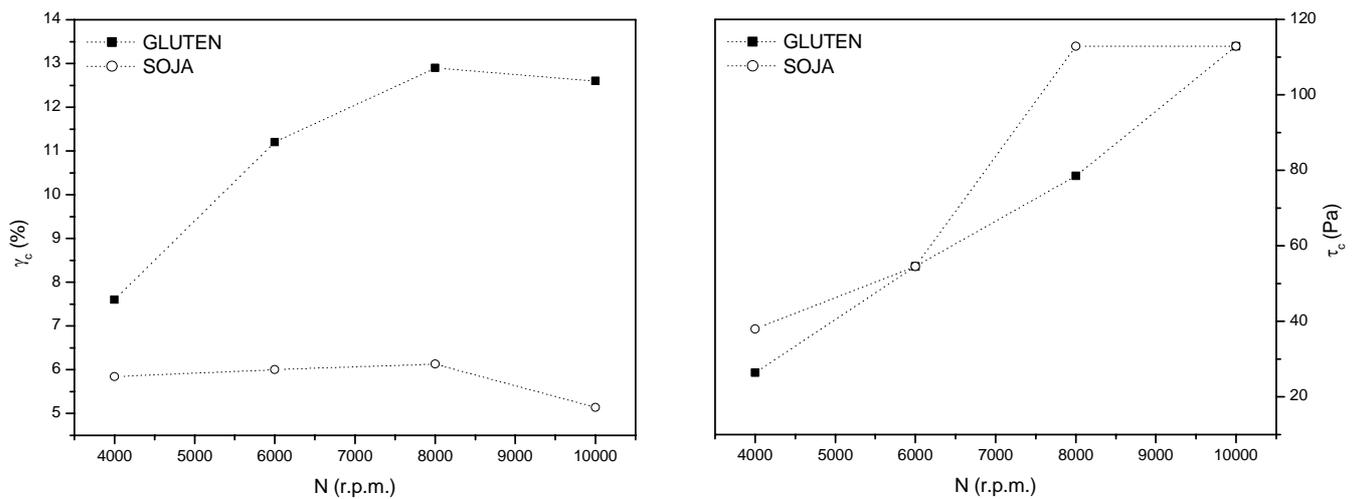


Figura 4.2.2.2. Variación de la deformación crítica (*izquierda*) y del esfuerzo crítico (*derecha*) en función de la velocidad de rotación, para emulsiones con gluten o soja, procesadas a diferentes velocidades de rotación

Estudiando los espectros mecánicos obtenidos para las diferentes velocidades de procesado mediante los correspondientes barridos de frecuencia (figura 4.2.2.3.), se observa que las emulsiones de gluten sufren un aumento en los valores de los módulos viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$ , con el aumento de la velocidad de procesado. Un comportamiento similar se ha encontrado en las emulsiones estabilizadas con el aislado proteico de soja, aunque en este caso el aumento de la energía impuesta al sistema produce valores más altos de las funciones viscoelásticas, en concordancia con los resultados obtenidos con los barridos de esfuerzo.

Tanto en las emulsiones de gluten como en las de soja, tiene lugar la aparición de un mínimo en el módulo de pérdidas,  $G''$ , que permite la obtención del módulo plateau, característico de sistemas estructurados y relacionado con la estabilidad de las emulsiones.

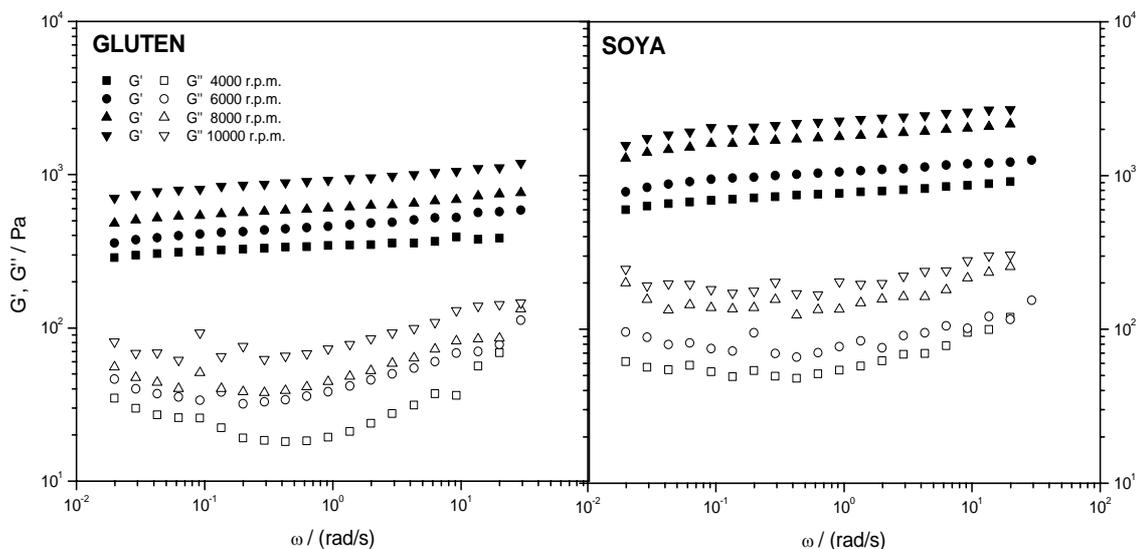


Figura 4.2.2.3. Barridos de frecuencia de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten (izq.) o de soja (dcha.), procesadas a diferentes velocidades (4 000, 6 000, 8 000, 10 000 r.p.m.)

En la figura 4.2.2.4. se representan las curvas de distribución de tamaños de gota para las emulsiones de gluten y soja procesadas a diferentes velocidades en el dispositivo r tor-estátor utilizado. Un incremento de la energía impuesta al sistema da lugar a distribuciones de tamaño desplazadas hacia diámetros de menor tamaño. Además, parece existir una tendencia hacia distribuciones más estrechas con el aumento de la velocidad de procesado. Por tanto, el efecto de la energía impuesta al sistema puede describirse en función de un aumento del área interfacial, que conduciría a un aumento de las interacciones entre los segmentos de proteína que rodean las gotas y que se traduce en un reforzamiento del entramado estructural.

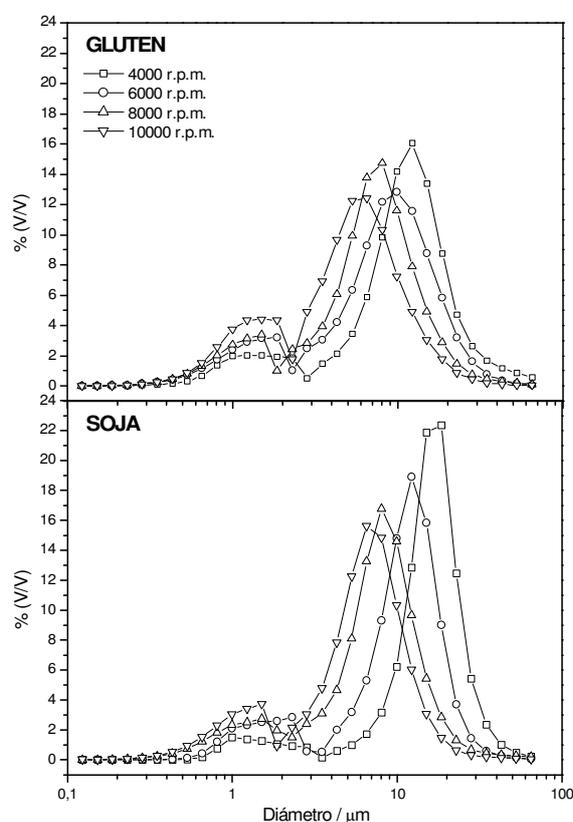


Figura 4.2.2.4. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten (arriba) o de soja (abajo) y procesadas a diferentes velocidades

En la tabla 4.2.2.1. se recogen los principales parámetros obtenidos, tanto para el gluten como para la soja, a partir de los ensayos reológicos y de las medidas de distribución de tamaños de gota para las diferentes velocidades de procesado estudiadas. La representación del módulo plateau frente a la velocidad de rotación (figura 4.2.2.5.) pone en evidencia el aumento del grado de estructuración del sistema al aumentar la energía impuesta. En el caso de las emulsiones de soja, este aumento en la estructuración del sistema es aún mayor que en el caso de las emulsiones de gluten.

El aumento de la zona plateau que se produce al aumentar la velocidad de procesado se ha relacionado anteriormente con un aumento en la estabilidad de la emulsión (Franco y col., 1995).

	<b>N (r.p.m.)</b>	<b>D<sub>32</sub> (µm)</b>	<b>D<sub>43</sub> (µm)</b>	<b>U</b>	<b>τ<sub>c</sub> (Pa)</b>	<b>γ<sub>c</sub> (%)</b>	<b>G<sub>N</sub><sup>0</sup> (Pa)</b>
<b>Gluten</b>	<b>4 000</b>	5,72	14,56	0,564	26,4	7,6	339,36
	<b>6 000</b>	3,97	10,38	0,620	54,6	11,2	424,50
	<b>8 000</b>	3,64	8,76	0,634	78,5	12,9	574,5
	<b>10 000</b>	3,02	6,76	0,654	112,9	12,6	867,5
<b>Soja</b>	<b>4 000</b>	9,04	18,36	0,374	37,9	5,84	735,05
	<b>6 000</b>	5,80	12,34	0,46	54,6	6,00	999,25
	<b>8 000</b>	3,96	9,46	0,552	112,9	6,13	1611
	<b>10 000</b>	3,28	7,43	0,546	112,9	5,14	2061,5

Tabla 4.2.2.1. Valores de parámetros reológicos y microestructurales para emulsiones preparadas a diferentes velocidades de rotación

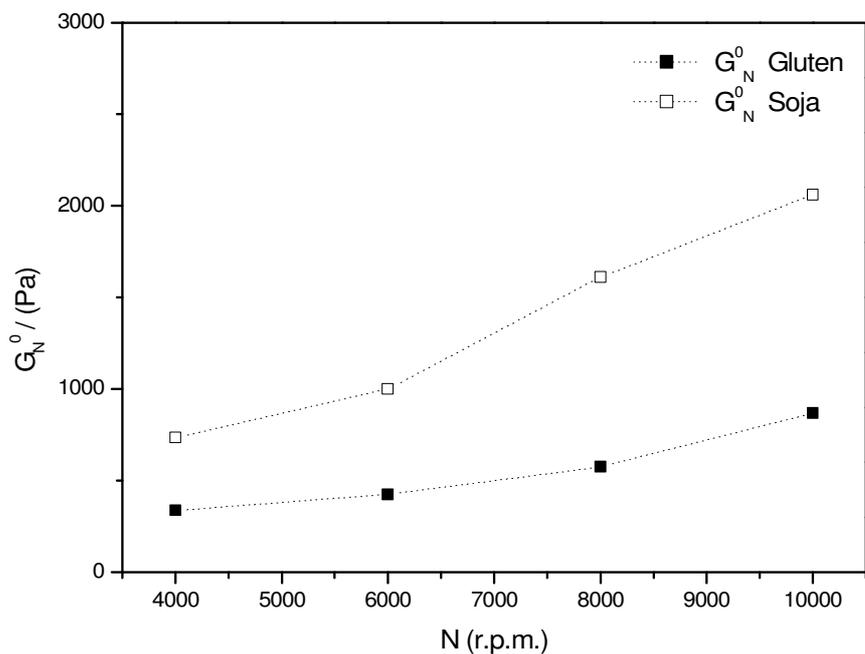


Figura 4.2.2.5. Módulo plateau,  $G_N^0$ , frente a la velocidad de procesamiento en emulsiones estabilizadas con gluten o soja

En la figura 4.2.2.6. es posible observar la disminución del diámetro de las gotas de fase dispersa cuando aumenta la velocidad a la que se procesan las emulsiones. Una mayor aplicación de energía durante el proceso de formación de la emulsión desplaza el equilibrio rotura-coalescencia hacia la rotura de gotas, aumentando el área interfacial del sistema, y favoreciéndose la estructuración del mismo, produciéndose emulsiones cuyos valores de las funciones viscoelásticas son más elevados. Las emulsiones de gluten poseen diámetros generalmente menores a las emulsiones de soja, reduciéndose las diferencias a altas velocidades de rotación. Obsérvese que, a pesar de que los tamaños de gota para emulsiones estabilizadas con gluten son menores que para las emulsiones estabilizadas con soja, en el módulo plateau se produce la tendencia contraria.

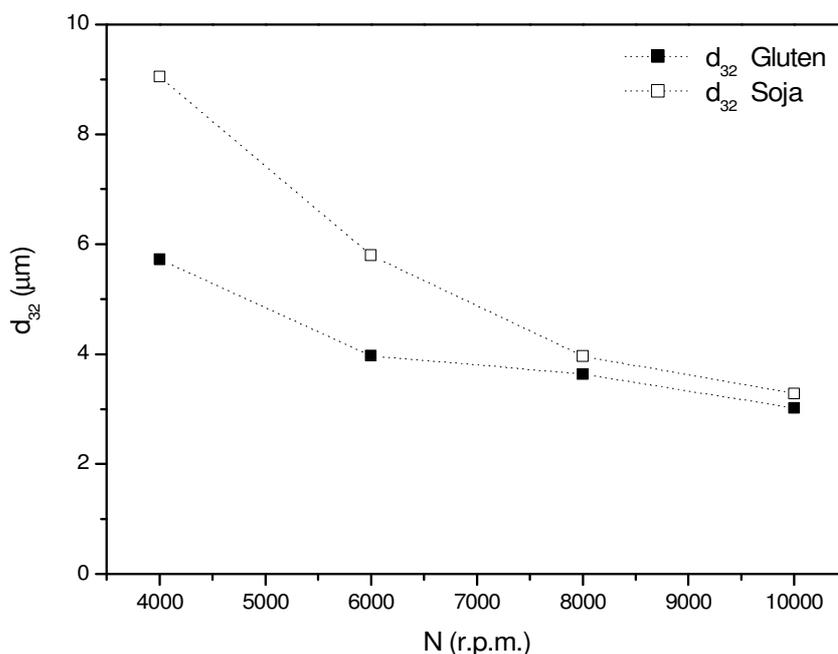


Figura 4.2.2.6. Diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente a la velocidad de procesado en emulsiones estabilizadas con gluten o soja

### 4.3. Conclusiones

1. La temperatura de procesado ejerce una influencia sobre la microestructura y las propiedades reológicas de las emulsiones estabilizadas con gluten. Mientras que la distribución de tamaños de gota parece regirse por el balance entre la ruptura y la coalescencia de las gotas, estando ésta favorecida a las temperaturas más altas, las propiedades viscoelásticas de las emulsiones deben estar afectadas por otros factores, tales como un reforzamiento estructural, que puede atribuirse al crecimiento del tamaño de las unidades poliméricas de glutenina a una temperatura superior a 50°C.
2. Una mayor energía impuesta al sistema durante el proceso, como consecuencia de una mayor velocidad del elemento dispersor del dispositivo emulsificador, produce emulsiones de menor diámetro de gota y con mayores valores del módulo plateau, tanto en las estabilizadas con proteína de gluten de trigo como en aquellas estabilizadas con proteínas de soja.



# **CAPÍTULO 5.**

## **COMPOSICIÓN**

## CAPÍTULO 5. COMPOSICIÓN

### 5.1. Introducción

Las propiedades físico-químicas y la estabilidad de las emulsiones formadas dependen en gran medida del tipo y las concentraciones de varios ingredientes utilizados en su preparación, además de las condiciones de procesado empleadas. Por ello, una vez establecidas las condiciones óptimas de procesado, se va a realizar un estudio de la influencia que la composición tiene sobre la reología y la microestructura de las emulsiones estabilizadas con proteínas vegetales (gluten, soja, algarroba). Para ello, se han medido las propiedades de emulsiones con diferente contenido en aceite y proteína, así como a diferentes valores de pH y de fuerza iónica. Tomando como base una emulsión estabilizada con algarroba se va a proceder también a estudiar la influencia que ejercen conjuntamente la concentración de proteína y el pH de la fase continua.

### 5.2. Resultados y discusión

#### 5.2.1. Concentración de aceite

Cuando aumenta la concentración de aceite, los valores de los módulos de almacenamiento,  $G'$ , y de pérdidas,  $G''$ , se hacen mayores en las emulsiones estabilizadas por ambas proteínas. En la figura 5.2.1.1., se puede observar cómo en los barridos de esfuerzo hay un salto cuantitativo en los valores de  $G'$  y  $G''$  importante al aumentar la concentración de aceite de 65 a 70% (p/p). En el caso de las emulsiones de gluten, este salto es más pronunciado. Además, el incremento en la concentración de fase dispersa lleva consigo aparejado una ampliación del intervalo viscoelástico lineal, como se evidencia a partir de los resultados que se muestran en la figura 5.2.1.2. En dicha figura se observa un claro aumento tanto del esfuerzo crítico como de la deformación crítica, por debajo de los cuales la muestra se mantiene dentro del intervalo de viscoelasticidad lineal, con la cantidad de aceite presente en la emulsión final. En la mayor parte de los casos, el esfuerzo crítico para las emulsiones de gluten y soja son similares, aunque la soja presenta un esfuerzo crítico sensiblemente mayor al 80% de aceite. En el caso de las deformaciones

críticas, se obtienen mayores valores para el gluten en todos los casos. Hay que tener en cuenta que en este estudio se producen dos efectos, por un lado, el aumento de la concentración de la fase oleosa y, por otro lado, el consiguiente descenso del exceso de proteína en la fase continua.

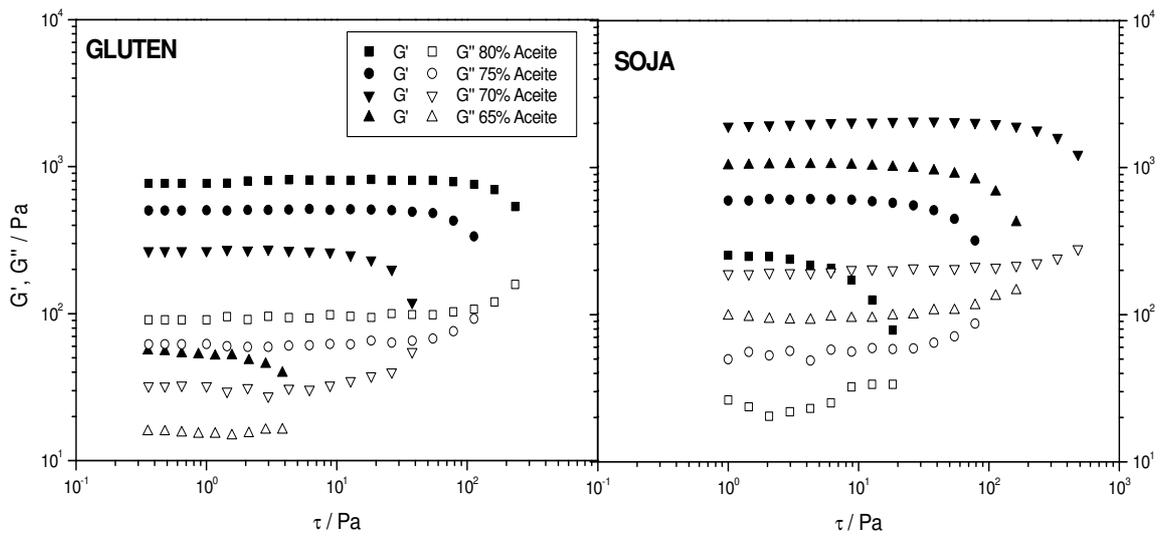


Figura 5.2.1.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 1% (p/p) de gluten (izq.) o de soja (dcha.), procesadas a 6 000 r.p.m., y con una concentración de aceite variable

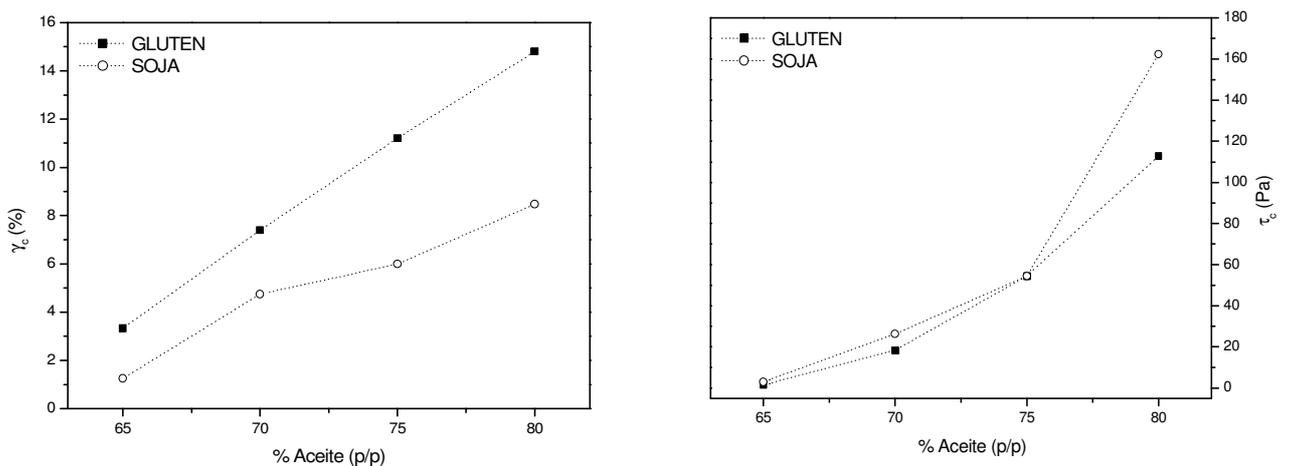


Figura 5.2.1.2. Variación de la deformación crítica (izquierda) y del esfuerzo crítico (derecha) en función de la concentración de aceite para emulsiones con 1% (p/p) de gluten o soja, procesadas a 6 000 r.p.m.

Un aumento en la concentración de aceite produce una extensión importante de la zona plateau en las emulsiones estabilizadas por cualquiera de las dos proteínas, como puede observarse en la figura 5.2.1.3.. Este efecto, que es más importante para las emulsiones estabilizadas con gluten, revela un reforzamiento del entramado estructural con la concentración de fase dispersa. La emulsión estabilizada con gluten a la menor concentración de aceite (65%) muestra un entramado relativamente débil, apreciándose la tendencia hacia la zona terminal del espectro mecánico que se alcanzaría a bajas frecuencias. Hay que tener en cuenta que esta emulsión tiene una fracción de fase oleosa cercana a la que se considera máximo valor de empaquetamiento de la fase dispersa para una emulsión de gotas monodispersas ( $\phi_{\text{máx}} \sim 0,64$ ). Al seguir aumentando la fracción de fase oleosa se puede producir un aumento en las interacciones entre las gotas, reforzándose la estructura de la emulsión.

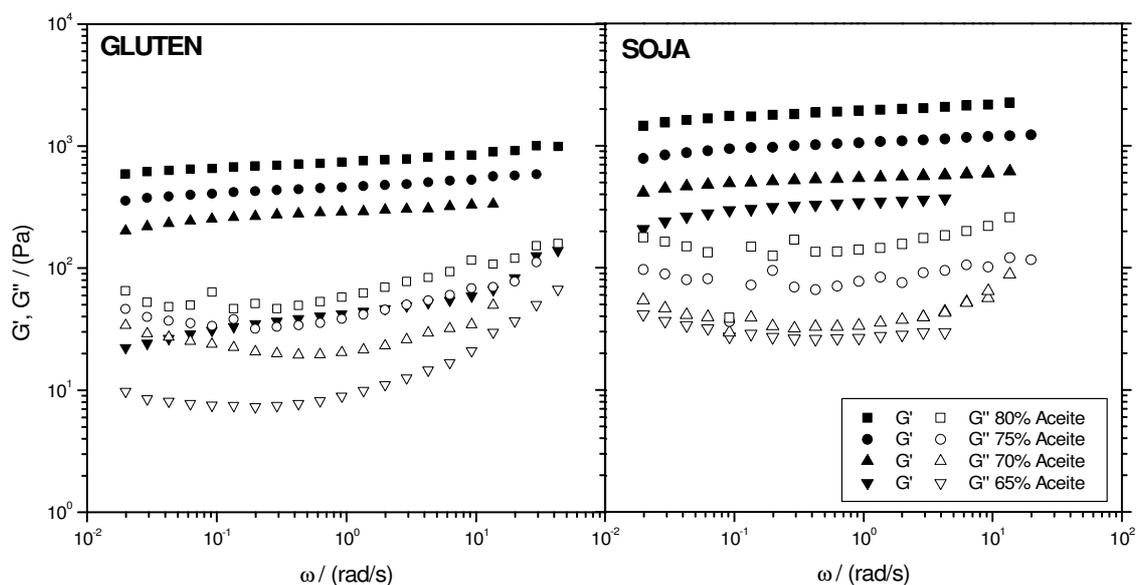


Figura 5.2.1.3. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 1% (p/p) de gluten o soja y una concentración variable de aceite, procesadas a 6 000 r.p.m.

Básicamente, el reforzamiento de la estructura antes mencionado se debe al aumento de la fracción en volumen de la fase dispersa, puesto que los perfiles de las

curvas de distribución de tamaño de gota no parecen afectarse demasiado al aumentar la concentración de aceite, sobre todo en emulsiones estabilizadas con soja.

En la figura 5.2.1.4. aparecen representados las curvas de distribución de tamaños de gota para las emulsiones estabilizadas con gluten y soja a diferentes concentraciones de fase oleosa.

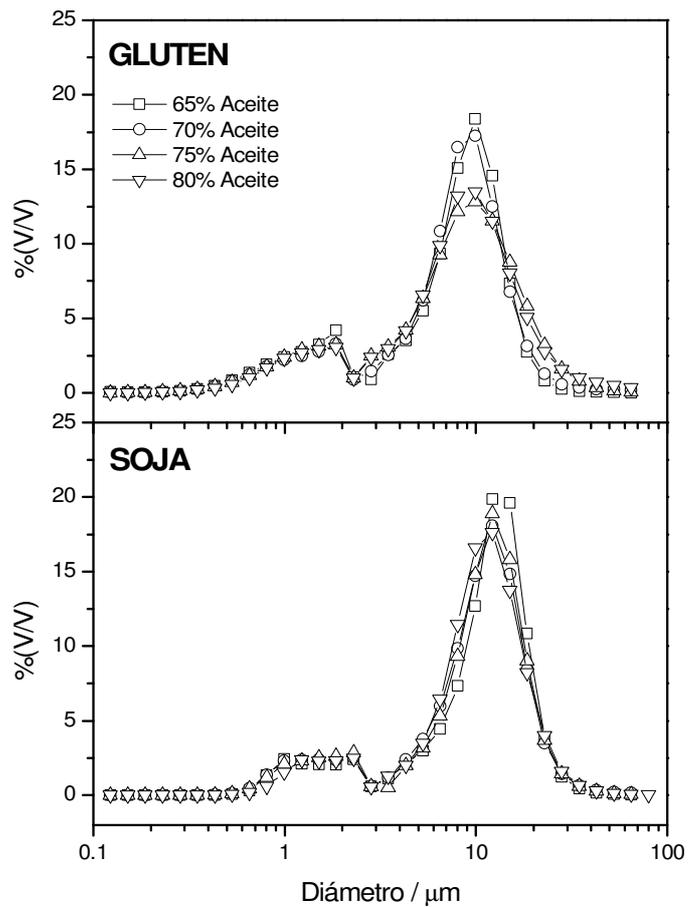


Figura 5.2.1.4. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten (arriba) o de soja (abajo) y con una concentración variable de aceite

Como puede observarse en las figuras 5.2.1.5. y 5.2.1.6., las emulsiones estabilizadas por proteína de soja poseen mayores propiedades viscoelásticas que las estabilizadas por gluten de trigo, aunque en éstas las gotas tengan un tamaño ligeramente menor.

La evolución del módulo plateau con el contenido en aceite es menos pronunciada para las emulsiones estabilizadas con gluten. Este efecto puede atribuirse a que el aumento de la concentración de la fase oleosa se traduce en un incremento en la concentración proteica de la fase continua original, lo cual podría producir un descenso de la velocidad de difusión del emulsionante a la interfase. En el caso de la soja, el aumento de concentración no produce aumentos tan considerables como en el caso del gluten.

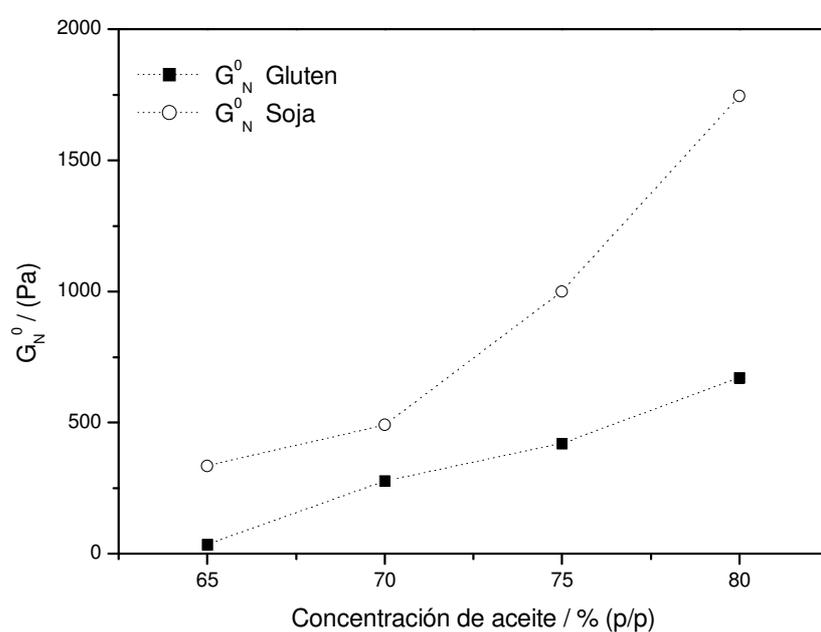


Figura 5.2.1.5. Módulo plateau,  $G_N^0$  frente a la concentración de aceite en emulsiones estabilizadas con gluten o soja

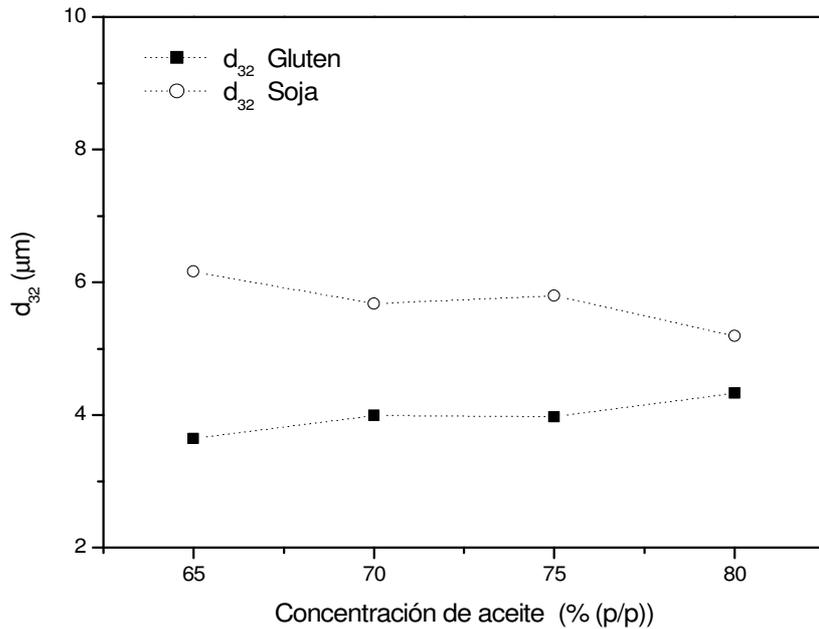


Figura 5.2.1.6. Diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente a la concentración de aceite en emulsiones estabilizadas con gluten o soja

En la figura 5.2.1.7. aparecen las fotografías obtenidas con el microscopio confocal TCS SP2 de Leica (Heidelberg, Alemania) de las emulsiones estabilizadas con gluten con 65 y 75% (p/p) de fase oleosa. De cada emulsión aparecen dos imágenes: una en modo confocal, en la que se aprecia un solo plano, obtenida por fluorescencia; y otra focal, que es la que se podría obtener con un microscopio óptico común con una lente adecuada, y en la que no se obtiene uno, sino varios planos acumulados de la muestra.

No ha sido necesaria la utilización de ningún marcador fluorescente, puesto que las proteínas vegetales estudiadas (gluten, soja, algarroba) presentan autofluorescencia, probablemente debido a su contenido en aminoácidos emisores.

Las micrografías revelan la existencia de un empaquetamiento compacto de las gotas, con una amplia distribución de tamaños, tomando parte en la formación de una red floculada tridimensional. Las imágenes también muestran un tamaño predominante, que se corresponde al segundo pico en las curvas de distribución de tamaño de gota. Las gotas más pequeñas se sitúan entre los espacios que existen entre las gotas de mayor tamaño. La forma de las gotas tiende a ser poliédrica, puesto

que la fracción en volumen excede de forma clara el valor del máximo empaquetamiento para partículas esféricas monodispersas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las imágenes que se corresponden a diferentes concentraciones de aceite, mostrando tamaños de gota similares. Esto concuerda con lo observado en la figura 5.2.1.4., en la que las distribuciones de tamaño para las diferentes concentraciones de aceite eran bastante similares.

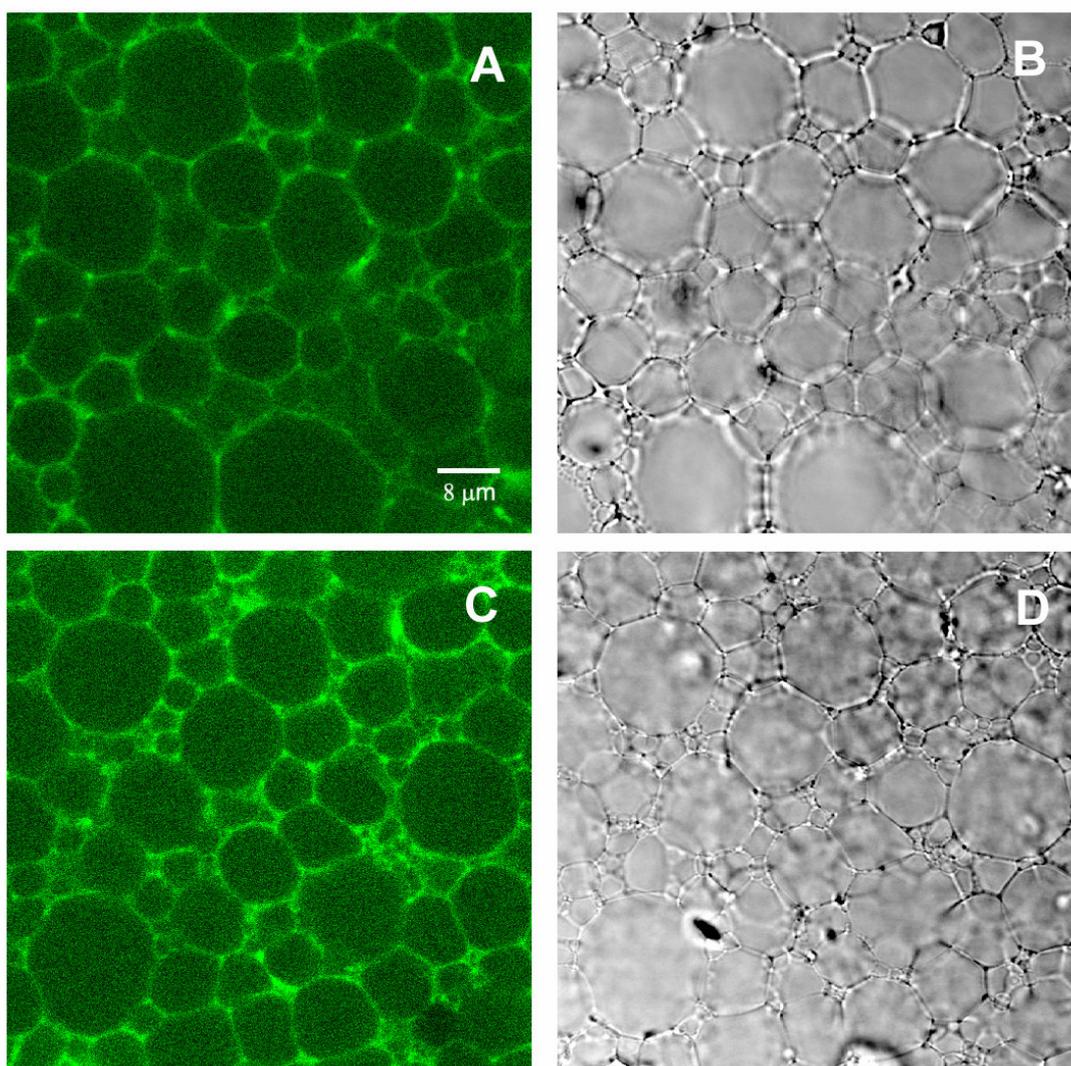


Figura 5.2.1.7. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (izquierda) y óptica (derecha) a partir de emulsiones estabilizadas con: (A-B), 1% (p/p) de gluten al 65% (p/p) de aceite; (C-D), 1% (p/p) de gluten al 75% (p/p) de aceite

	% Aceite	D <sub>32</sub> (µm)	D <sub>43</sub> (µm)	U	τ <sub>c</sub> (Pa)	γ <sub>c</sub> (%)	G <sup>0</sup> <sub>N</sub> (Pa)
<b>Gluten</b>	<b>65</b>	3,64	9,08	0,466	1,6	3,3	35
	<b>70</b>	3,99	9,76	0,504	18,3	7,4	278,45
	<b>75</b>	3,97	10,38	0,620	54,6	11,2	424,50
	<b>80</b>	4,33	11,22	0,643	112,9	14,8	672,50
<b>Soja</b>	<b>65</b>	6,16	12,82	0,410	2,9	1,25	335,85
	<b>70</b>	5,68	12,38	0,477	26,4	4,74	492
	<b>75</b>	5,80	12,34	0,460	54,6	6,00	999,25
	<b>80</b>	5,19	9,99	0,461	162,4	8,47	1745,5

Tabla 5.2.1.1. Valores de parámetros reológicos y microestructurales para emulsiones con diferentes concentraciones de aceite

## 5.2.2. Concentración de proteína

Ha sido posible estabilizar emulsiones concentradas al 75% de aceite utilizando pequeñas cantidades de proteína. Así, en el caso de las emulsiones que utilizan soja o algarroba como emulsionantes, la concentración mínima de aislado proteico necesaria para conseguir una emulsión estable ha sido de 0,125%, mientras que cuando se ha utilizado gluten como emulsionante, la concentración mínima de concentrado proteico necesaria ha sido 0,25%. El hecho de que no haya sido posible obtener emulsiones estables a menores concentraciones de gluten puede deberse, entre otras cosas, al alto peso molecular de las subunidades de glutenina, presente en el gluten, y a que la concentración de proteína en el concentrado de gluten vital es algo menor que en el aislado de soja o de algarroba. Sin embargo, debido a la alta consistencia alcanzada por las emulsiones estabilizadas con el aislado de algarroba a las mayores concentraciones, no ha sido posible una preparación adecuada en el dispositivo utilizado de emulsiones con concentración mayor del 1% de proteína (2 o 3% (p/p)) puesto que no se aseguraba un mezclado homogéneo durante el proceso, lo cual dificulta la formación de una emulsión estable.

En las figuras 5.2.2.1., 5.2.2.2., 5.2.2.3. se pueden observar los resultados obtenidos al realizar los barridos de esfuerzo sobre las emulsiones de proteína, gluten, soja y algarroba, respectivamente, a diferentes concentraciones. En las figuras

5.2.2.4. y 5.2.2.5. se comparan los resultados obtenidos para las tres proteínas mediante los valores de los esfuerzos y deformaciones críticas. El intervalo viscoelástico lineal, en todos los casos, se extiende conforme aumenta la concentración de proteína presente.

Habría que resaltar que la algarroba es la que posee un intervalo viscoelástico lineal más amplio, sobre todo, a la concentración del 1% (p/p) para la que el esfuerzo crítico de la emulsión de algarroba llega a ser del orden de dos y cuatro veces mayor que el correspondiente a la emulsión equivalente de gluten y soja, respectivamente. Esto puede deberse al mayor contenido proteico del aislado de algarroba utilizado comparado con el gluten vital y aislado de soja empleados, o quizá sea un efecto de residuos de goma no eliminados del todo del aislado y que puedan estar ejerciendo el papel de espesante.

También llama la atención el importante salto que tiene lugar en los valores de los módulos de almacenamiento y pérdidas en las emulsiones de gluten cuando se sube la concentración de proteína del 1 al 2%, en adelante, llegando a situarse por encima de los valores de  $G'$  y  $G''$  equivalentes de las emulsiones de soja.

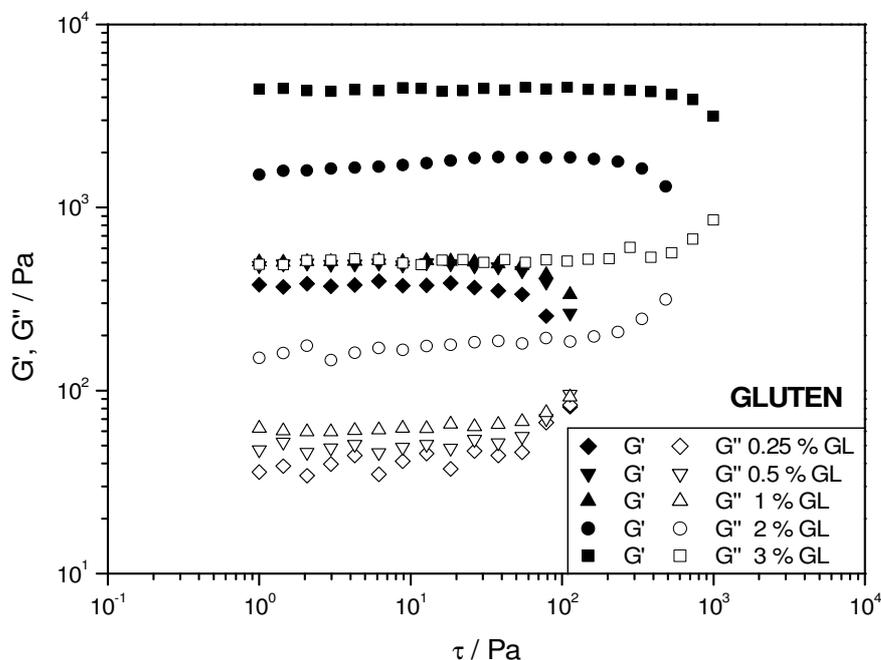


Figura 5.2.2.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y diferentes contenidos de gluten procesadas a 6 000 r.p.m.

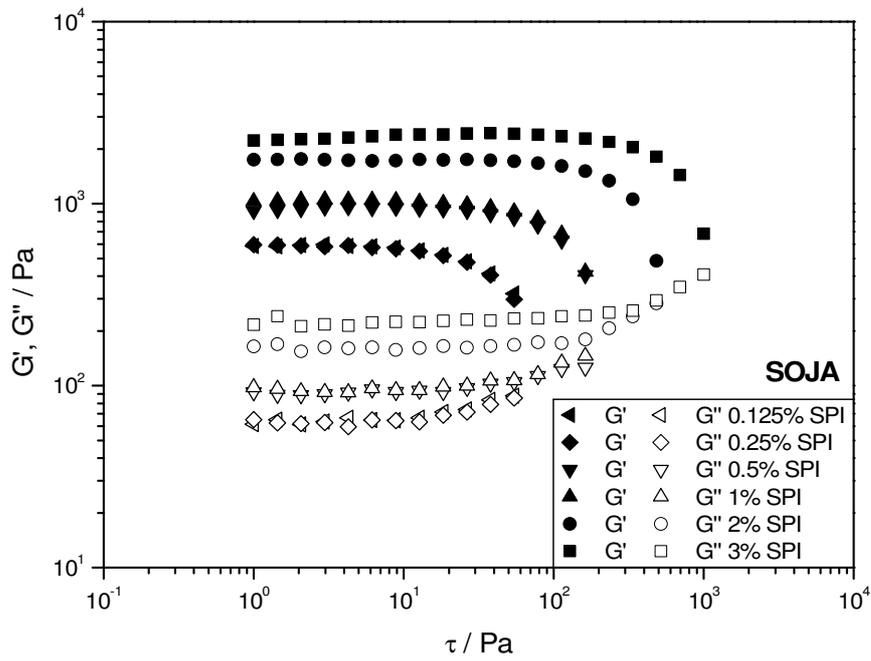


Figura 5.2.2.2. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y diferentes contenidos de soja procesadas a 6 000 r.p.m.

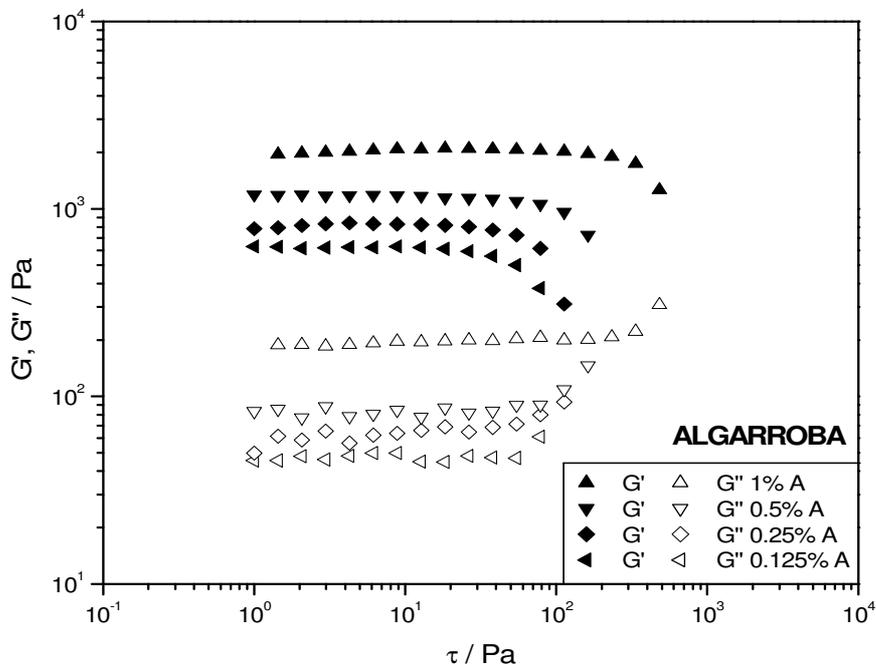


Figura 5.2.2.3. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y diferentes contenidos de algarroba procesadas a 6 000 r.p.m.

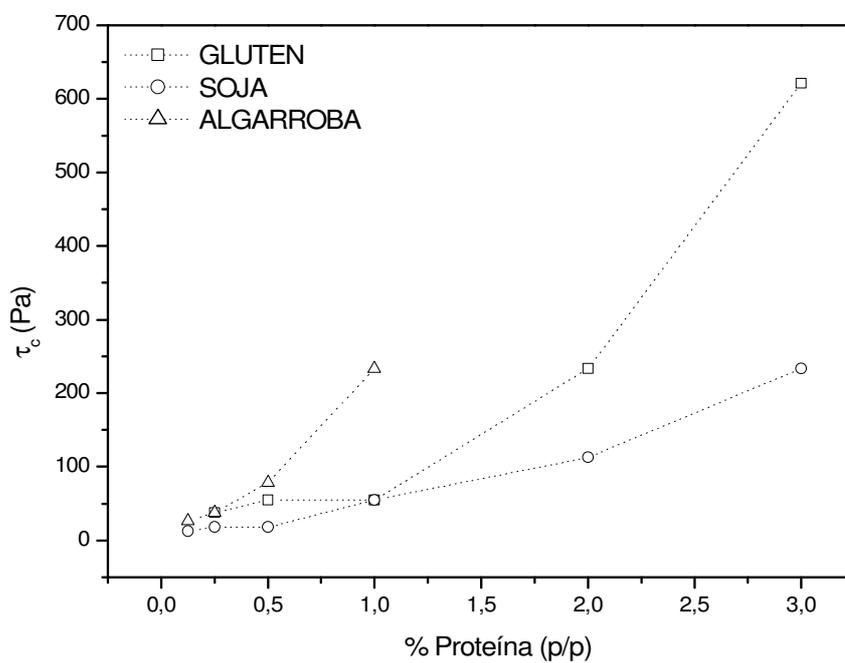
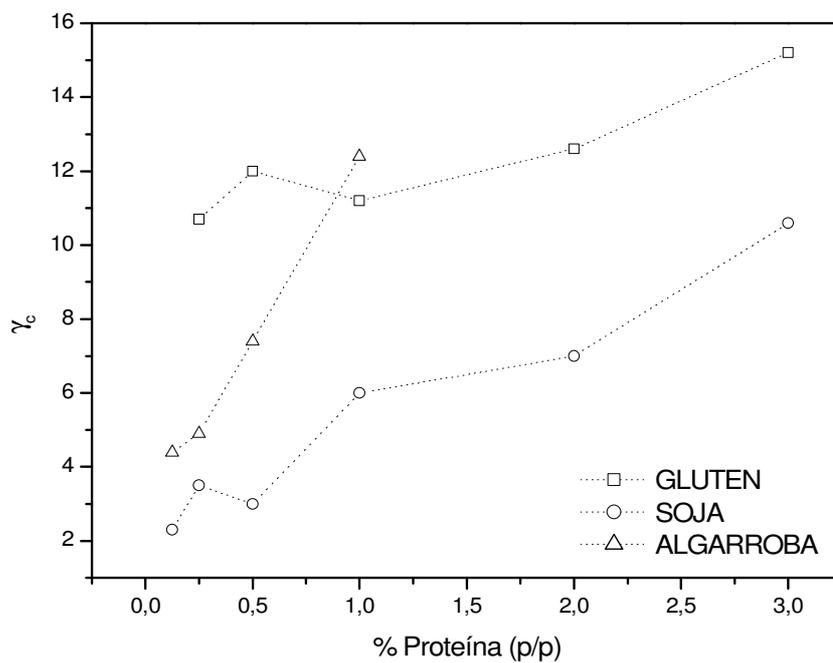


Figura 5.2.2.4. *Arriba:* Deformación crítica vs. Concentración de aceite; *Abajo:* Esfuerzo crítico vs. Concentración de aceite para emulsiones con 1% (p/p) de gluten o soja, procesadas a 6 000 r.p.m.

En las figuras 5.2.2.5., 5.2.2.6. y 5.2.2.7. se observa la evolución de las propiedades viscoelásticas con la concentración de proteína. Un aumento de la concentración de proteína ha originado un aumento importante en los dos módulos,  $G'$  y  $G''$ , para las tres proteínas vegetales estudiadas. Para una misma concentración de proteína, las emulsiones estabilizadas con el aislado de algarroba presentan mayores valores de las funciones viscoelásticas lineales. Esta diferencia se hace realmente importante para una concentración del 1%. A concentraciones de 1% de proteína o menores, las emulsiones de soja presentaban mayores valores para  $G'$  y  $G''$  que las emulsiones de gluten, como ocurre generalmente. Sin embargo, como puede observarse en la figura 5.2.2.8., en la que se representan los valores de  $G_N^0$  para los tres tipos de emulsión, esta tendencia se ve modificada para concentraciones de proteína superiores. De esta forma, las emulsiones estabilizadas con gluten al 3% muestran valores mucho más altos que las emulsiones estabilizadas con el aislado proteico de soja; así, en esta emulsión el módulo plateau es un 60% más alto para el gluten en comparación a la soja. Por tanto, puede concluirse que a concentraciones superiores al 1% (p/p), un aumento de la concentración de gluten provoca un mayor incremento en las propiedades viscoelásticas de las emulsiones en comparación con las emulsiones preparadas con soja.

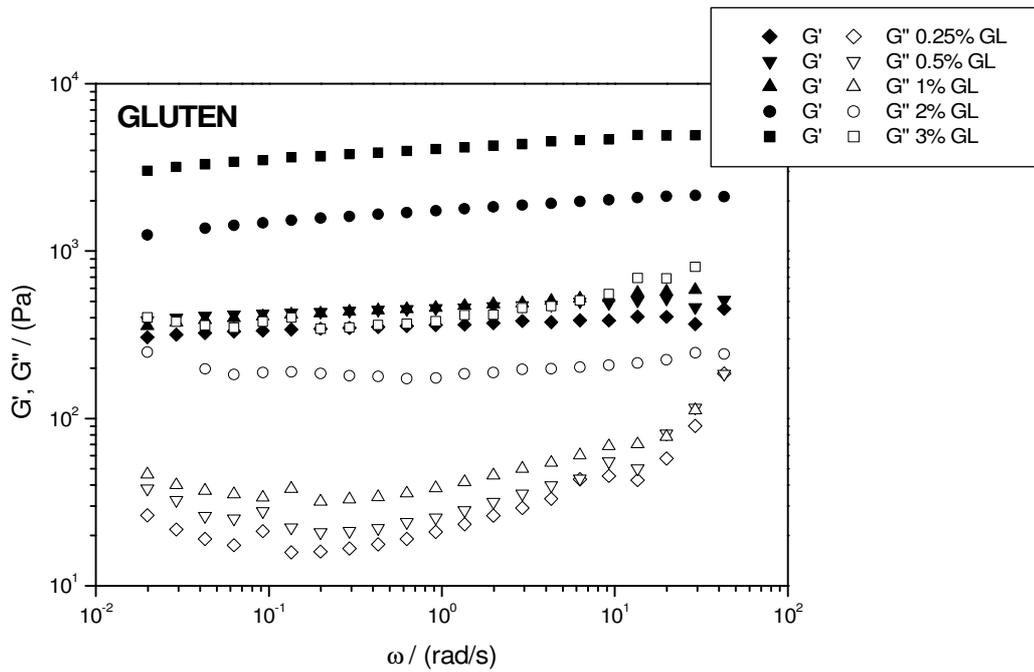


Figura 5.2.2.5. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones con concentración variable de gluten y una concentración fija de aceite, procesadas a 6 000 r.p.m.

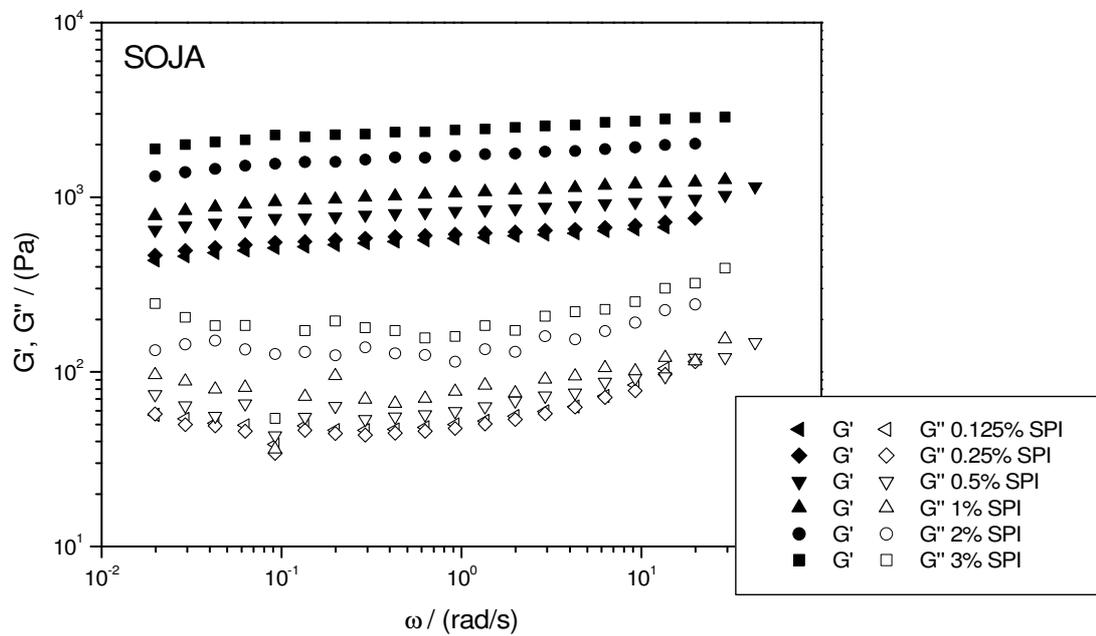


Figura 5.2.2.6. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones con concentración variable de soja y una concentración fija de aceite, procesadas a 6 000 r.p.m.

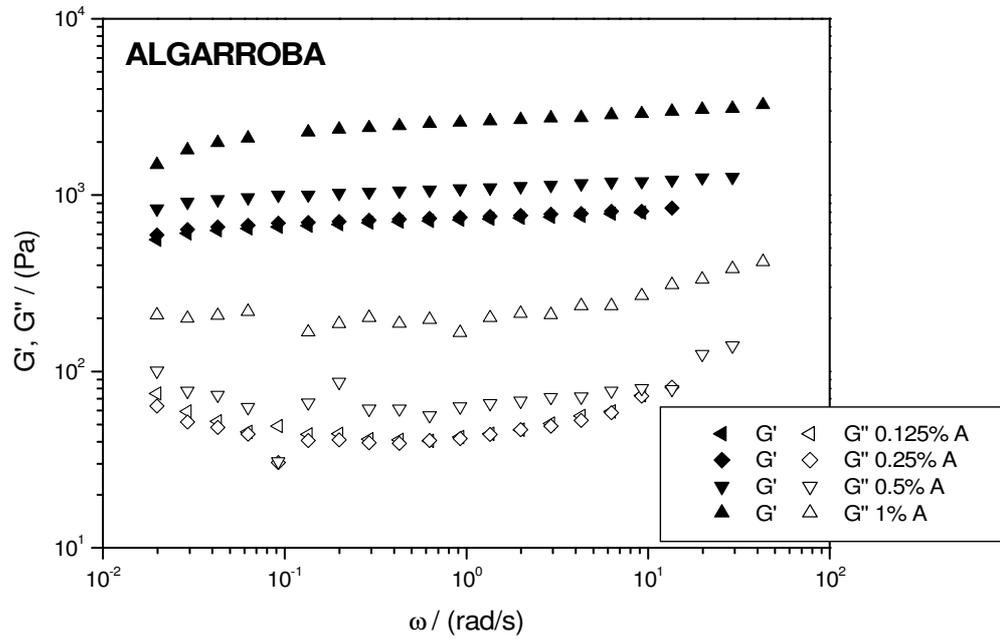


Figura 5.2.2.7. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones con concentración variable de algarroba y una concentración fija de aceite, procesadas a 6 000 r.p.m.

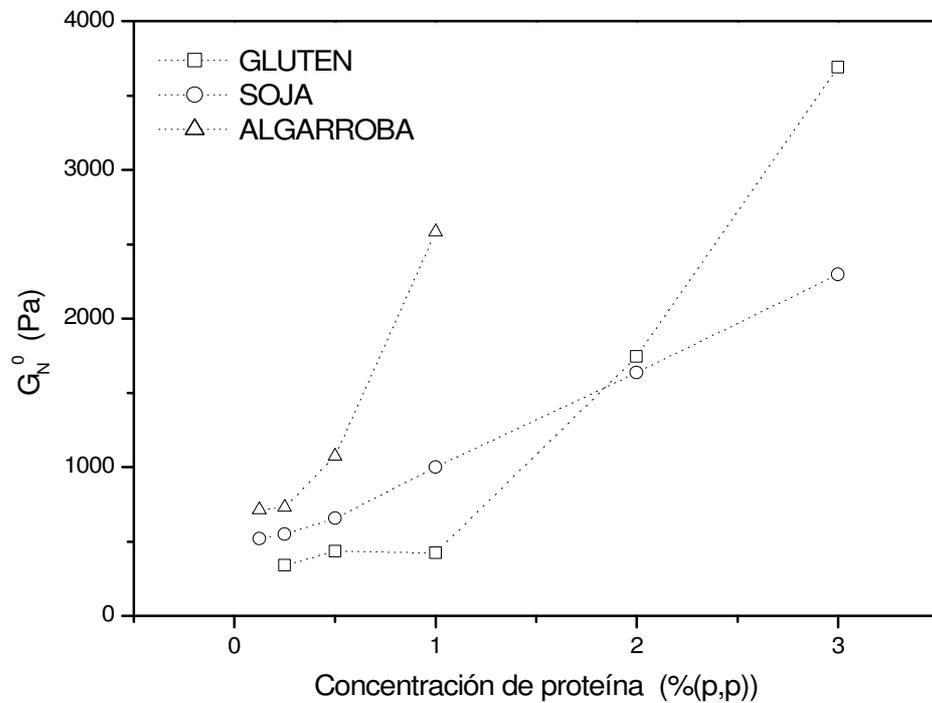


Figura 5.2.2.8. Módulo plateau,  $G_N^0$ , frente a la concentración de proteína en emulsiones estabilizadas con gluten, soja o algarroba

El aumento de los parámetros viscoelásticos con el aumento de la concentración de proteína está acompañado por una evolución de las curvas de distribución de tamaños de gota hacia diámetros menores, para las emulsiones estabilizadas por cualquiera de las tres proteínas. Esta disminución de los diámetros de gota con el aumento de la concentración puede apreciarse en las figuras 5.2.2.9, 5.2.2.10. , 5.2.2.11. y 5.2.2.12. Por tanto, se observa cómo una mayor cantidad de proteína presente permite la estabilización de mayor superficie interfacial. En el caso de las emulsiones de gluten, el importante salto cuantitativo que tenía lugar en los valores de los módulos  $G'$  y  $G''$  se ve reflejado en las curvas de distribución de tamaños de gota, en las que se puede ver el paso desde una distribución bimodal para concentraciones de proteína del 1% e inferiores hasta una distribución monomodal a una concentración de gluten del 3%. La emulsión del 2% de gluten presenta una distribución de transición, con un pico ancho en el que aparece un hombro a los diámetros menores, en los que se sitúa el pico de la distribución para el 3% de gluten.

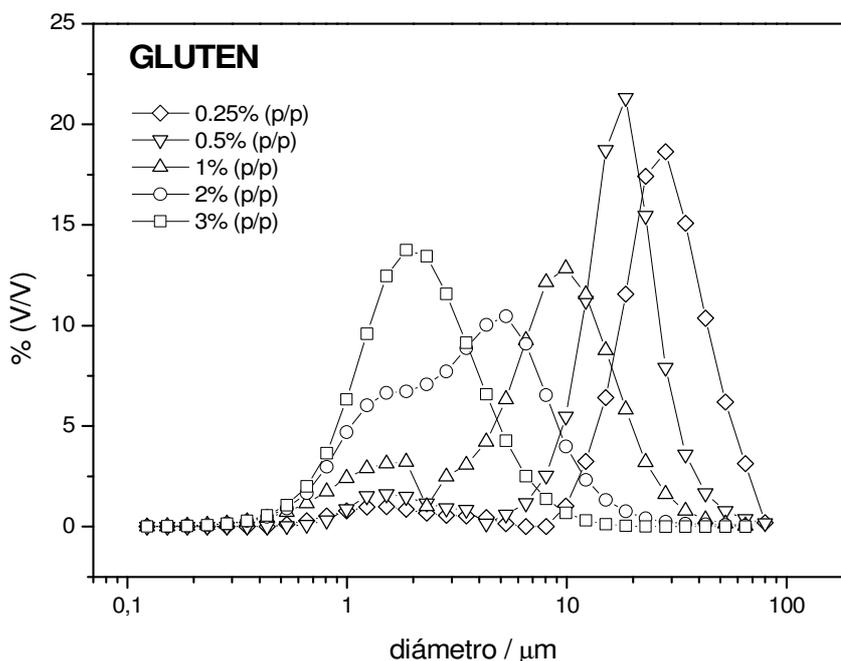


Figura 5.2.2.9. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con una concentración variable de gluten y con una concentración de aceite de 75% (p/p)

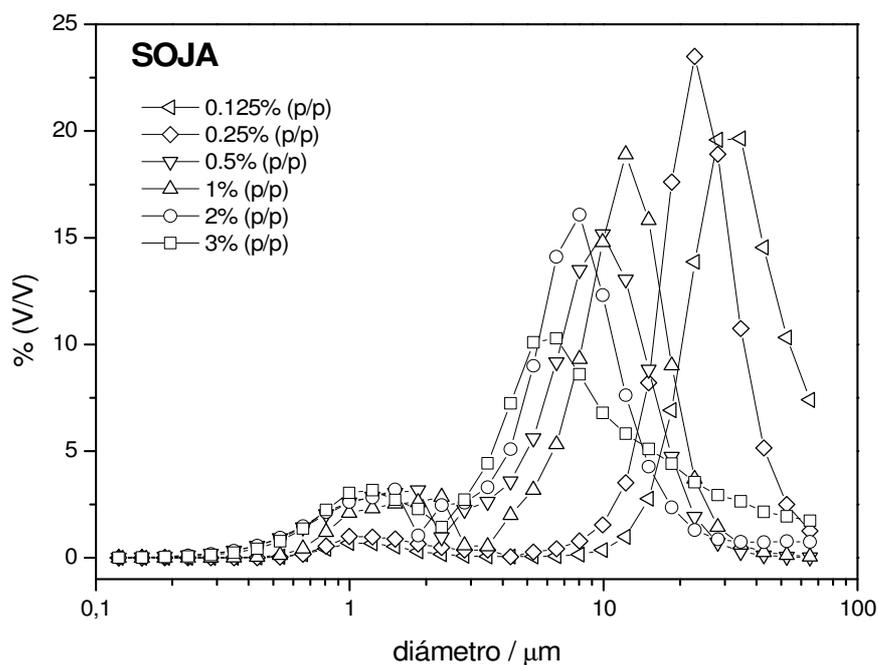


Figura 5.2.2.10. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con una concentración variable de soja y con una concentración de aceite de 75% (p/p)

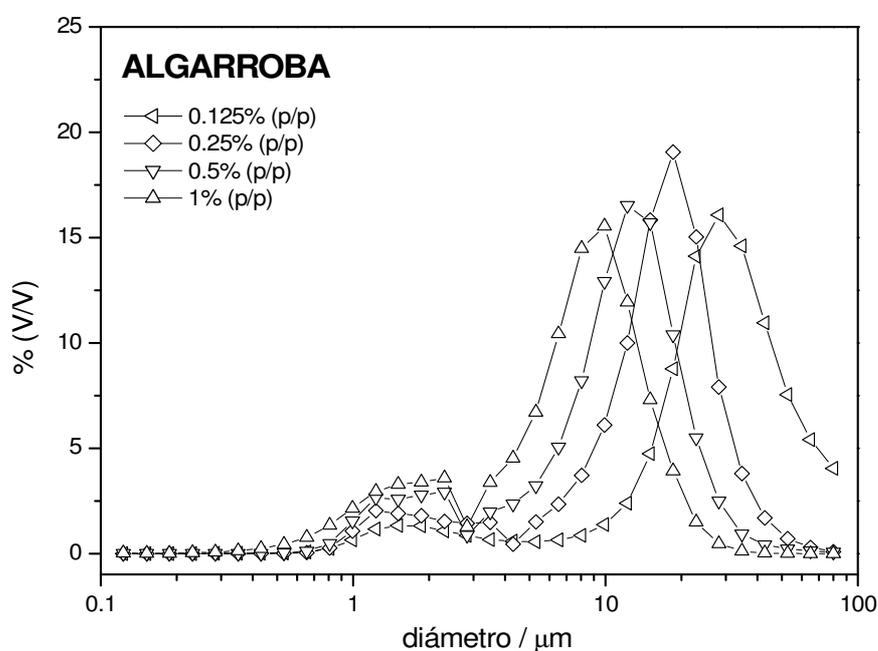


Figura 5.2.2.11. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con una concentración variable de algarroba y con una concentración de aceite de 75%

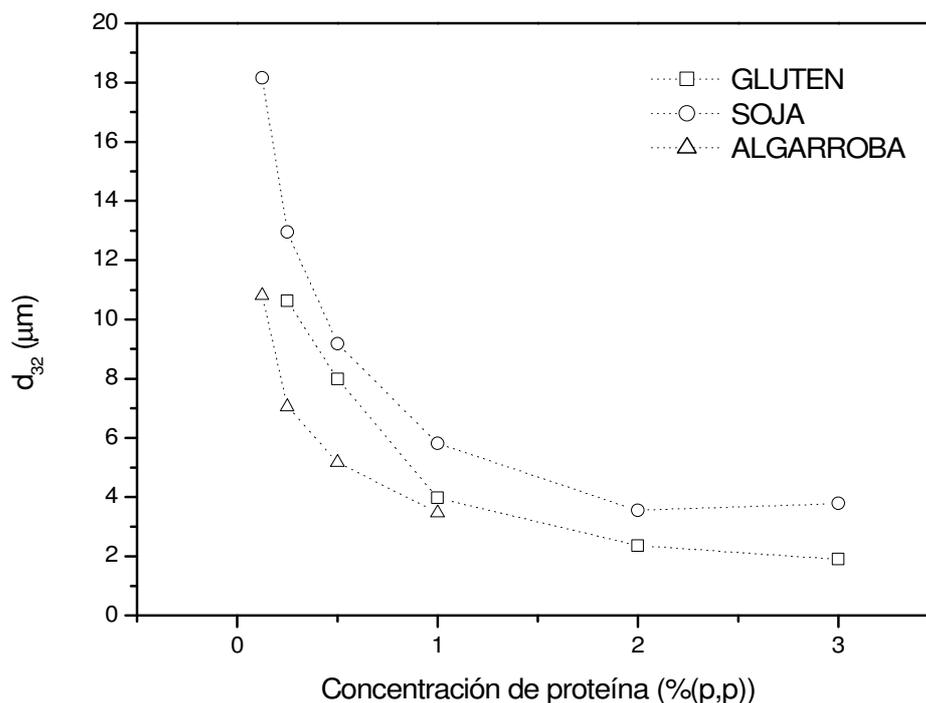


Figura 5.2.2.12. Diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente a la concentración de proteína en emulsiones estabilizadas con gluten, soja o algarroba

En las figuras 5.2.2.13., 5.2.2.14. y 5.2.2.15 se recogen las imágenes obtenidas por microscopía confocal de emulsiones de gluten, soja y algarroba preparadas a diferentes concentraciones de proteína. Un efecto patente es la reducción en el tamaño de las gotas al aumentar el contenido en proteína. Además, la forma de las gotas parece ser más poliédrica a las concentraciones más bajas. Esto podría ser debido a que la viscosidad de la fase acuosa, que se encuentra restringida a una fina capa entre las gotas de aceite, es mucho menor para las emulsiones menos concentradas. Las micrografías obtenidas para las emulsiones con una mayor concentración de proteína sugieren que un alto contenido de proteína (la señal fluorescente se considera debida a la proteína vegetal) se encuentra localizado en la fase acuosa. Este efecto se debe probablemente al exceso de proteína sobre la concentración requerida para saturar la interfase obtenida con estas emulsiones. Una comparación entre las imágenes obtenidas para las emulsiones estabilizadas con un 2% de gluten y soja sugiere una diferencia en la microestructura de estas dos

proteínas. La emulsión de soja da lugar a una imagen que muestra una microestructura típica de emulsiones altamente floculadas, mientras que la emulsión de gluten se asemeja a una dispersión de la fase oleosa en el interior de una matriz tipo gel. Esta semejanza se hace más patente en la micrografía correspondiente a una emulsión estabilizada con un 3% (p/p) de gluten. Langton y col. (1999) han obtenido imágenes mediante la técnica de microscopía confocal de muestras sin diluir de emulsiones concentradas altamente floculadas estabilizadas por yema de huevo, en las que la morfología de la fase acuosa era descrita en términos de una red de agregados de yema. Imágenes similares han sido obtenidas por Bugusu y col. (2001) para masas de gluten sin marcador fluorescente. Estos autores identificaron zonas de autofluorescencia que consistían en proteínas de gluten en forma de fibrillas, constituyendo un entramado extensivo y continuo.

En la figura 5.2.2.15. se presentan micrografías para emulsiones estabilizadas por un 1% (p/p) de cada una de las proteínas que se han estudiado. Puede observarse que la emulsión que aparentemente presenta mayores tamaños de gota es aquella estabilizada con aislado proteico de soja, siendo la emulsión estabilizada con aislado de algarroba la que parece presentar menores tamaños. Estos resultados concuerdan con las curvas de distribución y con los valores de diámetros medios.

	<b>% Proteína</b>	<b>D<sub>32</sub> (μm)</b>	<b>D<sub>43</sub> (μm)</b>	<b>U</b>	<b>τ<sub>c</sub> (Pa)</b>	<b>γ<sub>c</sub> (%)</b>	<b>G<sub>N</sub><sup>0</sup> (Pa)</b>
<b>Gluten</b>	<b>0,25</b>	10,63	25,16	0,406	37,9	10,7	339,36
	<b>0,5</b>	7,98	15,92	0,404	54,6	12,0	434
	<b>1</b>	3,97	10,38	0,620	54,6	11,2	424,50
	<b>2</b>	2,35	4,37	0,685	233,6	12,6	1743,5
	<b>3</b>	1,91	2,83	0,574	621	15,2	3690
<b>Soja</b>	<b>0,125</b>	18,14	37,94	0,359	12,7	2,3	519,02
	<b>0,25</b>	12,94	27,44	0,348	18,3	3,5	550,02
	<b>0,5</b>	9,18	18,18	0,364	37,9	4,3	369,20
	<b>1</b>	5,80	12,34	0,460	54,6	6,0	999,25
	<b>2</b>	3,56	10,44	0,683	112,9	7,0	1637,25
	<b>3</b>	3,78	16,50	1,254	233,6	10,6	2294,75
<b>Algarroba</b>	<b>0,125</b>	10,81	28,18	0,490	26,7	4,4	713,4
	<b>0,25</b>	7,05	15,18	0,476	37,9	4,9	730,6
	<b>0,5</b>	5,16	10,67	0,491	78,5	7,4	1072,5
	<b>1</b>	3,47	7,36	0,508	233,6	12,4	2583,5

Tabla 5.2.2.1 Valores de parámetros reológicos y microestructurales para emulsiones preparadas a diferentes concentraciones de proteína

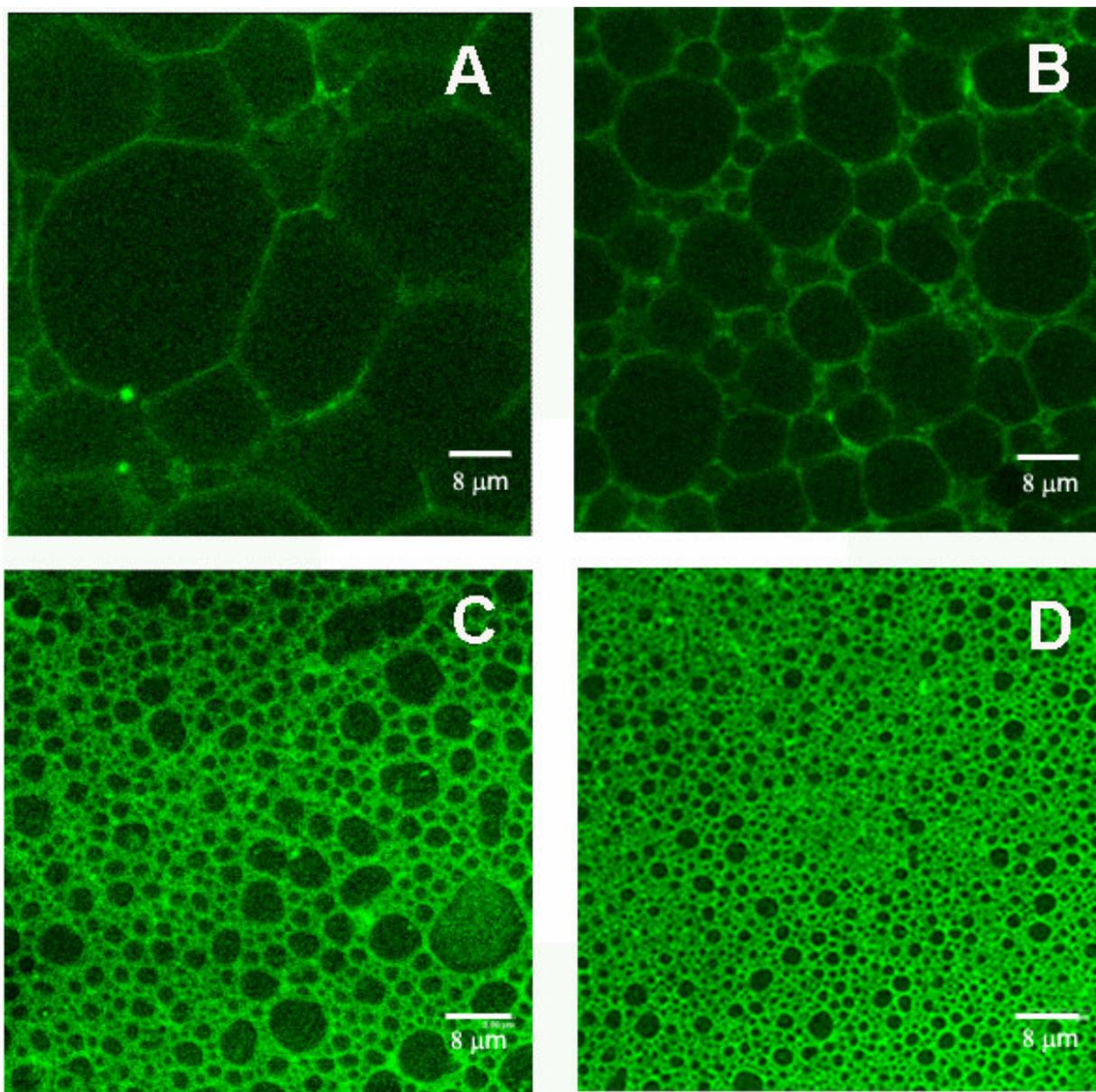


Figura 5.2.2.13. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de emulsiones estabilizadas con gluten a diferentes concentraciones: (A) 0,25% (p/p); (B) 1% (p/p); (C) 2% (p/p); (D) 3% (p/p)

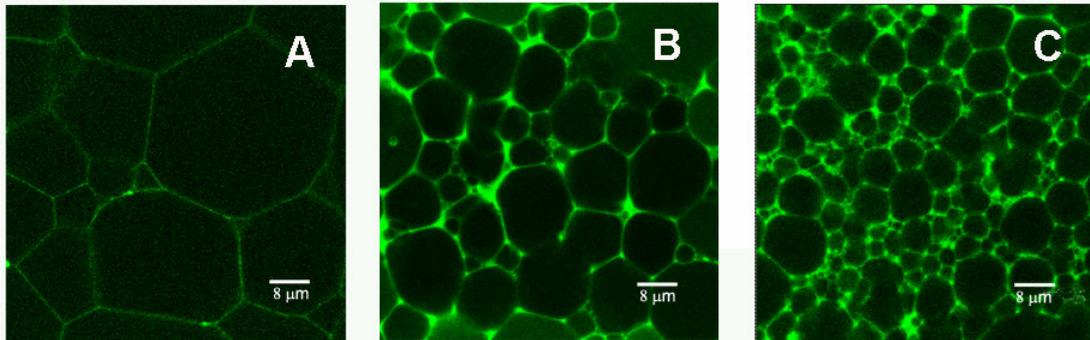


Figura 5.2.2.14. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de emulsiones estabilizadas con soja a diferentes concentraciones: (A) 0,25% (p/p); (B) 1% (p/p); (C) 2% (p/p)

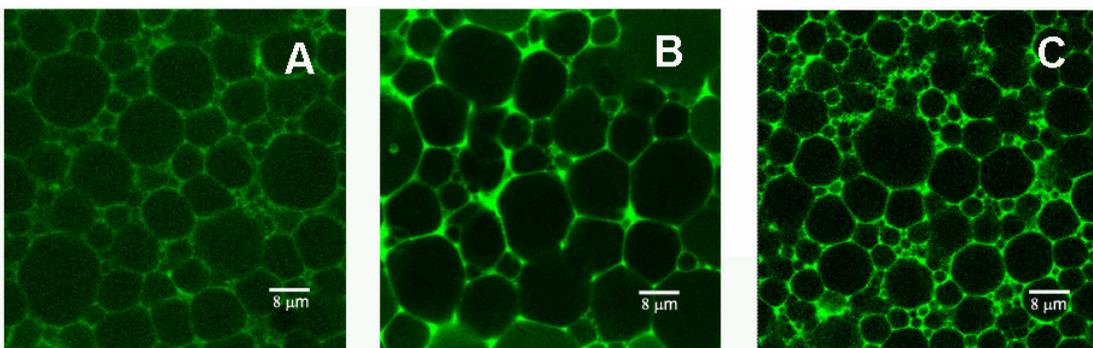


Figura 5.2.2.15. Imágenes obtenidas por microscopía de emulsiones a pH 2 estabilizadas con un 1% (p/p) de (A) gluten de trigo; (B) aislado de soja; (C) aislado de algarroba

### 5.2.3. pH

Las proteínas tienden a estabilizar la emulsión frente a la coalescencia de las gotas mediante una combinación de repulsión electrostática y estérica, siendo su eficacia particularmente sensible al pH y a la fuerza iónica (Demetriades y McClements, 1998). La solubilidad de las proteínas es mínima en el punto isoeléctrico (pI), al corresponderse éste con una carga neta neutra, con el consiguiente aumento de las asociaciones de las cadenas de polipéptidos. El punto isoeléctrico de las globulinas de la soja se encuentra entre 4 y 5 (Malhotra y Coupland, 2004; Ortiz y col., 2004); mientras que el punto isoeléctrico del gluten se sitúa alrededor de 6 (Mejri y col., 2004). Ambas proteínas presentan una curva de solubilidad típica en forma de U. El valor del pH afecta en gran medida la capacidad emulsionante de las proteínas y, por tanto, al proceso de emulsificación. A valores de pH lejanos al punto isoeléctrico de la proteína, las superficies de las gotas presentan carga eléctrica, siendo ésta negativa por encima del pI, y positiva por debajo del mismo. Si los valores de pH están suficientemente alejados del pI, las emulsiones son estables a la floculación y a su posterior coalescencia debido a una repulsión electrostática suficientemente elevada entre las gotas (Hunt y Dalgleish, 1994; Demetriades y col., 1997a, b; McClements, 1998). Alrededor del pI, las fuerzas repulsivas de naturaleza electrostática se reducen, lo que conduce a una floculación de las gotas, principalmente debido al dominio de las fuerzas atractivas de van der Waals.

La influencia que tiene el pH sobre las propiedades reológicas de una emulsión se pone de manifiesto en los resultados obtenidos para las proteínas vegetales estudiadas. En las figuras 5.2.3.1. y 5.2.3.2. aparece, respectivamente, la evolución de los parámetros viscoelásticos,  $G'$  y  $G''$ , con el esfuerzo de cizalla de las emulsiones de gluten y soja a diferentes valores de pH. En el caso de las emulsiones estabilizadas con gluten, la emulsión preparada a pH 10 es la que presenta unos mayores valores para las propiedades viscoelásticas. Este resultado podría estar relacionado con la mayor solubilidad del gluten a pH alcalino (Mejri y col., 2004), debida a la presencia en el gluten de una alta proporción de aminoácidos ácidos (Glu, Asp) los cuales son ionizables a altos valores de pH (Mejri y col., 2004; Belton y col., 1995; Tatham y col., 1990). No ha sido posible obtener emulsiones estables mediante emulsificación directa con 1% de gluten en el intervalo de pH entre 6 y 9.

En el caso de las emulsiones estabilizadas con el aislado proteico de soja, para pH 4 y 5, valores de pH próximos al punto isoeléctrico de la proteína, se obtienen resultados similares, mientras que para la emulsión a pH 2 se obtienen valores ligeramente superiores. La emulsión a pH 10 es la que presenta menores valores para las propiedades viscoelásticas.

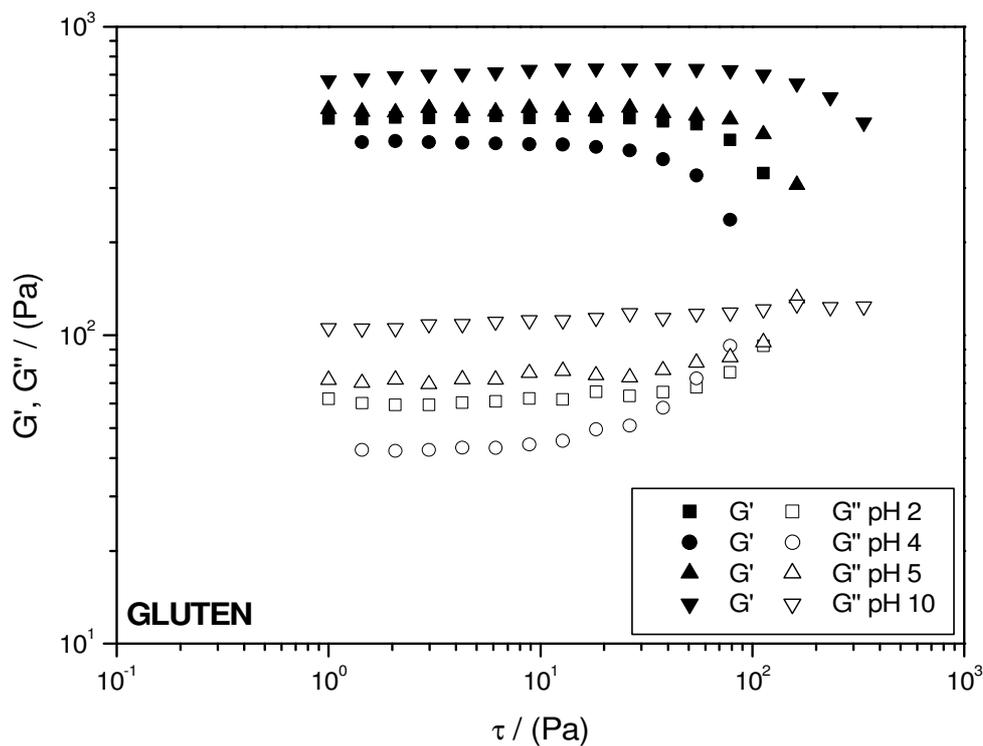


Figura 5.2.3.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,8 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, a diferentes pH (2, 4, 5, 10)

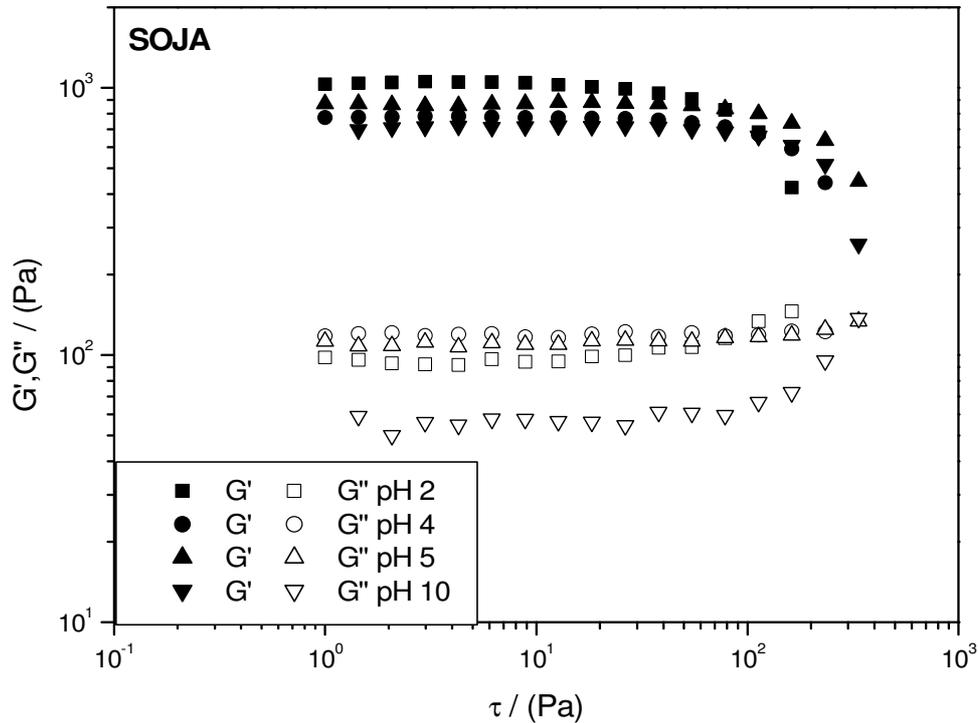


Figura 5.2.3.2. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,8 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, a diferentes pH (2, 4, 5, 10)

En las figuras 5.2.3.3. y 5.2.3.4. están representados los espectro mecánicos para las emulsiones estabilizadas con proteínas de gluten y soja, respectivamente, a diferentes pH. En el caso del gluten, y en concordancia con los resultados obtenidos en los barridos de esfuerzo realizados sobre las emulsiones, la emulsión preparada a pH 10 es la que presenta mayores valores para los módulos  $G'$  y  $G''$  casi en la totalidad del intervalo de frecuencias estudiado. Puede observarse como la emulsión preparada a pH 10 presenta un mínimo menos acentuado y más desplazado a frecuencias menores que el resto. Además, los valores de  $G'$  y  $G''$  obtenidos a pH 10 son superiores a los que se obtienen con el resto de sistemas.

En el caso de las emulsiones de soja, en cambio, se observa un espectro mecánico cualitativamente similar para todas las emulsiones a diferentes pH. Las emulsiones preparadas a un pH cercano al punto isoeléctrico (4 o 5) son las que poseen menores valores de los parámetros viscoelásticos.

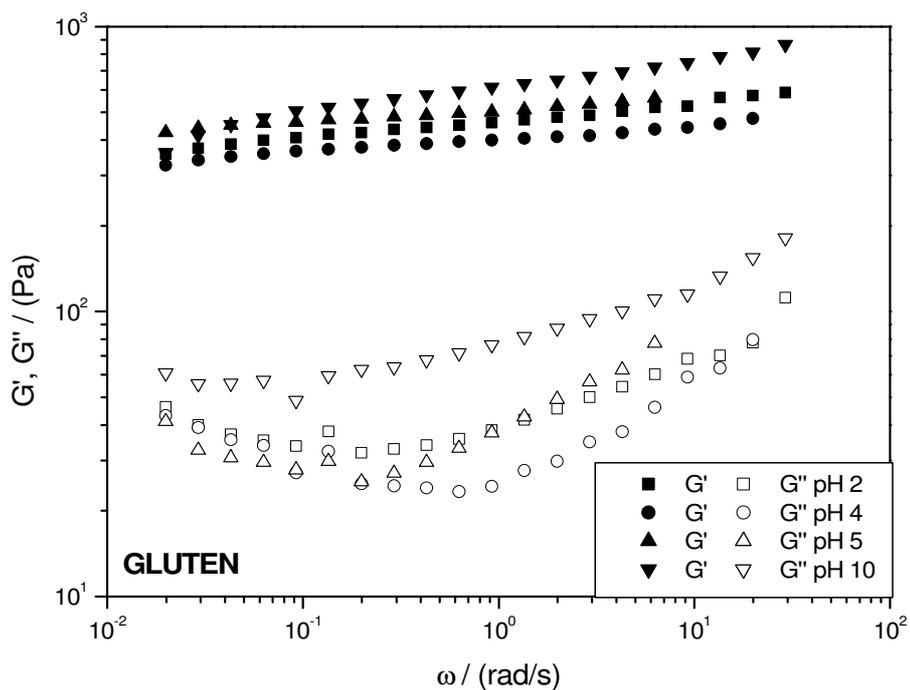


Figura 5.2.3.3. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, preparadas a diferentes pH (2, 4, 5, 10)

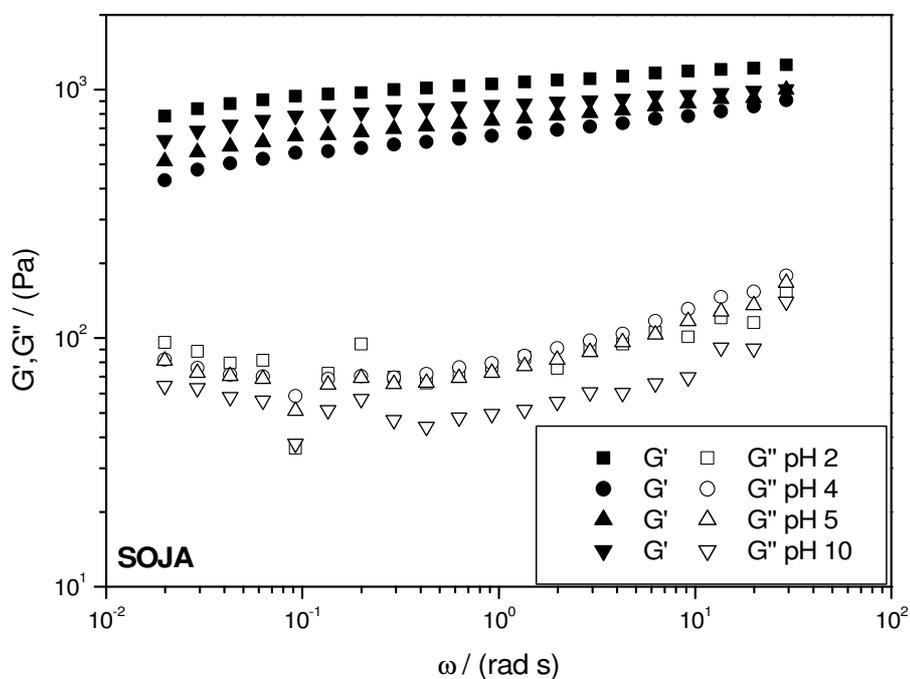


Figura 5.2.3.4. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, preparadas a diferentes pH (2, 4, 5, 10)

En las figuras 5.2.3.5. y 5.2.3.6. aparecen las curvas de distribución de tamaño de gota de la fase dispersa para las emulsiones de gluten y soja, respectivamente. Para ambas proteínas, los mayores diámetros de gota se han obtenido para los pH más cercanos al punto isoeléctrico de la proteína: en el caso del gluten, se obtiene una distribución de tamaños más desplazada hacia los mayores diámetros para la emulsión a pH 5 (más próxima a 6 que el resto de pH estudiados); mientras que para las emulsiones de soja, los mayores diámetros corresponden a las emulsiones a pH 4 y 5 (cerca de 4,5), lo que concuerda con los menores parámetros viscoelásticos presentados por estas dos emulsiones en comparación con el resto. Esta tendencia hacia mayores diámetros cuando el pH de la fase continua se encuentra en las proximidades del punto isoeléctrico puede explicarse por la menor cantidad de proteína soluble en la fase continua previa a la emulsificación, lo cual dificulta la etapa de difusión de proteína hacia la interfase. Además, se produce una reducción de las fuerzas electrostáticas repulsivas. Como resultado se obtienen peores distribuciones de tamaño de gotas debido a un proceso de coalescencia.

En las figuras 5.2.3.7. y 5.2.3.8. se resumen estos resultados de forma clara, al representar el módulo plateau y el diámetro de Sauter frente al pH para las emulsiones de gluten y soja. El mayor diámetro de Sauter se obtiene a un pH próximo al correspondiente al menor módulo plateau, lo cual resulta más evidente en el caso de la soja. Este pH se encuentra situado en las proximidades del punto isoeléctrico, de hecho, la forma de la representación del parámetro  $d_{32}$  o del módulo plateau de forma invertida recuerdan a la curva de solubilidad de la proteína. Las emulsiones con un pH igual a 2 tienen un diámetro ligeramente superior a las estabilizadas a pH alcalino. Obsérvese que las emulsiones de soja presentan un mínimo del tamaño de gota y un máximo del módulo plateau a pH 8. Otros autores (Waniska y Kinsella, 1985) han llegado a la conclusión de que esto se debe a un mayor grado de desnaturalización de la proteína a pH 2, lo cual hace que la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase proteína-agua sea menor.

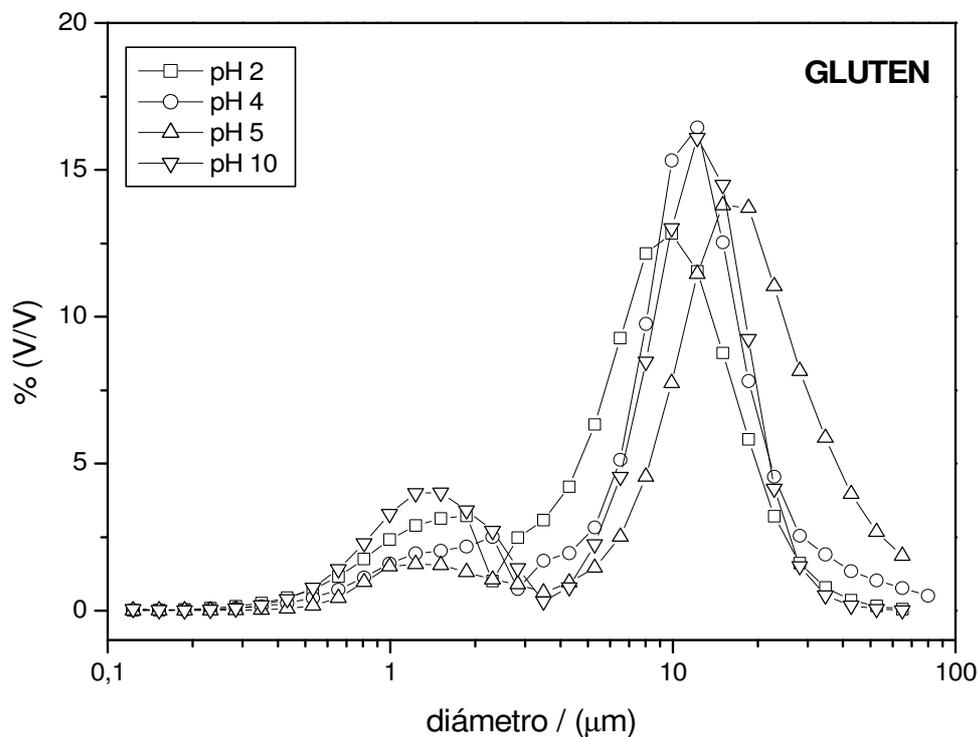


Figura 5.2.3.5. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten a diferentes pH

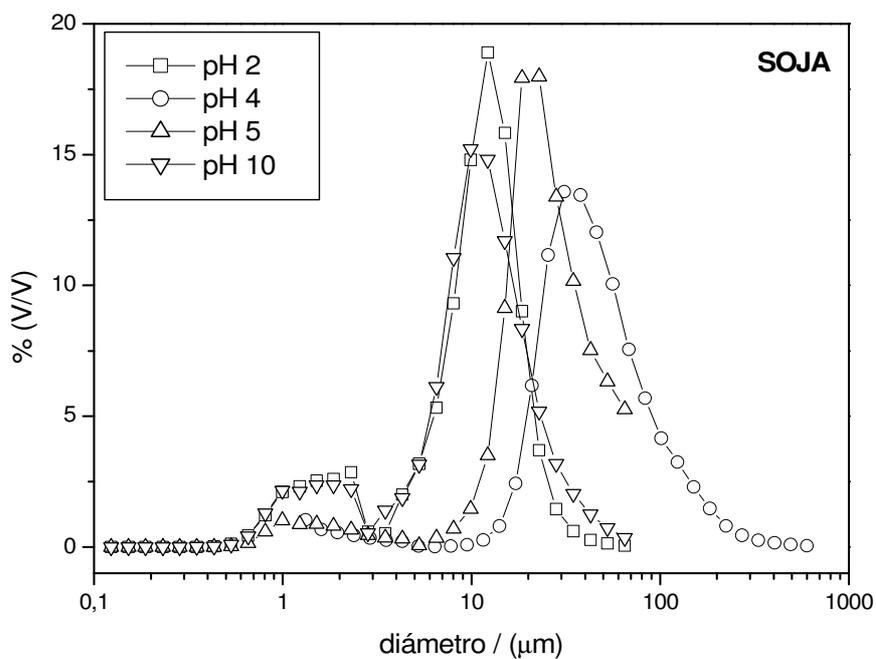


Figura 5.2.3.6. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de soja a diferentes pH

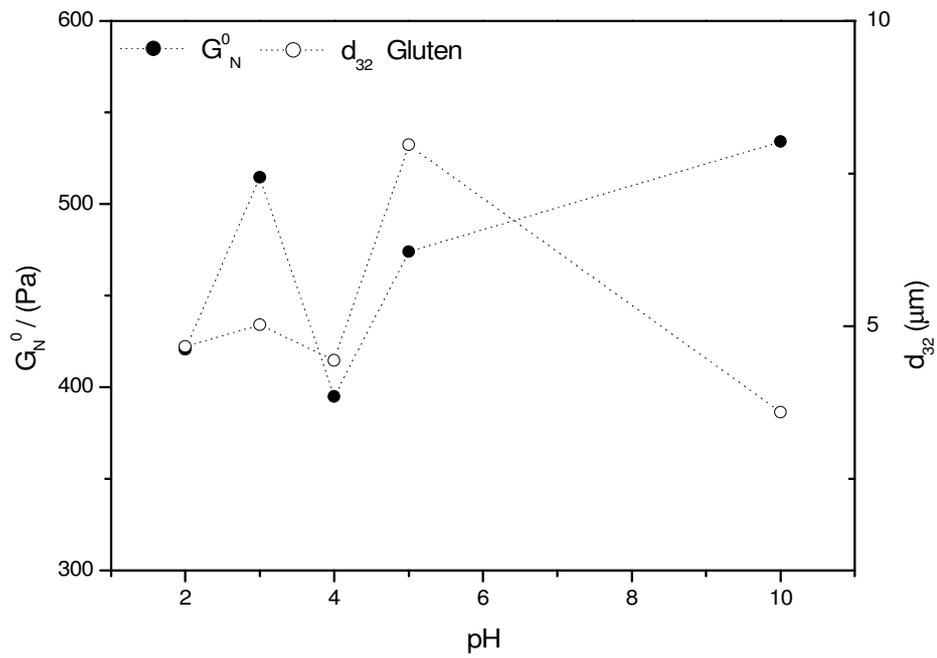


Figura 5.2.3.7. Módulo plateau,  $G_N^0$ , y diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente al pH de la fase continua en emulsiones concentradas O/W estabilizadas con 1% (p/p) de gluten

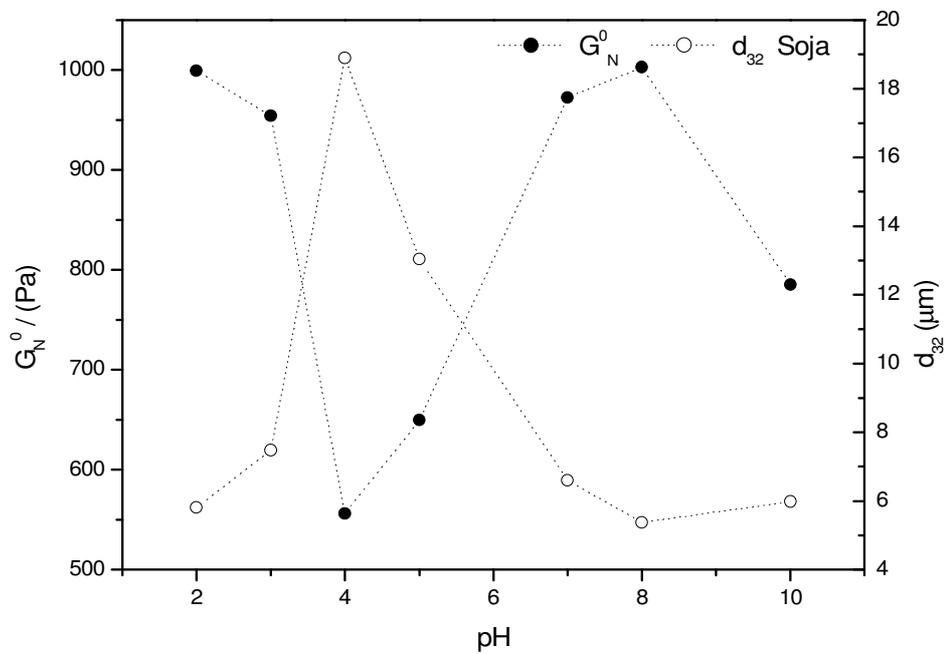


Figura 5.2.3.8. Módulo plateau,  $G_N^0$ , y diámetro de Sauter,  $d_{32}$ , frente al pH de la fase continua en emulsiones concentradas O/W estabilizadas con 1% (p/p) de soja

En el caso de la soja, hay una relación inversamente proporcional entre el módulo plateau y el diámetro de Sauter, lo cual se justificaría por el aumento de la superficie específica con la disminución del diámetro de las gotas.

En la tabla 5.2.3.1. aparecen los valores de los diferentes parámetros para todos los valores de pH estudiados, algunos de los cuales se han omitido en las figuras anteriores para facilitar la interpretación de los resultados representados.

	pH	D <sub>32</sub> (µm)	D <sub>43</sub> (µm)	U	τ <sub>c</sub> (Pa)	γ <sub>c</sub> (%)	G <sup>0</sup> <sub>N</sub> (Pa)
<b>Gluten</b>	2	3,97	10,38	0,620	54,6	11,20	424,50
	3	5,02	10,13	0,504	54,6	11,40	514,65
	4	4,44	11,64	0,623	26,4	6,59	394,85
	5	7,97	25,33	0,580	78,5	15,40	474
	10	3,59	11,44	0,525	78,5	13,60	534
<b>Soja</b>	2	5,80	12,42	0,460	54,6	6,00	999,25
	3	7,48	15,58	0,470	109,9	8,40	953,95
	4	18,9	49,8	0,730	78,5	10,85	556,25
	5	13,04	29,79	0,479	112,9	14,00	649,65
	7	6,60	13,24	0,466	112,9	11,00	972
	8	5,38	9,85	0,420	112,9	11,10	1002,6
	10	5,98	13,90	0,587	112,9	17,05	785,35

Tabla 5.2.3.1.

#### 5.2.4. Combinación de efectos: Concentración de proteína y pH

Un segundo objetivo planteado al analizar la influencia del pH ha sido determinar si se mantiene el comportamiento descrito anteriormente al modificar la concentración de proteína. Para este estudio se han elegido emulsiones preparadas con un aislado proteico de algarroba. En este caso se han estudiado dos valores de pH extremos: 2 y 10, realizándose este estudio a dos concentraciones de proteína diferentes: 0,125 y 1% (p/p). El punto isoeléctrico del aislado proteico de algarroba se sitúa en torno a 4, que es el pH para el que se ha obtenido un mínimo en la curva de solubilidad.

Según la curva de solubilidad obtenida, el aislado presenta una solubilidad mayor a pH 10 que a pH 2. Este dato podría explicar los mayores valores para los parámetros viscoelásticos obtenidos a pH 10 cuando la concentración de aislado en la emulsión es de 0,125% (figuras 5.2.4.1. y 5.2.4.2.). En cambio, cuando la concentración aumenta hasta el 1%, las diferencias entre los parámetros viscoelásticos dejan de ser tan importantes, aunque es a pH 2 donde se obtienen los mayores valores para las propiedades viscoelásticas. Este último efecto no parece tener reflejo en la distribución de tamaños de gota (ver figura 5.2.4.3. y tabla 5.2.4.1.).

Debe atribuirse por tanto a un efecto espesante de la proteína no solubilizada, que aumentaría la viscosidad de la fase continua, aumentando así la viscoelasticidad de la emulsión final.

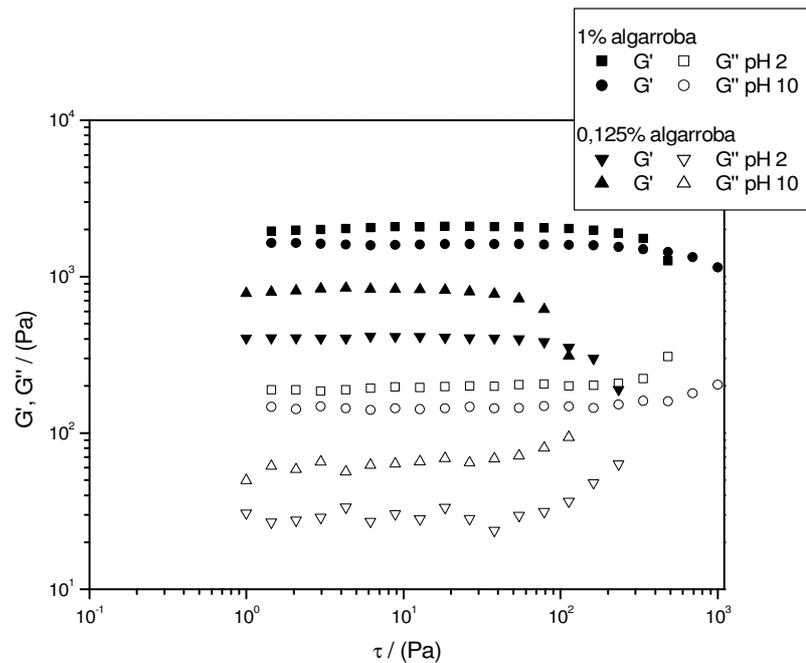


Figura 5.2.4.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 0,125/1 % (p/p) de algarroba, preparadas a pH extremos (2, 10)

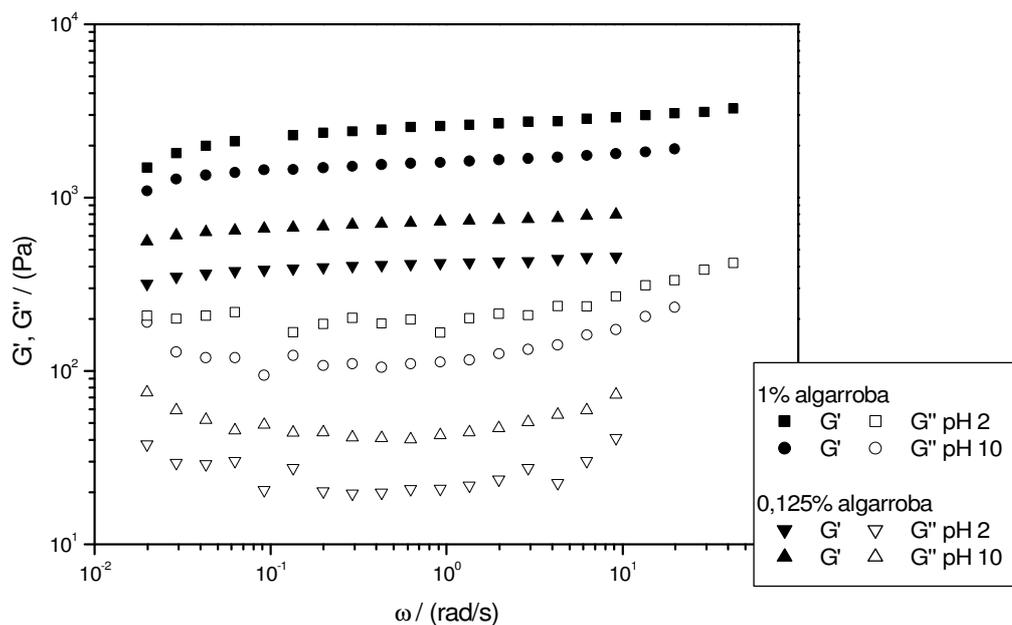


Figura 5.2.4.2. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 0,125/1 % (p/p) de algarroba, preparadas a pH extremos (2, 10)

Las curvas de distribución de gotas (figura 5.2.4.3.) de emulsiones estabilizadas con una misma concentración de aislado proteico de algarroba a pH 2 y 10 son bastante similares, siendo más importante el efecto de la concentración: al igual que ocurría con las emulsiones de gluten y soja (capítulo 5, apartado 5.2.2.), un aumento en la concentración de proteína presente en el sistema conduce a emulsiones con menores diámetros de gota, así como con mayores valores para los módulos de pérdidas y almacenamiento.

En la tabla 5.2.4.1. aparecen recogidos los diferentes parámetros obtenidos para las tres proteínas a partir de los ensayos reológicos y de distribución de tamaños de gota.

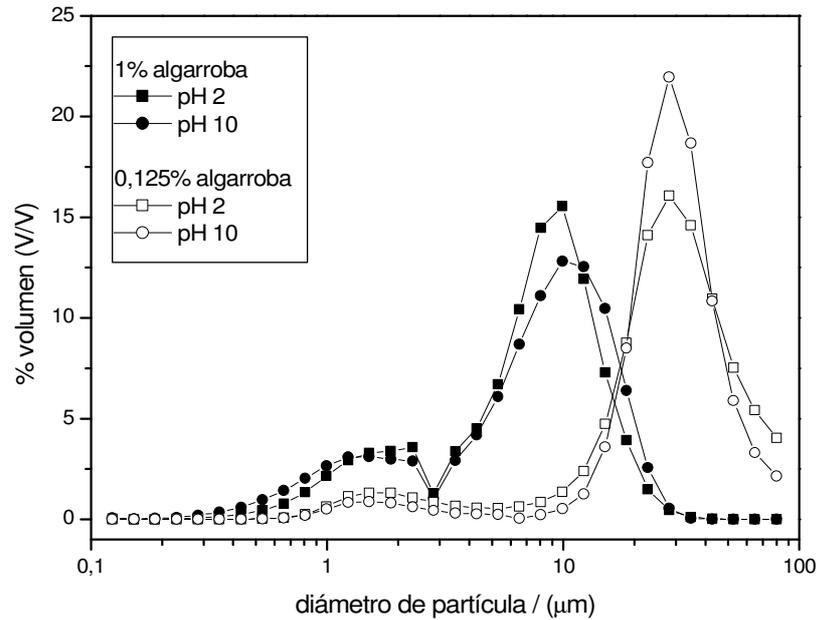


Figura 5.2.4.3. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 0,125/1% (p/p) de algarroba a pH extremos

	% Proteína	pH	D <sub>32</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>43</sub> ( $\mu\text{m}$ )	U	$\tau_c$ (Pa)	$\gamma_c$	G <sup>0</sup> <sub>N</sub> (Pa)
<b>Algarroba</b>	0,125	2	10,81	28,18	0,490	78,5	0,204	403,05
	0,125	10	13,28	27,72	0,370	26,4	0,044	713,4
	1	2	3,47	7,36	0,508	233,6	0,124	2583,5
	1	10	2,94	7,82	0,564	483,3	0,334	1439

Tabla 5.2.4.1.

### 5.2.5. Concentración de electrolito

En este apartado se ha estudiado la influencia que tiene la presencia de un electrolito como el cloruro de sodio (NaCl) sobre la reología y la microestructura de una

emulsión estabilizada con gluten de trigo. La adición del electrolito se ha realizado sobre la fase continua, previa a la adición de aceite. Es sabido que la fuerza iónica puede llegar a desestabilizar una emulsión estabilizada por proteínas. Los minerales aumentan la fuerza iónica en la fase acuosa, reducen la repulsión electrostática entre gotas y, por tanto promueven la separación de fases (Kulmyrzaev y Schubert, 2004). Sin embargo, la influencia de los iones minerales sobre la estabilidad de emulsiones estabilizadas por proteínas es compleja y depende de la naturaleza precisa de los iones, de las características eléctricas de la superficie de la gota y de las condiciones del medio (McClements, 1999). La presencia de un electrolito favorece el apantallamiento de las interacciones electrostáticas y el consecuente aumento de las interacciones hidrofóbicas, lo que promueve el acercamiento entre las gotas y una mayor probabilidad de interacciones entre las películas que se encuentran en la interfase

En el presente estudio se han utilizado para modificar la fuerza iónica de la emulsión iones monovalentes, como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , que son altamente solubles en agua y tienen una baja afinidad por la mayoría de los ligandos, por lo que existen principalmente como iones libres en sistemas acuosos. Por todo ello, los iones monovalentes pueden alterar la estabilidad de las emulsiones estabilizadas por proteínas de forma diferente a los multivalentes (Kulmyrzaev y Schubert, 2004).

Por tanto, tomando como base una emulsión de pH 2, con 1% de gluten de trigo y 75%(p/p) de aceite, y procesada a 6000 r.p.m. y 20°C, se ha variado la fuerza iónica mediante la adición de NaCl, llegando a una concentraciones de 38,8 y 61,5 mM. No ha sido posible el estudio de mayores valores de fuerza iónica, ya que no llegan a formarse emulsiones estables en las condiciones de experimentación. En la tabla 5.2.5.1. aparecen los valores del esfuerzo crítico y la deformación crítica, obtenidos a partir de los barridos de esfuerzo realizados sobre las emulsiones estudiadas. Se observa cómo un aumento en la concentración del electrolito da lugar a una disminución de la deformación crítica y del esfuerzo crítico, de forma que si el NaCl está presente a una concentración igual a 61,54 mM, la deformación y el esfuerzo críticos disminuyen, respectivamente, un 25 y un 30,5 % respecto a los valores obtenidos para la emulsión preparada sin adición de sal.

NaCl (mM)	$\gamma_c$	$\tau_c$ (Pa)
0	0,112	54,6
38,8	0,097	54,6
61,5	0,084	37,9

Tabla 5.2.5.1.

En la figura 5.2.5.1. están representados los espectros mecánicos para las emulsiones de gluten con diferente concentración de NaCl. Se observa una disminución de la extensión de la zona plateau cuando hay NaCl presente en la emulsión. En la bibliografía de propiedades físico-químicas de proteínas (Damodaran, 1997), se ha descrito un efecto del tipo “salting out”, como consecuencia de la presencia del electrolito, que origina una competencia entre soluto y proteína por el agua presente. Este efecto conduce a una disminución en la solubilidad de la proteína. No obstante, en este caso, el pH es muy inferior al punto isoeléctrico, por lo que la presencia de cargas de las moléculas proteicas será importante. Por tanto, parece más probable un efecto de apantallamiento de las fuerzas electrostáticas originadas por los iones cloruro.

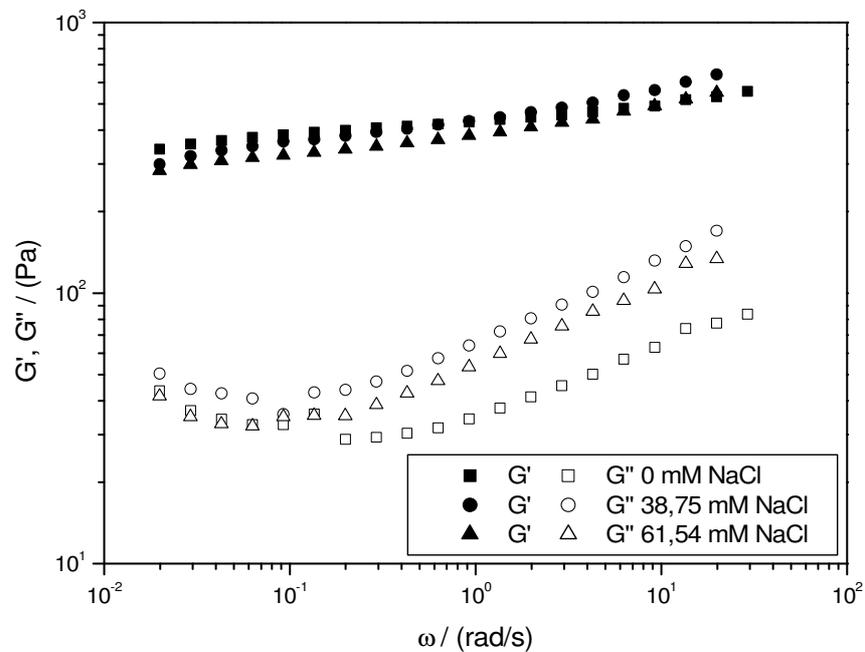


Figura 5.2.5.1. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, con diferentes concentraciones de electrolito, NaCl: 0 (■, □); 38,8 mM (●, ○); 61,5 mM (▲, Δ)

El apantallamiento de las interacciones electrostáticas por la presencia de NaCl queda reflejado en las curvas de distribución de tamaños de gota (figura 5.2.5.2.), donde se observa una tendencia hacia mayores diámetros de gota conforme aumenta la concentración de electrolito. Esto concuerda con los resultados reológicos antes presentados y se justifica por la mayor tendencia de las gotas a agregarse cuando el cloruro de sodio se encuentra en el medio, al disminuir la repulsión electrostática entre las gotas. Estos resultados podrían relacionarse con los encontrados por Palazolo y col. (2005) para emulsiones estabilizadas con suero de soja, en las que la desestabilización aumentaba con la adición de NaCl, como consecuencia del aumento de la eficiencia de las colisiones debido al apantallamiento de las interacciones electrostáticas en la película interfacial. La desestabilización de emulsiones mediante la adición de sal ha sido objeto de varios estudios (Popineau y col., 2002; Srinivasan y col., 2000; Wagner y Guéguen, 1999; Dickinson y col., 1998).

En la tabla 5.2.5.2. se puede observar la disminución del módulo plateau con la concentración de sal presente en el medio, así como el aumento del diámetro con la misma.

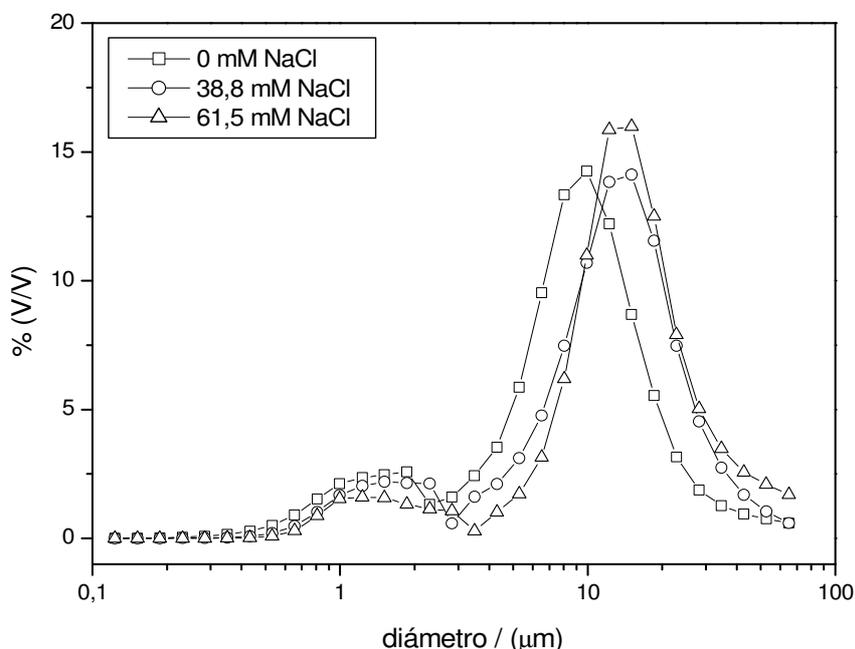


Figura 5.2.5.2. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten a diferentes concentraciones de electrolito, NaCl: 0 (□); 38,8 mM (○); 61,5 mM (Δ)

NaCl (mM)	$G_N^0$ (Pa)	$d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{43}$ ( $\mu\text{m}$ )	U
0	420,67	3,97	10,38	0,62
38,8	363,4	6,35	15,58	0,58
61,5	317,1	7,91	18,28	0,59

Tabla 5.2.5.2.

La descripción clásica de las interacciones entre gotas cargadas de una emulsión corresponde a la teoría DLVO, que asume que la energía de interacción total entre dos gotas es el resultado de las fuerzas de van der Waals atractivas y de las fuerzas de interacción repulsivas de naturaleza electrostática. El aumento en la concentración de sal disminuye drásticamente la altura de la barrera energética; cuando se supera una concentración crítica, la barrera energética deja de ser superior a la energía térmica, que es la responsable de la agregación de las gotas. La presencia de NaCl en las emulsiones estudiadas conduce a una doble capa menos extensa, menos repulsión entre gotas y a una agregación de gotas a una concentración crítica de electrolito (Kulmyrzaev y Schubert, 2004).

### 5.3. Conclusiones

1. Un aumento de la concentración de aceite o de proteína origina una reorganización del tamaño de gota de la fase dispersa, así como una evolución hacia una mayor extensión de la zona plateau, que ha sido relacionada anteriormente con un aumento de la estabilidad de la emulsión. Cuando la reducción del tamaño es importante, tiende a producirse una evolución del perfil bimodal de tamaños hacia uno monomodal, con el consiguiente aumento de las interacciones del sistema.
2. El tamaño de gota de las emulsiones estabilizadas con proteínas de soja es mayor al de las emulsiones estabilizadas con gluten o algarroba, lo cual estará relacionado con mayores valores de tensión interfacial, que dificultan la rotura

de gotas durante el proceso de emulsificación. Las imágenes obtenidas por microscopía de las emulsiones revelan una estructura con un alto empaquetamiento de gotas, observándose una mayor deformación de las gotas en el caso de las emulsiones de soja.

3. Las emulsiones preparadas a un pH próximo al punto isoeléctrico presentan una distribución de tamaños de gota desplazada hacia mayores diámetros, lo cual puede explicarse en base a la menor cantidad de proteína soluble presente en la fase continua en las proximidades del punto isoeléctrico. El alejamiento del punto isoeléctrico produce una disminución del tamaño de gota que, generalmente, se corresponde con menores valores de los parámetros viscoelásticos.
4. La estabilización de las emulsiones resulta muy sensible a la presencia de electrolito en la fase continua. Un aumento de la fuerza iónica produce un apantallamiento de cargas que reduce las fuerzas electrostáticas, dando lugar a emulsiones con mayores tamaños de gota y con una zona plateau menos desarrollada. No ha sido posible la preparación de emulsiones estables con una concentración de cloruro sódico superior a 61,5 mM en la fase continua.



**CAPÍTULO 6.**  
**PROCESADO**  
**POST-EMULSIFICACIÓN**

## CAPÍTULO 6. PROCESADO POST-EMULSIFICACIÓN

### 6.1. Introducción

En el capítulo anterior se han caracterizado los parámetros reológicos y microestructurales de este tipo de emulsiones en diferentes condiciones de procesado y composición. Se trataría ahora de comprobar si es posible la mejora de la estructura obtenida tras el proceso de emulsificación. Existen diferentes estudios que revelan una relación entre reología, parámetros estructurales y estabilidad (Rahalkar, 1992; Franco y col., 1995; Dalgleish, 1997; McClements, 2004). En este capítulo se pretenden estudiar las modificaciones que se producen sobre las propiedades reológicas y la microestructura de las emulsiones como consecuencia de un procesado térmico o de una modificación de pH, para establecer así las condiciones que originen un reforzamiento del entramado estructural formado entre las moléculas de proteína, lo cual debería traducirse en un aumento de estabilidad de la emulsión.

### 6.2. Resultados y Discusión

#### 6.2.1. Tratamientos térmicos

Existen diferentes estudios realizados sobre la evolución de las propiedades reológicas de emulsiones sometidas a tratamientos térmicos mediante ensayos oscilatorios de baja deformación (Chen y Dickinson, 1998; Dickinson y Cassanova, 1999; Dickinson y Hong, 1995; Dickinson y Yamamoto, 1996a,b; Dickinson y col., 1996; Moros y col., 2003). Sin embargo, muchos de esos estudios se centran en emulsiones de muy baja viscosidad y con una fracción en volumen de fase oleosa relativamente baja, en los que la aplicación de calor a la emulsión origina un cruce entre los módulos viscoelásticos  $G'$  y  $G''$ , dando lugar a una transición desde un sistema con carácter predominantemente fluido hasta un entramado tipo gel. Este apartado, en cambio, se centrará en el estudio de emulsiones de alta viscosidad con una fracción en volumen de fase oleosa elevada, concretamente, emulsiones aceite en agua con un 75% de aceite y estabilizadas con un 1% de gluten o de soja. El presente estudio se basa en el seguimiento de la evolución de los parámetros reológicos (módulo de almacenamiento,  $G'$ , y módulo de pérdidas,  $G''$ ) durante la aplicación de diferentes tratamientos térmicos sobre las emulsiones, así como en la influencia que estos ciclos térmicos tienen sobre

los espectros mecánicos y la distribución de tamaños de gotas de las emulsiones. Además, se ha estudiado la influencia que el pH de la fase continua tiene sobre el comportamiento termorreológico de las emulsiones preparadas.

Tanto para las emulsiones de gluten como para las de soja, las rampas de temperatura se han llevado a cabo entre 20 y 70°C a una frecuencia constante igual a 1 Hz, mediante el siguiente protocolo: en primer lugar, una subida de temperatura desde 20 hasta 70°C, a una velocidad constante de 1°C/min o de 5°C/min; a continuación, un tramo isoterma a 70°C durante 50 minutos; posteriormente, una bajada de temperatura desde 70 a 20°C, a la misma velocidad que la subida; y, por último, un tramo isoterma a 20°C durante 10 minutos. La deformación aplicada se ha ajustado para mantener las medidas dentro del intervalo viscoelástico lineal. Estos ensayos se han llevado a cabo preparando emulsiones con diferentes valores de pH de la fase continua: 2, 4 (sólo en el caso del gluten), 6 (sólo en el caso de la soja) y 10.

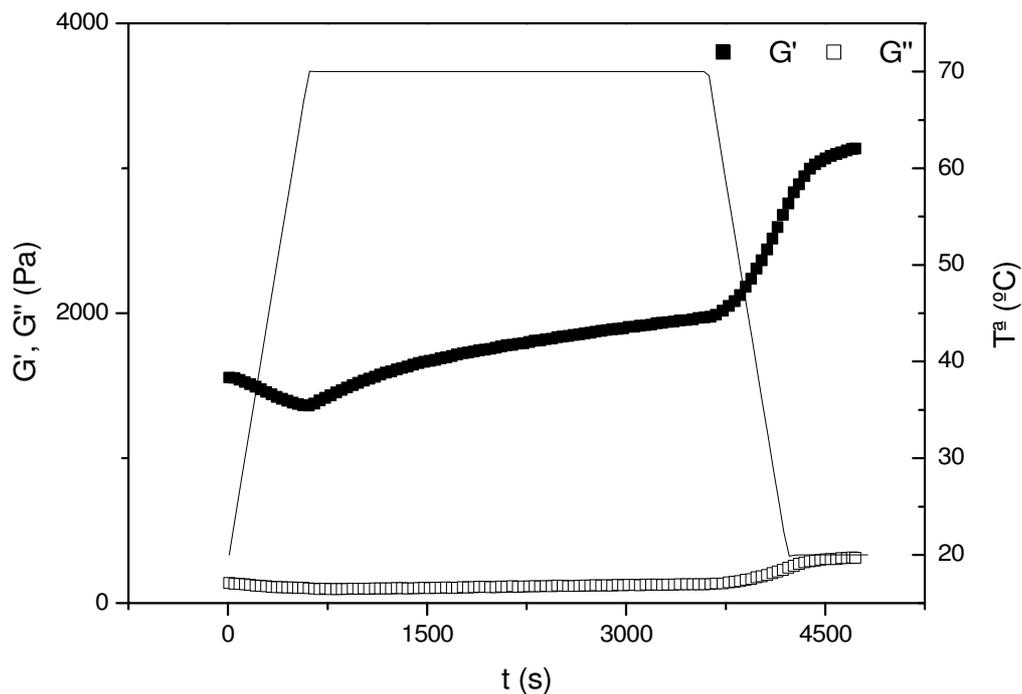


Figura 6.2.1.1. . Evolución de los módulos de almacenamiento y de pérdidas con el tiempo durante la aplicación un ciclo de temperatura a 5°C/min, para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de soja

En la figura 6.2.1.1. puede observarse la evolución de  $G'$  y  $G''$  durante el ciclo de calentamiento/enfriamiento que resulta cualitativamente similar a la encontrada en estudios de gelificación realizados previamente sobre emulsiones estabilizadas por proteínas (Moros y col., 2003; Chen y Dickinson, 1998; Dickinson y Hong, 1995; Kim y col., 2001). Así, se pueden observar tres regiones claramente diferenciadas:

1. Una primera región, comprendida entre 20 y 70°C, durante la subida de temperatura, en la que la evolución de los módulos de almacenamiento y de pérdidas es típica, con un descenso inicial que suele conducir a un mínimo en los valores de  $G'$  y  $G''$ .
2. La segunda etapa del ciclo térmico corresponde al tramo isoterma a 70°C, en la que  $G'$  y  $G''$  aumentan de forma progresiva. Generalmente se observa una tendencia hacia un valor asintótico de los módulos de almacenamiento y de pérdidas con el tiempo.
3. La etapa de enfriamiento conduce nuevamente a un aumento considerable de los valores de  $G'$  y  $G''$ , alcanzándose finalmente un valor plateau a 20°C, temperatura a la cual se sitúa un segundo tramo isoterma.

En algún estudio previo con proteínas de la yema de huevo (Moros y col., 2003) se han encontrado diferencias en la distribución de tamaños de gota debido a un proceso de coalescencia durante una etapa de calentamiento. Sin embargo, en el caso presente, esta posibilidad no parece probable, sobre todo si consideramos los resultados mostrados en la figura 6.2.1.2., donde no se aprecian diferencias significativas en las distribuciones de tamaños de gota antes y después del procesado térmico para una emulsión estabilizada con gluten a pH 2, para la que sí se producen diferencias importantes en las propiedades viscoelásticas con la temperatura. Además, para las emulsiones estudiadas no se obtiene en ningún caso una disminución de los valores de los módulos mayor al 20% durante la etapa de calentamiento. Esto parece indicar que el

descenso de los valores de  $G'$  y  $G''$  se deben al efecto que produce la temperatura sobre la viscosidad de la fase continua.

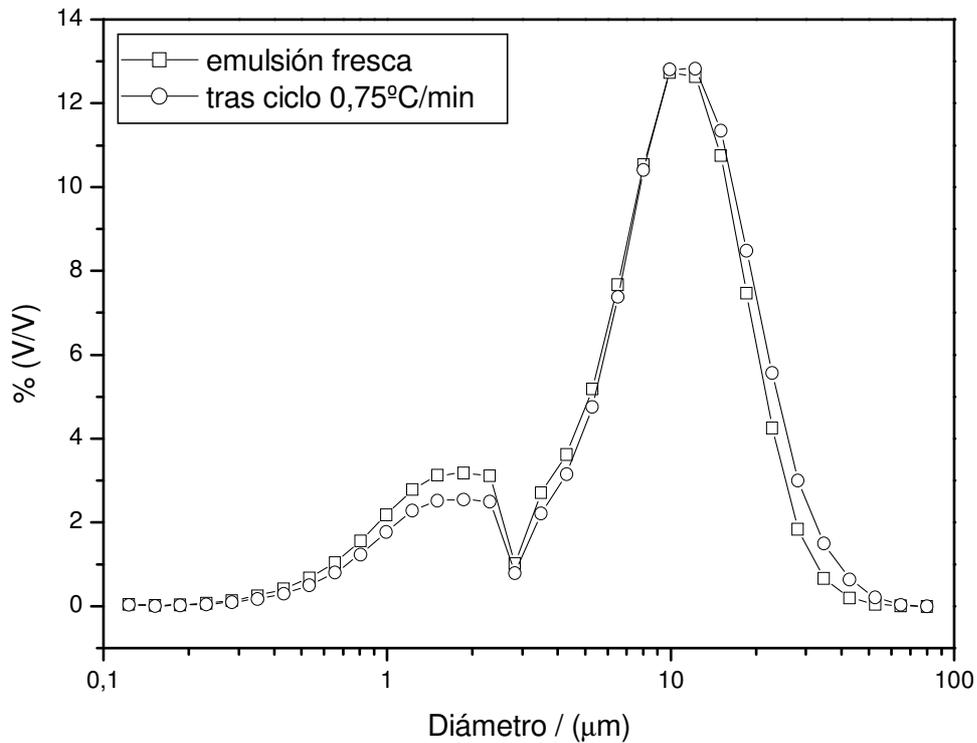


Figura 6.2.1.2. Curvas de distribución de tamaños de gota para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten, antes y después de la aplicación de un ciclo de temperatura a 0,75°C/min

El posterior aumento de  $G'$  y  $G''$  que tiene lugar durante el calentamiento y el enfriamiento de la muestra son consecuencia de diferentes tipos de interacciones proteína-proteína que se producen durante el procesado térmico. Las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre regiones polipeptídicas adyacentes son las principales propulsoras de las primeras etapas de la gelificación a altas temperaturas. El crecimiento de los módulos viscoelásticos que tiene lugar durante el proceso puede atribuirse tanto a la presencia de entrecruzamientos entre grupos sulfuro como a la

formación de puentes de hidrógeno favorecida durante la etapa de enfriamiento (Dickinson y Hong, 1995, 1997).

El incremento pronunciado de  $G'$  durante la etapa de enfriamiento concuerda con los resultados de Beveridge y col. (1984) atribuidos a la formación de enlaces de hidrógeno múltiples.

Algunos autores han relacionado un aumento del valor de  $G'$  durante el calentamiento de emulsiones estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina (Dickinson y col., 1992) o proteínas del suero de leche (Aguilera y col., 1993) con una fuerte interacción entre las moléculas de proteínas situadas en la interfase y las moléculas o agregados proteicos que se encuentran en la primera etapa de gelificación en el seno de la fase continua. Yost y Kinsella (1992) han observado mediante microscopía la existencia de tales interacciones entre las proteínas adsorbidas y las no adsorbidas en la interfase. Además, mientras mayor sea la concentración local de proteínas en la fase continua, mayor será la estructuración esperable debido a la mayor densidad de entrecruzamientos (Mulvihill y Kinsella, 1987). En este tipo de emulsiones denominadas *emulsión gel*, en las que la interacción entre proteína adsorbida y no adsorbida suele ser fuerte, la capa viscoelástica de proteína que rodea a la gota de aceite juega un papel importante actuando como punto de anclaje que confiere gran estabilidad estructural.

En las figuras 6.2.1.3., 6.2.1.4., 6.2.1.5. y 6.2.1.6. se muestra la evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo para emulsiones de gluten y soja a diferentes valores de pH, para las dos velocidades estudiadas (0,75 y 5 °C/min).

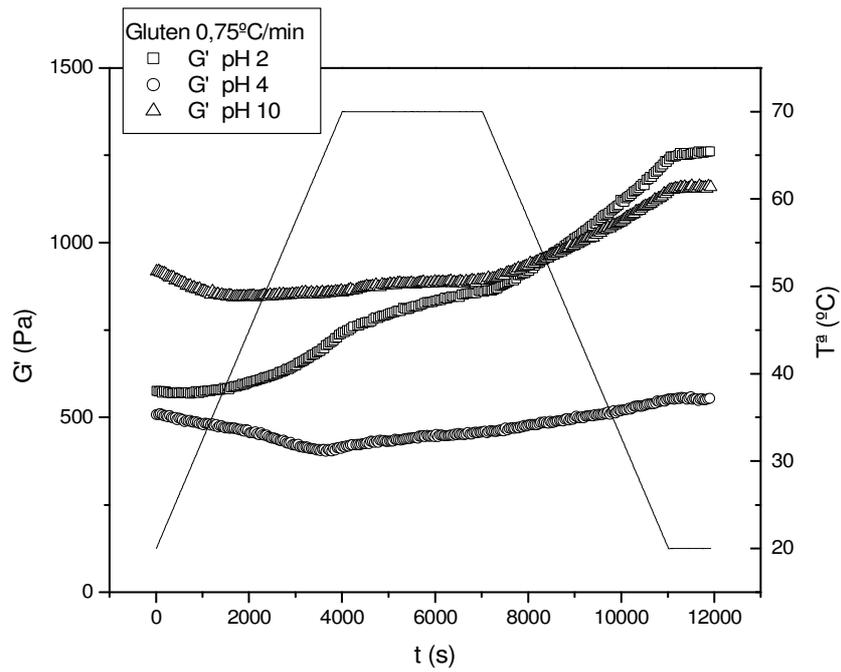


Figura 6.2.1.3. . Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo durante la aplicación un ciclo de temperatura a 0,75 °C/min, para emulsiones O/W que contienen 75% de aceite y 1% de gluten, a diferentes valores de pH (2, 4, 10)

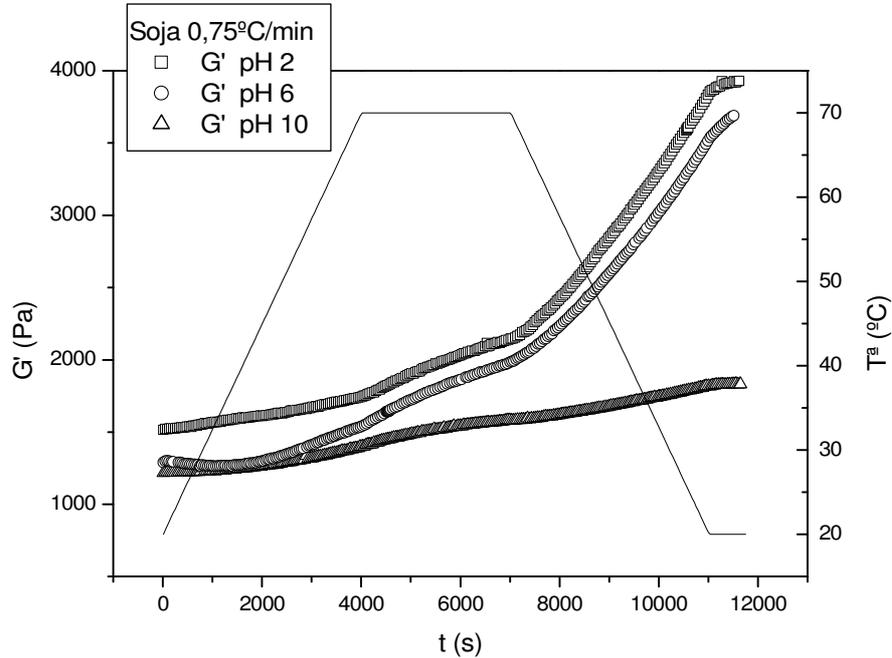


Figura 6.2.1.4. . Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo durante la aplicación un ciclo de temperatura a 0,75 °C/min, para emulsiones O/W que contienen 75% de aceite y 1% de soja, a diferentes valores de pH (2, 6, 10)

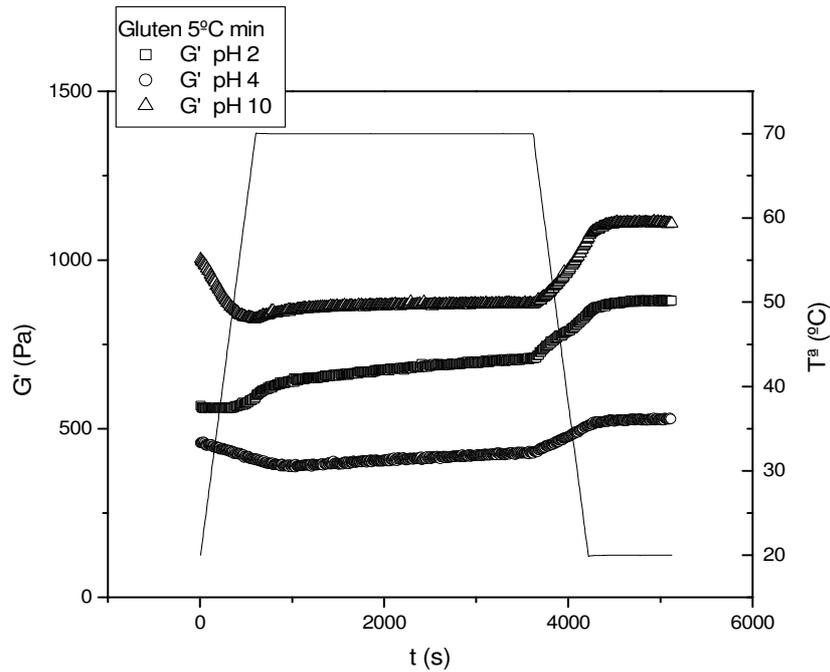


Figura 6.2.1.5. . Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo durante la aplicación un ciclo de temperatura a 5 °C/min, para emulsiones O/W que contienen 75% de aceite y 1% de gluten, a diferentes valores de pH (2, 4, 10)

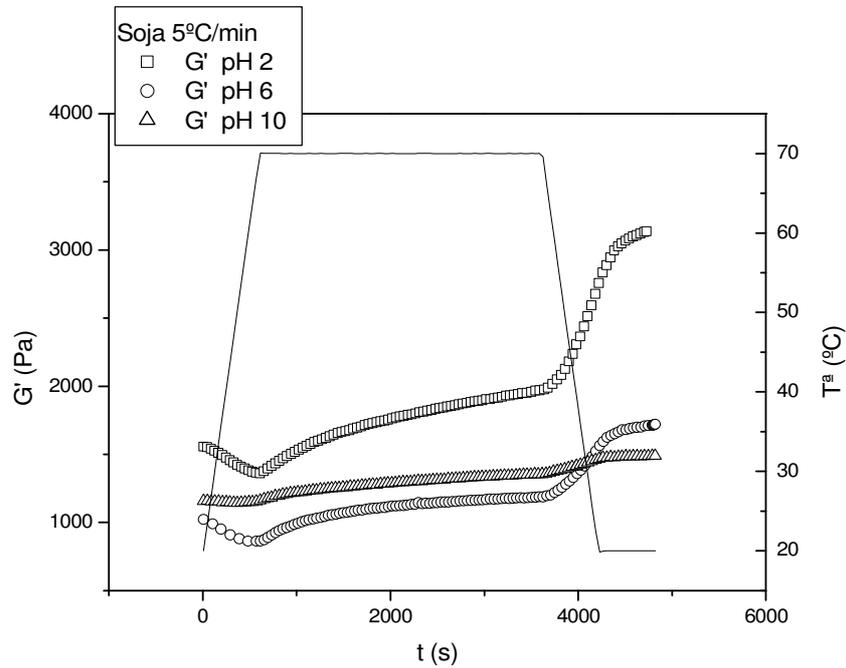


Figura 6.2.1.6. . Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo durante la aplicación un ciclo de temperatura a 5 °C/min, para emulsiones O/W que contienen 75% de aceite y 1% de soja, a diferentes valores de pH (2, 6, 10)

El crecimiento del módulo elástico tras el tratamiento térmico es más bajo para la mayor velocidad de calentamiento empleada, tanto para las emulsiones estabilizadas con gluten como para las estabilizadas con soja. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Moros y col. en estudios con emulsiones similares estabilizadas por proteínas de yema de huevo. En ese caso se relacionó con la temperatura a la que comienza la desnaturalización de la proteína, que aumenta conforme aumenta la velocidad de calentamiento (Moros y col. 2003). En cualquier caso, los ensayos realizados a menor velocidad de calentamiento implican un mayor tiempo de exposición a temperatura elevada.

Es posible definir un parámetro  $I$ , que considere el crecimiento de  $G'$  durante el tratamiento térmico, como:

$$I = \frac{G'_f - G'_0}{G'_0}$$

donde  $G'_0$  es el valor del módulo de almacenamiento a tiempo cero (antes del tratamiento térmico), y  $G'_f$  es el valor del módulo de almacenamiento para la emulsión al finalizar el tratamiento térmico al que se somete. Como puede observarse en la tabla 6.2.1.1., el mayor crecimiento del módulo de almacenamiento tras el procesado, que es un índice del reforzamiento estructural, es mayor para la menor velocidad de calentamiento, independientemente del pH inicial y del tipo de proteína utilizada.

	<i>pH</i>	<i>I</i>	
		<i>0,75°C/min</i>	<i>5°C/min</i>
<i>Gluten</i>	<b>2</b>	1,20	0,55
	<b>4</b>	0,09	0,16
	<b>10</b>	0,26	0,10
<i>Soja</i>	<b>2</b>	1,59	1,02
	<b>6</b>	1,86	0,68
	<b>10</b>	0,50	0,28

Tabla 6.2.1.1. Valores de  $I$  como medida del reforzamiento estructural de la emulsión tras el ciclo térmico

Cuando las proteínas son sometidas a tratamiento térmico tienen lugar importantes cambios físico-químicos, como su desnaturalización, cambios

conformacionales y cambios en la hidrofobicidad (Weegels y col., 1994). La estabilidad de las proteínas es mayor a pH alcalino, lo cual se manifiesta con una mayor temperatura de desnaturalización (Franco y col., 2000; Renkema y col., 2001). Este aumento de estabilidad explicaría el menor aumento de las propiedades viscoelásticas en el caso de las emulsiones preparadas a pH 10, si las comparamos con las preparadas a pH 2.

Generalmente, las emulsiones de soja presentan mayores valores de  $G'$  que las de gluten. Los valores del índice de reforzamiento estructural experimentan una evolución con el pH muy diferente para las dos proteínas. A pH 2 se obtienen valores altos del índice de reforzamiento tanto para las emulsiones de gluten como para las de soja. Cuando el pH se aproxima al punto isoelectrico, el índice de reforzamiento que se obtiene en las emulsiones estabilizadas con gluten es mínimo.

Las interacciones que tienen lugar durante el procesado térmico favorecen el aumento de los parámetros viscoelásticos tanto para las emulsiones estabilizadas por proteínas de gluten como para las estabilizadas por proteínas de soja. Esto se puede comprobar mediante el estudio de los espectros mecánicos de las emulsiones antes y después de cada tratamiento térmico (figuras 6.2.1.7.-6.2.1.12.). Los barridos de frecuencia realizados sobre las muestras que han sido sometidas a tratamiento térmico ofrecen siempre valores de los módulos de almacenamiento y de pérdidas mayores que los obtenidos con la emulsión fresca (sin tratamiento térmico) en todo el intervalo de frecuencias estudiado.

Las emulsiones estabilizadas con soja sometidas a tratamiento térmico experimentan siempre una mejora significativa de las propiedades viscoelásticas. De nuevo, se comprueba que el reforzamiento estructural es especialmente notable a valores de pH cercanos al punto isoelectrico o a pH ácido, sobre todo a velocidades de calentamiento moderadas.

El reforzamiento del entramado estructural que forman las emulsiones estabilizadas con gluten mediante tratamiento térmico es en general moderado, salvo las emulsiones preparadas a pH ácido. Esto concuerda con los resultados antes presentados, puesto que en los termogramas obtenidos para la emulsión a pH 2, el aumento de  $G'$  con la temperatura se encuentra en torno al 120 o 55%, para ciclos térmicos a 0,75 o 5°C/min, respectivamente.

Al aumentar el pH se produce una evolución del índice de reforzamiento estructural de la emulsión estabilizada con gluten que da lugar a un mínimo a pH próximo al punto isoeléctrico, mientras que en el caso de las emulsiones estabilizadas con soja aparece un máximo cercano al pI. Conviene recordar que las emulsiones preparadas con gluten en el pI no resultan estables.

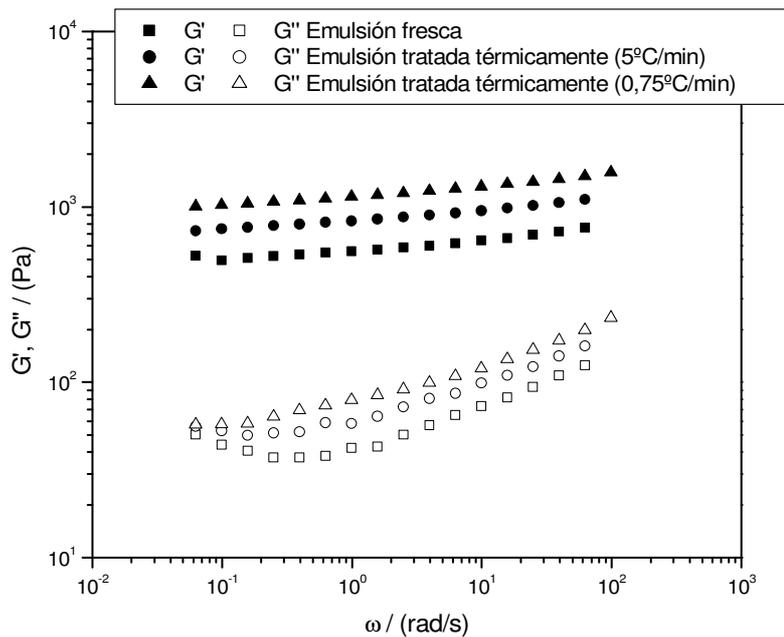


Figura 6.2.1.7. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

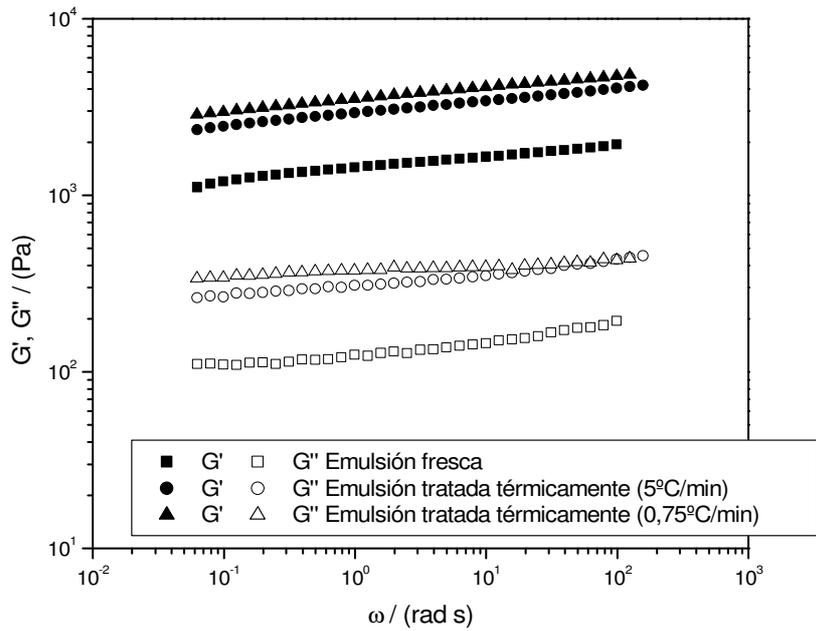


Figura 6.2.1.8. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de aislado proteico de soja, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

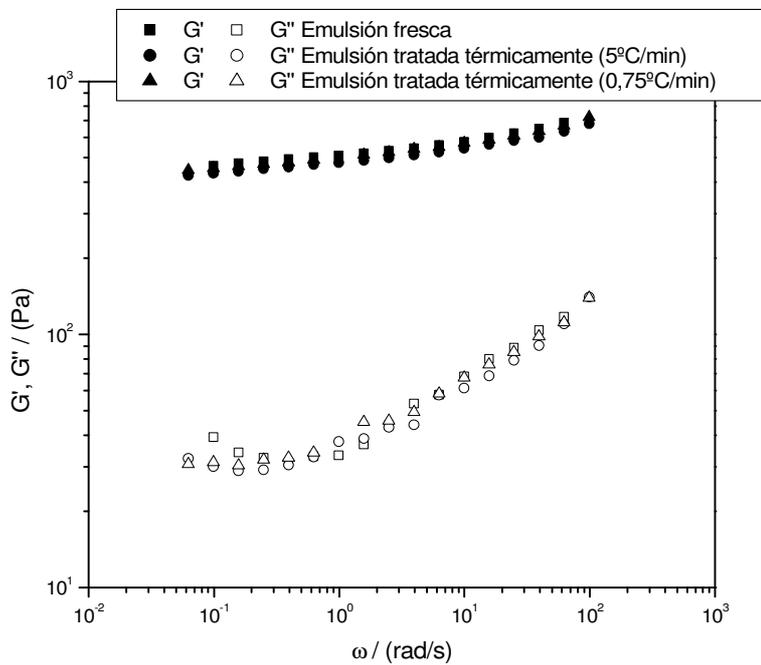


Figura 6.2.1.9. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 4 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

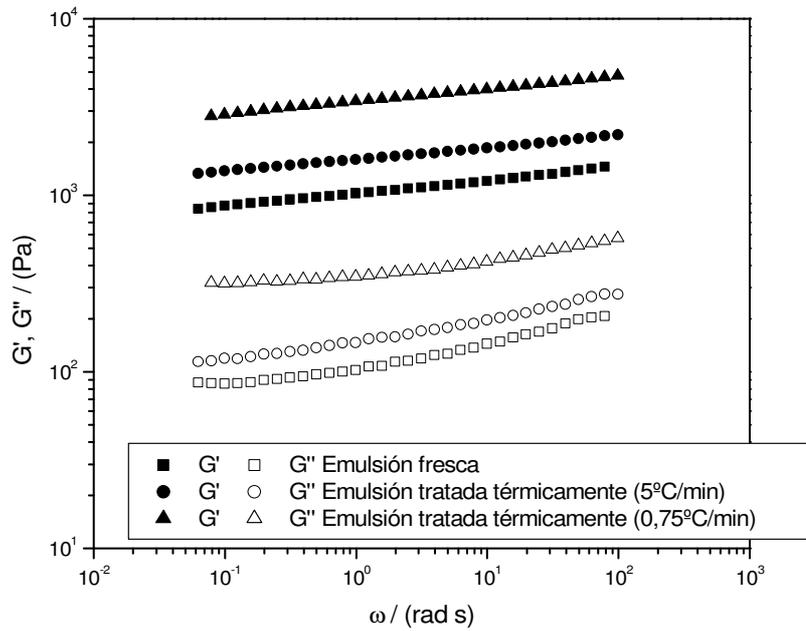


Figura 6.2.1.10. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 6 que contiene 75% de aceite y 1% de aislado proteico de soja, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

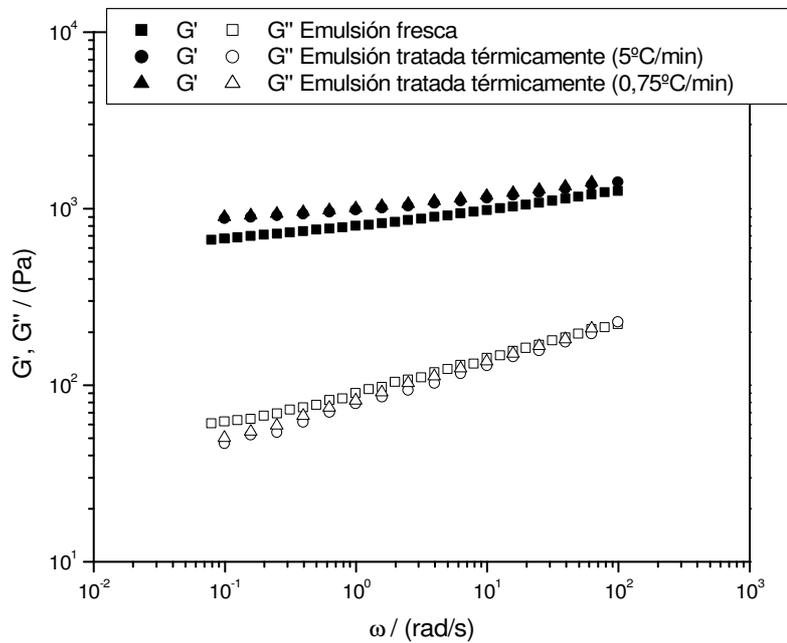


Figura 6.2.1.11. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 10 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

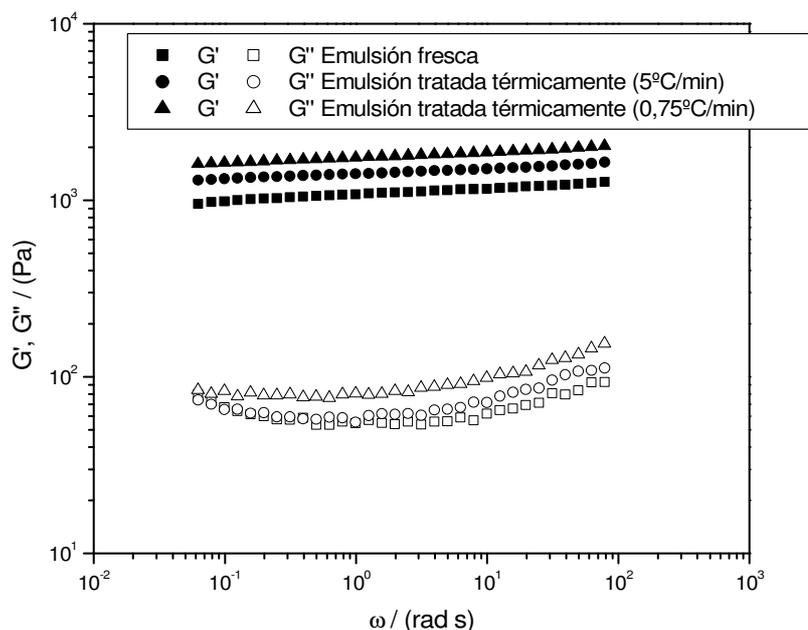


Figura 6.2.1.12. Barridos de frecuencia para una emulsión O/W a pH 10 que contiene 75% de aceite y 1% de aislado proteico de soja, antes y después de la aplicación dos ciclos diferentes de temperatura

Los estudios anteriores se han completado con ensayos de dobles ciclos térmicos para estudiar la reversibilidad de algunas de las interacciones. Recuérdese que durante el calentamiento, las moléculas de proteína se abren parcialmente, de forma que tanto grupos hidrofóbicos como sulfhidrilos reactivos, que se encontraban anteriormente enterrados en el interior de la proteína, pasan a estar expuestos a la fase continua. Esto es particularmente importante en el caso de proteínas globulares. De esta manera, se ve favorecida por la formación de agregados irreversibles entre las moléculas de proteína a través de una serie de pasos, que incluyen entre otras interacciones hidrofóbicas (Kerstens y col., 2005). La formación de puentes de hidrógeno tiene lugar principalmente durante la etapa de enfriamiento del proceso térmico al que se han sometido las emulsiones. Estas interacciones son reversibles, de forma que si tras el enfriamiento se vuelve a calentar a la muestra a 5°C/min, tal y como se puede comprobar en las figuras 6.2.1.13. y 6.2.1.14. para la emulsión estabilizada con un 1% de gluten a pH 2 para los ciclos térmicos a 5 y 0,75°C/min, respectivamente, se produce una caída en los parámetros viscoelásticos hasta un valor aproximadamente igual al que se alcanzaba durante la etapa isoterma a 70°C, independientemente de la historia térmica.

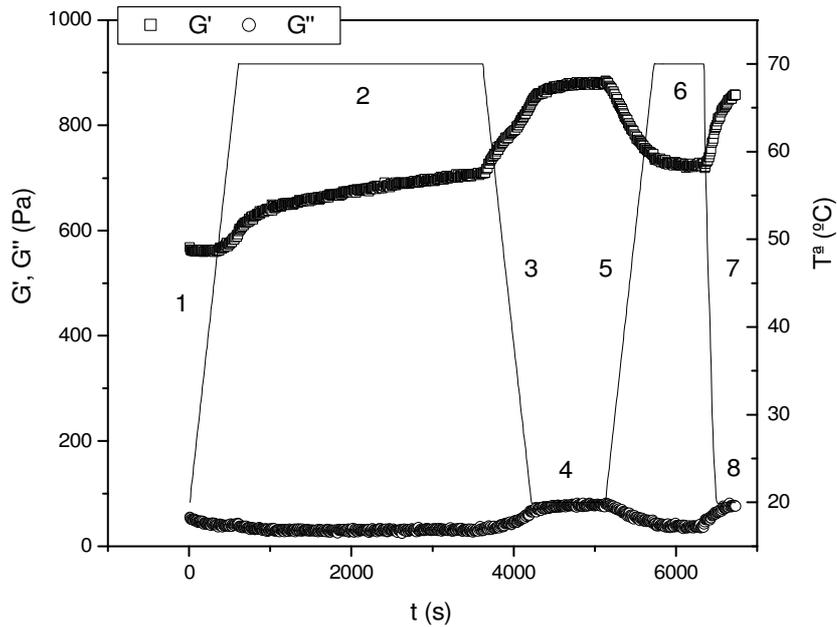


Figura 4.2.8.14.. Evolución del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdidas con el tiempo para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten durante la aplicación de un ciclo térmico: 1) 20-70°C, 5°C/min; 2) 70°C, 3000 s; 3) 70-20°C, 5°C/min; 4) 20°C, 900 s; 5) 20-70°C, 5°C/min; 6) 70°C, 600 s; 7) 70-20°C, 30°C/min; 8) 20°C, 300 s

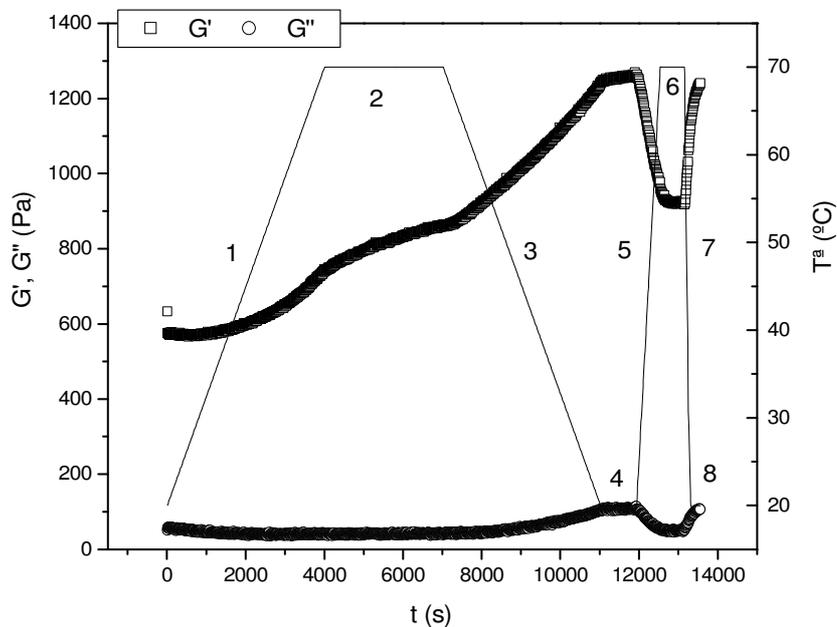


Figura 4.2.8.15. Evolución del módulo de almacenamiento y del módulo de pérdidas con el tiempo para una emulsión O/W a pH 2 que contiene 75% de aceite y 1% de gluten durante la aplicación de un ciclo térmico: 1) 20-70°C, 0,75°C/min; 2) 70°C, 3000 s; 3) 70-20°C, 0,75°C/min; 4) 20°C, 900 s; 5) 20-70°C, 5°C/min; 6) 70°C, 600 s; 7) 70-20°C, 30°C/min; 8) 20°C, 300 s

### 6.2.2. Modificación del pH en emulsiones finales

Muchas proteínas presentan una baja capacidad emulsionante en condiciones próximas al punto isoeléctrico debido a la débil participación de interacciones electrostáticas y a su baja solubilidad. Así, en muchos casos para lograr la estabilización de la emulsión es necesario procesar el sistema proteico a valores de pH extremos, incluso en condiciones en los que la aplicación alimentaria de la emulsión no sería posible. Para evitar este tipo de problemas se ha procedido a estudiar el efecto que produce la modificación del pH en una etapa posterior a la de fabricación de la emulsión sobre la microestructura y reología de la misma.

En el caso de las emulsiones preparadas utilizando proteínas de gluten y soja como emulsionante, se ha estudiado la posibilidad de preparar las emulsiones a un pH extremo (2 o 10) y, posteriormente, llevar la emulsión obtenida a otro pH final diferente, bien por la imposibilidad de obtener una emulsión estable a ese pH de forma directa, como es el caso de las emulsiones con gluten, bien por llevar la emulsión a un pH más cercano al pH de las emulsiones comerciales. Las emulsiones se han preparado a un pH inicial de 2 o 10, añadiendo al día siguiente de su preparación la cantidad necesaria de HCl o de NaOH para conseguir un pH final de 4.

En las figuras 6.2.2.1., 6.2.2.2., 6.2.2.3. y 6.2.2.4. aparecen los barridos de esfuerzo realizados sobre las emulsiones obtenidas a pH 4 utilizando gluten y soja, tanto de forma directa como indirecta. En ambos casos se comparan las emulsiones obtenidas a pH 4 tras emulsificación directa con las que se obtienen indirectamente tras la modificación del pH de emulsiones preparadas a pH 2 o 10 y con las correspondientes emulsiones a pH 2 y pH 10 sin modificar. Las emulsiones obtenidas a pH 4 por vía indirecta, tras la modificación del pH, presentan un valor de la deformación crítica mayor que la de la emulsión preparada directamente a pH 4 cuando se utiliza gluten como emulsionante. Si el emulsionante es la proteína de soja, este efecto depende del pH de partida. En cualquier caso, el esfuerzo crítico siempre es mayor para emulsiones preparadas por vía indirecta.

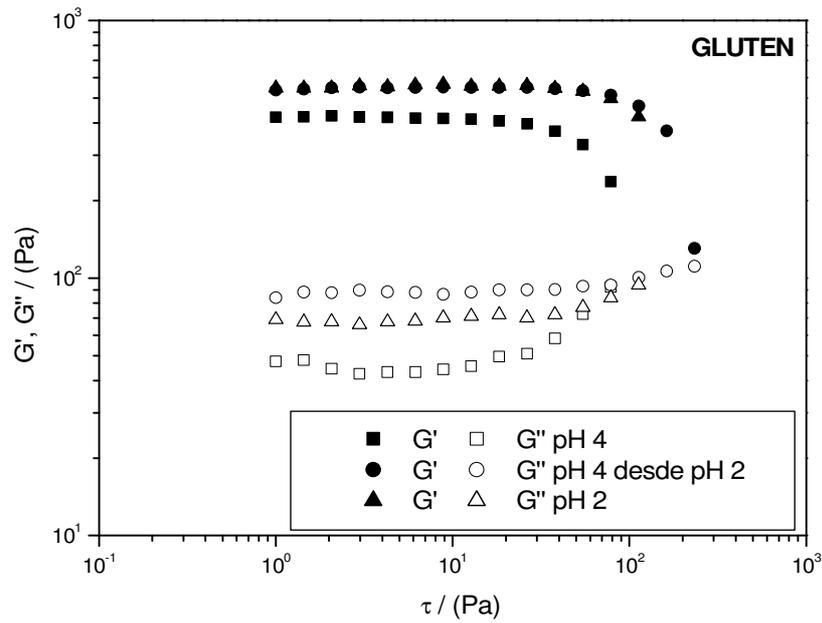


Figura 6.2.2.1. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 2 (●, ○); a pH 2 (▲, △)

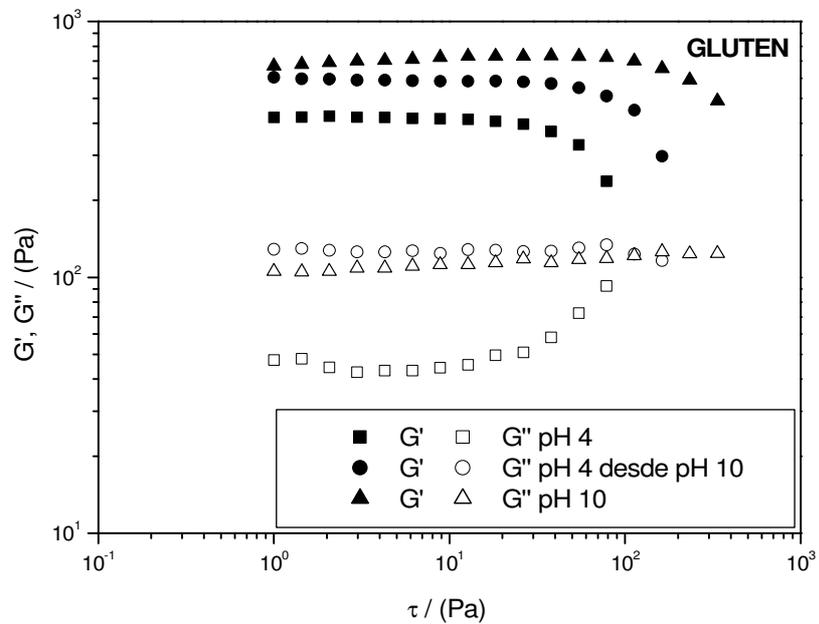


Figura 6.2.2.2. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 10 (●, ○); a pH 10 (▲, △)

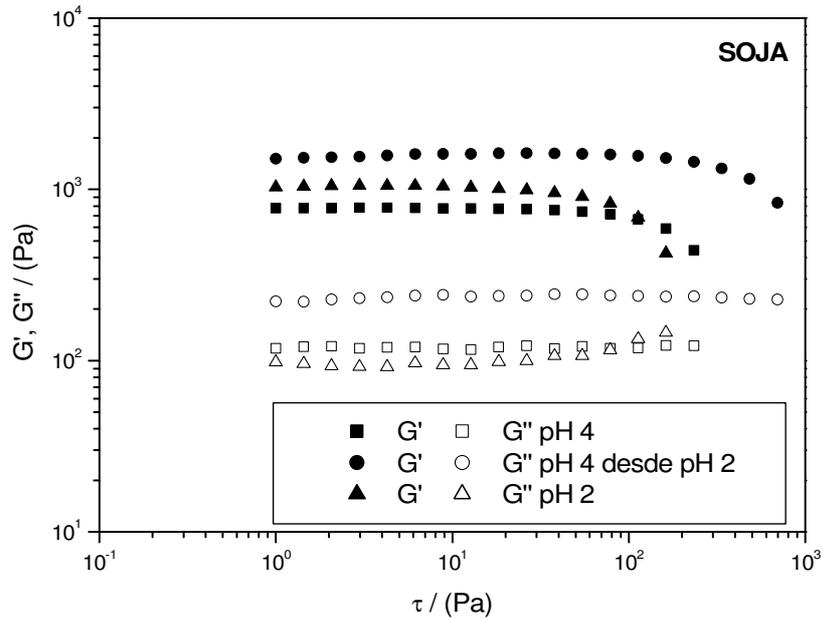


Figura 6.2.2.3. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 2 (●, ○); a pH 2 (▲, △)

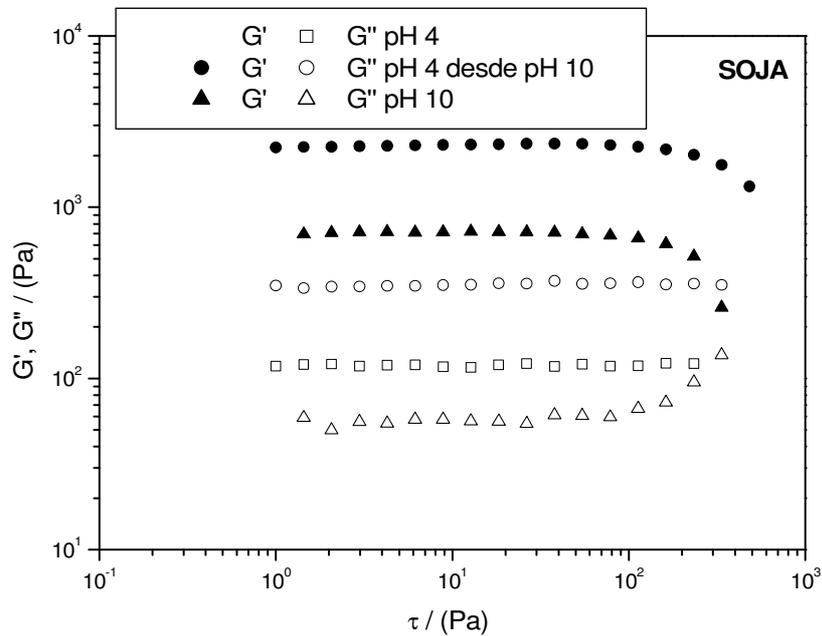


Figura 6.2.2.4. Barridos de esfuerzo a una frecuencia constante (6,28 rad/s) de emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 10 (●, ○); a pH 10 (▲, △)

Los espectros mecánicos para las emulsiones modificadas (figuras 6.2.2.5., 6.2.2.6., 6.2.2.7. y 6.2.2.8.) son bastante similares, independientemente del pH de partida (2 o 10), y presentan propiedades viscoelásticas de mayor magnitud que la emulsión preparada directamente a pH 4, sin modificación posterior. Sin embargo, la influencia de la historia del pH es muy diferente dependiendo del tipo de proteína utilizado. Las emulsiones con gluten experimentan una reducción de la zona plateau cuando se preparan a pH 4 por vía indirecta. Así, la tangente de pérdidas a 1 rad/s aumenta desde 0.05 hasta 0.11 si proviene de pH ácido, o hasta 0.17 si proviene de pH alcalino. En cambio, las emulsiones estabilizadas con proteína de soja sólo experimentan un desplazamiento de los módulos, sin modificación aparente de la zona plateau. No se han encontrado diferencias significativas para los valores de  $\tan\delta$  a 1 rad/s independientemente de la vía utilizada en la preparación de las emulsiones a pH 4.

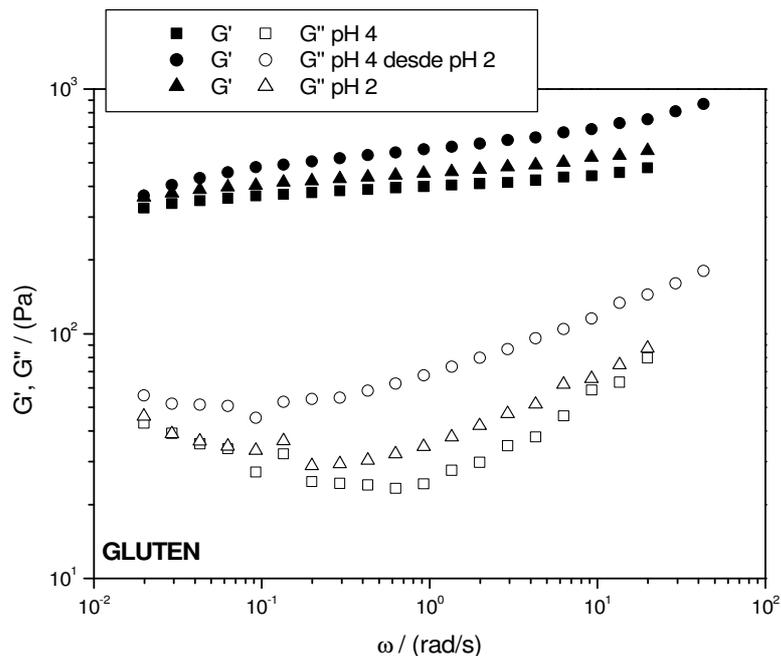


Figura 6.2.2.5. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 2 (●, ○); a pH 2 (▲, △)

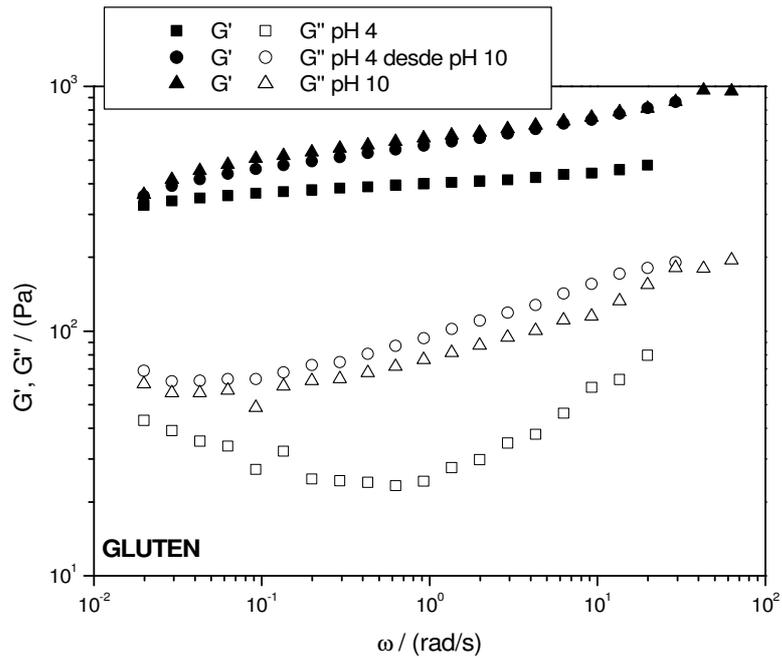


Figura 6.2.2.6. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de gluten, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 10 (●, ○); a pH 10 (▲, △)

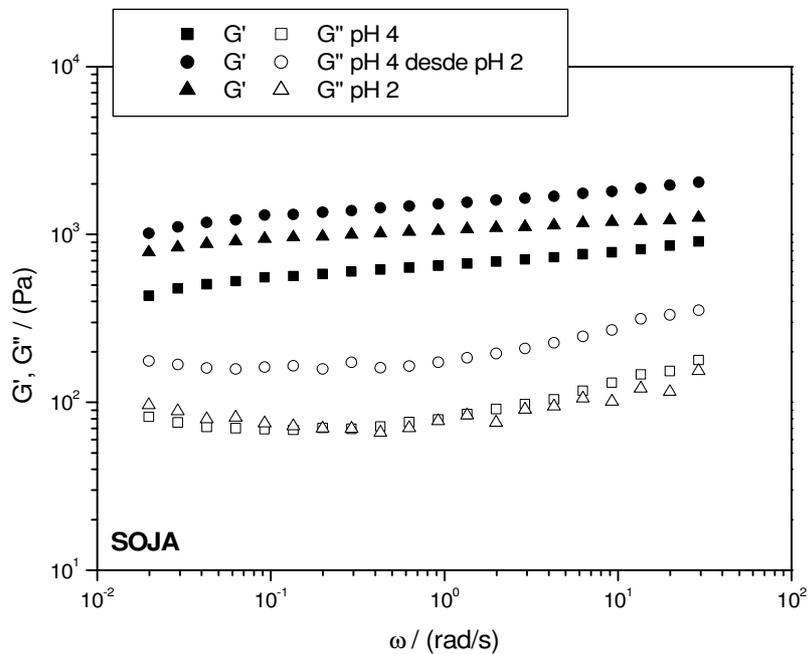


Figura 6.2.2.7. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 2 (●, ○); a pH 2 (▲, △)

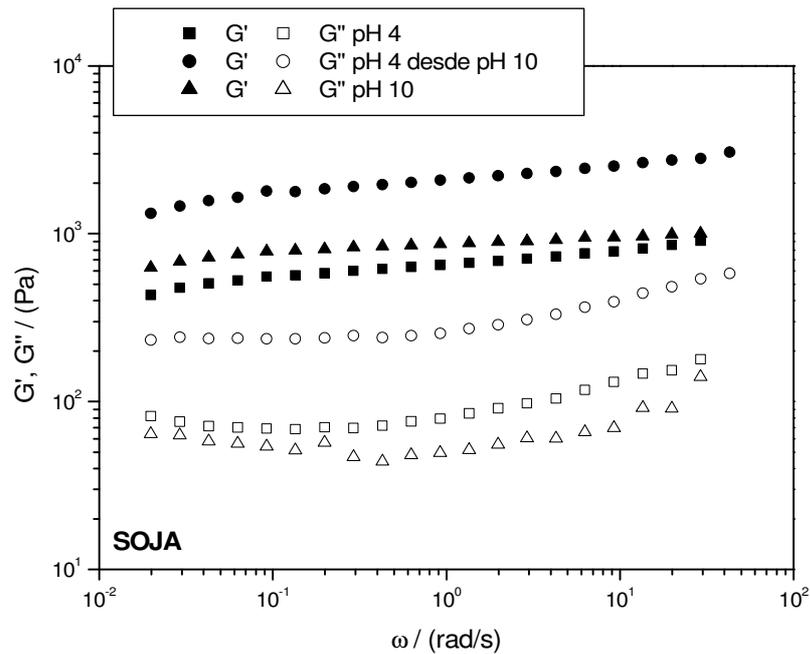


Figura 6.2.2.8. Evolución de las funciones viscoelásticas con la frecuencia para emulsiones que contienen 75% (p/p) de aceite y 1% (p/p) de soja, a pH 4 (■, □); a pH 4 a partir de pH 10 (●, ○); a pH 10 (▲, △)

En las figuras 6.2.2.9., 6.2.2.10., 6.2.2.11. y 6.2.2.12. aparecen las curvas de distribución de tamaño de gota para las emulsiones tras la modificación del pH, en comparación con las emulsiones sin modificar. Las emulsiones de gluten obtenidas a pH 4, ya sea directa o indirectamente, presentan tamaños de gota similares. En cambio, para las de soja, la emulsión de pH 4 obtenida tras la acidificación con HCl de la emulsión a pH 10 es la que da lugar a los menores diámetros de gota, mientras que la emulsión obtenida tras la alcalinización de la emulsión de pH 2 tiene unos diámetros más próximos a los de la emulsión preparada sin modificación de pH. Esto puede estar relacionado con la solubilidad algo mayor de la proteína a pH alcalino.

Por tanto, una vez formada la emulsión, cuando las proteínas ya se han desplegado sobre la superficie de la gota a pH 2 o 10, en los que hay mayor cantidad de proteína soluble en la fase continua, un cambio en el pH de la emulsión no parece provocar un desplazamiento de las proteínas de la interfase, al no desestabilizarse la emulsión y al aumentar sus propiedades viscoelásticas. A pesar de todo, es necesario tomar estos resultados con cierta precaución, puesto que la aplicación de mayor energía mecánica sobre la emulsión debe influir también en cierta medida sobre las propiedades

reológicas de la misma. De hecho, en la emulsión de soja preparada desde pH alcalino se obtiene una reducción importante del tamaño de las gotas durante la homogeneización para modificar el pH (figura 6.2.2.12.).

En la tabla 6.2.2.1. se recogen los parámetros más importantes para estas emulsiones.

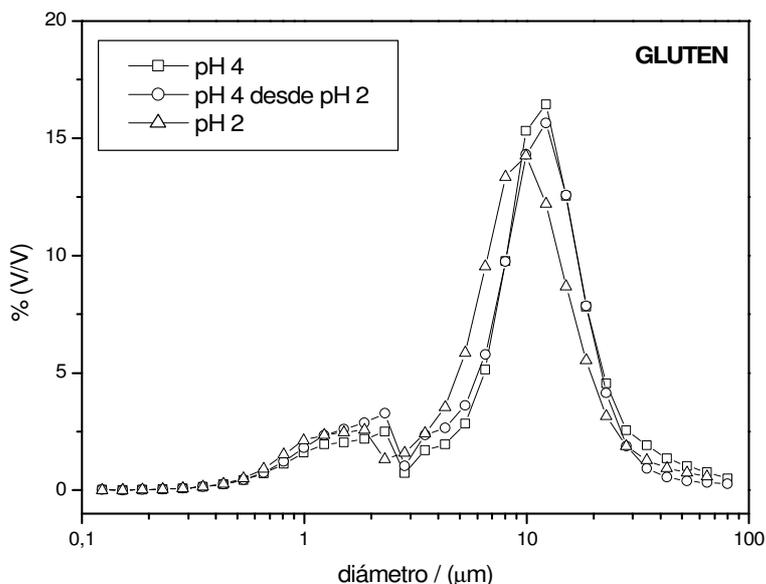


Figura 6.2.2.9. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten a pH 4 (□); a pH 4 a partir de pH 2 (○); a pH 2 (Δ)

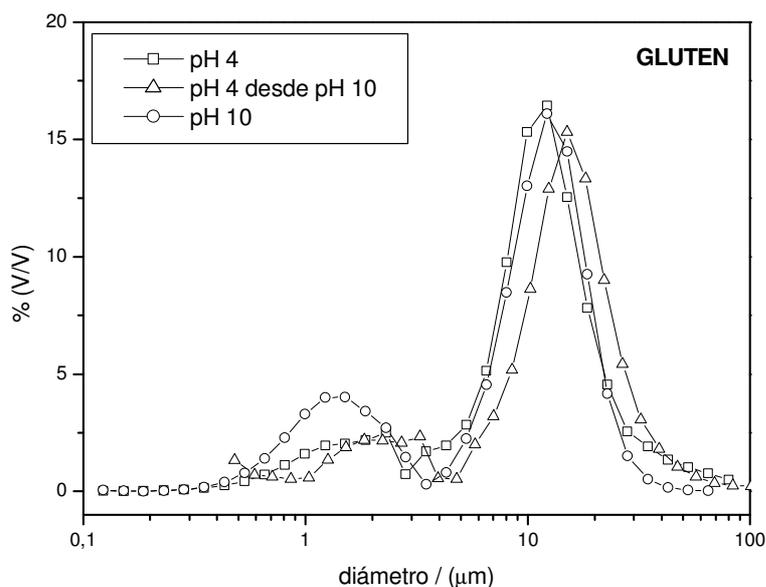


Figura 6.2.2.10. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de gluten a pH 4 (□); a pH 4 a partir de pH 10 (○); a pH 10 (Δ)

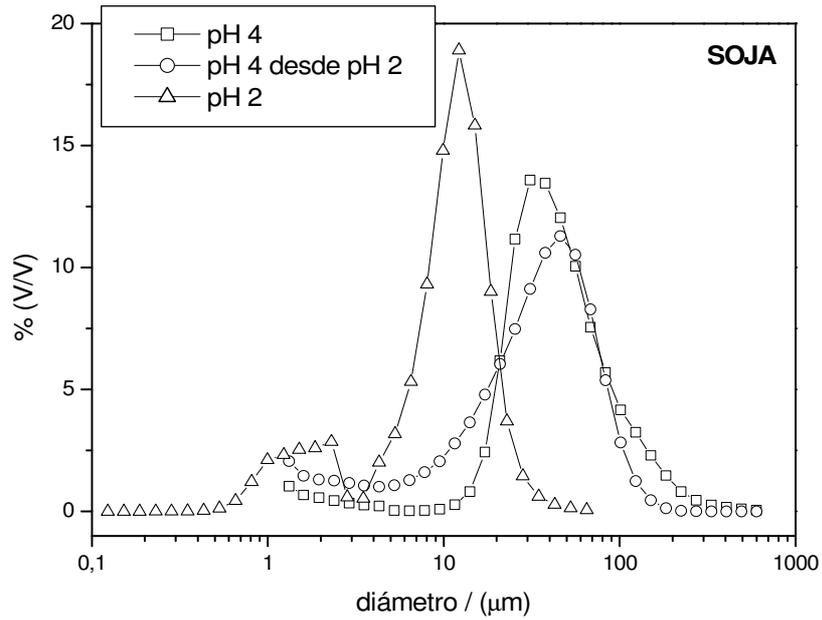


Figura 6.2.2.11. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de soja a pH 4 ( $\square$ ); a pH 4 a partir de pH 2 ( $\circ$ ); a pH 2 ( $\Delta$ )

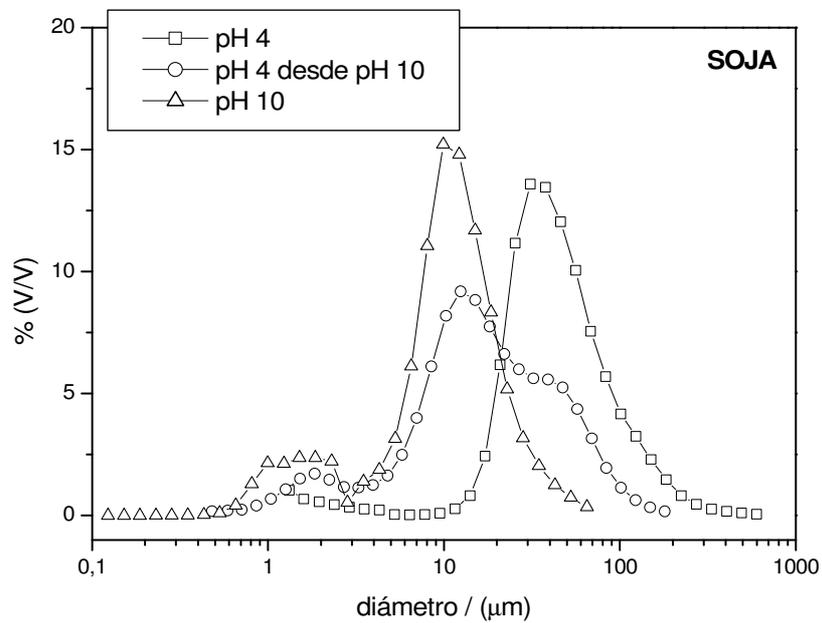


Figura 6.2.2.12. Curvas de distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con 1% (p/p) de soja a pH 4 ( $\square$ ); a pH 4 a partir de pH 10 ( $\circ$ ); a pH 10 ( $\Delta$ )

	pH	D <sub>32</sub> (μm)	D <sub>43</sub> (μm)	U	τ <sub>c</sub> (Pa)	γ <sub>c</sub>	G <sub>N</sub> <sup>0</sup> (Pa)
	4	4,44	11,64	0,623	26,4	0,066	394,85
<b>Gluten</b>	4 desde 2	4,00	10,06	0,570	78,5	0,151	479,5
	4 desde 10	4,83	14,60	0,565	78,5	0,149	392,2
	4	18,9	49,8	0,730	78,5	0,108	556,25
<b>Soja</b>	4 desde 2	10,32	35,12	0,628	233,6	0,160	1307
	4 desde 10	7,24	22,32	0,988	162,4	0,074	1794

Tabla 6.2.2.1.

### 6.3. Conclusiones

1. Es posible producir un reforzamiento del entramado estructural formado entre las moléculas de proteína que estabilizan la interfase mediante tratamiento térmico. Este efecto puede explicarse en base a una serie de fenómenos que pueden participar en mayor o menor medida durante el procesado térmico:
  - a. Aumento de la hidrofobicidad superficial que puede ir acompañado de aumento del contenido de sulfhidrilos libres expuestos al medio y de fenómenos de desnaturalización.
  - b. Agregación irreversible entre moléculas de proteínas que puede ir acompañada de entrecruzamientos (por ejemplo, formación de puentes disulfuro).
  - c. Formación de puentes de hidrógeno durante la etapa de enfriamiento.
  
2. Dicho reforzamiento estructural depende de:
  - a. La historia térmica. Así, los mejores resultados se consiguen cuando el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es más prolongado.
  - b. El tipo de proteína, siendo más pronunciado para las emulsiones estabilizadas con soja. El aumento de la hidrofobicidad superficial suele ser más importante en proteínas globulares.
  - c. El pH, que a su vez depende del tipo de proteína.

3. Se ha desarrollado un procedimiento para obtener emulsiones estables en un amplio intervalo de valores de pH incluyendo las proximidades del punto isoeléctrico. Este proceso incluye tres etapas:
  - a. Emulsificación a valores de pH alejado del pI
  - b. Etapa de maduración necesaria para la estabilización de la interfase y desarrollo de la microestructura de la emulsión
  - c. Modificación del pH y homogeneización. La etapa de mezclado debe ser moderada para evitar fenómenos de coalescencia inducida por cizalla

**CAPÍTULO 7.**  
**MODELO**  
**DE**  
**VISCOELASTICIDAD**

## CAPÍTULO 7. MODELO DE VISCOELASTICIDAD

### 7.1. Introducción

En este último capítulo, se intenta evaluar la capacidad de alguno de los modelos reológicos más utilizados en sistemas dispersos para describir el comportamiento viscoelástico lineal de emulsiones estabilizadas con proteínas de gluten, soja o algarroba, su relación con parámetros que describen su microestructura, o su comportamiento viscoelástico no lineal.

El modelo o modelos propuestos deben satisfacer la relación entre las propiedades reológicas y la microestructura de la emulsión. En este caso, se estudiará la utilidad del modelo de Mason para correlacionar parámetros viscoelásticos y microestructurales (Mason y col., 1997).

Además, el modelo reológico propuesto debe reproducir las propiedades viscoelásticas lineales (módulos de almacenamiento y pérdidas, módulo de relajación lineal), y las propiedades viscoelásticas no lineales (módulo de relajación no lineal, viscosidad en flujo transitorio o estacionario). Para ello se propone el uso del modelo de Wagner que factoriza el módulo de relajación no lineal separándolo en dos funciones: el módulo de relajación lineal y la función de amortiguación. La primera función será descrita a través del modelo de Maxwell generalizado, y la segunda a través del modelo empírico de Soskey-Winter.

### 7.2. Resultados y Discusión

#### 7.2.1. Relación entre reología y parámetros estructurales

Es posible encontrar en la bibliografía diferentes intentos de correlacionar la reología con los parámetros microestructurales de las muestras. Princen (1983) realizó un estudio basado en un modelo de estructura tipo espuma, válido para espumas monodispersas y emulsiones altamente concentradas, encontrando una expresión que relacionaba el módulo de almacenamiento de cizalla,  $G'$ , con la tensión interfacial,  $\sigma$ , la fracción en volumen de fase dispersa,  $\phi$ , y un tamaño característico de la celda unidad, representado por el diámetro medio superficial de las esferas no distorsionadas,  $d_{32}$ .

Princen y Kiss (1986) extendieron este tratamiento obteniendo experimentalmente una ecuación para el módulo elástico de cizalla a bajas deformaciones en emulsiones polidispersas reales:

$$G' = a \cdot \frac{\sigma}{d_{32}} \cdot \phi^{1/3} (\phi - b) \quad (7.2.1.1.)$$

donde  $a$  y  $b$  son constantes adimensionales, aunque sus valores pueden depender ligeramente del espesor de la película acuosa localizada entre las gotas de aceite y de la distribución de tamaños de gota. Se piensa que la constante  $b$  está relacionada con la fracción en volumen del máximo empaquetamiento de las gotas sin distorsionar. Algunos autores han utilizado esta ecuación para correlacionar parámetros estructurales y reológicos de emulsiones estabilizadas con tensioactivos (Princen y Kiss, 1986; Pons y col., 1995; Sánchez y col., 1998) o con tensioactivos poliméricos (Perrin, 2000).

Recientemente, Mason y col. (1997) trabajando con emulsiones concentradas monodispersas estabilizadas con SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), han obtenido una curva maestra para la evolución del módulo elástico,  $G'$ , que obedece la siguiente relación:

$$G' \propto \frac{2\sigma}{d_{32}} \cdot \phi (\phi - \phi_0) \quad (7.2.1.2.)$$

donde  $\phi_0$  es la fracción en volumen del máximo empaquetamiento de esferas monodispersas. Por tanto, la elasticidad está gobernada por la presión de Laplace de las gotas,  $2\sigma/d_{32}$ , en concordancia con el modelo de Princen. Algunos autores han intentado utilizar el mismo procedimiento de Mason y col. para emulsiones estabilizadas por proteínas (Dimitrova y Leal-Calderon, 2001, 2004; Bressy y col., 2003). Sin embargo, el módulo elástico puede ser bastante mayor que el que predice la ecuación de Mason. Por tanto, un factor adicional de elasticidad debería considerarse. En el caso de las emulsiones estabilizadas por proteínas globulares este factor ha sido atribuido al cambio en la conformación de las proteínas cuando se adsorben en la interfase, conduciendo a la formación de una red elástica en la superficie de las gotas (Dickinson, 2001).

Una comparación entre las propiedades viscoelásticas lineales y los parámetros estructurales, como la distribución de tamaños de gota, de emulsiones estabilizadas por gluten o por aislado proteico de soja, permite asumir que una relación cuantitativa puede ser establecida.

En este estudio se ha utilizado un procedimiento diferente para correlacionar los resultados experimentales con la ecuación de Mason, representando el módulo plateau,  $G_N^0$ , para las emulsiones estabilizadas por gluten y soja, en función de una combinación de parámetros estructurales, cuya ecuación es la siguiente:

$$G_N^0 = \frac{k}{d_{32}} \phi(\phi - \phi_0) \quad (7.2.1.3.)$$

donde  $k$  es proporcional a la tensión interfacial.

Esta representación aparece en la figura 7.2.1.1.. Como puede observarse en esta figura, los resultados experimentales concuerdan con la evolución predicha por la ecuación de Mason, aunque existen algunas desviaciones para las emulsiones que tienen gluten como agente emulsionante. Los valores obtenidos por las emulsiones de soja son bastante más altos que los obtenidos por las emulsiones de gluten. Este efecto puede ser atribuido a la diferencia en los valores de la tensión interfacial. Sin embargo, las emulsiones con mayor contenido en gluten presentan una clara desviación de la tendencia que predice el modelo de Mason, mostrando propiedades elásticas mucho más elevadas que las esperadas. En estos casos, el módulo plateau alcanza incluso valores más altos que las emulsiones estabilizadas con una misma concentración del aislado proteico de soja. Este efecto es coincidente con la evolución de las propiedades viscoelásticas (figura 5.2.2.5.) y de la microestructura (figura 5.2.2.9.) en las emulsiones de gluten. La mayor elasticidad de las emulsiones más concentradas puede atribuirse al desarrollo de una red elástica que se extiende a las capas de fase acuosa y forma un entramado de gluten en el que la fase oleosa se encuentra suspendida.

Estas desviaciones encontradas en las emulsiones de gluten para concentraciones de proteína iguales o superiores al 2% pueden entenderse mejor mediante las fotografías obtenidas por microscopía confocal (figura 5.2.2.13.).

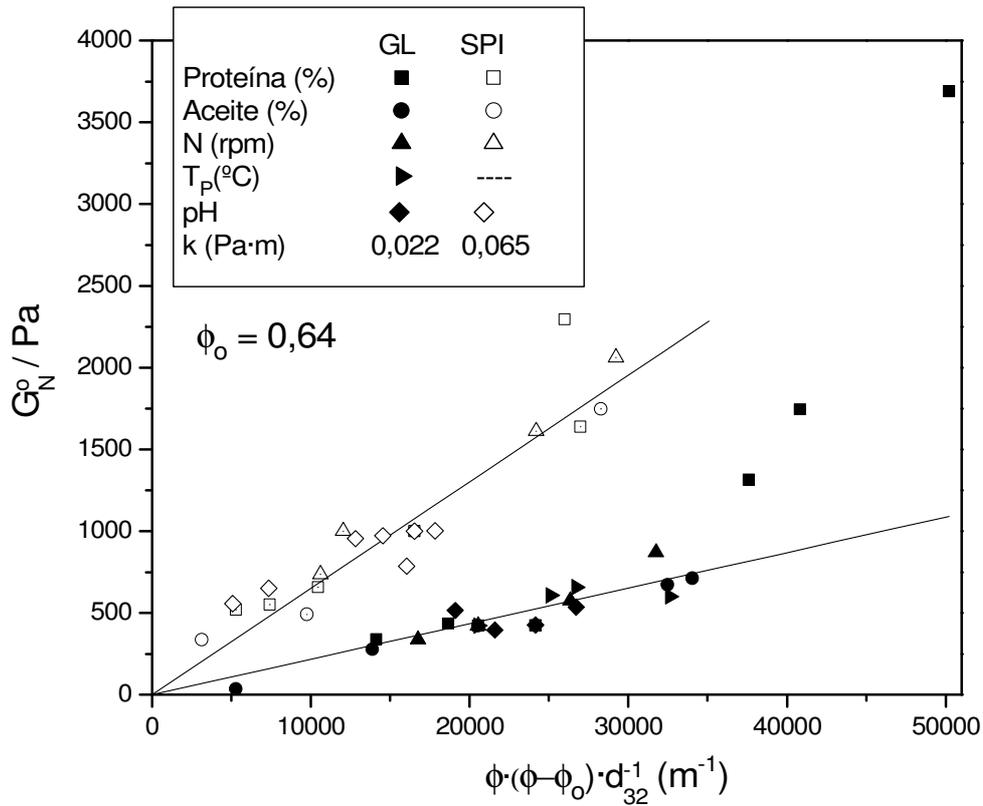


Figura 7.2.1.1. Ajuste al modelo de Mason para emulsiones estabilizadas con soja (símbolos huecos) y con gluten (símbolos llenos)

### 7.2.2. Viscoelasticidad Lineal

El comportamiento viscoelástico lineal de un material puede describirse mediante la ecuación de Lodge, introducida en el apartado 1.8.5.3.1. de los antecedentes bibliográficos:

$$[\sigma] = \int_{-\infty}^t m(t-t') [C^{-1}](t') dt' \quad (7.2.2.1)$$

En un fluido viscoelástico, la función memoria  $m(t-t')$  puede representarse mediante el modelo de Maxwell generalizado, que considera la superposición de una serie de  $n$  procesos de relajación independientes, cada proceso mostrará un tiempo de relajación,  $\lambda_k$ , y un coeficiente de relajación,  $G_k$ .

El módulo de relajación lineal puede expresarse mediante el modelo generalizado de Maxwell según la siguiente expresión:

$$G(t-t') = G_e + \sum_{k=1}^n G_k \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda_k}\right) \quad (7.2.2.2.)$$

donde  $G_e$  será igual a cero para un fluido viscoelástico.

Por tanto, la función memoria vendrá expresada por:

$$m(t-t') = -\frac{dG(t-t')}{dt'} \quad (7.2.2.3.)$$

$$m(t-t') = \sum_{k=1}^n \frac{G_k}{\lambda_k} \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda_k}\right) \quad (7.2.2.4.)$$

La ecuación constitutiva de la viscoelasticidad lineal resultante será:

$$[\sigma] = \int_{-\infty}^t \left[ \sum_{k=1}^n \frac{G_k}{\lambda_k} \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda_k}\right) \right] [C^{-1}](t') dt' \quad (7.2.2.5.)$$

Las funciones viscoelásticas lineales del material, como el módulo de almacenamiento  $G'$  y el de pérdidas  $G''$  pueden obtenerse a partir de esta ecuación constitutiva, mediante las siguientes expresiones (Bird y col., 1987; Ferry, 1980):

$$G'(\omega) = G_e + \sum_{k=1}^n G_k \frac{\omega^2 \lambda_k^2}{1 + \omega^2 \lambda_k^2} \quad (7.2.2.6.)$$

$$G''(\omega) = \sum_{k=1}^n G_k \frac{\omega \lambda_k}{1 + \omega^2 \lambda_k^2} \quad (7.2.2.7.)$$

Estas ecuaciones pueden utilizarse para calcular el espectro discreto de relajación. Uno de los métodos de cálculo del espectro de relajación más utilizado consiste en la minimización de la diferencia de cuadrados de las desviaciones entre los datos experimentales y los calculados por el modelo. Para ello debe seleccionarse un conjunto de  $N$  tiempos de relajación,  $\lambda_k$ , de forma que se cumplan las siguientes especificaciones:

$$\lambda_{\max} \cdot \omega_{\min} > 1 \quad (7.2.2.8.)$$

$$\lambda_{\min} \cdot \omega_{\max} < 1 \quad (7.2.2.9.)$$

donde  $\omega_{\min}$  y  $\omega_{\max}$  son los valores mínimo y máximo experimentales de frecuencia. Los correspondientes valores de  $G_k$  se obtienen minimizando la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los valores experimentales y los calculados de ambos módulos,

simultáneamente. Si los valores experimentales se designan por  $G'_j$  y  $G''_j$  y los valores calculados a partir de las ecuaciones 7.2.2.6. y 7.2.2.7. por  $G'(\omega_j)$  y  $G''(\omega_j)$ , la cantidad a minimizar para  $N$  frecuencias es la siguiente (Bird y col., 1987):

$$\sum_{j=1}^N \left[ \left( \frac{G'(\omega_j)}{G'_j} - 1 \right)^2 + \left( \frac{G''(\omega_j)}{G''_j} - 1 \right)^2 \right] \quad (7.2.2.10.)$$

La mayor dificultad en el cálculo del espectro radica en que el conjunto de tiempos de relajación compatibles con los datos no es único, ya que es elegido arbitrariamente. Por el contrario, existe un conjunto de soluciones entre las cuales debe elegirse la solución adecuada. Se ha optado por seguir un procedimiento iterativo que consiste en formar un número  $Q$  de conjuntos de  $N$  tiempos de relajación con los que se obtienen  $Q$  espectros, a partir de los cuales se obtiene un espectro promedio ponderado en función del grado de ajuste. El número  $n$  de pares de valores  $(G_j, \lambda_j)$  se obtiene del producto de  $Q$  por  $N$ . Para valores bajos de  $N$  se obtiene un espectro excesivamente suavizado. Sin embargo, si  $N$  es alto pueden aparecer valores negativos para los modos de relajación. Tampoco resulta aconsejable utilizar altos valores de  $Q$  que prolongan el tiempo de cálculo (Partal y col., 1999a).

En la figuras 7.2.2.1., 7.2.2.2. y 7.2.2.3. se observan los valores de  $G_k$  y  $\lambda_k$  para emulsiones al 75% de aceite y estabilizadas con 1% de gluten, soja y algarroba, respectivamente. Puede observarse además que el ajuste al modelo de Maxwell es muy bueno en el caso de las emulsiones estabilizadas con gluten o soja y aceptable para las emulsiones estabilizadas con algarroba. Los mayores tiempos de relajación tienen una influencia predominante en la zona de baja frecuencia, en tanto que las frecuencias superiores vienen controladas por los tiempos de relajación cortos.

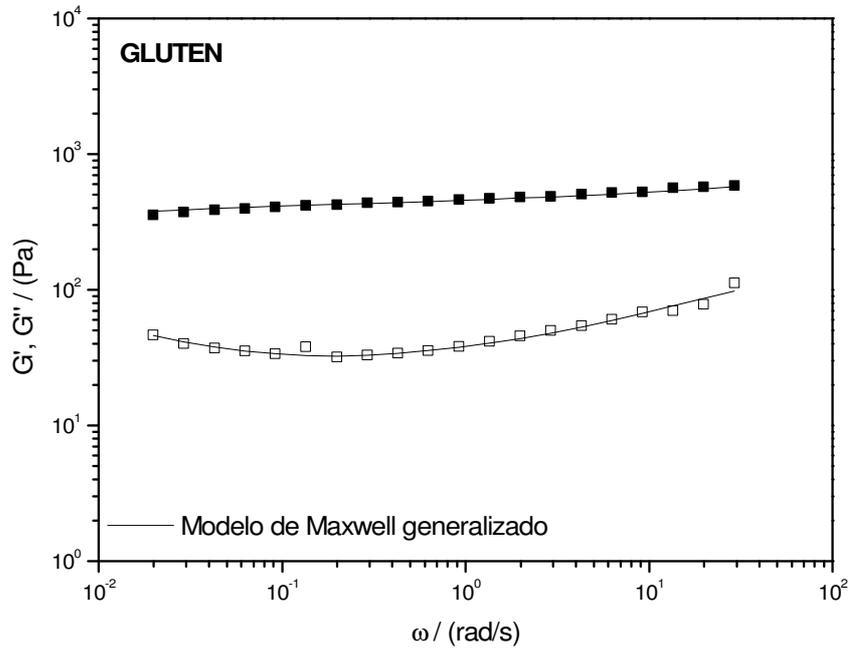


Figura 7.2.2.1. Variación de los módulos de almacenamiento y pérdidas con la frecuencia en una emulsión que contiene un 1% de gluten de trigo y 75% de O, procesada a 6000 r.p.m. a 20°C

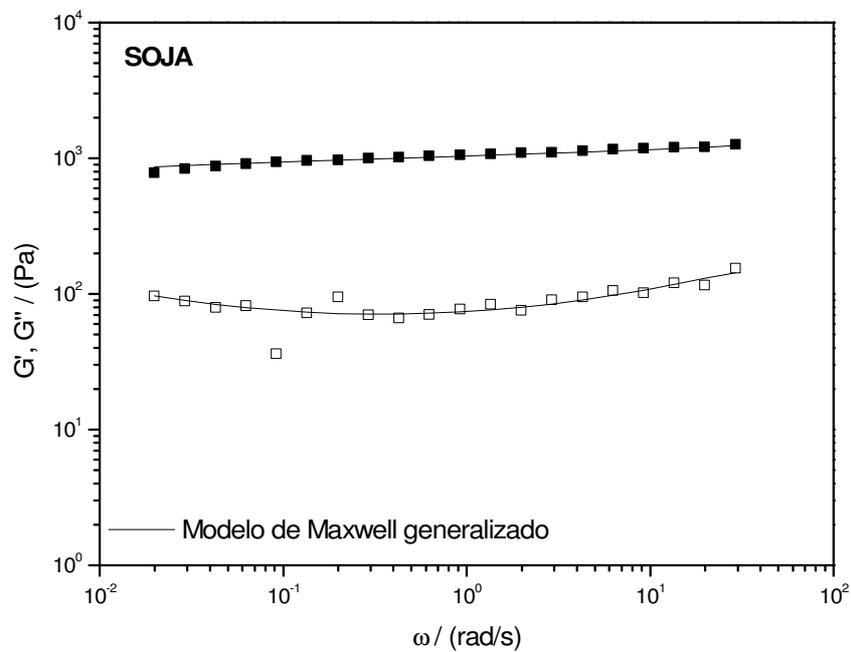


Figura 7.2.2.2. Variación de los módulos de almacenamiento y pérdidas con la frecuencia en una emulsión que contiene un 1% de soja y 75% de O, procesada a 6000 r.p.m. a 20°C

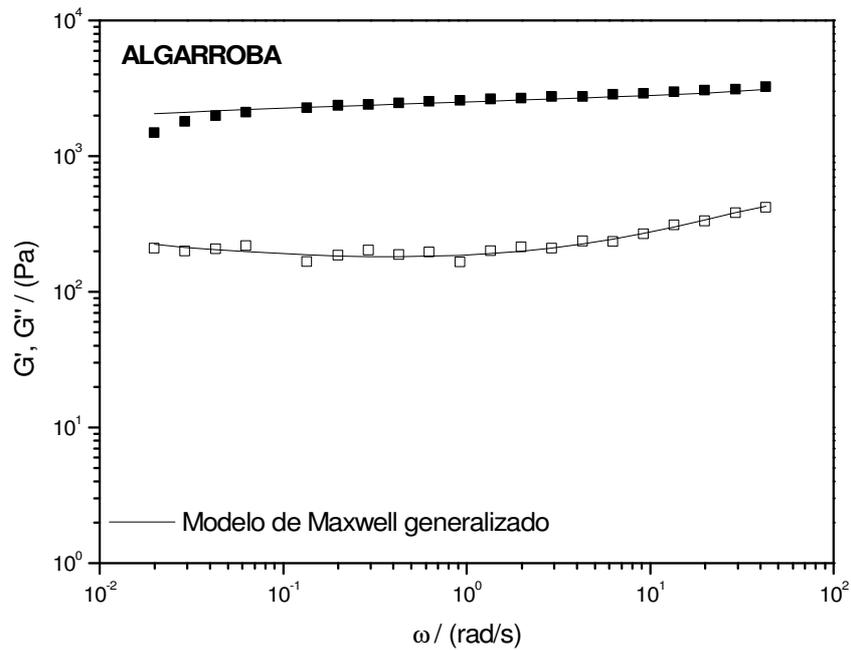


Figura 7.2.2.3. Variación de los módulos de almacenamiento y pérdidas con la frecuencia en una emulsión que contiene un 1% de algarroba y 75% de O, procesada a 6000 r.p.m. a 20°C

Los valores de los espectros discretos obtenidos a partir del método iterativo de minimización de la ecuación 7.2.2.10. descrito anteriormente para emulsiones estabilizadas con un 1% de proteína de gluten, soja o algarroba, se representan en la figura 7.2.2.4.

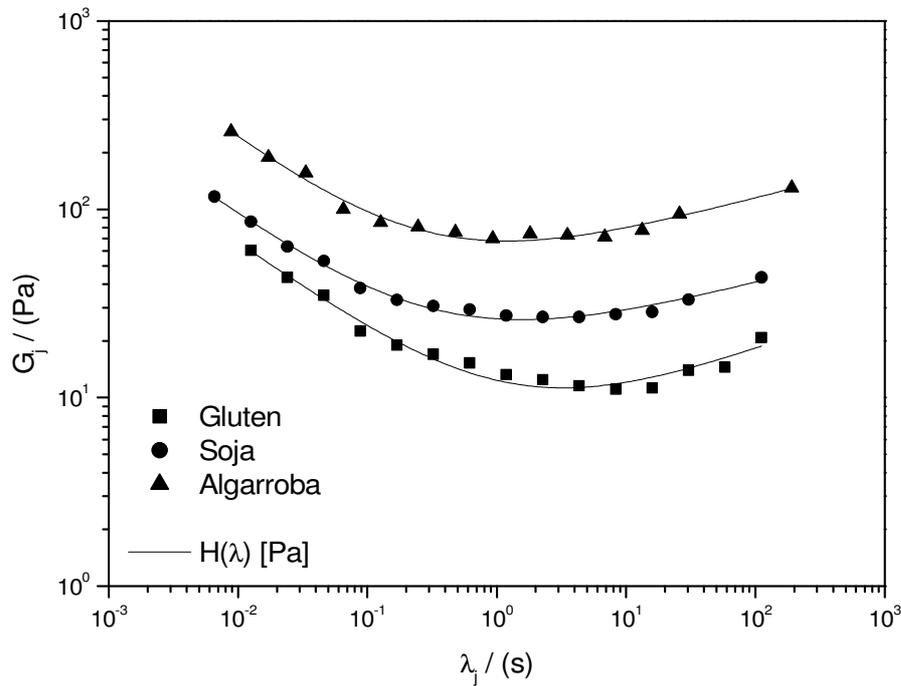


Figura 7.2.2.4. Espectros de relajación continuos para emulsiones que contienen un 1% de proteína y 75% de O, procesadas a 6000 r.p.m. a 20°C

Los espectros discretos resultantes se encuentran en la zona de transición y plateau, lejos de la zona terminal. Pueden ajustarse por tanto al modelo empírico propuesto por Baumgaertel, Shausberger y Winter (1990), denominado modelo BSW:

$$H(\lambda) = nG_N^0 \left[ \left( \frac{\lambda}{\lambda_c} \right)^{-m} + \left( \frac{\lambda}{\lambda_p} \right)^n \right] \quad (7.2.2.11.)$$

donde  $\lambda_c$  y  $\lambda_p$  son los tiempos de relajación característicos correspondientes al comienzo de las zonas plateau y terminal, respectivamente, del espectro de relajación lineal, los exponentes  $m$  y  $n$  corresponden a las pendientes de la zona de transición y plateau, respectivamente.

Como puede observarse, el modelo establece una proporcionalidad directa entre el valor del espectro y el modulo plateau, que a su vez depende de la tensión interfacial, de la fracción en volumen de fase dispersa y del diámetro medio de las gotas de fase dispersa, tal y como se ha establecido tras el ajuste al modelo de Mason (ecuación 7.2.1.3.). El modelo BSW ha sido utilizado con anterioridad para reproducir propiedades viscoelásticas lineales de emulsiones aceite/agua del tipo salsas finas

estabilizadas con mezclas de yema de huevo y un tensioactivo no iónico (Franco y col., 1995).

Los parámetros del modelo BSW se presentan en la tabla 7.2.2.1.

	$G_N^0$ (Pa)	$\lambda_c$ (s)	$m$	$\lambda_p$ (s)	$n$
<b>Gluten</b>	425	0,0036	0,49	128574	0,25
<b>Soja</b>	999	0,0025	0,51	431163	0,18
<b>Algarroba</b>	2584	0,0024	0,53	244177	0,18

Tabla 7.2.2.1.

Puede deducirse de los valores de estos parámetros que los resultados experimentales corresponden claramente a la zona plateau del espectro de relajación. Así, el valor de  $\lambda_c$  es claramente inferior al tiempo de relajación mínimo experimental, en tanto que  $\lambda_p$  es muy superior a los valores del tiempo de relajación obtenido en el espectro discreto, lo cual refleja el hecho de que el comportamiento viscoelástico de estas emulsiones se encuentra bastante alejado de la zona terminal.

No se aprecian diferencias significativas en la pendiente de la zona de transición para las emulsiones estabilizadas con las tres proteínas estudiadas. Sin embargo, la pendiente de la zona plateau tiende a disminuir para las emulsiones que presentan mayor valor del módulo plateau y mayor tiempo de relajación terminal. Por tanto, la emulsión estabilizada con gluten es la que presenta una zona plateau más reducida, que es la que dispone de la menor cantidad de moléculas de proteína para la estabilización de la fase dispersa.

### 7.2.3. Ensayos de relajación

Se ha estudiado el comportamiento viscoelástico no lineal de emulsiones estabilizadas con gluten, soja o algarroba, mediante ensayos de relajación del esfuerzo y ensayos de crecimiento del esfuerzo en flujo transitorio. Se han realizado ensayos de relajación del esfuerzo aplicando distintas deformaciones de cizalla, a partir de los cuales puede obtenerse la influencia de la deformación sobre el módulo de relajación  $G(\gamma, t)$ . Si la deformación aplicada es suficientemente pequeña se obtiene el módulo de relajación lineal  $G(t)$ .

En las figuras 7.2.3.1., 7.2.3.2. y 7.2.3.3. se representa la evolución con el tiempo de los módulos de relajación lineal,  $G(t)$ , y no lineal,  $G(\gamma, t)$ , obtenida experimentalmente para las tres emulsiones estudiadas. Puede observarse que el módulo de relajación no lineal presenta aproximadamente la misma evolución independientemente de la deformación aplicada. Además, a partir de cierto valor de tiempo de relajación, dicha evolución es similar a la que experimenta el módulo de relajación lineal. En estas condiciones es posible la factorización del módulo de relajación en dos componentes: uno dependiente exclusivamente del tiempo, el módulo de relajación lineal,  $G(t)$ , y otro dependiente de la deformación de cizalla aplicada,  $h(\gamma)$ , conocido como “función amortiguación” o “función damping”, que se relaciona con los efectos no lineales (ecuación 7.2.3.1.).

$$G(\gamma, t) = G(t) \cdot h(\gamma) \quad (7.2.3.1.)$$

Este comportamiento puede encontrarse con relativa frecuencia en la bibliografía de polímeros (Isono y col., 1991; Takahashi y col., 1993). También se han encontrado resultados similares en emulsiones concentradas aceite/agua (Figoni y Shoemaker, 1983; Campanella y Peleg, 1987; Gallegos y col., 1992b; Partal y col., 1999b).

#### *Módulo de relajación lineal*

A partir del espectro discreto de relajación presentado en la figura 7.2.2.4. es posible calcular el módulo de relajación lineal mediante la ecuación correspondiente al módulo de Maxwell generalizado:

$$G(t-t') = G_r + \sum_{k=1}^n G_k \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda_k}\right) \quad (7.2.3.2.)$$

A su vez, la función memoria puede obtenerse a partir del módulo de relajación lineal de la siguiente forma:

$$m(t-t') = -\frac{dG(t-t')}{dt'} \quad (7.2.3.3.)$$

$$m(t-t') = \sum_{k=1}^n \frac{G_k}{\lambda_k} \exp\left(-\frac{t-t'}{\lambda_k}\right) \quad (7.2.3.4.)$$

En las figuras 7.2.3.1.-7.2.3.3. se incluyen además los valores del módulo de relajación lineal obtenidos mediante la ecuación 7.2.2.10. a partir de los datos del espectro discreto que a su vez proceden de los resultados obtenidos en ensayos viscoelásticos dinámicos.

Como puede observarse, existe una buena concordancia entre los valores experimentales y los calculados a partir del módulo viscoelástico lineal. Debe tenerse en cuenta que estos valores proceden de un modelo de Maxwell generalizado efectuado sobre resultados experimentales que corresponden a distintos lotes, distintos ensayos y realizados con distintos reómetros.

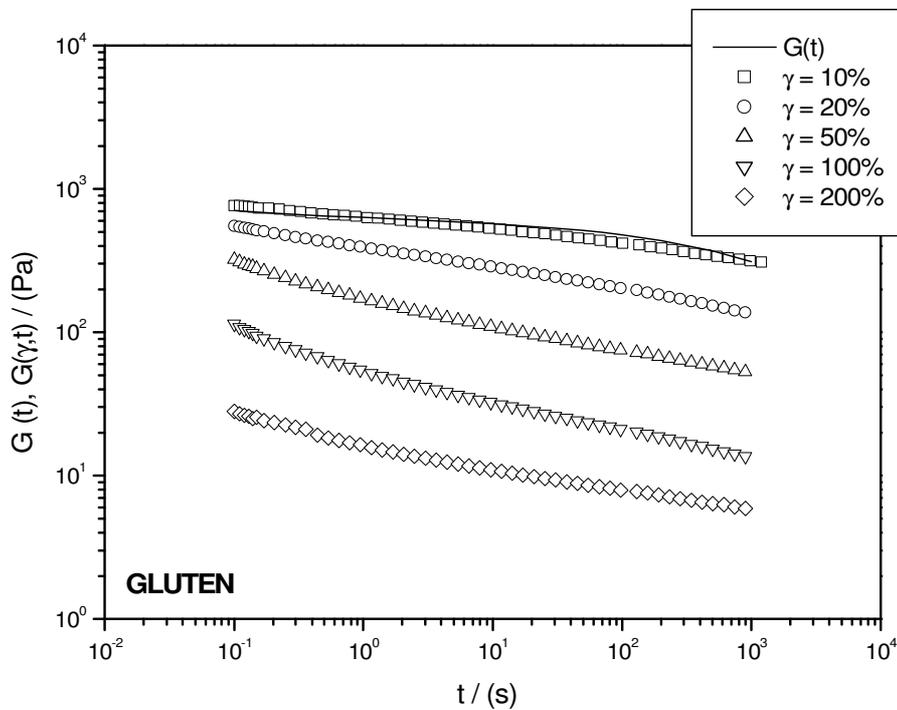


Figura 7.2.3.1. Evolución con el tiempo del módulo de relajación lineal y de los módulos de relajación no lineales, de emulsiones con 75% de aceite y 1% de gluten

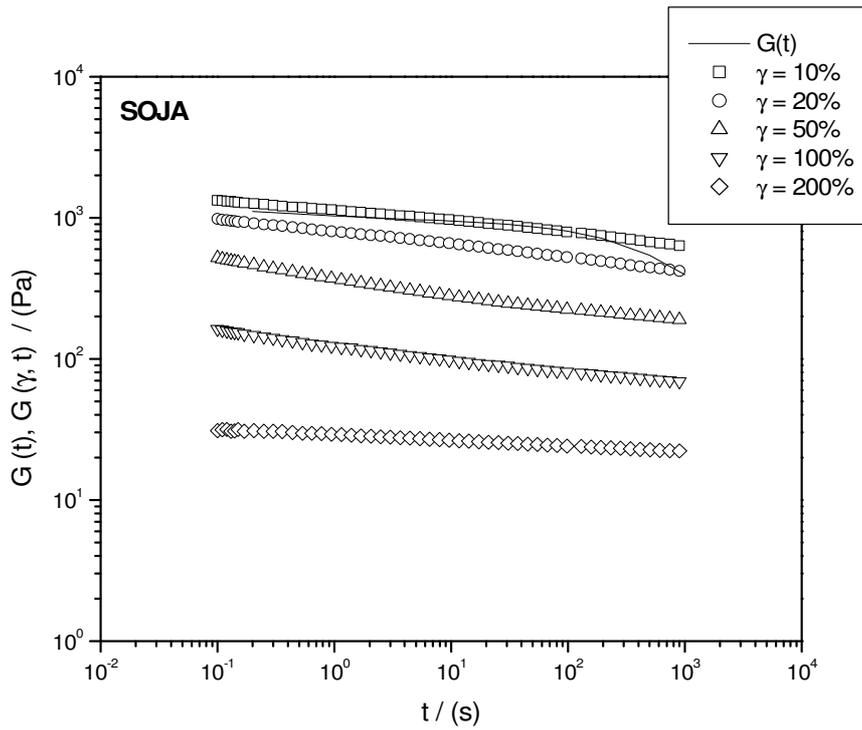


Figura 7.2.3.2. Evolución con el tiempo del módulo de relajación lineal y de los módulos de relajación no lineales, de emulsiones con 75% de aceite y 1% de soja

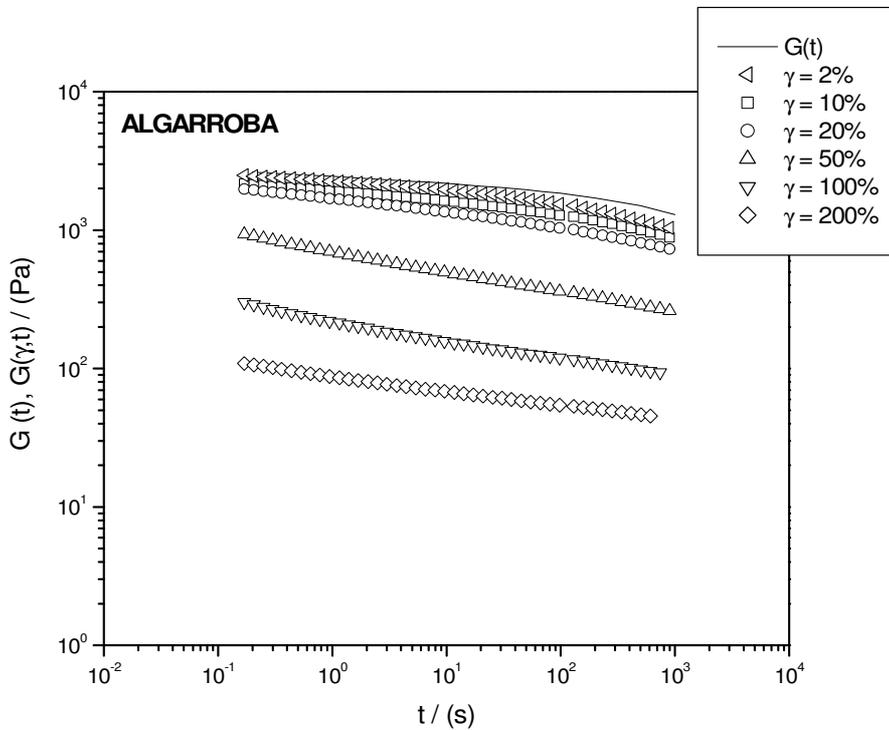


Figura 7.2.3.3. Evolución con el tiempo del módulo de relajación lineal y de los módulos de relajación no lineales, de emulsiones con 75% de aceite y 1% de algarroba

*Función de amortiguación*

Los resultados anteriores pueden utilizarse para calcular la función amortiguación a tiempos de relajación elevados mediante la ecuación 7.2.3.1.:

$$h(\gamma) = \frac{G(\gamma, t)}{G(t)} \quad (7.2.3.5.)$$

Esta función permite describir el grado de no linealidad de las muestras. Existen diversos modelos matemáticos que representan la evolución de la función de amortiguación con la deformación, como el modelo de Wagner (Wagner, 1976), el modelo de Papanastasiou (Papanastasiou y col., 1983) o el modelo de Soskey-Winter (Soskey y Winter, 1984), que utilizan las ecuaciones 7.2.3.6., 7.2.3.7. y 7.2.3.8., respectivamente.

$$h(\gamma) = \exp(-\kappa\gamma) \quad (7.2.3.6.)$$

$$h(\gamma) = \frac{\alpha}{\alpha + \gamma^2} \quad (7.2.3.7.)$$

$$h(\gamma) = \frac{1}{1 + a\gamma^b} \quad (7.2.3.8.)$$

Los valores de los parámetros de los tres modelos para las emulsiones de gluten, soja y algarroba se recogen en la tabla 7.2.3.1. Como puede comprobarse, las emulsiones de gluten son las que presentan valores mayores para los parámetros de amortiguación de Soskey-Winter (a) y de Wagner ( $\kappa$ ). Esto concordaría con la idea de que menores valores de estos parámetros están relacionados con sistemas con mayores propiedades viscoelásticas (Gallegos y col., 2002).

	Gluten	Soja	Algarroba
$\kappa$	2,47	1,8	2,30
$\alpha$	0,064	0,13	0,080
a	14	12,09	8,3
b	1,88	1,76	1,70

Tabla 7.2.3.1.

En la figura 7.2.3.4 se presentan los ajustes de la función de amortiguación a cada uno de los tres modelos expuestos para la emulsiones estabilizadas con soja. Como puede apreciarse en esta figura el modelo de Soskey-Winter es el que reproduce los resultados de forma mas adecuada. Este modelo se ha empleado frecuentemente en la bibliografía para emulsiones aceite en agua similares (Gallegos y col., 1992a, 1992b; Gallegos y Franco, 1999a; Franco, 1995; Partal y col., 1999). En la figura 7.2.3.5. se presentan los valores de la función de amortiguación calculados según la ecuación 7.2.3.5. para las emulsiones estabilizadas con gluten, soja y algarroba, así como los ajustes correspondientes al modelo de Soskey-Winter. A pesar de no existir grandes diferencias entre los tres sistemas, las emulsiones de algarroba son las que presentan mayores valores de la función de amortiguación a las mayores deformaciones, lo que indicaría una mayor resistencia de la microestructura a la deformación aplicada, probablemente favorecida por los menores tamaños de gota de la fase dispersa que contribuyen a la formación de un entramado con un mayor grado de estructuración, como puede deducirse de la mayor extensión de la zona plateau y del valor más elevado del modulo plateau.

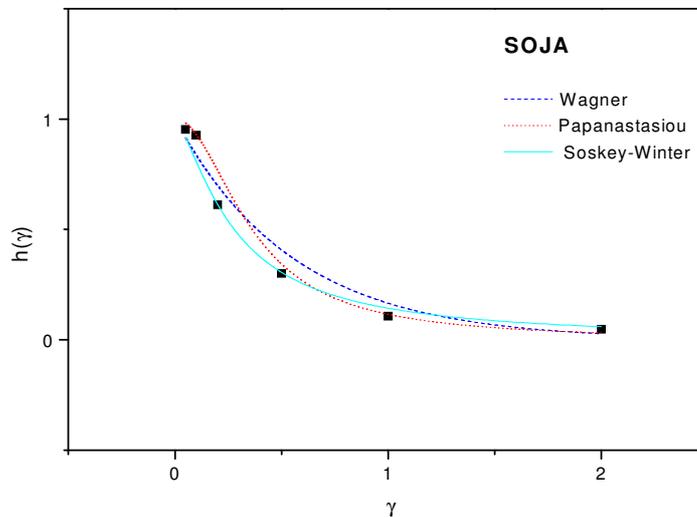


Figura 7.2.3.4. Evolución de la función amortiguación con la deformación y ajuste a diferentes modelos para una emulsión estabilizada con soja

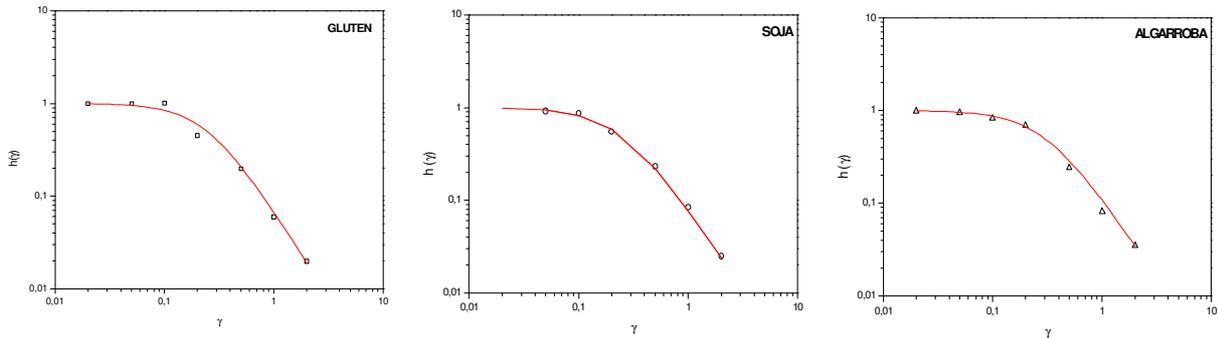


Figura 7.2.3.5. Evolución de la función amortiguación con la deformación y ajuste al modelo de Soskey-Winter para emulsiones estabilizadas con gluten, soja y algarroba

#### 7.2.4. Ensayos de crecimiento del esfuerzo

Para poder validar un modelo de viscoelasticidad no lineal será preciso contrastar su capacidad para reproducir los resultados obtenidos en algún tipo de ensayo en el que la participación de las propiedades viscoelásticas no lineales de la emulsión sea significativa. Entre los ensayos más utilizados para este fin, en una gran variedad de materiales, se encuentran los ensayos de flujo transitorio (Laun 1978, Huang y Kokini 1994, Liang y Mackley 1994, Madiedo y col. 2000)

El flujo transitorio de emulsiones alimentarias ha sido objeto de estudio por diferentes autores (Figoni y Shoemaker, 1983; Campanella y Peleg, 1987; Gallegos y col., 1988; Bower y col., 1999; Partal y col., 1999b; Gallegos y col., 2002), desde dos puntos de vista diferentes: como resultado del fenómeno de tixotropía o como un caso concreto del comportamiento viscoelástico no lineal de la emulsión. No obstante, en ambos casos se pone de manifiesto que dicha respuesta transitoria es el resultado de una modificación estructural inducida por cizalla.

En las figuras 7.2.4.1., 7.2.4.2. y 7.2.4.3. se muestra la evolución de la viscosidad para emulsiones estabilizadas con un 1%(p/p) gluten, soja y algarroba, respectivamente, procesadas a 6000 rpm y 20°C, y con un pH igual a 2, en función de la velocidad de cizalla aplicada.

Estos sistemas suelen responder a la aplicación de una velocidad de cizalla constante mediante curvas del esfuerzo en función del tiempo caracterizadas por:

- La aparición de un sobreesfuerzo a tiempos cortos, que se relaciona con un comportamiento elástico
- Tras el valor del sobreesfuerzo, se produce un descenso del esfuerzo con el tiempo, correspondiente a una modificación estructural, hasta llegar a un valor de equilibrio o estacionario. En esta segunda parte del ensayo, el material exhibe un comportamiento predominantemente viscoso (Kokini y Dickie, 1981).

Como era de esperar, a medida que disminuye la velocidad de cizalla, se produce un desplazamiento en el tiempo al que aparece el sobreesfuerzo hacia valores mayores. Si continúa el descenso de la velocidad de cizalla, llega un momento en el que desaparece el sobreesfuerzo, como se aprecia en las figuras 7.2.4.1 a 7.2.4.3.

Algunos de los parámetros que pueden utilizarse para describir el comportamiento de las emulsiones en flujo transitorio son: el valor del sobreesfuerzo ( $\tau_{max}$ ), la deformación correspondiente al sobreesfuerzo ( $\gamma_{max}$ ), el esfuerzo de cizalla en equilibrio ( $\tau_{\infty}$ ), el tiempo para alcanzar dicho equilibrio ( $t_{\infty}$ ) y el sobreesfuerzo relativo ( $(\tau_{max} - \tau_{\infty})/\tau_{\infty}$ ) (figura 1.8.1.).

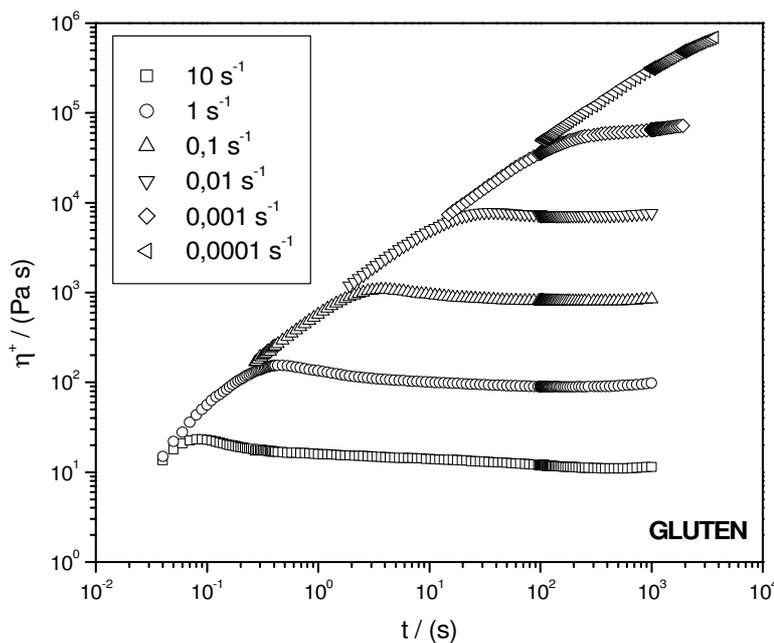


Figura 7.2.4.1. Evolución de la viscosidad transitoria con el tiempo de cizalla, en función de la velocidad de cizalla aplicada para emulsiones O/W con 75%(p/p) de aceite y 1%(p/p) de gluten

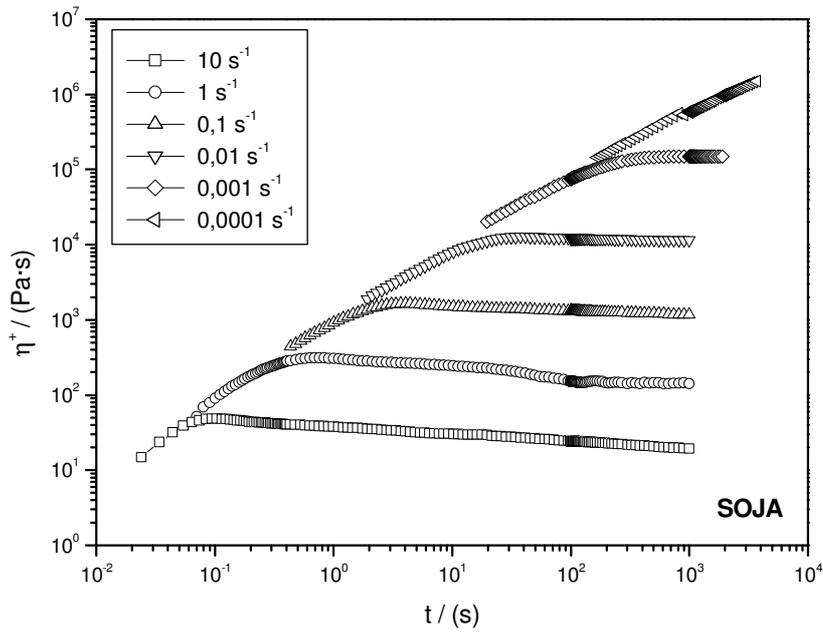


Figura 7.2.4.2. Evolución de la viscosidad transitoria con el tiempo de cizalla, en función de la velocidad de cizalla aplicada para emulsiones O/W con 75%(p/p) de aceite y 1%(p/p) de soja

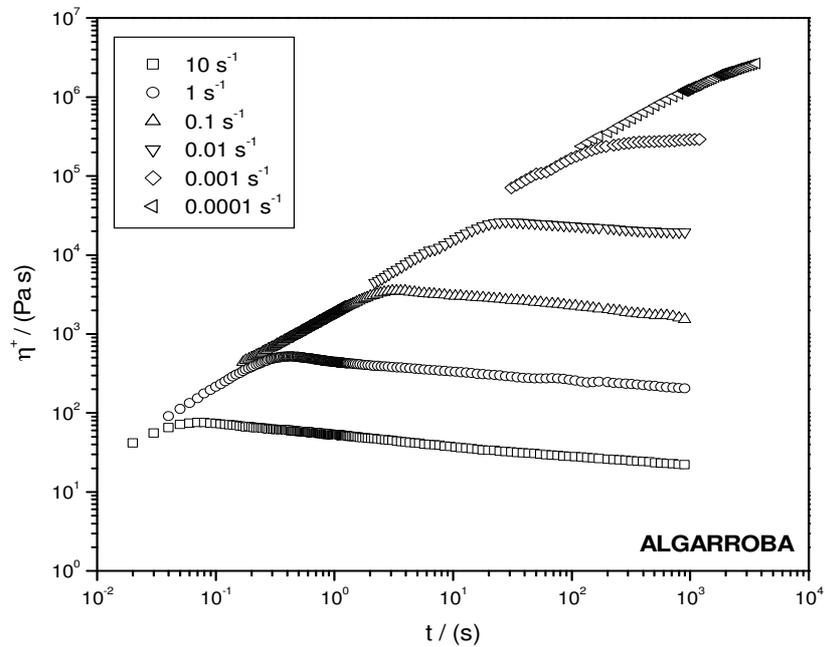


Figura 7.2.4.3. Evolución de la viscosidad transitoria con el tiempo de cizalla, en función de la velocidad de cizalla aplicada para emulsiones O/W con 75%(p/p) de aceite y 1%(p/p) de algarroba

En las tablas 7.2.4.1., 7.2.4.2. y 7.2.4.3. aparecen para cada proteína los valores obtenidos experimentalmente de los parámetros antes mencionados, a las diferentes velocidades de cizalla aplicadas. La deformación a la que aparece el máximo se obtiene a partir del producto del valor del sobreesfuerzo por el tiempo necesario para alcanzarlo ( $\gamma_{\max} = \dot{\gamma} \cdot t_{\max}$ ). Este parámetro ha sido utilizado para evaluar la aplicabilidad de algunas ecuaciones constitutivas en las que su valor debe ser del orden de la unidad e independiente de la velocidad de cizalla impuesta. Así, Campanella y Peleg (1987) aplicaron el modelo de Wagner para describir el flujo transitorio de emulsiones determinando el valor del parámetro  $\kappa$  de la ecuación 7.2.3.6 como la inversa de la deformación en el sobreesfuerzo ( $\kappa = 1/\gamma_{\max}$ ). Si  $\kappa$  es considerada una constante del material, la deformación en el sobreesfuerzo debe ser independiente de la velocidad de cizalla aplicada. Esta es precisamente una de las limitaciones de la aplicación de la función de amortiguación de Wagner para las emulsiones estabilizadas con gluten y algarroba, ya que en ambos casos el valor de  $\gamma_{\max}$  aumenta con la velocidad de cizalla desde la aparición del sobreesfuerzo, como puede observarse en las tablas 7.2.4.1 a 7.2.4.3. En cambio, dicho aumento no resulta significativo para las emulsiones estabilizadas con soja. En cualquier caso, los valores de  $\gamma_{\max}$  son del mismo orden para las tres emulsiones estudiadas. En la figura 7.2.4.4. se presenta la variación de los esfuerzos en el máximo, en el equilibrio y la cantidad de sobreesfuerzo, definido como  $(\tau_{\max} - \tau_{\infty}) / \tau_{\infty}$ , con la velocidad de cizalla. Como puede apreciarse en dicha figura. es preciso superar en cualquier caso un valor de velocidad de cizalla, situado entre  $10^{-3}$  y  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , para que se produzca la aparición del sobreesfuerzo. Además, a estas velocidades más bajas no se ha alcanzado el equilibrio en el tiempo del ensayo por lo que los valores de  $\tau_{\infty}$  son extrapolaciones incluidas a efectos de comparación.

$\dot{\gamma} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\gamma_{\max}$	$\tau_{\max} \text{ (Pa)}$	$t_{\infty} \text{ (s)}$	$\tau_{\infty} \text{ (Pa)}$	$(\tau_{\max} - \tau_{\infty}) / \tau_{\infty}$
0,0001	-	70	-	70	0
0,001	-	72,2	1900	72,2	0
0,01	0,34	78,3	154	72,1	0,086
0,1	0,40	108	96	80,8	0,33
1	0,44	155	100	89,5	0,73
10	0,90	233	606	110	1,11

Tabla 7.2.4.1. Emulsiones estabilizadas con gluten

$\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	$\gamma_{\max}$	$\tau_{\max}$ (Pa)	$t_{\infty}$ (s)	$\tau_{\infty}$ (Pa)	$(\tau_{\max} - \tau_{\infty}) / \tau_{\infty}$
0,0001	-	150	-	150	0
0,001	-	149	737	149	0
0,01	0,45	127	815	115	0,11
0,1	0,40	165	902	117	0,41
1	0,6	312	606	141	1,21
10	0,65	486	1000	193	1,52

Tabla 7.2.4.2. Emulsiones estabilizadas con soja

$\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	$\gamma_{\max}$	$\tau_{\max}$ (Pa)	$t_{\infty}$ (s)	$\tau_{\infty}$ (Pa)	$(\tau_{\max} - \tau_{\infty}) / \tau_{\infty}$
0,0001	-	195	-	195	0
0,001	-	182	1201	182	0
0,01	0,31	306	901	223	0,38
0,1	0,37	379	901	180	1,1
1	0,44	461	1294	211	1,18
10	0,9	757	901	221	2,43

Tabla 7.2.4.3. Emulsiones estabilizadas con algarroba

El comportamiento viscoelástico de las muestras se pone de manifiesto en las figura 7.2.4.1 a 7.2.4.3 así como en la figura 7.2.4.4, en las que se aprecia cómo el máximo en la curva del esfuerzo transitorio alcanza un mayor valor cuantos mayores son las velocidades de deformación, apareciendo además este sobreesfuerzo a tiempos más cortos. Este efecto se observa para los tres sistemas.

Altos valores del tiempo máximo ( $t_{\max}$ ) están relacionados con estructuras más estables capaces de resistir mayores deformaciones, mientras que el sobreesfuerzo  $\tau_{\max}$  se asocia con el módulo de almacenamiento que se obtiene en ensayos viscoelásticos lineales, dando una idea del grado de elasticidad del sistema (Navarro y col., 1997). Así, si comparamos estos resultados con los obtenidos en los ensayos dinámicos, se observa una tendencia similar del  $\tau_{\max}$  que la encontrada en el módulo plateau, obteniéndose una misma secuencia gluten < soja < algarroba.

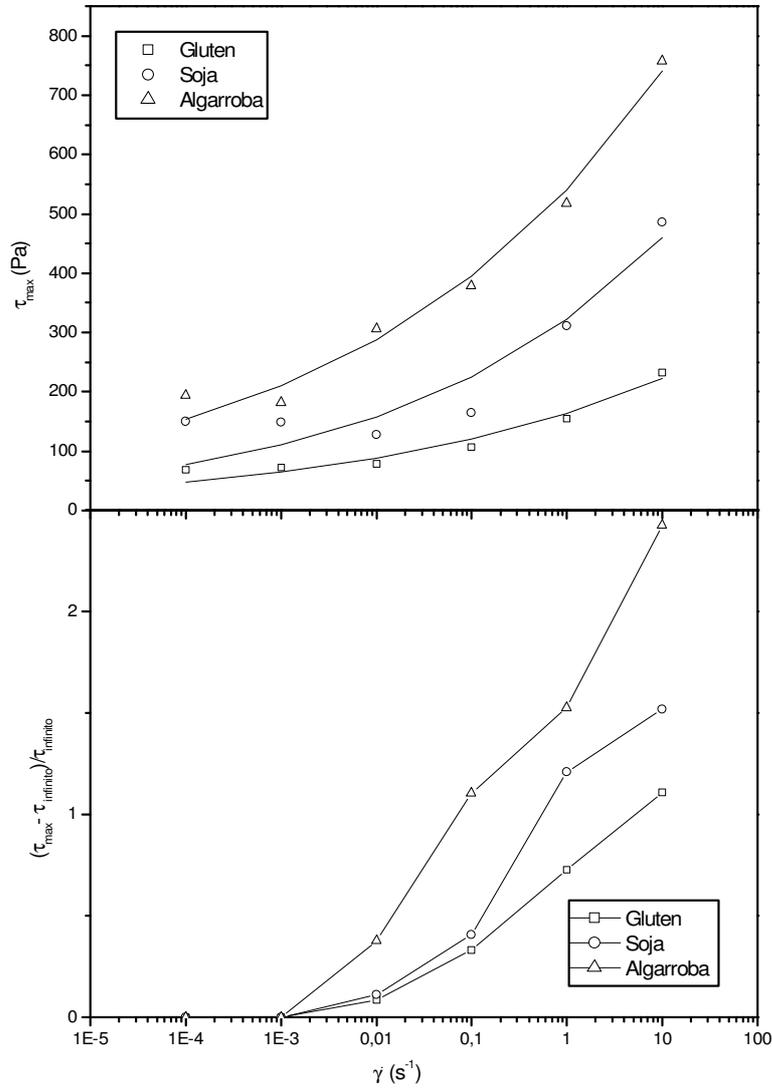


Figura 7.2.4.4. Valores de los parámetros que caracterizan a las curvas de esfuerzo transitorio, en función de la velocidad de cizalla empleada

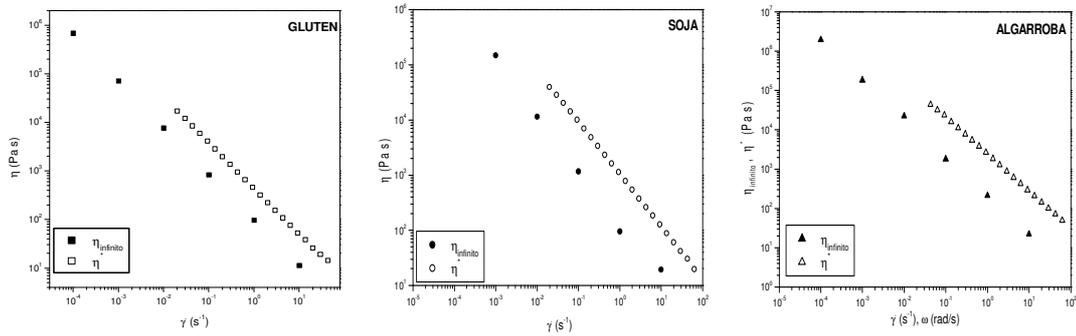


Figura 7.2.4.5. Valores de la viscosidad a tiempo infinito y de la viscosidad compleja frente a la velocidad de deformación y la velocidad angular, respectivamente

En la figura 7.2.4.5. se puede observar como no se cumple la regla de Cox-Merz, puesto que los valores de la viscosidad compleja son superiores a los correspondientes a la viscosidad a tiempo infinito. Aún así, se conserva la misma pendiente y secuencia (gluten < soja < algarroba).

Si se compara para los diferentes sistemas estudiados, se observa la misma tendencia para el esfuerzo estacionario que la seguida por el sobreesfuerzo y el modulo plateau. El tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario es del mismo orden para las emulsiones que contienen soja y algarroba e inferior para las emulsiones estabilizadas con gluten que presentan una destrucción estructural más rápida. Por tanto, al igual que ocurre en los ensayos dinámicos, las emulsiones estabilizadas con gluten son las menos resistentes a la cizalla y, además, las que presentan un carácter más fluido tras la ruptura estructural por acción de ésta.

### 7.2.5. Modelo viscoelástico no lineal

Como ya se indicó en el apartado de antecedentes bibliográficos, existen diversos modelos para predecir la respuesta viscoelástica no lineal de un material. Entre estas ecuaciones constitutivas se encuentra la ecuación conocida como K-BKZ, propuesta por Kaye (1962) y por Bernstein, Kearsley y Zapas (1963).

Basándose en esta ecuación constitutiva para el caso en que la función potencial es factorizable, puede obtenerse otra ecuación constitutiva conocida como modelo de Wagner (1979):

$$[\sigma] = \int_{-\infty}^t m(t-t')h(I_1, I_2)[C^{-1}]dt' \quad (7.2.5.1.)$$

En cizalla esta ecuación adopta la forma:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t-t')h(\gamma)\gamma(t, t')dt' \quad (7.2.5.2.)$$

Para deformaciones pequeñas,  $h(\gamma)$  tiende a 1 y la ecuación anterior se reduce a la ecuación constitutiva de la viscoelasticidad lineal. Esta expresión puede en principio predecir la respuesta de un material cuando es sometido a un ensayo de crecimiento del esfuerzo, siempre que se describa de manera adecuada la función memoria, por ejemplo a partir del modelo de Maxwell generalizado, y la función amortiguación, a través de alguna de las expresiones anteriores como la del modelo de Soskey-Winter.

En las figuras 7.2.4.1 y 7.2.4.2. se comparan los valores experimentales de la viscosidad en flujo transitorio de las emulsiones estabilizadas con soja y algarroba, respectivamente, con los valores obtenidos a partir del modelo viscoelástico no lineal. Para el cálculo de los valores de crecimiento del esfuerzo se han utilizado métodos de integración numérica.

Como puede observarse se han obtenido ajustes satisfactorios al modelo de Wagner, para el caso de la emulsión estabilizada con proteína de soja en un amplio intervalo de velocidades de cizalla. No obstante, los valores de viscosidad obtenidos a partir del modelo resultan algo inferiores a los experimentales para las velocidades de cizalla más altas. Por el contrario, el modelo de Wagner solo es capaz de reproducir los resultados experimentales de viscosidad obtenidos para las emulsiones estabilizadas con proteína de gluten y de algarroba a muy baja velocidad de cizalla, produciendo una subestimación de la viscosidad cuando la cizalla aumenta.

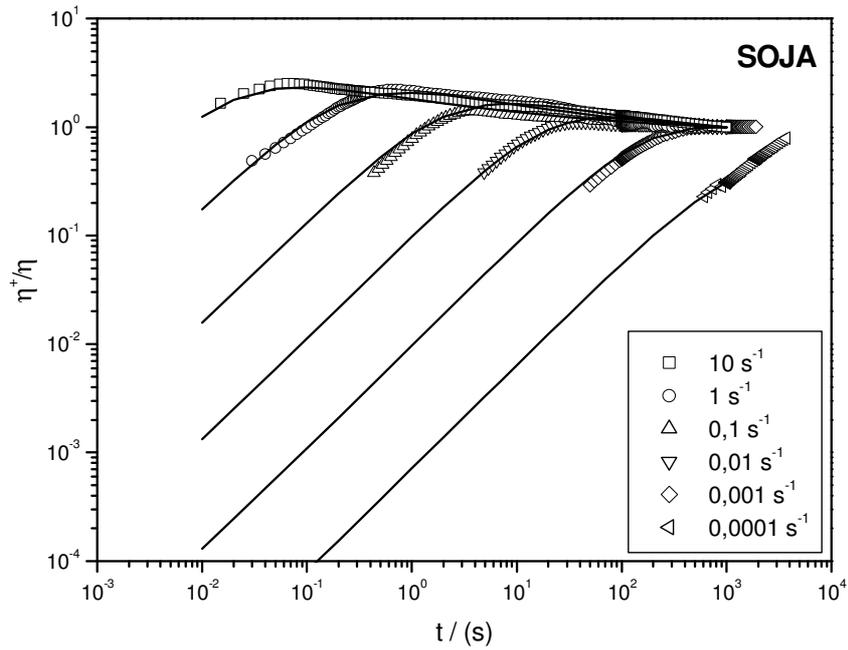


Figura 7.2.5.1. Cociente viscosidad transitoria ( $\eta^+$ ) entre viscosidad estacionaria ( $\eta$ ) frente al tiempo para una emulsión estabilizada con soja, a diferentes velocidades de deformación. La línea continua representa el ajuste al modelo de Wagner

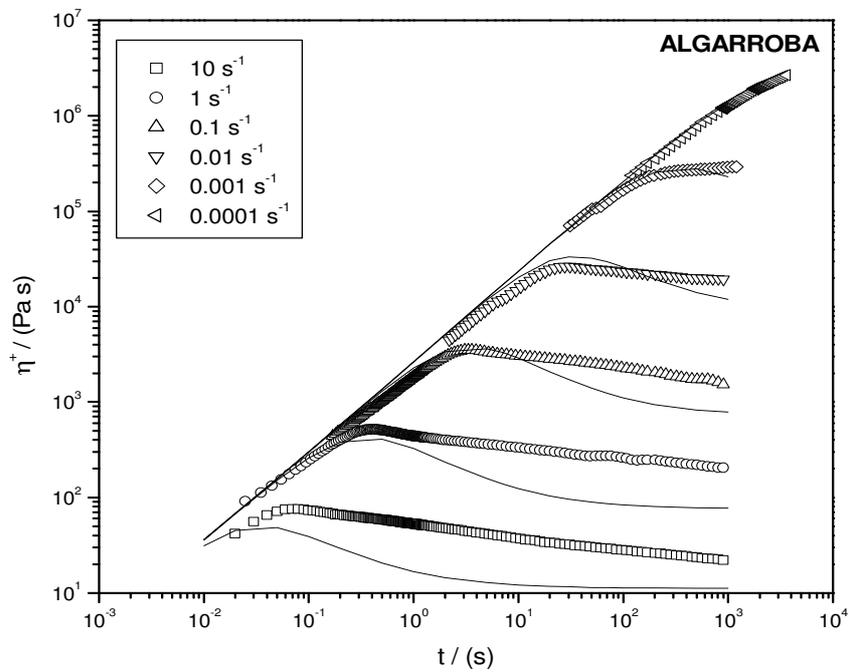


Figura 7.2.5.2. Viscosidad transitoria ( $\eta^+$ ) frente al tiempo para una emulsión estabilizada con algarroba, a diferentes velocidades de deformación. La línea continua representa el ajuste al modelo de Wagner

### 7.3. Conclusiones

1. Mediante el ajuste al modelo de Mason de los resultados obtenidos para emulsiones estabilizadas con gluten o soja se han obtenido sendas curvas maestras que describen la relación entre un parámetro de viscoelasticidad lineal (el módulo plateau) y parámetros estructurales (el diámetro de Sauter y la fracción en volumen de fase dispersa). El modelo subestima los resultados obtenidos con gluten a altas concentraciones de emulsionante, ya que no es capaz de predecir el importante reforzamiento estructural que se produce como consecuencia del exceso de proteína en la fase continua.
2. Las funciones viscoelásticas lineales tales como módulo de almacenamiento, módulo de pérdidas o módulo de relajación lineal pueden ser representados satisfactoriamente por el modelo de Maxwell generalizado. Los coeficientes de relajación obtenidos pueden ajustarse al modelo BSW que describe adecuadamente las zonas de transición y plateau del espectro de relajación.
3. Todas las emulsiones estudiadas muestran el mismo comportamiento cualitativo cuando son sometidas a una deformación constante en los ensayos transitorios, con un sobreesfuerzo a tiempos cortos, como consecuencia de su comportamiento elástico, seguido de un descenso del esfuerzo hasta un valor estacionario. A medida que la velocidad de cizalla disminuye, el sobreesfuerzo aparece cada vez a tiempos más largos, llegando a desaparecer.
4. Se ha obtenido un ajuste satisfactorio al modelo viscoelástico no lineal para las emulsiones estabilizada con soja, utilizando en dicho ajuste la función de amortiguación de Soskey-Winter. El modelo falla para las emulsiones estabilizadas con algarroba a partir de velocidades de deformación superiores a  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  y sólo es capaz de reproducir el comportamiento viscoelástico lineal de las emulsiones con gluten.



# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Agboola, S.O., Dalgleish, D.G., Enzymatic hydrolysis of milk proteins used for emulsion formation.1. Kinetics of protein breakdown and storage stability of the emulsions, *J. of Agric. and Food Sci.*, **1996a**, 44, 3631
- Agboola, S.O., Dalgleish, D.G., Enzymatic hydrolysis of milk proteins used for emulsion formation. 2. Effects of calcium, pH and ethanol on the stability of the emulsions, *J. of Agric. and Food Sci.*, **1996b**, 44, 3637
- Aguilera, J.M., Stanley, D.W., *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, Elsevier, Amsterdam, **1990**
- Aguilera, J.M., Xiong, Y.L., Kinsella, J.E., Viscoelastic properties of mixed dairy gels, *Food Res. Int.*, **1993**, 1, 26, 11
- Ahuja S.K., *Proc. IX Intl. Congress on Rheology*, México, **1984**, 3, 515
- Asada, T., Onogi, S., *Polym. Eng. Rev.*, **1983**, 3, 323
- Aksel, N., Teipel, U., *Progress and Trends in Rheology, IV*, Gallegos, C. (ed.), Steinkopff, Darmstadt, **1994**
- Alaimo, M.H., Kumosinski, T.F., Investigation of hydrophobic interactions in colloidal and biological systems by molecular dynamics simulations and NMR spectroscopy, *Langmuir*, **1997**, 13, 2007
- Alexander, A.E., Johnson, P., *Colloid Science*, I, Oxford University Press, Londres, **1949**
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, A.. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates and tannins. *J Food Compos Anal* 10, **1997**, 166
- Bagley, E.B., End corrections in the capillary flow of polyethylene, *J. Appl. Phys.*, **1957**, 28 (5), 624
- Banks, W., Muir, D.D., Stability of alcohol containing emulsions, en *Advances in Food Emulsions and Foams*, Dickinson, E., Stainsby, G. (eds.), Elsevier Applied Science, Londres, **1988**
- Barnes H.A., *Theoretical and Applied Rheology*, Moldenaers, P., Keunings, R. (eds.), **1992**
- Barnes, H.A., Rheology of emulsions - a review, *Colloids Surf.*, **1994**, 91, 89
- Barnes, H.A., A review of the slip (wall depletion) of polymer solutions, emulsions and particle suspensions in viscometers: its cause, character and cure, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, **1995**, 56, 221
- Barnes, H. A., *A handbook of elementary rheology*; University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics: Aberystwyth, Reino Unido, **2000**
- Barnes, H.A., Walters, K., The Yield Stress Myth?, *Rheol. Acta*, **1985**, 24, 323
- Barnes, H.A., Carnali, O.J., The vanein-cup as a novel rheometer geometry for shear thinning and thixotropic materials, *J. Rheol.*, **1990**, 34, 841
- Batcherlor, G.K., The effect of Brownian motion on the bulk stress in a suspension of spherical particles, *J. Fluid Mech.*, **1977**, 83, 97
- Baumgaertel M., De Rosa, M.E., Machado, J., Masse, M. y Winter, H.H., The relaxation time spectrum of nearly monodisperse polybutadiene melts, *Rheol. Acta*, **1992**, 31, 75
- Belton, P.S., On the elasticity of wheat gluten, *J. Cereal Sci.* **1999**, 29, 103

- Belton, P.S., Colquhoun, I. J., Grant, A., N. Wellner, Field, J.M., Shewry, P.R., Tatham, A.S., FTIR and NMR studies on the hydration of a high-M<sub>r</sub> subunit of glutenin, *Int. J. of Biol. Macromolecules*, **1995**, 17, 2, 74
- Beneyto, F.J., Lema, J.M., Sola, C., *Afinidad*, **1980**, 37, 306
- Berjano, M., Comportamiento viscoelástico no lineal de mayonesas comerciales, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **1989**
- Bernstein, B., Kearsley, E.A., Zapas, L.J. A Study of Stress Relaxation with Finite Strain, *Trans Soc. Rheology* , **1963**, 7, 291
- Beveridge, T., Jones, L., Tung, M.A., Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey soybean, and albumen protein gels, *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, 32, 2, 307
- Binder, R.J., Coit, J.E., Williams, K.T., Brekke, J.E.. Carob varieties and composition, *Food Technology*, **1959**, 13, 213
- Bird, R.B., Armstrong, R.C., Hassager, O., *Dynamics of Polymer Liquids vol. 1, Fluid Dynamics*, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Nueva York, **1987**
- Bistany, K., Kokini, J.L., Comparison of small amplitude dynamic viscoelastic properties and steady shear properties of food materials, *Journal of Texture Studies*, **1983**, 14, 113
- Bizot, H., Le Bail, P., Leroux, B., Davy, J., Roger, P.; Buleon, A. Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated linear and branched polyanhydroglucose compounds. *Carbohydrate Polymers*, **1997**, 32, 33
- Booth, F., The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetric electrolyte, *Proc. R. Soc. London Ser. A*, **1950**, 203, 533
- Bower, C., Gallegos, C., Mackley, M.R., Madiedo, J.M., The rheological and microstructural characterisation of the non linear flow behaviour of concentrated oil-in water, *Rheol Acta*, **1999**, 38, 145
- Braginsky, L.M., Belevitskaya, M.A., Kinetics of droplets breakup in agitated vessels, en *Liquid-Liquid Systems*, Kulov, N.N. (ed.), Nova Science, Commack, Nueva York, **1996**, cap. 1
- Bressy, L., Hébraud, P., Schmitt, V., Bibette, J., Rheology of emulsions stabilized by solid interfaces, *Langmuir*, **2003**, 19, 598
- Breuillet, C., Yildiz, E., Cuq, B., Kokini, J. L., Study of the anomalous capillary Bagley factor behavior of three types of wheat flour doughs at two moisture contents. *Journal of Texture Studies*, **2002**, 33, 315
- Brydson, J.A., *Flow Properties of Polymer Melts*, 2<sup>a</sup> ed., George Godwin Limited, Londres, **1981**, 1
- Bugusu, B., Rajwa, B., Hamacker, B.H., Interaction of maize zein with wheat gluten in composite dough and bread as determined by confocal laser scanning microscopy, *Scanning*, **2002**, 24, 1
- Buscall, R., McGowan, I.J., Morton-Jones, A.J., The rheology of concentrated dispersions of weakly attracting colloidal particles with and without wall slip, *J.Rheol.*, **1993**, 37, 621
- Calixto, F. S., Canellas, J., Components of nutritional interest in carob pods *Ceratonia siliqua*, *J. of the Sci. of Food Agric.*, **1982**, 33, 1319
- Campanella, O.H., Peleg, M., On the relationship between the dynamic viscosity and the relaxation modulus of viscoelastic liquids, *J. Rheol.*, **1987**, 31, 439
- Cao, Y.H., Dickinson, E., Wedlock, D.J., Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide, *Food Hydrocolloids*, **1990**, 4, 185

- Catsimpoolas, N., Ekenstam, C., Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, **1969**, 490
- Cesàro A., Sussich, F., Plasticization: The Softening of Materials, en *Bread Staling*, Chinachoti, P. y Vodovotz, Y. (eds.), CRC press, **2001**
- Chapman, D., A contribution to the theory of electro-capillarity, *Phil. Mag.*, **1913**, 25, 475
- Chen, H., Formation and properties of casein films and coatings, en *Protein-based films and coatings*, CRC Press LLC, Cap. 7, **2002**
- Chen, J., Dickinson, E., Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. *Journal of Texture Studies*, **1998**, 29, 285
- Cheng, D.C-H., Yield stress: A time-dependent property and how to measure it, *Rheol. Acta*, **1986**, 25, 542
- Cherian, G, Chinachoti, P., H and O Nuclear Magnetic Resonance study of water in gluten in the glassy and rubbery state, *Cereal Chemistry*, **1996**, 73, 5, 618
- Clark A.H.. Structural and mechanical properties of biopolymer gels, en *Food Polymers, Gels and Colloids*, Dickinson, E., (eds) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido, **1991**, 322
- Clark A.H., Ross-Murphy S.B.. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv. Polym. Sci.*, **1987**, 83, 57
- Cogswell, F.N., Converging flow of polymer melts in extrusion dies. *Poly. Engn. and Sci* **1972**, 12, 64
- Cogswell, F.N., Converging flow of polymer melts in extrusion dies. *Poly. Eng. Sci.*, **1972**, 12, 64–73
- Colonna, P., Tayeb, J., Mercier, C., Extrusion cooking of starch and starchy products, en *Extrusion Cooking*, Mercier, C., Linko, P., Harper, J.M. (eds.), American Association of Cereal Chemists, **1989**, 247
- Couchmann, P. R., A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures, *Macromolecules* **1978**, 11, 117
- Cox, W.P., Merz, E.H., Correlation of dynamic and steady flow viscosities, *J. Polym Sci.*, **1958**, 28, 619
- Dagorn-Scaviner, C., Gueguen, J., Lefebvre, J., Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors, *J. Food Sci.*, **1987**, 52, 335
- Dalgleish, D.G., Food emulsions, en *Emulsions and Emulsion Stability*, Sjoblom, J., Ed., Marcel Dekker, Nueva York, **1996**
- Dalgleish, D.G., Food emulsions stabilized by proteins, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **1997**, 2, 573
- Damodaran, S., Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation, *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, 262
- Damodaran, S., Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins, en *Food Proteins*, Kinsella, J.E., Soucie, W.G., (eds.), American Chemical Society, Champaign, IL, **1989**, cap. 3
- Damodaran S., Food proteins: an overview, en *Food proteins and their applications*, Damodaran, S., Paraf, A. (ed.), Nueva York, Marcel Dekker, Inc. **1997**. Cap. 1, 1
- Darby, R., *Viscoelastic Fluids; An Introduction to Their Properties and Behaviour*, Marcel Dekker, Nueva York, **1976**

- Davis, R.H., Schonberg, J.A., Rallison, J.M., The lubrication force between two viscous drops, *Physics of Fluids A*, **1989**, 1, 77
- de Graaf, E., Madeka, H., Cocero, A. M., Kokini, J.L., Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry, *Biotechnol. Prog.*, **1993**, 9, 210
- De Rosa, M.E., Winter, H.H., The effect of entanglements on the rheological behavior of polybutadiene critical gels, *Rheol. Acta*, **1994**, 33, 220
- Dealy, J.M. *Rheometers for Molten Plastics*. (Eds) Van Nostrand Reinhold Company, Nueva Cork, **1982**
- Dealy, J.M., Official nomenclature for material functions describing the response of a viscoelastic fluid to various shearing and extensional deformations, *J. Rheology*, **1994**, 38, 179
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl, *Journal of Food Science*, **1997**, 62, 342
- Derjaguin, B.V., Churaev, N.V., Muller, V.M., *Surface Forces*, Plenum Press, Nueva York, **1987**
- Derjaguin, B.V., *Theory of Stability of Colloids and Thin Films*, Plenum Press, Nueva York, **1989**
- Di Gioia, L., Cuq, B., Gilbert, S., Thermal properties of corn gluten meal and its proteic components, *Int. J. of Biol. Macromol.*, **1999**, 24, 341
- Dickinson, E., en *Food Structure: its Creation and Evaluation*, Blanshard, J.M.V., Mitchell, J.R. (eds.), Butterworths, Londres, **1988**
- Dickinson, E., Food colloids - An overview, *Colloids Surf.*, **1989**, 42, 191
- Dickinson, E., *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford, **1992**
- Dickinson, E., Milk protein interfacial and the relationship to emulsion stability and rheology, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2001**, 20, 197
- Dickinson, E., Stainsby, J., *Colloids in Foods*, Applied Science Publishers, Londres, **1982**
- Dickinson, E., Flint, F.O., Hunt, J.A., Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions, *Food Hydrocoll.*, **1989**, 3, 389
- Dickinson, E., Hunt, J.A., y Horne, D.S., Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed  $\beta$ -casein or phosvitin, *Food Hydrocolloids*, **1992**, 6, 359
- Dickinson, E., McClements, D.J., *Advances in Food Colloids*, Chapman & Hall, Londres, **1995**
- Dickinson, E., Hong, S.T., Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein-stabilized emulsion gels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43, 2560
- Dickinson, E., Yamamoto Y., Viscoelastic properties of heat-set whey protein stabilized emulsion gels with added lecithin, *Journal of Food Science*, **1996a**, 61, 811
- Dickinson, E., Yamamoto, Y., Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels crosslinked with transglutaminase, *J. Agric. and Food Chem.*, **1996b**, 44, 6, 1371
- Dickinson, E., Hong, S.T., Yamamoto, Y., Rheology of heat-set emulsion gels containing beta-lactoglobulin and small-molecule surfactants, *Neth. Milk and Dairy J.*, **1996**, 50, 2, 199
- Dickinson, E., Hong, S.T., Influence of an anionic surfactant on the rheology of heat-set  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized emulsion gels, *Colloids Surf. A*, **1997**, 127, 1

- Dickinson, E., Semenova, M.G., Antipova, A.S., Salt stability of casein emulsions, *Food Hydrocoll.*, **1998**, 12, 2, 227
- Dickinson, E., Casanova, H., A thermoreversible emulsion gel based on sodium caseinate, *Food Hydrocoll.*, **1999**, 13, 285
- Dimitrova, T.D., Leal-Calderón, F., Bulk elasticity of concentrated protein stabilized emulsions, *Langmuir*, **2001**, 17, 3235
- Dimitrova, T.D., Leal-Calderón, F., Rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2004**, 108-09, 49
- Djakovic, L.M., Dokic, P., Effect of emulsifiers on the dynamics of oil emulsification in water, *Tenside Detergents*, **1977**, 14, 126
- Diogo, A.C., Rheology of liquid foams under shear: transient shear, steady shear and exponential (strong) shear flows, *Les Cahiers de Rhéologie*, **1995**, 14, 231
- D'Ovidio, R., Masci, S., The low molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten., *J. Cereal Sci.*, **2004**, 39, 321
- Drozdov, A., Physical aging in amorphous polymers: companion of observations in calorimetric and mechanical tests, *European Pol. J.*, **2001**, 37, 1379
- Elizalde, B.E., Bartholomai, G.B., Pilosof, A.M.R., The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. *Lebens Wiss U Technol*, 29, **1996**, 334
- Elliot, J.H., Ganz, A.J. Salad dressings. Preliminary rheological characterization *J. Texture Stud.*, **1977**, 8, 359
- Everett, D.H., *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1988**
- Farahnaky, A., Badii, F., Farhat, I.A., Mitchell, J.R., Hill, S.E., Enthalpy relaxation of bovine serum albumin and implications for its storage in the glassy state, *Biopolymers*, **2005**, 78, 2, 69
- Farhat, I.A., Measuring and modelling the glass transition temperature, Steele, R. (ed.), *Understanding and measuring the shelf-life of foods*, CRC Press, **2004**, cap. 11
- Feillet, P.; Roulland, T. M., Caroubin: a gluten-like protein isolated from carob bean germ, *Cereal Chem.*, **1998**, 75, 488
- Fellows, P., *Food Processing Technology: Principles and Practice*, VCH Publishers, Weinheim, **1988**
- Ferguson, J., Kemblowski, Z. *Applied Fluid Rheology*. Elsevier Science Publishing, Nueva York, **1991**
- Ferry, J.D. *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley & Sons (eds.) Nueva York, **1980**
- Figoni, P.I., Shoemaker, C.F., Characterization of time dependent flow properties on mayonnaise under steady shear, *J. Texture Stud.*, **1983**, 14, 431
- Fox, P.F., *Advanced Dairy Chemistry*. Vol 1 Londres: Elsevier Applied Science, **1992**, 63-110, 141
- Fox, P.F., Kelly, A.L., The Caseins, en *Proteins in Food Processing*, Yada, R.Y, (ed), CRC Press, **2004**
- Franco, J.M., Comportamiento viscoso y viscoelástico de emulsiones alimentarias del tipo salsa fina que contienen una mezcla de emulsionantes, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **1995**

- Franco, J.M., Berjano, M., Guerrero, A. Muñoz, J., Gallegos, C., Flow Behavior and Stability of Light Mayonnaise Containing a Mixture of Egg-Yolk and Sucrose Stearate As Emulsifiers, *Food Hydrocoll.*, **1995a**, 9, 111
- Franco, J.M., Guerrero, A., Gallegos, C., Rheology and Processing of Salad Dressing Emulsions, *Rheol. Acta*, **1995b**, 34, 513
- Franco, J.M., Guerrero, A., Gallegos, C., Influencia de las Concentraciones de Aceite y Emulsionante en las Propiedades Reológicas de Emulsiones Aceite en Agua del Tipo Salsa Fina, *Grasas y Aceites*, **1995c**, 46, 108
- Franco, J.M., Berjano, M., Gallegos, C., Linear viscoelasticity of salad dressing emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 713
- Franco J.M., Raymundo, A., Sousa, I., Gallegos, C., Influence of processing variables on the rheological and textural properties of lupin protein-stabilized emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **1998a**, 46, 3109
- Franco, J.M., Gallegos, C., Barnes, H., On slip effects in steady-state flow measurements of oil-in-water food emulsions, *J. Food Eng.*, **1998b**, 36, 89
- Franco J.M., Partal, P., Ruiz-Márquez, D., Conde, B., Gallegos, C., Influence of pH and protein thermal treatment on the rheology of pea protein-stabilized emulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 975
- Fukushima, D., Soy Proteins, en *Proteins in Food Processing*, Yada, R.Y, (ed), CRC Press, **2004**
- Gallegos, C., Muñoz, J., Rodriguez García J.M., Flores, V., *Progress and Trends in Rheology II.*, Giesekus, H., Hibberd, M.F. (eds.) Steinkopft Verlag Berlín Heidelberg, **1988a**
- Gallegos, C., Berjano, García, F.P., M., Muñoz, J., Flores, V., *Grasas y Aceites*, **1988b**, 39, 254
- Gallegos, C., Berjano, M., Choplin, L., Linear viscoelastic behavior of commercial and model mayonnaise, *J. Rheol.*, **1992a**, 36, 465
- Gallegos, C., Berjano, M., Muñoz, J., Flores, V., Transient Flow of Mayonnaise Described by a Non-Linear Viscoelasticity Model, *J. Texture Studies*, **1992b**, 23, 153
- Gallegos, C., Sánchez, M.C., Guerrero, A., Franco, J.M., Effect of process parameters on the rheological properties of o/w emulsions, en *Rheology and Fluid Mechanics of Nonlinear Materials ASME*, Siginer, D.A., Advani, S.G. (eds.), Nueva York, **1996**, 217
- Gallegos, C., Franco, J.M., Rheology of food emulsions. en *Advances in the Flow and Rheology of Non-newtonian Fluids*, Siginier, D.A., De Kee, D., Chhabra, R.P. (eds), Amsterdam, Elsevier Science, **1999a**, 87
- Gallegos C., Franco, J.M., Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **1999b**, 4, 288
- Gallegos, C., Franco, J.M., Madiedo, J.M., Raymundo, A., Sousa, I., Nonlinear Viscoelasticity Modeling of Vegetable Protein-Stabilized Emulsions, *Engineering and food for the 21<sup>st</sup> century*, Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V., Aguilera, J.M. (eds.), CRC Press, **2002**, cap. 25
- Gibson, A. G., Converging dies, en *Rheological Measurements*; A.A. a. D.W.C. Collyer, Ed., Elsevier Applied Science, Nueva York, **1988**, 49
- Gidley, M. J.; Cooke, D.; Ward-smith, S. Low moisture polysaccharide systems: thermal and spectroscopic aspects, en *The glassy state in foods*; Blanshard, J.M.V., Lillford, P.J., (eds.), Nottingham University Press: Nottingham, **1993**, 303
- Gladwell, N., Rahalkar, R.R., Richmond, P., Creep/recovery behavior of oil-water emulsions: Influence of disperse phase concentration, *J. Food Science*, **1985**, 50, 1477

- Gladwell, N., Rahalkar, R.R., Richmond, P., Influence of disperse phase concentration upon the viscoelastic behaviour of emulsions, *Rheol. Acta*, **1986**, 25, 55
- Gopal, E.S.R., Principles of emulsion formation, en *Emulsion Science*, Sherman, P., Ed., Academic Press, Londres, **1968**, cap. 1
- Gordon, M., Taylor, J.S., Ideal copolymers and the second-order transition of synthetic rubbers, *Journal of Applied Chemistry*, **1952**, 2, 493
- Goshawk, J.A., Binding, D.M., Kell, D.B., Goodacre, R., Rheological phenomena occurring during the shearing flow of mayonnaise, *J. Rheol.*, **1998**, 42, 1537
- Gouy, G., Sur la constitution de la charge électrique a la surface d'un electrolyte, *Compt. Rend.*, **1909**, 149, 654
- Gouy, G., Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un electrolyte, *J. Phys. Radium*, **1910**, 9, 457
- Gregory, T., Mayers, S., Note on slippage during the study of the rheological behaviour of paste inks, *Surface Coatings International*, **1993**, 76, 82
- Groetsch, C.W., *The Theory of Tikhonov Regularization for Fredholm Equations of the first Kind*, Pitman, Boston, **1984**
- Groves, M.J., Ahmad, A.B. Some rheological properties of lyotropic liquid-crystals formed by phosphated polyoxyethylene surfactants, n-hexane and water. *Rheol. Acta*, **1976**, 15, 501
- Guerrero, A., Partal, P., Berjano, M., Gallegos, C., Linear Viscoelasticity of O/W Sucrose Palmitate Emulsions, *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, **1996**, 100, 246
- Guerrieri, N, Cereal Proteins, en *Proteins in Food Processing*, Yada, R.Y, (ed), CRC Press, **2004**, cap. 8
- Gunning, P.A., Hennok, M.S.R., Howe, A.M., Mackie, A.R., Richmond, P., Robins, M.M., Stability of oil-in-water emulsions - The effect of dispersed phase and polysaccharide on creaming, *Colloids Surf.*, **1986**, 20, 65
- Hall, I.S., Dawson, E., Effect of Air Film in Emulsification *Ind. Eng. Chem.*, **1940**, 32, 415
- Halling, P.J., Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1981**, 15, 155
- Hamaker, H.C., The London-Van der Waals attraction between spherical particles, *Physica*, **1937**, 4, 1058
- Harper, J.M., *Extrusion of food* vol. I, Boca Ratón, E.E.U.U., CRC Press, **1981**
- Hay, J.N., Physical ageing in polymer blends, *The glassy state in foods*, Blanshard, J.M.V., Lillford, P.L. (eds.), **1993**, 269
- Heijboer, J.; Molecular origin of relaxation in polymers, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1976**, 279, 104
- Heller, W., Pugh, T.L., Steric protection of hydrophobic colloidal particles by adsorption of flexible macromolecules, *J. Chem. Phys.*, **1954**, 22, 1778
- Helmholtz, HLF, Studies of electric boundary layers, *Ann. Phys. Chem.*, **1879**, 7, 337
- Hendrix, W.P., Orr, C., Automatic sedimentation size analysis instrument, en *Particle Size Analysis*, Groves, M.J., Wyatt-Sargent, J.L. (eds.), Society for Analytical Chemistry, Londres, **1972**
- Hibbert, D.J., Howe, A.M., Mackie, A.R., Purdy, P.W. Robins, M.M., *Food Emulsions and Foams*, Dickinson, E. (ed.), Royal Society of Chemistry, Londres, **1987**

- Hiemenz, P.C., *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Dekker, Nueva York, **1986**
- Hirano, H., Kagawa, H., Kamata, Y. y Yamauchi, F. , Structural homology among the major 7S globulin subunits of soybean seed storage proteins, *Phytochemistry*, 26, **1987**, 41
- Hirtzel, C.S., Rajagopalan, R., *Colloid Phenomena: Advances Topics*, Noyes Data Corporation, Park Ridge, N.J.,**1985**
- Hogg, R., Healy, T. W., Fuerstenau, D.W., Mutual coagulation of colloidal dispersions, *Trans. Faraday Soc.*, **1966**, 62, 1638
- Hoseney, R.C., Zeleznal, K., Lai, C.S., *Wheat gluten: a glassy polymer*. American Association of Cereal Chemists **1986**, 63, 3, 285
- Hoseney, R.C., Rogers, D.E., The formation and properties of wheat flour doughs, *Food Science and Nutrition*, **1990**, 29, 2, 73
- Huang, H., Kokini, J.L., *Progress and Trends in Rheology IV*, Gallegos, C. (ed.), **1994**, 239
- Hudson, N.E., Ferguson, J. *Progress an Trends in Rheology IV*. (Eds) Gallegos C, Seinkopff, Carmstad, **1994**, 432
- Hunt, J.A., Dalgleish, D.G., Effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate, *Journal of Food Science*, **1994**, 59, 2131
- Hunt, J.A., Dalgleish, D.G., Heat stability of oil-in-water emulsions containing milk proteins: Effect of ionic strength and pH, *Journal of Food Science*, **1995**, 60, 1120
- Hunter, R.J., *Foundations of Colloid Science*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, **1986**
- Isono, Y., Itoh, K., Komiyatani, T., Fujimoto, T., Differential dynamic modulus of polyisobutylene with high-molecular-weight .1. Single-step large shearing deformations, *Macromolecules*, **1991**, 24, 4429
- Israelachvili, J.N., Wennerstrom, H., Role of hydration and water-structure in biological and colloidal interactions, *Nature*, **1996**, 379, 219
- Israelachvili, J.N., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Londres, **1992**
- Jones, D.M., Walters, K., Williams, P.R., On the extensional viscosity of mobile polymer systems. *Rheol. Acta* **1987**, 26, 20
- Kabalnov, A.S., Shchukin, E.D., Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability, *Advances in Colloid and Interface Science*, **1992**, 38, 69
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P., Miller, S.S., Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis, *Trends in Food Science and Technology*, **1995**, 6, 180
- Kalichevsky, M.T., The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR *Carbohydrate polymers*, **1992**, 18, 77
- Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz, E.M.; Blanshard, J.M.V. Glass transition of gluten 2: the effects of lipids and emulsifiers, *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**,1, 267
- Kalichevsky, M.T.; Blanshard, J.M.V.; Tokarczuk, P.F. Effect of water content and sugars on the glass transition of casein sodium caseinate. *Int. J. of Food Sc. And Techn.* **1993a**, 28, 139
- Kalichevsky, M. T., Blanshard, J.M.V., Marsh, R.D.L., Application of mechanical spectroscopy to the study of glassy biopolymers and related systems, en *The glassy state in foods*, editado por Blanshard, J.M.V. & Lillford, P.L., Nottingham University Press: Nottingham, **1993b**, 133

- Karbstein, H. and Schubert, H., Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions, *Chemical Engineering and Processing*, **1995**, 34, 205
- Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N., Kobayashi, K., Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation, *Agric.Biol. Chem.*, 47, **1983**, 33
- Kauzmann, W., The nature of the glassy state and the behaviour of liquids at low temperatures, *Chem. Rev.*, **1948**, 43, 219
- Kaye, A., Non-Newtonian Flow in Incompressible Fluids, Part I: A General Rheological Equation of State; Part II: Some Problems in Steady Flow, College of Aeronautics, Cranford, Reino Unido, **1962**, Nota 134
- Kerstens, S., Murray, B.S., Dickinson, E., Confocal microscopy of heat-induced aggregation and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin in presence of non-ionic surfactant, *Food Hydrocoll.*, **2004**, 19, 3, 625
- Kim, H. J., Decker, E. A., McClements, D., Role of postadsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH, *Langmuir*, **2001**, 18, 20, 7577
- Kinsella, J.E. Functional properties of food proteins: a review, *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.*, **1976**, 7, 219
- Kinsella, J.E., Functional properties of soy proteins, *J.Am. Oil. Chemists'Soc*, 56, **1979**, 242
- Kinsella, J.E., Relationships between structure and functional properties of food proteins, en *Food Protein*, Fox, P.F., Condon J.J., (eds.), Londres: Applied Science Publisher, **1982**
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Proteins in whey: chemical, physical and functional properties, en *Advances in food and nutrition research*, Kinsella J.E. (ed.), Academic Press, **1989**, 343
- Kinsman, S., Electrical resistance method for automated counting of particles *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1969**, 158, 703
- Kokini, J.L., Dickie, A.M., An attempt to identify and model transient viscoelastic flow of fluid and semi-solid food materials, *J. Texture Stud.*, **1981**, 12, 539
- Kokini, J.L., Cocero, A.M., Madeka, H., State diagrams help predict rheology of cereal proteins, *Food Technol.*, **1995**, 49, 10, 74
- Koshiyama, I., Purification of the 7S component of soybean proteins, *Agric. Biol. Chem.*, **1965**, 29, 885
- Koshiyama, I., Fukushima, D., Identification of the 7S globulin with  $\beta$ -conglycinin in soybean seeds, *Phytochemistry*, **1976a**, 15, 157
- Koshiyama, I., Fukushima, D., Purification and some properties of  $\beta$ -conglycinin in soybean seeds, *Phytochemistry*, **1976b**, 15, 161
- Kulmyrzaev, A., Schubert, H., Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions, *Food Hydrocoll.*, **2004**, 18, 13
- Langton, M., Jordansson, E., Altskär, A., Sorensen, C., Hermansson, A.M. Microstructure and image analysis of mayonnaises, *Food Hydrocoll.*, **1999**, 13, 113
- Lapasin, R., Metodi per la caratterizzazione dei materiali tissotropici, *L'a industria della Vernice*, **1980**, 34, 5, 16
- Larson, R.G., *Constitutive Equations for Polymer Melts and Solutions*, Butterworths, Nueva York, **1988**

- Laun, H.M., Description of nonlinear shear behavior of a low-density polyethylene melt by means of an experimentally determined strain dependent memory function, *Rheol. Acta*, **1978**, 17, 1
- Laye P.G., Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry, en *Principles of thermal analysis and calorimetry*, Haines P.J. (ed.), Royal Society of Chemistry, **2002**, 55
- LeMeste, M., Simatos, D., Gervais, P., Interaction of water with food components, en *Ingredient interactions - Effects on food quality*, Gaonkar, A. (ed.), **1995**, 85
- Lee, B., Richards, F.M., The interpretation of protein structure: Estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.*, **1971**, 55, 379
- Lefebvre J, Popineau, Y, Cornec, M, Viscoelastic properties of gluten proteins: influence of prolamin composition and of temperature, *Gluten Proteins*, Association of Cereal Research, 1994, Detmold, 180
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., *Principles of Biochemistry*, 2ª ed., Worth Publishers, Nueva York, **1993**
- Lequeux, F., Hebraud, P., Munch, J.P., Pine, D., *Proceedings of the II World Congress on Emulsion*, EDS, Burdeos, **1997**
- Liang, R.F. Mackley, M.R., Rheological characterization of the time and strain dependence for polyisobutylene solutions *J. N-newtonian Fluid Mech.*, **1994**, 52, 387
- Li-Chan, E. C. Y., Nakai, S., Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme, *J. Agric. Food Chem.* **1991a**, 39, 1238
- Li-Chan, E. C. Y., Nakai, S., Importance of hydrophobicity of proteins in food emulsions, *Microemulsions and emulsions in foods*, Washington, ACS, **1991b**, 193
- Li-Chan, E. C., Separation and purification, en *Food proteins. Properties and characterization*, Nakai, S. and Modler, H. W. (eds.), Nueva York, **1996**, 42
- Lips, A., Campbell, I.J., and Pelan, E.G., Aggregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers, en *Food Polymers, Gels and Colloids*, Dickinson, E., Ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**, 1
- Lourdin, D., Colonna, P., Brownsey, G.J., Noel, T.R., Ring, S.G., Structural relaxation and physical ageing of starchy materials, *Carbohydrate Research*, **2002**, 337, 827
- Luyten, H., Vereijken J., Buecking, M., Using proteins as additives in foods: an introduction, en *Proteins in Food Processing*, Yada, R.Y, (ed), CRC Press, **2004**, cap. 18
- Lyklema, J., Principles of the stability of lyophobic colloidal dispersions in non-aqueous media, *Adv., Colloid Sci.*, **1968**, 2, 65
- Ma, L., Barbosa-Cánovas, G.V., Rheological characterization of mayonnaise. Part I : Slippage at different oil and xanthan gum concentrations, *J. Food Eng.*, **1995**, 25, 397
- MacRitchie, F., Lafiandra, D., Structure-function relationships of wheat proteins, en *Functional properties of food macromolecules*, Mitchell, J.R., Ledward, D.A. (eds.) Elsevier Applied Science, Londres, **1997**, 293
- Madeka, H., Kokini, J.L., Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein: development of a preliminary state diagram, *Cereal Chem.*, **1996**, 73, 4, 433
- Madiedo, J.M., *Caracterización Reológica de Emulsiones Mediante Espectros de Relajación y Retardación*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **1996**

- Madiedo, J.M., Berjano, M., Guerrero, A., Muñoz, J., Gallegos, C., Influence of surfactant concentration and temperature on the flow behavior of sucrose oleate aqueous systems. *Colloids and Surfaces*, **1994a**, 82, 59
- Madiedo, J.M., Muñoz, J., Berjano, M., Gallegos, C., en *Progress and Trends in Rheology, IV*, Gallegos, C. (ed.), Steinkopff, Darmstadt, **1994b**
- Madiedo, J.M., Gallegos, C., Rheological characterization of oil-in-water food emulsions by means of relaxation and retardation spectra, *Applied Rheol.*, **1997**, 7, 161
- Madiedo, J.M., Franco, J.M., Valencia, C., Gallegos, C., Modeling of the non-linear rheological behavior of a lubricating grease at low-shear rates, *J. Tribology-Trans. ASME*, **2000**, 122, 3, 590
- Mahanty, J. and Ninham, B.W., *Dispersion Forces*, Academic Press, Nueva York, 1976
- Malhotra, A., Coupland, J.N., The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates, *Food Hydrocoll.*, **2004**, 18, 1, 101
- Marrucci, G., Remarks on the viscosity of polymeric liquid crystals, *Proc. IX Intl. Congress on Rheology*, México, **1984**, 1, 441
- Martín, R., Galán, M., Muñoz, M.J., Rodríguez, M., en *Progress and Trends in Rheology IV*, Gallegos, C. (ed.), Steinkopff, Darmstadt, **1994**, 614
- Mas, R., Magnin, A., Rheology of colloidal suspensions: case of lubricating greases, *J. Rheol.*, **1994**, 38, 889
- Mason T.G., Lacasse, M.D., Levine, D., Grest, G.S., Bibette, J., Weiltz, D.A., Osmotic Pressure and Viscoelastic Shear Moduli of Monodisperse Emulsions, *Phys. Rev.*, **1997**, 56, 3150
- Matsumura, Y., Kang, H.J., Sakamoto, H., Motoki, M., Mori, T., Filler Effects of Oil Droplets on the Viscoelastic Properties Of Emulsion Gels, *Food Hydrocoll.*, **1993**, 7, 227
- Maxwell, J.C., On the dynamical theory of glasses, *Phil. Trans. Royal. Soc.*, Londres, **1867**, A157, 49
- McClements, D.J., *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, Boca Raton, FL: CRC Press, **1999**
- Mejri, M., Rogé, B., BenSouissi, A., Michels, F., Mathlouthi, M., Effects of some additives on wheat gluten solubility: A structural approach, *Food Chem.*, **2005**, 92, 1, 7
- Melik, D.H., Fogler, H.S., Fundamentals of colloidal stability in quiescent media, en *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 3, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, **1988**, cap. 1
- Mellander, O., Elektrophoretische Untersuchung von Casein. *Biochem. Z.* **1939**, 300, 240
- Micard, V., Morel, N. H., Bonicel, J., Guilbert, S., Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation, *Polymer*, **2001**, 42, 477
- Mita T., Yamada, K., Matsumoto, S., Yonezawa, D., *J. Texture Stud.*, **1973**, 4, 41
- Mitchell, J.R., Water and food macromolecules, en *Functional properties of food macromolecules*, Mitchell, J.R., Ledward, D.A. (eds.) Elsevier Applied Science, Londres, **1997**
- Mizuno, A., Mitsuiki, M., Motoki, M., Effect of crystallinity on the glass transition temperature of starch, *J. of Agric. and Food Chem.*, **1998**, 46, 98
- Mizuno, A., Mitsuiki, M., Motoki, M., Glass transition temperature of casein as affected by transglutaminase, *J. of Food Science*, **1999**, 64, 5, 796

- Mizuno, A., Mitsuiki, M., Motoki, M., Ebisawa, K., Suzuki, E., Relationship between the glass transition of soy protein and molecular structure, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3292
- Mohammed, Z.H., Hill, S.E., Mitchell, J.R., Covalent Crosslinking in heated protein systems, *J. of Food Science*, **2000**, 65, 2, 221
- Molina Ortiz, S.M., Puppo, M.C., Wagner, J.R., Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates–carrageenan systems, *Food Hydrocoll.*, **2004**, 18, 6, 1045
- Morales, A., Kokini, J.L., Glass transition of soy globulins using differential scanning calorimetry and mechanical spectrometry. *Biotechnol. Prog.*, **1997**, 13, 624
- Morel, M.H., Bonicel, J., Micard, V., Guilbert, S. Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfite-treated wheat gluten during aging at various temperatures and relative humidities, *J. Agr. Food Chem.*, **2000**, 48, 186
- Mori, T., Utsumi, S., Inaba, H., Kitamura, K. y Harada, K. , Differences insubunit composition of glycinin among soybean cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 20
- Moros, J.E., Reología de emulsiones alimentarias estabilizadas con yema de huevo deshidratada de bajo contenido en colesterol, *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla, **2000**
- Moros, J.E., Cordobés, F., Franco, J.M., Gallegos, C., Enhancement of gel strength by application of thermal treatments in highly flocculated emulsions, *Food Hydrocoll.*, **2003**, 17, 199
- Morr, C.V., Ha, E.Y.W., Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties, **1993**, *CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.*, 33, 431
- Morris, E. R., Cutler, A. N., Ross-Murphy, S. B., Rees, D. A., Price, J. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions, *Carbohydrate Polymers*, **1981**, 1, 5
- Morris, C., *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, San Diego, Academic **1992**, 1742
- Mulder, H., Walstra, P., *The Milk Fat Globule*, Pudoc, Wageningen, **1974**
- Mulhivill, D.M., Kinsella, J.E., Gelation characteristics of whey proteins and p-lactoglobulin, *Food Tech.*, **1987**, 41, A, 102
- Napper, D.H., Steric stabilization, *J. Colloid Interface Sci.*, **1977**, 58, 390
- Navarro, A.S., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., Correlation between transient rotational viscometry and a dynamic oscillatory test for viscoelastic starch based systems, *J. Texture Stud.*, **1997**, 28, 365
- Nawar, W.W., Lipids, in *Food Chemistry*, 3<sup>a</sup> ed., Fennema, O.R. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, **1996**, 225
- Nielsen, N. C., The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1985**, 62, 1680
- Nielsen, N. C., Dickinson, C. D., Cho, T. J., Thanh, V. H., Scallion, B. J., Fischer, R.L., Sims, T. L., Drews, G. N., Goldberg, R. B. , Characterization of the glycinin gene family in soybean, *Plant Cell*, **1989**, 1, 313
- Noel, T.R., Parker, R., Ring, S.G., Tartham, A.S., The glass transition behaviour of wheat gluten proteins, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1995**, 17, 2, 81
- Ogale, A.A., Cunningham, P., Dawson, P.L., Acton, J.C., Viscoelastic, thermal, and microstructural characterization of soy protein isolate films, *J. Food Science*, **2000**, 65, 4, 672

- Okubo, K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T. y Kubo, S., Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 99
- Oosterbroek, M., Mellema, J., Linear viscoelasticity in emulsions. I. The effect of an interfacial film on the dynamic viscosity of nondilute emulsions, *J. Colloid Interface Sci.*, **1981**, 84, 14
- Orr, C., Determination of particle size, en *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 3, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, **1988**, cap. 3
- Ostwald, Wo, Beitr ige zur Renntnis der Emulsionen, *Kolloid-Z*, **1910a**, 6, 103
- Ostwald, Wo, Beitrage zur Kolloidchemie des Kautschuks, II. Weitere Bemerkungen zur Theorie der Vulkanisation, *Kolloid-Z*, **1910b**, 7, 64
- Otsubo, Y., Prud'homme, R.K., Effect of Drop Size Distribution on the Flow Behaviour of Oil-in-Water Emulsions, *Rheol. Acta*, **1994**, 33, 29
- Pal, R., Rheology of highly flocculated oil in water emulsions, *Chem. Eng. Commun.*, **1990**, 98, 211
- Pal, R., Dynamics of flocculated emulsions, *Chem. Eng. Sci.*, **1997**, 52, 1177
- Pal, R., Rheology of polymer thickened emulsions, *Journal of Rheology*, **1992**, 36, 1245
- Pal, R., Yan, Y., Masliyah, J.H., Rheology of Emulsions, en *Emulsions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Schramm, L.L. (ed.), American Chemical Society, Washington, D.C., **1992**
- Pal, R., Effect of Droplet Size on the Rheology of Emulsions, *AIChE J.*, **1996**, 42, 3181
- Pal, R., Rhodes, E., Viscosity/Concentration Relationships for Emulsions, *J. Rheol.*, **1989**, 33, 1021
- Pandolfè, W.D., Homogenizers, en *Encyclopedia of Food Science and Technology*, John Wiley & Sons, Nueva York, **1991**, 1413
- Pandolfè, W.D., Effect of premix condition, surfactant concentration and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization, *Journal of Dispersion Science and Technology*, **1995**, 16, 633
- Papanastasiou, A.C., Scriven, L.E., Macosko, C.W., An Integral Constitutive Equation for Mixed Flows: Viscoelastic Characterization, *J. Rheol.*, **1983**, 27, 387
- Partal, P., Guerrero, A., Berjano, M., Muñoz, J.M., Gallegos, C., Flow behavior and stability of oil-in-water emulsions stabilized by a sucrose palmitate, *J. Texture Stud.*, **1994**, 25, 331
- Partal, P., Martínez-Boza, F., Conde, B., Gallegos, C., Rheological characterisation of synthetic binders and unmodified bitumens, *Fuel*, **1999a**, 78, 1, 1
- Partal, P., Guerrero, A., Berjano, M., Gallegos, C., Transient flow of O/W sucrose palmitate emulsions, *J. Food Eng.*, **1999b**, 41, 1, 33
- Pearson, A.M., Soy proteins, en *Developments in food proteins*, Hudson B.J.W., (ed.), Londres, Elsevier Applied Science, **1982**, 67
- Perrin, P., Droplet-droplet interactions in both direct and inverse emulsions stabilized by a balanced amphiphilic polyelectrolyte, *Langmuir*, **2000**, 16, 881
- Petrie, C.J.S., *Elongational Flows*, Pitman, Londres, **1979**
- Phipps, L.W., *The High Pressure Dairy Homogenizer*, Technical Bulletin 6, National Institute of Research in Dairying Reading, Plesset, M.S. y Saffren, M.M. (eds.), Jet Propulsion Laboratory, Pasadena, **1985**

- Plattner, B., Strahm, B., Rausch, K., The Phase Transition Analyzer™ and its impact on extrusion Processing of foodstuffs, *ASAE meeting paper No. 01-6067*, St. Joseph, Mich.: ASAE , **2001**
- Plucinski, J., Gupta, R.K., Chakrabarti, S., Wall slip of mayonnaises in viscometers, *Rheol. Acta*, **1998**, 37, 256
- Pons, R., Solans, C., Tadros, T.F, Rheological behavior of highly concentrated oil-in-water (o/w) emulsions, *Langmuir*, **1995**, 11, 1966
- Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C., Bérot, S., Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration, *J. of Cereal Science*, **2002**, 35, 3, 327
- Pouplin, M., Redl, A., Gontard, N., Glass transition of wheat gluten plasticized with water, glycerol, or sorbitol, *J. Agr. Food Chem.* **1999**, 47, 538
- Price D. M., Thermomechanical, Dynamic Mechanical and Dielectric Methods, en *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, Haines, P. J. (ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2002**, 94
- Princen, H.M. , Rheology of foams and highly concentrated emulsions, *J Colloid Int. Sci*, **1983**, 91, 1, 160
- Princen, H.M., Kiss, A.D., Rheology of foams and highly concentrated emulsions. *J. Colloid Int. Sci.*, **1986**, 112, 427
- Privalov, P.L., Griko, Y.V., Venyaminov, Y.S., Kutysenko, V.P., Cold denaturation of myoglobin, *J.Mol. Biol.*, **1986**, 190, 487
- Quemada, D., Flaud, P., Jezequel, P.H. *Proc. IX Intl. Congress on Rheology*, México, **1984**, 3, 441
- Race, S.W., Improved product quality through viscosity measurement, *Food Technology*, **1991**, 45, 86.
- Rahalkar, R.R., Viscoelastic properties of oil water emulsions, en *Viscoelastic Properties of Foods*, Rao, M.A., Steffe, J.F. (eds.), Elsevier Applied Science, Londres, **1992**, 317
- Rao, V.N.M., Delaney, R.A.M., Skinner, G.E. (1995). Rheological properties of solid foods, in *Engineering Properties of Foods*, 2ª ed., Rao, M.A., Rizvi, S.S.H., (eds.), Marcel Dekker, Nueva York, **1995**, Cap. 2
- Rao, M.A., Rheological properties of fluid foods, en *Engineering Properties of Foods*, 2ª ed., Rao, M.A., Rizvi, S.S.H. (eds.), Marcel Dekker, Nueva York, **1995**, Cap. 1
- Rees, L.H., What to know about homogenizers - also colloid mills . when are they used and which is best for your operation. Here are facts you should consider with examples of typical processes, *Food Eng.*, **1967**, 39, 69
- Regenstein, J. M., Regenstein, C. E., Food Protein Chemistry. An Introduction for Food Scientists, Orlando, Academic Press, **1984**
- Rehage, H., *Interesting Correlations between the rheology properties of rod-shaped micelles and dye assemblies*, en *ACS Symposium Series*, Herb C.A. y R.K. Prudhomme (eds.), , **1994**, 578, 63
- Reiner, M., *Deformation, Strain and Flow*. (eds) Lewis, Londres, **1960**
- Renkema, J.M.S., Knabben, J.H.M., van Vliet, T., Gel formation by beta-conglycinin and glycinin and their mixtures, *Food Hydrocoll.*, **2001**, 15, 4-6, 407
- Richardson, E.G., The formation and flow of emulsion, *J. Colloid Sci.*, **1950**, 5, 404
- Richardson, R.K., Ross-Murphy, S.B., Mechanical properties of globular protein gels: I. Incipient gelation behaviour, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1981a**, 3, 315

- Richardson, R.K., Ross-Murphy, S.B., Mechanical properties of globular proteins gels: II Concentration, pH concentration, pH and ionic strength dependence, *Br. Poly. J.*, **1981b**, 13, 11
- Rivas, H.J., Sherman, P., Soy and meat proteins as food emulsion stabilizers. 1. Viscoelastic properties of corn oil-in-water emulsions incorporating soy or meat protein, *J. Text. Studies*, **1983a**, 14, 251
- Rivas, H.J., Sherman, P., Soy and meat proteins as food emulsion stabilizers. 2. Influence of emulsification temperature, NaCl and methanol on the viscoelastic properties of corn oil-in-water emulsions incorporating acid precipitated soy protein, *J. Text. Studies*, **1983b**, 14, 267
- Rivas, H.J., Sherman, P., Soy and meat proteins as food emulsion stabilizers. 3. The influence of soy and meat protein fractions on oil-in-water interfacial tension, *J. Dispers., Sci. Technol.*, **1984a**, 5, 143
- Rivas, H.J., Sherman, P., Soy and meta proteins as food emulsion stabilizers. 4. The stability and interfacial rheology of O/W emulsions stabilized by soy and meat proteins fractions, *Colloids Surfaces*, **1984b**, 11, 155
- Rizvi, S. Rheological properties of comminuted meat systems. *Food Technol.*, **1981**, 35, 238
- Robinson, S.K., Practice in mayonnaise manufacture, *Am. Food J.*, **1924**, 19, 185
- Rollema, H.S., Casein association and micelle formation, en *Advanced Dairy Chemistry, vol. 1, Proteins*, Fox, P.F., ed., Elsevier Applied Science, Londres, **1992**, 111
- Roos, Y., Characterization of food polymers using state diagrams, *J. of Food Eng.* **1995**, 24, 339
- Roos, Y., Karel, M., Water and molecular-weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions, *J. Food Science*, **1991**, 56, 6, 1676
- Sánchez, M.C., Berjano, M., Guerrero, A., Brito, E., Gallegos, C., Evolution of the microstructure and rheology of o/w emulsions during the emulsification process, *Can. J. Chem. Eng.*, **1998**, 76, 479
- Sánchez, M.C., Berjano, M., Guerrero, A., Gallegos, C., Evolución de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua durante el proceso de emulsificación y almacenamiento, *Grasas y Aceites*, **2000**, 51, 230
- Sartor, G., Johari, G.P., Polymerization of a vegetable protein, wheat gluten, and the glass-softening transition of its dry and reacted state, *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 19692
- Schenkel, J.H. and Kitchner, J.A., A test of the Derjaguin–Verwey–Overbeek theory with a colloidal suspension, *Transactions of the Faraday Society*, **1960**, 56, 161
- Sherman, P., *Industrial Rheology with particular Rference to Foods, Pharmaceuticals and Cosmetics*, Academic Press, Londres, **1970**
- Sherman, P., Rheological Properties of Emulsions, en *Encyclopedia of Emulsion technology*, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, **1983**
- Singh, H., A study of changes in wheat protein during bread baking using SE-HPLC, *Food Chemistry* 90, 2005, 1-2, 247
- Singh, N., Smith, A.C., Rheological behaviour of different cereals using capillary rheometry, *Journal of Food Engineering*, **1999**, 39, 2, 203
- Schram, G, A Practical Approach to Rheology and Rheometry, Haake, Karlsruhe, **1994**
- Schubert, H. and Armbruster, H., Principles of formation and stability of emulsions, *International Chemical Engineering*, **1992**, 32, 14
- Slade, L., Levine, H., Effects of glass transitions on processing and storage, en *The glassy state in foods*, Blanshard, J.M.V., Lillford, P.L. (eds.) **1993**, 35

- Smart, M.G., Fulcher, R.G., and Pechak, D.G., Recent developments in the microstructural characterization of foods, en *Characterization of Foods: Emerging Techniques*, Gaonkar, A.G., Ed., Elsevier, Amsterdam, **1995**, cap. 11
- Soskey, P.R., Winter, H.H., Large step shear strain. experiments with parallel-disk rotational rheometers, *J. Rheol.*, **1984**, 28, 625
- Sperling, L.H., Introduction to Physical Polymer Science, Wiley, Nueva York, **1986**
- Srinivasan, M., Singh, H., Munro, P. A., The effect of sodium chloride on the formation and stability of sodium caseinate emulsions, *Food Hydrocoll.*, **2000**, 14, 5, 497
- Staswick, P. E., Hermodson, M. A., Nielsen, N. C., Identification of the cysteines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits, *J.Biol. Chem.*, **1984**, 259, 13431
- Stern, O., Zur Theorie der Electrolytischen Doppelschicht, *Z. Elektrochem.*, **1924**, 30, 508
- Stone, H.A., Dynamics of drop deformation and breakup in viscous fluids, *Annual Review of Fluid Mechanics*, **1994**, 26, 65
- Sugisaki, M.; Suga, H.; Seki, S. Calorimetric study of glassy state.4. Heat capacities of glassy water and cubic ice, *B. Chem. Soc. Jap.*, **1968**, 41, 11, 2591
- Swaigood, H. E., en *Developments in Dairy Chemistry: 1, Proteins*(Fox, P. F., ed.), Applied Science Publishers, Londres y Nueva York, **1982**, 1
- Swaigood, H.E., Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 1 Proteins, 3<sup>a</sup> ed, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (eds.), Kluwer Academic Plenum Publishers, Nueva York, **2003**, 139
- Tadros, T.F., Use of viscoelastic measurements in studying interactions in concentrated dispersions, *Langmuir*, **1990**, 6, 2
- Tadros, T.F., Fundamental principles of emulsion rheology and their applications, en *First World Congress on Emulsion*, IV, EDS, Paris, **1993**, 237
- Tadros, T.F., Fundamental principles of emulsion rheology and their applications, *Colloids Surf. A*, **1994**, 91, 30
- Tadros, T.F., Vincent, B., Liquid/liquid interfaces, en *Encyclopedia of Emulsion Technology*, I, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, **1983**
- Takahashi, M., Isaki, T., Takigawa, T., Masuda, T., Measurement of biaxial and uniaxial extensional flow behavior of polymer melts at constant strain rates, *J. Rheol.*, **1993**, 37, 5, 827
- Taylor, P., Ostwald ripening in emulsions, *Colloids and Surfaces A*, **1995**, 99, 175
- Thanh, V.H., Shibasaki, K., Beta-conglycinin from soybean proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, 490, 370
- Thanh, V. H., Shibasaki, K., Major proteins of soybean seeds. Subunitstructure of  $\beta$ -conglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 692
- Thanh, V. H. and Shibasaki, K., Major proteins of soybean seeds. Reversible and irreversible dissociation of  $\beta$ -conglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, 27, **1979**, 805
- Tatham, A. S., Shewry, P. R., Field, J. M., Conformational Studies of the Repetitive Domains of the Cereal Prolamins, en *Gluten Proteins* (Proc. 4th Int. Wheat Gluten Workshop) Bushuk, W., Tkachuk, R. (eds.). AACC, Minnesota **1990**, 376
- Thomson, *Application of Dynamics to Physics and Chemistry*, McMillan and Co., Londres, **1888**

- Tilley, K.A., Benjamin, R.E., Bagorogoza, K.E., Okot-Kotber, B.M., Prakash, O., Kwen, H., Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function, *J. Agric., Food. Chem.*, **2001**, 49, 2627
- Tornberg, E., Functional characteristics of protein stabilized emulsions: emulsifying behaviour of proteins in a valve homogenizer, *J. Food Sci.*, 29, **1978** 867
- Toufeili, I., Lambert, I.A., Kokini, J.L., Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of gluten: development of a preliminary state diagram, *Cereal Chemistry*, **2002**
- Trouton, F.T., On the coefficient of viscous traction and its relation to that of viscosity., *Proceedings of the Royal Society of London*, 1906, 426
- Tschoegl, N.N. *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behaviour*, Springer-Verlag, Berlín, (eds.), **1989**
- Utsumi, S., Kim, C. S., Kohno, M., Kito, M. , Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits, *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, 51, 3267
- Utsumi, S., Matsumura, Y., Mori, T. , Structure-function relationships of soy proteins, en *Food Proteins and Their Applications*, Damodaran, S., Paraf, A. (eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, **1997**, 257
- van Wazer, J.R., Lyons, J.W., Kim, K.Y., Corwell, R.E. Viscosity and Flow Measurements. (Eds) John Wiley and Sons, Nueva York, **1963**
- Voigt, W., *Ann. Phys.*, **1892**, 47, 671
- Wagner, M.H., Analysis of time-dependent non-linear stress-growth data for shear and elongational flow of a low-density branched polyethylene melt, *Rheol. Acta*, **1976**, 15, 136
- Wagner, M.H., Raible, T., Meissner, J., Tensile stress overshoot in uniaxial extension of a LDPE Melt, *Rheol. Acta*, **1979**, 18, 427
- Wagner, J.R., Guéguen, J. Surface functional properties of native, acid treated and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *J. of Agric. and Food Chem.*, **1999**, 47, 6, 2173
- Walstra, P., Oortwijn, H., de Graaf, J. J., Studies on milk fat dispersion. I.Methods for determining globule-size distribution. *Neth. Milk Dairy J.*, **1969**, 23, 12
- Walstra, P., Oortwijn, H., Estimating globule-size distribution of oil-in-water emulsions by coulter counter, *J. Colloid Interface Sci.*, **1969**, 29, 3, 424
- Walstra, P., Oortwijn, H., Effect of globule size and concentration on creaming in pasteurized milk, *Neth. Milk Dairy J.*, **1975**, 29, 263
- Walstra, P., Formation of emulsions, en *Encyclopedia of Emulsion Technology*, I, Becher, P. (ed.) Marcel Dekker, Nueva York, **1983**, 129
- Walstra, P., Principles of emulsion formation, *Chemical Engineering Science*, **1993**, 48, 333
- Walstra, P., Emulsion stability, in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 4, Becher, P., Ed., Marcel Dekker, Nueva York, **1996a**, cap. 1
- Walstra, P., Disperse systems: Basic considerations, in *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, Nueva York, **1996b**, cap. 3
- Walstra, P. Y Smulders, P., *Formation of Emulsions*. 2<sup>nd</sup> World Congress on Emulsions, Burdeos, **1997**
- Walters, K., *Rheometry*, Halsted Press, Wiley, Nueva York, **1975**

- Wang, Y., Belton, P.S., Bridon, H., Garanger, E., Wellner, N., Parker, M.L., Grant, A., Feillet, P., Noel, T.R., Physicochemical Studies of Caroubin: A Gluten-like Protein, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 3414
- Waniska, R.D., Kinsella, J.E., Surface properties of beta(c)lactoglobulin: adsorption and rearrangement during film formation, *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 1143
- Weegels, P.L., de Groot, A.M.G., Verhoek J.A., Hamer R.J., Effects on Gluten of Heating at Different Moisture Contents. II. Changes in Physico-Chemical Properties and Secondary Structure, *J. Cereal Sci.*, **1994**, 19, 1, 39
- Weegels, P.L., Hamer, R. J., Temperature-induced changes of wheat products, en *Interactions: The keys to cereal quality*, Hamer, R. J., Hosney, R. C. (eds.), American Association of Cereal Chemist Inc., **1998**, cap. 5, 95
- Weese, J., A regularization method for nonlinear ill-posed problems, *Comput. Phys. Commun.*, **1992**, 269, 99
- Wetton, R.E., Morton, M.R., Rowe, A.M. Comparison of DMTA and DETA, *Am. Lab.*, **1986**, 18, 1, 96
- White, G.W., Cakebread, S.H., The glassy state in certain sugar-containing food products, *J. Food Technol.*, **1966**, 1, 73
- White, J.L., Han, M.H., Nakajima, N., Brzoskowski, R., The Influence of Materials of Construction of Biconical Rotor and Its Compounds and Considerations of Slippage, *J. Rheol.*, **1991**, 35, 167
- Wiechert, W., *J. Appl. Mech.*, **1951**, 18, 293
- Williams, A., Janssen, J.J.M., and Prins, A., Behaviour of droplets in simple shear flow in the presence of a protein emulsifier, *Colloids and Surfaces A*, **1997**, 125, 189
- Wu, S., Chain structure and entanglement, *J Polym Sci*, **1989**, 27, 723
- Yamauchi, F., Sato, M., Sato, W., Kamata, Y., Shibasaki, K., Isolation and identification of a new type of  $\beta$ -conglycinin in soybean globulins, *Agric.Biol. Chem.*, **1981**, 45, 2863
- Yoshimura, A.S., Prud'homme, R.K., Prigen, H.M., Kiss, A.D., A comparison of techniques for measuring yield stresses. *J. Rheology.*, **1987**, 31, 699
- Yoshimura, A., Prud'homme, R.K., Wall Slip Corrections for Couette and Parallel Disk Viscometers, *J. Rheol.*, **1988a**, 32, 53
- Yoshimura, A., Prud'homme, R.K., Wall Slip Effects on Dynamic Oscillatory Measurements, *J. Rheol.*, **1988b**, 32, 575
- Yost, R.A., Kinsella, J.E., Microstructure of whey-protein isolate gels containing emulsified butterfat droplets, *J. Food Sci.*, **1992**, 57, 4, 892
- Yousif, A., Alghzawi, H.M., Processing and characterization of carob powder *Food Chem.*, **2000**, 6, 283