



ESTUDIO REOLÓGICO Y MICROESTRUCTURAL DE
EMULSIONES Y GELES DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE
CANGREJO

ALBERTO ROMERO GARCÍA

Sevilla, 3 de noviembre de 2008



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO REOLÓGICO Y MICROESTRUCTURAL DE
EMULSIONES Y GELES DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE
CANGREJO

Tesis Doctoral presentada por D. Alberto Romero García.

Dirigida por los Doctores:

D. Antonio Francisco Guerrero Conejo y D. Felipe Cordobés Carmona

Los Directores

El Doctorando

Fdo. D. Antonio Francisco Guerrero Conejo Fdo. D. Felipe Cordobés Carmona Fdo. D. Alberto Romero García

Sevilla, 10 de noviembre de 2008

D. ANTONIO FRANCISCO GUERRERO CONEJO Y D. FELIPE
CORDOBÉS CARMONA, PROFESORES DE LA UNIVERSIDAD DE
SEVILLA

INFORMAN:

Que la presente Memoria titulada “ESTUDIO REOLOGICO Y MICROESTRUCTURAL DE EMULSIONES Y GELES DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE CANGREJO” presentado por D. ALBERTO ROMERO GARCIA para optar al grado de Doctor con Mención Europea, ha sido realizada en su mayoría en el Departamento de Ingeniería Química de esta Universidad bajo nuestra dirección, por lo que autorizamos su presentación.

Y para que conste y en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente en Sevilla, a 10 de noviembre de 2008.

D. Antonio Francisco Guerrero Conejo

D. Felipe Cordobés Carmona

ÍNDICE

<u>Synopsis</u>	1
I. <u>Introducción</u>	7
II. <u>Antecedentes bibliográficos</u>	13
1. <u>Proteínas alimentarias</u>	15
1.1 <u>Introducción</u>	15
1.2 <u>Estructura y composición de las proteínas</u>	15
1.3 <u>Electroforesis</u>	21
1.3.1 <u>Definición y técnicas electroforéticas</u>	21
1.3.2 <u>Estimación del peso molecular por SDS-PAGE</u>	22
1.3.3 <u>Sistemas para la realización de la electroforesis</u>	23
1.4 <u>Estabilidad conformacional y desnaturalización de las proteínas</u>	25
1.5 <u>Propiedades funcionales</u>	27
1.5.1 <u>Interacción proteína-agua</u>	27
1.5.2 <u>Solubilidad</u>	28
1.5.3 <u>Viscosidad y capacidad espesante</u>	28
1.5.4 <u>Flavor</u>	29
1.5.5 <u>Gelificación</u>	29
1.5.6 <u>Emulsificación y formación de espumas</u>	30
2. <u>Proteínas de cangrejo</u>	33
2.1 <u>Composición proteica del cangrejo</u>	33
2.1.1 <u>Proteínas sarcoplasmáticas</u>	33
2.1.2 <u>Proteínas miofibrilares</u>	33
2.1.3 <u>Proteínas del estroma o tejido conectivo</u>	34
2.2 <u>Funcionalidad de proteínas de cangrejo</u>	34
2.2.1 <u>Capacidad de retención de agua</u>	34
2.2.2 <u>Solubilidad</u>	34
2.2.3 <u>Viscosidad</u>	34
2.2.4 <u>Gelificación</u>	35
2.2.5 <u>Emulsificación</u>	35

3.	<u>Interfases</u>	37
	3.1 <u>Tensión superficial</u>	37
	3.1.1 <u>Tensiómetro de gotas</u>	38
	3.1.2 <u>Balanza de Langmuir</u>	38
	3.2 <u>Proteínas en la interfase</u>	42
	3.2.1 <u>Adsorción en la interfase</u>	42
	3.2.2 <u>Naturaleza de las proteínas adsorbidas</u>	44
4.	<u>Emulsiones</u>	47
	4.1 <u>Introducción</u>	47
	4.2 <u>Formación de emulsiones</u>	48
	4.3 <u>Variables influyentes en la emulsificación</u>	51
	4.4 <u>Equipos de homogeneización</u>	55
	4.5 <u>Estabilidad de emulsiones</u>	59
	4.5.1 <u>Mecanismos de desestabilización de emulsiones</u>	60
	4.5.2 <u>Fuerzas que actúan sobre las gotas</u>	63
	4.6 <u>Propiedades físicas de las emulsiones</u>	65
5.	<u>Geles</u>	69
	5.1 <u>Introducción</u>	69
	5.2 <u>Gelificación</u>	70
	5.3 <u>Tipos de estructura de geles</u>	72
	5.4 <u>Caracterización de geles</u>	73
	5.4.1 <u>Capacidad de retención de agua</u>	74
	5.4.2 <u>Calorimetría diferencial de barrido</u>	74
	5.4.3 <u>Solubilidad</u>	75
	5.4.4 <u>Microscopía</u>	76
6.	<u>Conceptos básicos de reología</u>	79
	6.1 <u>Introducción</u>	79
	6.2 <u>Cizalla simple</u>	79
	6.3 <u>Tensores esfuerzo, deformación y velocidad de deformación</u>	81

6.3.1	<u>Tensor esfuerzo</u>	81
6.3.2	<u>Tensor deformación y velocidad de deformación</u>	83
6.4	<u>Caracterización reológica de un material</u>	84
6.5	<u>Clasificación de los diferentes comportamientos reológicos</u>	85
6.5.1	<u>Comportamiento en flujo estacionario</u>	86
A)	<u>Fluidos newtonianos</u>	86
B)	<u>Fluidos no newtonianos</u>	86
6.5.2	<u>Comportamiento dependiente del tiempo de cizalla</u>	90
6.5.3	<u>Viscoelasticidad</u>	91
A)	<u>Introducción</u>	91
B)	<u>Modelos analógicos</u>	92
C)	<u>Ensayos viscoelásticos lineales</u>	96
6.6	<u>Principio de superposición de Boltzmann</u>	101
6.7	<u>Ecuaciones constitutivas viscoelasticidad lineal en cizalla simple</u>	101
6.8	<u>Espectros de relajación y retardación</u>	103
7.	<u>Reología de emulsiones</u>	105
7.1	<u>Introducción</u>	105
7.2	<u>Factores que afectan a la reología de la emulsión</u>	105
7.2.1	<u>Concentración de la fase dispersa</u>	105
7.2.2	<u>Reología de las fases</u>	107
7.2.3	<u>Tamaño, forma y distribución de tamaño de gotas</u>	108
7.2.4	<u>Interacción entre gotas</u>	109
7.2.5	<u>pH</u>	111
8.	<u>Reología de geles</u>	111
8.1	<u>Introducción</u>	111
8.2	<u>Técnicas reológicas para el seguimiento de la gelificación</u>	112
8.2.1	<u>Reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación</u>	112
8.2.2	<u>Caracterización de la transición sol-gel: el punto gel</u>	112
8.3	<u>Técnicas reológicas para la caracterización de geles</u>	114
8.3.1	<u>Viscoelasticidad</u>	114
A)	<u>Ensayos dinámicos</u>	114

	B) <u>Ensayos de Fluencia “Creep”</u>	114
	C) <u>Relajación del esfuerzo</u>	115
	8.3.2 <u>Perfil de textura</u>	115
III.	<u>DESARROLLO EXPERIMENTAL</u>	117
1.	<u>Materiales</u>	119
	1.1 <u>Harina de cangrejo</u>	119
	1.2 <u>Aceite</u>	119
	1.3 <u>Reactivos</u>	119
2.	<u>Métodos</u>	120
	2.1 <u>Preparación de las muestras</u>	120
	2.1.1 <u>Harina de cangrejo</u>	120
	2.1.2 <u>Aislado de cangrejo</u>	120
	2.1.3 <u>Emulsiones</u>	121
	2.1.4 <u>Geles</u>	123
	2.2 <u>Técnicas de caracterización</u>	123
	2.2.1 <u>Harina de cangrejo</u>	123
	A) <u>Granulometría</u>	123
	B) <u>Composición</u>	123
	C) <u>Solubilidad</u>	125
	D) <u>Punto isoelectrico</u>	125
	E) <u>Densidad de las dispersiones acuosas</u>	126
	F) <u>Viscosidad de las dispersiones acuosas</u>	126
	2.2.2 <u>Aislado de cangrejo</u>	127
	A) <u>Composición</u>	127
	B) <u>Solubilidad y punto isoelectrico</u>	127
	C) <u>Electroforesis</u>	128
	D) <u>Reología de dispersiones</u>	129
	2.2.3 <u>Caracterización interfacial</u>	131
	A) <u>Tensiómetro de gotas</u>	131
	B) <u>Balanza de Langmuir</u>	132

2.2.4	<u>Emulsiones</u>	133
	A) <u>Caracterización del aceite</u>	133
	B) <u>Medidas de Backscattering</u>	134
	C) <u>Medidas de distribución de tamaño de gotas</u>	134
	D) <u>Ensayos reológicos de emulsiones</u>	135
	E) <u>Medidas de Microscopia Confocal</u>	137
	F) <u>Tratamiento térmico</u>	137
2.2.5	<u>Geles</u>	138
	A) <u>Capacidad de retención de agua</u>	138
	B) <u>Solubilidad de geles</u>	138
	C) <u>Electroforesis</u>	139
	D) <u>Ensayos reológicos de geles</u>	139
	E) <u>Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)</u>	141
2.3	<u>Estudio estadístico</u>	141
IV.	<u>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u>	143
1.	<u>Caracterización de derivados proteicos</u>	145
1.1	<u>Harina de cangrejo</u>	145
1.1.1	<u>Granulometría</u>	145
1.1.2	<u>Composición</u>	146
1.1.3	<u>Solubilidad</u>	147
1.1.4	<u>Punto isoeléctrico</u>	150
1.1.5	<u>Densidad de las dispersiones acuosas</u>	151
1.1.6	<u>Viscosidad de las dispersiones acuosas</u>	151
	A) <u>Variación de la viscosidad con la concentración</u>	151
	B) <u>Variación de la viscosidad con la temperatura</u>	153
1.2	<u>Aislado de cangrejo</u>	155
1.2.1	<u>Composición</u>	155
1.2.2	<u>Solubilidad y punto isoeléctrico</u>	155
1.2.3	<u>Electroforesis</u>	158
1.2.4	<u>Reología de dispersiones</u>	162
	A) <u>Influencia de la concentración de proteínas de aislado</u>	162

	B) <u>Influencia del pH</u>	165
	1.3 <u>Caracterización interfacial</u>	167
	1.3.1 <u>Caracterización aceite-agua</u>	167
	1.3.2 <u>Caracterización aire-agua</u>	169
2.	<u>Emulsiones</u>	173
	2.1 <u>Caracterización del aceite</u>	173
	2.1.1 <u>Composición</u>	173
	2.1.2 <u>Densidad</u>	174
	2.1.3 <u>Viscosidad</u>	174
	2.2 <u>Emulsiones estabilizadas con harina</u>	175
	2.2.1 <u>Selección de las condiciones de emulsificación</u>	175
	A) <u>Selección de parámetros</u>	176
	B) <u>Resultados estadísticos</u>	181
	C) <u>Influencia del tiempo tras preparación de la emulsión</u>	186
	D) <u>Estudio del mecanismo de desestabilización</u>	190
	2.2.2 <u>Influencia de la velocidad de agitación</u>	193
	A) <u>Consumo de potencia y densidad de energía</u>	193
	B) <u>Curva de distribución de tamaño de gotas</u>	198
	C) <u>Propiedades viscoelásticas lineales</u>	202
	2.2.3 <u>Influencia de la concentración de harina</u>	204
	A) <u>Consumo de potencia y densidad de energía</u>	205
	B) <u>Curva de distribución de tamaño de gotas</u>	207
	C) <u>Propiedades viscoelásticas lineales</u>	210
	D) <u>Correlación de param. reológicos con microestructurales</u>	212
	E) <u>Microestructura y apariencia visual de las emulsiones</u>	217
	F) <u>Estabilidad de las emulsiones</u>	219
	2.2.4 <u>Influencia de la modificación del pH</u>	221
	A) <u>Curva de distribución de tamaño de gotas</u>	224
	B) <u>Propiedades viscoelásticas lineales</u>	225
	C) <u>Estabilidad de las emulsiones</u>	228
	2.2.5 <u>Tratamientos térmicos</u>	235
	A) <u>Rampas “in situ”</u>	236

	B) <u>Tratamientos en baño</u>	244
3.	<u>Geles</u>	249
	3.1 <u>Gelificación térmica</u>	249
	3.1.1 <u>Selección de las condiciones de gelificación</u>	249
	3.1.2 <u>Influencia de la concentración de proteínas</u>	249
	3.1.3 <u>Influencia del pH</u>	252
	3.2 <u>Caracterización de geles</u>	255
	3.2.1 <u>Reología de geles</u>	255
	A) <u>Influencia de la concentración</u>	255
	B) <u>Influencia de pH</u>	257
	C) <u>Influencia del tiempo de enfriamiento (“setting”)</u>	260
	3.2.2 <u>Capacidad de retención de agua</u>	262
	3.2.3 <u>Solubilidad</u>	264
	3.2.4 <u>Electroforesis</u>	266
	3.2.5 <u>Microscopia electrónica de barrido</u>	273
V.	<u>CONCLUSIONES</u>	275
VI.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	281
VII.	<u>ANEXO</u>	297

Synopsis

Food industry typically produces a big amount of by-products that may generate some undesirable environmental impact. A way to get benefits from these by-products is to explore the functional properties of protein concentrates in order to obtain some added value products in the form of emulsions, such as mayonnaise-like or salad dressings, and gels, such as surimi-like or textured protein-based products. This strategy would lead to a valorisation of some food raw-materials as has been proposed for low-value by-products generated in the fish industry that could lead to obtain high added value products such as specific protein fractions that could be utilized as functional ingredients in foods (Spinelli y col. 1975; Finch, 1977).

Crustaceans constitute an excellent source of high-quality protein, rich in essential amino acids and lipids, including long-chain polyunsaturated fatty acids from ω -3 and ω -6 series, and also containing other components of functional value such as astaxanthin that posses a high antioxidant capacity, even higher than others important antioxidants such as β -carotene or vitamin E (Miki 1991).

A crustacean that was introduced to the Iberian Peninsula in 1974 and originally came from Louisiana (USA), the freshwater red-swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), is nowadays widely distributed in the watercourses and marshes of the Guadalquivir river and has been harvested commercially for more than thirty years (Cano y Ocete 2000). The industrial production of red crayfish is currently about 50,000 ton/year and almost 45% is exported to other European countries (particularly Sweden and Norway) and USA. However, the local red crayfish industry typically produces important surpluses with a strong seasonal character. The potentials of crayfish proteins as a functional ingredient in food products has been recently explored (Cremades, 2004).

Crayfish Flour (CF) containing about 65% protein and 19% lipids may be obtained as a by-product in the red crayfish industry from those crayfish surpluses. However, this by-product show some limitations derived from the high energetic costs of crayfish flour manufacture and its final use that is currently restricted to animal feeding. This second restriction is related to the high degree of protein denaturation achieved during the manufacture of the crayfish flour, which reduces its functional properties (i.e. emulsification ability). It is therefore particularly important to optimize the conditions of use for this product (i.e. composition or processing variables) in order

to improve its food applications as well as the physical and microbiological stability of crayfish-based product.

This study focuses on two functional properties of crayfish protein systems: one is the ability of crayfish flour as a food emulsifier and the other is the ability of myofibrillar protein from crayfish to form gel matrixes. Both of them contribute to establish the potentials of crayfish in its application to commercial food products that allow an important valorisation of the by-product. Craysfish flour was used as the only emulsifier for the study of o/w emulsions. It has been consider in this study that lipids from CF do not essentially modify the oil disperse phase and therefore do not exert any significant contribution to the physicochemical properties of the emulsions. However, a process for preparation of the Crayfish Protein Isolate (CFPI) which consisted of one stage of alkaline solubization and a further stage isoelectric precipitation. CFPI was used in order to focus this study in the role of crayfish proteins avoiding possible interactions with lipids in the formation of gels.

It was necessary to carry out a previous characterization of both protein systems (CF and CFPI). This characterization included a study of solubility, isoelectric point and electrophoretical analysis of crayfish proteins, as well as study of rheological properties of CF and CFPI dispersions and analysis of interfacial properties (air-water and oil-water) of these proteins.

Thus, one of the main objectives of this study is to evaluate the potentials of crayfish flour as emulsifier to obtain highly concentrated oil/water emulsions such as mayonnaise-like and salad dressings emulsions. First of all, it is necessary to optimize the conditions of processing and composition that lead to long-term stable emulsions, by characterizing the rheological properties and microstructural parameters of crayfish flour based emulsions. The rheological characterization has been focused on the linear viscoelastic properties of the emulsions, determined by means of small-amplitude oscillatory shear (SAOS). Microstructural parameters have been evaluated by means of droplet size distributions analysis. Microstructure has also been qualitatively characterised at the colloidal level by using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

The pH of the continuous phase has been found to be critical for properly carrying out the emulsification process. Thus, an important limitation found was that crayfish flour could not lead to any stable emulsions in a range of pH values valid for

food applications. As a consequence, it was necessary to develop an alternative emulsification process by means of an indirect procedure.

This indirect procedure consists of two main stages: the first stage is for the emulsification at high pH value, at which stabilization of the oil/water interface by myofibrillar proteins from crayfish is favoured; the final stage is for reducing the pH up to the desired value (within the range for food applications). An intermediate maturation stage was also found to be convenient to allow complete development of the network formed at rest.

In addition, a complementary post-emulsification heat treatment has been carried out in order to explore further enhancement on rheological properties, microstructure and stability of crayfish flour-based emulsions. A significant enhancement, induced by this heat treatment, has been found even at the most unfavourable conditions.

The other main objective of this study is to get benefits from the high concentration in myofibrillar proteins of crayfish protein derivatives in order to assess its ability to form heat induced gels. In fact, myofibrillar proteins after being subjected to heat processing exhibit a high density of active areas for network development, that lead to formation of gels. Thus, the excellent gelling and binding properties of myosin are well known (Ziegler y Acton, 1984). A synergistic effect between actin and myosine in the gelation of myofibrillar proteins has also been reported (Ishioroshi y col., 1980; Samejima y col., 1981; Yasui y col., 1982).

The gelation kinetics of crayfish protein isolate have been analysed inside the sensor system of the rheometer by subjecting CPI dispersions to a heat cycle and monitoring the evolution of linear viscoelastic properties. A linear viscoelastic characterization of the final emulsion has also been carried out after heat treatment by SAOS measurements. In addition, gels have been prepared by introducing tubes containing CFPI dispersions in a bath at 90°C for 30 min. SAOS measurements of the gels obtained has been carried out at 20°C as a function of concentration and pH.

Other techniques have been used on gels samples prepared in the bath, in order to characterize the gel microstructure, by means of Scanning Electron Microscopy (SEM), the gel Water Holding Capacity, the solubility of gel samples in different buffer solutions and electroforesis of the soluble extracts. This characterization has been used to assess the optimal processing conditions for the formation of gels with suitable

properties, as well as to evaluate the potentials of crayfish protein for the preparation of textured protein food products (i.e. surimi-like gels).

I. Introducción

La industria agroalimentaria genera una gran cantidad de subproductos y residuos que ocasionan un indeseable impacto medioambiental. Una forma de paliar dicho impacto consiste en explorar las propiedades funcionales de concentrados proteicos generados por estas industrias que permitan su aplicación en diversos productos alimentarios presentados en forma de emulsiones o geles. Entre estos productos pueden mencionarse emulsiones tipo mayonesa o salsas finas, geles tipo surimi o una gran variedad de alimentos texturizados. Este planteamiento permitiría una revalorización de algunos de estos subproductos infrautilizados, que incluso podría desembocar en la obtención de productos de gran valor añadido como alimentos funcionales (Spinelli y col., 1975; Finch, 1977). Los alimentos funcionales son aquellos que “exigen explícita o implícitamente mejorar la salud y el bienestar”. Estos alimentos e ingredientes se encuentran perfectamente implantados en EEUU y en Japón, donde tuvieron su origen, habiendo incrementado su presencia en Europa a ritmo acelerado.

Los crustáceos constituyen una excelente fuente de proteínas rica en aminoácidos esenciales, con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las series ω -3 y ω -6, y con otros ingredientes funcionales como la astaxantina que presenta un alto valor antioxidante. La capacidad antioxidante de la astaxantina es superior al de otras sustancias tan importantes como el β -caroteno o la vitamina E (Miki, 1991).

En las Marismas del Guadalquivir existe una población elevada de un crustáceo originario del estado de Louisiana (EEUU), el cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*), que fue introducido en esta región a principios de los años setenta (Cano y Ocete, 2000). Esta especie ha experimentado un crecimiento muy rápido gracias a un entorno favorable, dando lugar al desarrollo de una industria especializada en la elaboración y comercialización de este tipo de productos. En la actualidad, la producción industrial es del orden de 50.000 t/año, de las cuales un 45% se exporta a países europeos (Suecia y Noruega principalmente) y EEUU. Sin embargo, existen importantes excedentes que presentan un fuerte carácter estacional, relacionado con el crecimiento y desarrollo del cangrejo. La capacidad potencial de las proteínas de cangrejo como ingrediente funcional en productos alimentarios ha sido investigada recientemente (Cremades 2004).

La harina de cangrejo (CF), que contiene aproximadamente un 65 % de proteínas y un 19% de lípidos, es un subproducto que se obtiene a partir de los excedentes de la

industria cangrejera. Sin embargo, en la actualidad presenta una rentabilidad limitada debido a los grandes costes energéticos derivados de su proceso de fabricación y a su infravaloración ya que su principal aplicación hasta la fecha es la de alimento para otros animales (alimentos para mascotas, piscifactorías, etc.). El principal problema de su aplicación en otros productos de mayor valor añadido radica esencialmente en la desnaturalización de las proteínas durante su proceso de fabricación que reduce sus propiedades funcionales (por ejemplo en operaciones de emulsificación). Por lo tanto, resulta de gran importancia optimizar las condiciones de aplicación de este producto (en cuanto a composición y condiciones de procesados) para mejorar sus aplicaciones alimentarias y evitar su desestabilización física y microbiológica.

El presente estudio plantea explorar dos propiedades funcionales de la harina de cangrejo para su utilización como emulsionante alimentario y como agente activo para la formación de geles, con la finalidad de establecer su aplicación potencial en productos comerciales que permitan su revalorización. Se ha considerado que el aporte lipídico de la harina no modifica esencialmente la contribución de la fase dispersa a las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones por lo que estas han sido estudiadas utilizando harina cangrejo como único emulsionante. Sin embargo, para el estudio de geles se ha llevado a cabo un proceso de obtención de aislado de cangrejo (CFPI) que ha consistido en una etapa de solubilización alcalina y otra de precipitación isoelectrica, con la finalidad de centrar este estudio en el papel de las proteínas, evitando la posible interacción de los lípidos en la formación del gel.

Previamente es necesario abordar una caracterización adecuada de ambos derivados proteicos (CF y CFPI) que son los que se van a utilizar en este estudio. Esta caracterización ha incluido un estudio de solubilidad, punto isoelectrico y electroforesis de las proteínas de cangrejo, reología de dispersiones de harina y aislado y un análisis de las propiedades interfaciales (aire-agua y aceite-agua) de estas proteínas.

Así, uno de los objetivos principales del presente trabajo consiste en evaluar el potencial de la harina de cangrejo rojo como emulsionante para la obtención de emulsiones concentradas de aceite en agua tipo mayonesa y salsas finas. Para ello, es preciso establecer en primer lugar las condiciones de composición y procesado más favorables que permitan obtener emulsiones estables a través de una caracterización reológica y de parámetros microestructurales. La caracterización de las propiedades reológicas se ha centrado exclusivamente en la determinación de las propiedades

viscoelásticas lineales, en tanto que las características microestructurales han sido evaluadas a través de la distribución de tamaños de gota y, de forma cualitativa, mediante medidas de microscopía confocal de barrido.

Para ello, se ha encontrado crítico el valor de pH seleccionado para llevar a cabo el proceso de emulsificación. Así, debido a la imposibilidad de obtener emulsiones estables en un intervalo de pH de aplicación alimentaria, se ha optado en el presente trabajo por desarrollar un proceso de emulsificación alternativo mediante un procedimiento indirecto.

El procedimiento consiste en una etapa de preparación de la emulsión a pH elevado, en condiciones en las que el proceso de estabilización de la interfase aceite-agua está favorecido y una segunda etapa de reducción del pH hasta un valor intermedio (dentro del intervalo alimentario) una vez que la proteína se ha desplegado sobre la superficie de las gotas.

Además, como tratamiento complementario y posterior a la preparación de las emulsiones, se han estudiado los efectos de una etapa de procesado térmico sobre las propiedades reológicas, microestructura y estabilidad de las mismas, mejorando esta última incluso en las condiciones más adversas.

Independientemente de que se hayan conseguido muy buenos resultados de estabilidad en emulsiones concentradas aceite/agua formuladas con harina de cangrejo como único emulsionante, especialmente en condiciones de pH elevado, deberían barajarse en un futuro otras opciones para mejorar sus propiedades funcionales como emulsionante alimentario, bien tratando de mejorar el método de extracción de la harina, o bien controlando las posibles modificaciones que se le apliquen a la misma como puede ser la obtención de hidrolizados de proteínas (Petursson y col., 2004).

Otro de los objetivos principales que se plantea es aprovechar el alto contenido de proteínas miofibrilares de los derivados proteicos del cangrejo para evaluar su potencial en la formación de geles mediante tratamiento térmico. Las proteínas miofibrilares, que son las mayoritarias en este tipo de producto, presentan una elevada superficie activa, una vez que la proteína es desnaturalizada térmicamente, lo cual favorece la formación del gel. Así, se conocen las excelentes propiedades gelificantes de la miosina (Ziegler y Acton, 1984), así como el efecto sinérgico entre la actina y la miosina para el reforzamiento del gel (Ishioroshi y col., 1980; Samejima y col., 1981; Yasui y col.,

1982). Esto hace que resulte de gran interés la utilización de este tipo de proteínas en la formación de geles, en contraposición con la mayoría de los ingredientes usados en los alimentos como huevo, gluten o soja que contienen proteínas globulares.

Se ha estudiado tanto la cinética de gelificación, sometiendo a las muestras a un tratamiento térmico en el propio sistema sensor del reómetro, como la caracterización viscoelástica lineal de los geles obtenidos in situ al final de dicha etapa, mediante ensayos de cizalla oscilatoria (SAOS). Paralelamente, se han preparado geles mediante procesado térmico en un baño. Como consecuencia del comportamiento viscoelástico complejo de estos sistemas es necesario llevar a cabo un riguroso estudio mediante técnicas reológicas. De hecho, en los últimos años, se ha incrementado el interés en el estudio de las propiedades reológicas en el campo de los productos alimentarios, siendo las propiedades viscoelásticas lineales muy dependientes de la temperatura, concentración y estado físico de la dispersión (Binsi y col., 2007).

También, se plantean otras técnicas de caracterización de los geles como son el estudio de la microestructura, mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido, la capacidad de retención de agua, la solubilidad de los geles en diferentes disoluciones amortiguadoras y el estudio de la electroforesis de los extractos solubles. La caracterización completa nos ayuda a evaluar cuales son las mejores condiciones de procesado para la formación de geles con unas adecuadas propiedades, así como a evaluar el potencial del uso de proteína de cangrejo en la formación de geles alimentarios tales como alimentos texturizados tipo surimi.

II. Antecedentes Bibliográficos

1. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS

1.1 Introducción

Las proteínas son un grupo de polímeros naturales altamente complejo que juega un importante papel en los sistemas biológicos y alimentarios. Presentan una enorme diversidad funcional como resultado del gran número de combinaciones posibles entre los 20 aminoácidos existentes, de forma que pueden sintetizarse proteínas con diferentes estructuras y funciones 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 y químicas que definen las propiedades funcionales de las mismas, así como de los cambios que sufren esas propiedades durante el procesado.

1.2 Estructura y composición de las proteínas

El término proteína engloba a un complejo grupo de compuestos orgánicos, que consisten básicamente en combinaciones de aminoácidos mediante enlaces peptídicos, y que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y 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 α . Este carbono α 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, tan importantes 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, aspartato, glutamato) 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 1.2.1 aparecen las estructuras de todos los aminoácidos y del único iminoácido.

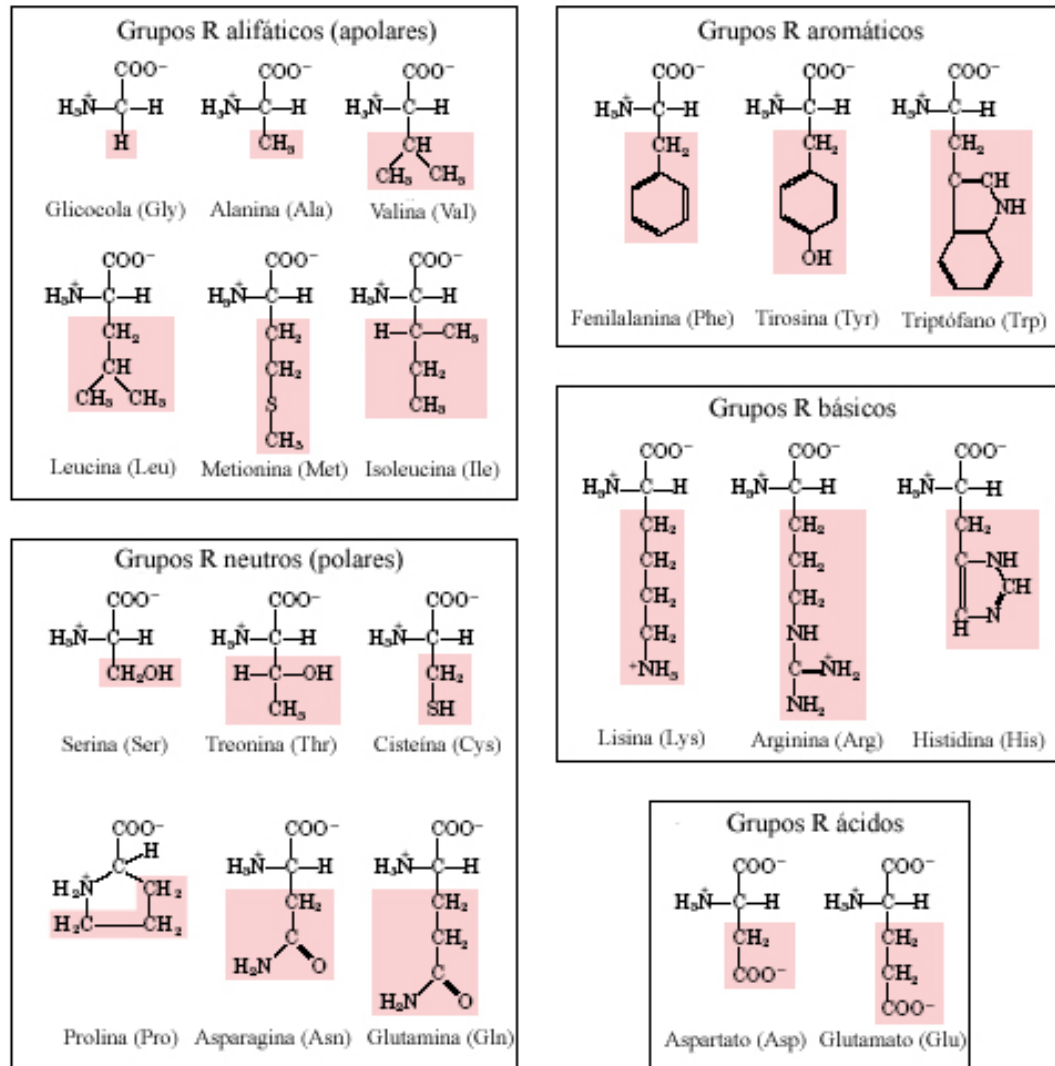


Figura 1.2.1. Estructuras de los 20 aminoácidos

El comportamiento de las proteínas tanto biológico como en los alimentos depende de su estructura. En general, existen cuatro niveles estructurales: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (figura 1.2.2.):

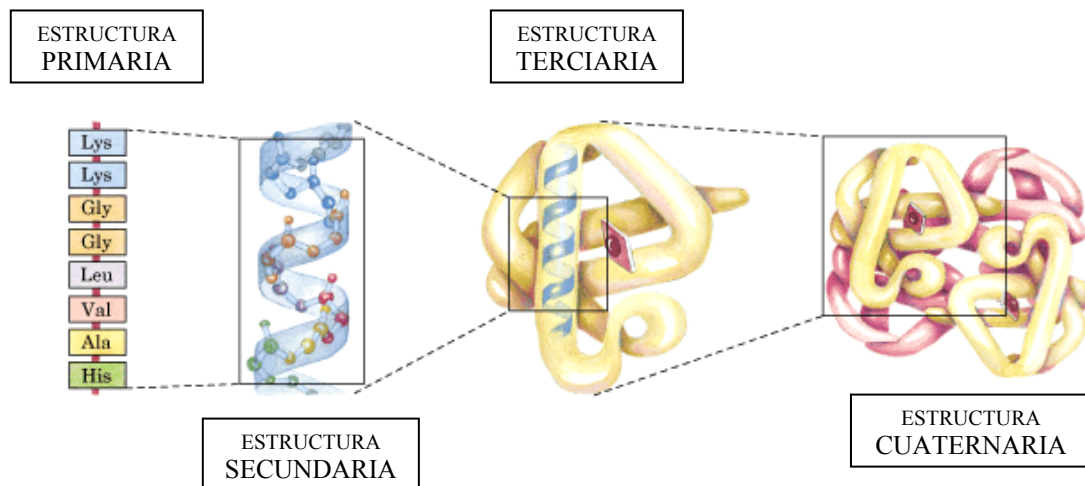


Figura 1.2.2. Diferentes niveles estructurales de las proteínas: desde la estructura primaria (izquierda) hasta la cuaternaria (derecha)

A) Estructura primaria

La estructura primaria de una proteína denota la secuencia lineal de distribución de 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 1.2.3.):

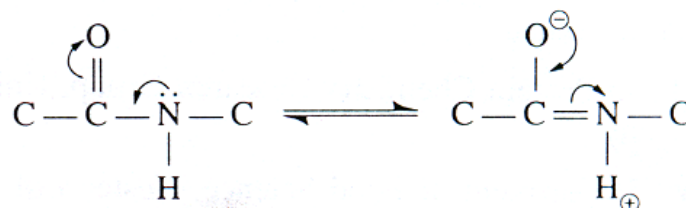


Figura 1.2.3. Estructura resonante de los aminoácidos que componen las proteínas

Como consecuencia de esta estructura resonante: i) la rotación del enlace entre péptidos está restringida a un máximo de unos 6°; 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 peptídica puede existir en configuración *cis* o *trans*.

Esta última es bastante frecuente por ser más estable. 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 α y C-C α tienen libertad rotacional, denominándose ángulos de rotación Φ y Ψ , 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- α y la lámina plegada β .

B.1.) Hélice- α

La hélice- α 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.

Algunos aminoácidos tienen más tendencia que otros a aparecer en las hélices α 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 anfífilas, 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.

B.2.) Lámina plegada β

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 β : paralelas y antiparalelas.

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

De forma general, las proteínas con una conformación tipo lámina β son más hidrofóbicas que las que tienen una configuración de hélice α , exhibiendo altas temperaturas de desnaturalización. Así, proteínas como la 11S globulina de la soja (64% de lámina β) poseen una temperatura de desnaturalización alta (84,5°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. En ciertas ocasiones aparecen las llamadas estructuras supersecundarias, que consisten en combinaciones de estructuras secundarias. La unidad β - α - β está formada por dos cadenas β paralelas conectadas entre sí a través de una cadena en hélice α . Otras estructuras supersecundarias frecuentes son la greca o el meandro β .

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, 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 que forma proteínas fibrilares, 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*. 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 interaccionan 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.

1.3 Electroforesis

1.3.1. Definición y técnicas electroforéticas

La electroforesis es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la separación y caracterización de las proteínas. La movilidad electroforética de una proteína depende de su carga neta (las proteínas presentan carga cuando se encuentran a un pH diferente de su pI) así como también de su tamaño y conformación. Los soportes utilizados para electroforesis se dividen en soportes inertes (acetato de celulosa, sílica gel, papel) e interactivos (azarosa, almidón y poliacrilamida). Estos últimos ayudan en la separación debido a su porosidad, actuando como tamices. Estos geles de poliacrilamida son los más utilizados debido a sus ventajas como son su alta reproducibilidad, estabilidad (a pH, temperatura, fuerza iónica), transparencia, elasticidad, porosidad controlable, compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos e inercia química. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada, variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del tensioactivo dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el tensioactivo aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el tensioactivo. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base

en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

1.3.2. Estimación del peso molecular por SDS-PAGE

Se deduce de lo anterior que esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. Estas determinaciones poseen un margen de error de ~10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ejemplo, proteínas con puntos isoeléctricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad), o proteínas altamente glicosiladas.

La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. No obstante, en ocasiones es útil analizar muestras no reducidas de una proteína, por ejemplo, para evaluar su composición de subunidades. En tal caso, la movilidad electroforética en SDS-PAGE, aunque guarda una cierta relación con el PM, no necesariamente corresponde con su PM exacto, dependiendo de la forma y los pliegues causados por los enlaces disulfuro, que seguirían intactos aún después de la interacción SDS-proteína, en condiciones no-reductoras. Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol (u otro reductor como el ditioneitol), los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales.

La movilidad electroforética relativa (R_f) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El R_f se calcula dividiendo la distancia recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario).

Al representar estos datos ($x=R_f$, $y=\text{Log PM}$) se observa la relación mencionada (Fig.1.3.1).

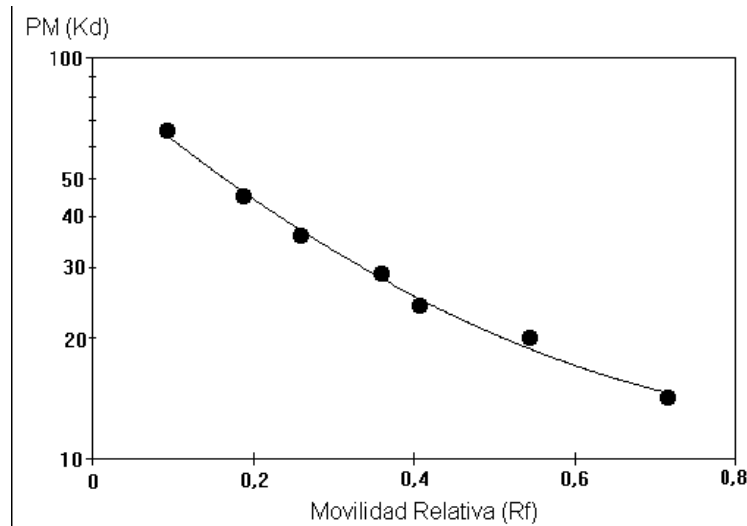


Figura 1.3.1. Ejemplo de una curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE.

El PM estimado para la proteína incógnita se determina interpolando a partir de la línea de regresión con los estándares de PM conocidos. Dicha línea de regresión muestra una ligera curvatura, típica de geles de concentración homogénea. Para la interpolación de bandas incógnita, en la práctica es más sencillo aplicar una regresión lineal simple a los puntos colineales más cercanos a la muestra. La técnica de SDS-PAGE se considera una técnica con un alto poder de resolución.

1.3.3. Sistemas para la realización de la electroforesis

La electroforesis puede ser realizada en sistema continuo, donde la muestra es aplicada directamente en el gel de separación, o en sistema discontinuo, donde la muestra es aplicada en un gel de concentración (“stacking gel”). El gel de concentración difiere del de separación en el tamaño de poro y en el pH, y tiene la función de concentrar a las proteínas de forma que la resolución no dependa del volumen inicial de la muestra. El gel de concentración posee poros de gran tamaño y por lo tanto no retiene a las proteínas. El gel de separación presenta poros más pequeños y ayuda en la separación por tamaño molecular de las proteínas (Hjelmeland y Chrambach, 1981).

En el caso del sistema discontinuo se puede describir el gel formado por dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o compactador) y luego las separan (en el gel inferior o separador) como se muestra en la figura 1.3.2.

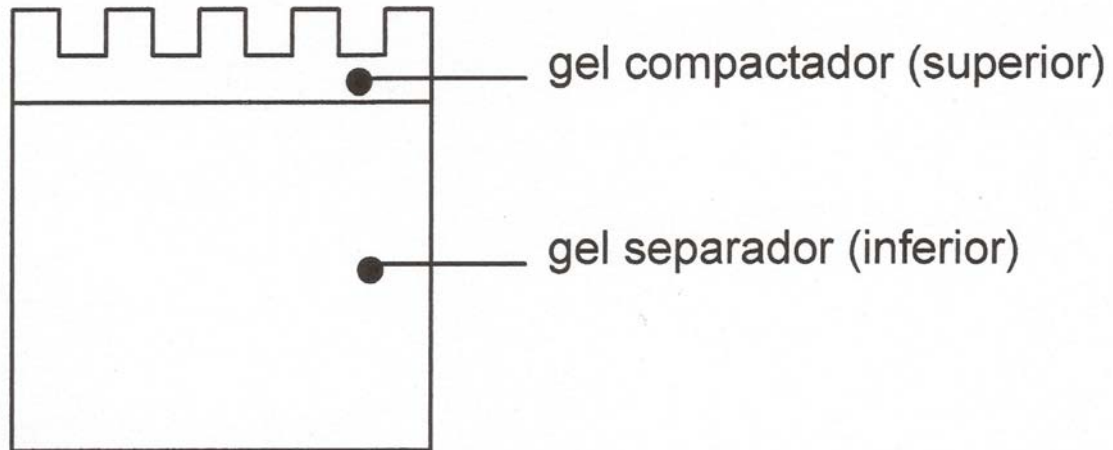


Figura 1.3.2. Partes de un gel de SDS-PAGE. Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH, que cumplen funciones diferentes, para aumentar el poder de resolución.

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 daltons.

También se pueden utilizar sistemas con geles en gradiente. Ciertos tipos de muestras poseen componentes con peso moleculares (PMs) muy variados, que incluyen desde macromoléculas hasta pequeños péptidos. En tales casos, el uso de un gel separador de concentración homogénea limita a resolver adecuadamente solo una fracción determinada de los componentes. La alternativa para estos casos es la utilización de geles de concentración heterogénea, en los cuales se prepara un gradiente que va desde una concentración baja, al inicio del gel (ej. 5%), aumentando hacia el final (ej. 30%) Estos geles proporcionan la mejor resolución obtenible por SDS-PAGE para mezclas heterogéneas, y su preparación requiere de un aditamento simple para generar gradientes, que puede ser obtenido comercialmente o preparado en el laboratorio (Fig. 1.3.3.)

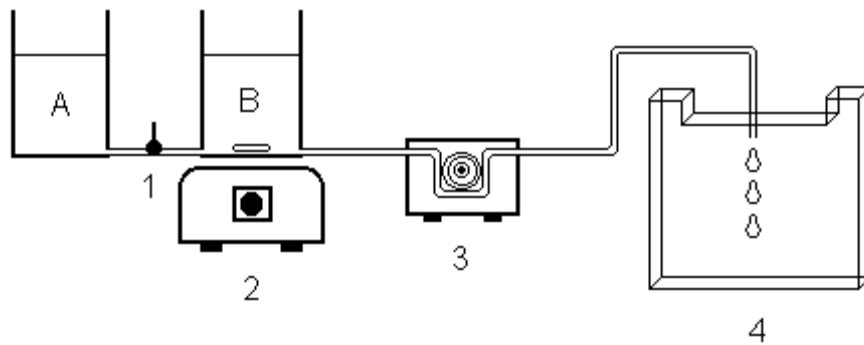


Figura 1.3.3. Esquema de la preparación de un gel de poliacrilamida en gradiente.
 1: llave; 2: agitador magnético; 3: bomba peristáltica; 4: molde de vidrio para el gel;
 A: solución diluida (concentración mínima); B: solución concentrada (concentración máxima)

1.4 Estabilidad conformacional y desnaturalización de las 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:

$$\Delta G_{DN} = \Delta G_H + \Delta G_{ele} + \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{vdW} - T\Delta S_{conf} \quad (1.4.1.)$$

donde ΔG_H , ΔG_{ele} , $\Delta G_{H\phi}$ y ΔG_{vdW} son los cambios en la energía libre para las interacciones por puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrofóbicas y de van der Waals, respectivamente, ΔS_{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, el valor de ΔG_{DN} oscila entre 10 y 20 Kcal/mol; lo que 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 enlaces.

El bajo valor de ΔG_{DN} 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, 1991 a, b).

Los puentes de hidrógeno aparecen predominantemente en las estructuras secundarias (hélice- α y lámina β) 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 se encuentran favorecidas por el aumento de la temperatura y la entropía; la fuerza de este tipo de interacciones aumenta con la temperatura hasta los 100°C aproximadamente. (Privalov y col., 1986).

1.5 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, carácter hidrofílico, 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 simple. 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 con otros componentes del alimento (lípidos, carbohidratos, sales,...) puede causar en la proteína cambios estructurales impredecibles, afectando así su comportamiento funcional.

1.5.1. 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. Por tanto, 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. Las condiciones de la disolución en la que se encuentra la proteína, como el pH, la fuerza iónica o la temperatura, afectan a 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.

1.5.2. 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 fisico-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.

1.5.3. 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 específica de las soluciones de proteínas, η_{sp} , se ve afectada principalmente por dos factores: la forma hidrodinámica y el tamaño de las moléculas, siguiéndose la siguiente relación:

$$\eta_{sp} = \beta C(\nu_2 + \delta_1 \nu_1) \quad (1.5.3.1.)$$

donde β es un factor de forma, C es la concentración, ν_1 y ν_2 son los volúmenes parciales específicos del solvente y de la proteína, respectivamente, y δ_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.

1.5.4. 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 huecos 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.

1.5.5. 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 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.

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 todas y cada una de las cadenas poliméricas 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% en peso de agua, en función de la concentración de proteína utilizada.

1.5.6. 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. Su estabilidad frente a la separación de fases durante el almacenamiento depende del tipo de emulsionante o espumante presente en las interfases. 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, 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,...) depende 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.

2. PROTEÍNAS DE CANGREJO

2.1 Composición proteica de los crustáceos

La harina de cangrejo es una importante fuente de proteínas de alta calidad. Por regla general las proteínas de los animales acuáticos, fundamentalmente las musculares, presentan una excelente distribución aminoacídica y una gran digestibilidad. De hecho las proteínas musculares contienen todos los aminoácidos esenciales para el hombre y son altamente nutricionales. Además, las proteínas musculares influyen en la textura, apariencia, sabor y jugosidad, así como estabilidad física durante el almacenamiento (Xiong, 2004). Las proteínas musculares de los crustáceos, como las de otro tipo de músculos, se pueden clasificar en sarcoplasmáticas, miofibrilares y del estroma o tejido conectivo. Además contienen diversas cantidades de compuestos nitrogenados no proteicos, según la especie.

2.1.1. Proteínas sarcoplasmáticas

Son proteínas de bajo peso molecular (10-100 kDa), solubles en agua y entre ellas cabe destacar las albúminas, mioglobinas y enzimas, representando el 30% del total de las proteínas del músculo. Entre otras funciones, las mioglobinas son las responsables del color rosado. El deterioro de la calidad de los pescados y crustáceos *postmortem* se debe a la presencia de enzimas sarcoplasmáticas, entre los que se incluyen los enzimas glucolíticos e hidrolíticos (fundamentalmente proteasas), cuya actividad depende de la especie de crustáceo así como de factores estacionales y medioambientales (Mazza, 1998).

2.1.2 Proteína miofibrilares

Son solubles en disoluciones de sales y constituyen aproximadamente del 60 al 70% del total. Están compuestas principalmente por miosina, actina, tropomiosina y troponinas, con pesos moleculares de 205, 45, 64 y 78 kDa, respectivamente (Suzuki, 1981; Flores y Bernell, 1984). Son, sin duda, las que participan con mayor importancia durante el procesado de estos productos. Entre sus funciones fundamentales se encuentran la formación de matrices tridimensionales y viscoelásticas mediante interacciones proteína-proteína, la capacidad para enlazarse con agua, y para formar polímeros que forman una capa superficial alrededor de las gotas de aceite en

emulsiones o películas flexibles en interfases aire-agua (Damodaran, 1997). Las proteínas miofibrilares sufren cambios durante el *rigor mortis*, tras la terminación del mismo y durante el almacenamiento a largo plazo en estado congelado.

2.1.3. Proteínas del estroma o tejido conectivo

Son proteínas insolubles y la cantidad en los animales acuáticos es menor que en los animales de sangre caliente, constituyendo del 3 al 10% de las proteínas totales. Destacan principalmente por su capacidad para retener agua.

2.2 Funcionalidad de las proteínas de cangrejo

A continuación se especifican algunas de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas de crustáceos (y en general musculares).

2.2.1. Capacidad de retención de agua

Hay dos tipos de causas que contribuyen a la retención de agua que son: la polaridad, incluyendo las cargas superficiales y efectos de capilaridad, siendo sin duda la segunda de ellas la más importante en este caso. En esta función destacan las proteínas del estroma pero principalmente las miofibrilares. El agua queda retenida principalmente en los espacios creados entre los filamentos de miosina y actina. La formación de enlaces entre la miosina y la actina en el estado de *rigor mortis* provoca que se expanda la miofibrilla y, por tanto, su capacidad para retener agua.

2.2.2. Solubilidad

La solubilidad en este caso depende de la estructura de las proteínas, de las miofibrillas, pH, concentración de sal (fuerza iónica), temperatura y del procesado. En estas proteínas hay que destacar que las proteínas sarcoplasmáticas son solubles, las del estroma insolubles, mientras que las miofibrilares requieren una fuerza iónica relativamente alta.

2.2.3. Viscosidad

De todas las proteínas, las que más contribuyen a la viscosidad son las miofibrilares y especialmente la miosina debido a la enorme relación longitud-diámetro que hace que la miosina presente alta viscosidad en disolución.

2.2.4. Gelificación

Se han encontrado dificultades para establecer relaciones estructura-gelificación debido a que las proteínas, compuestas por polímeros complejos, sufren cambios estructurales durante el procesado y son muy sensibles a algunas de las variaciones en los parámetros de procesado. Aún así, algunos estudios han reconocido que las proteínas sarcoplasmáticas son relativamente simples y con una estructura globular, teniendo poca capacidad para formar geles. Por otro lado, las proteínas miofibrilares, y en particular miosina y actomiosina, pueden interactuar entre sí formando dominios cooperativos dando lugar a geles rígidos y altamente viscoelásticos (Egelandsdal y col., 1986).

2.2.5. Emulsificación

Las propiedades emulsionantes de las proteínas de cangrejo son bastante dependientes de la fuerza iónica. Aún así, en general la capacidad emulsionante se puede clasificar de la siguiente forma: miosina > actomiosina > proteínas sarcoplasmática > actina, presentando las tropomiosina y la troponina muy poca capacidad emulsionante. Durante la emulsificación la miosina es rápidamente y preferentemente adsorbida en la interfase aceite-agua, debido a su estructura alargada y a su anfifilia. De esta forma, la miosina es un extraordinario emulsionante que da lugar a emulsiones estabilizadas con gotas uniformes y pequeñas en comparación con las otras proteínas presentes.

3. INTERFASES

3.1 Tensión superficial

En el interior de un líquido, las moléculas son sometidas a fuerzas de atracción con sus equivalentes en las tres direcciones. Sin embargo, en la superficie de un líquido o en la interfase de dos líquidos estas fuerzas no son isotrópicas, ya que no existe un equilibrio en todas las direcciones y, por tanto, las moléculas de la periferia son sometidas a fuerzas atractivas dirigidas hacia el líquido. Este efecto provoca a nivel de la interfase una minimización de su área que genera una tensión de superficie. Esta tensión puede estar representada por un exceso de energía en la superficie, llamado energía libre de superficie y puede ser medido como una medida de energía por unidad de superficie o área: la tensión superficial. La tensión superficial también está considerada como una medida de la energía cohesiva entre las moléculas. Los líquidos polares, como el agua, con interacciones intermoleculares fuertes generan un exceso de energía más importante y presentan tensiones de superficies más elevadas que los líquidos apolares como el aceite.

La tensión de superficie, γ , puede definirse como el trabajo, dW , por unidad de superficie para aumentar una superficie de una unidad arbitraria, dA :

$$\gamma = \frac{dW}{dA} \quad (3.1.1)$$

Los tensioactivos, moléculas anfifílicas, pueden adsorberse en la interfase gracias a sus partes hidrófilas e hidrófobas disminuyendo la tensión de superficie. El término “tensioactivo”, en sentido amplio, engloba todas las moléculas anfifílicas capaces de adsorberse en una interfase, incluyendo:

- lípidos polares, de pequeño tamaño, que poseen una parte hidrófila e hidrófoba bien definida.
- proteínas que poseen normalmente partes hidrófilas e hidrófobas y pueden utilizarse para minimizar su contacto con el agua.

La hipótesis de Gibbs permite analizar la termodinámica de un sistema constituido por una interfase vinculando la tensión superficial con la cantidad adsorbida. Existe una zona de transición de espesor distinto de cero a través de la cual tanto las propiedades físicas del sistema como la concentración, varían continuamente su valor desde una fase

α a otra fase β . En la hipótesis de Gibbs, esta zona interfacial está modelizada por una superficie de separación de espesor nulo colocada arbitrariamente en la región de transición. El sistema en cuestión se divide en dos volúmenes homogéneos, V_α y V_β y una superficie de separación. El número total de moles de un componente i en el sistema, N_i , es igual a la suma de las contribuciones de los dos volúmenes y la superficie. Es también posible definir una concentración superficial o un exceso de superficie de la especie i . Si este exceso es positivo, se habla de adsorción y si es negativo, se habla de desorción. En el caso de una interfase líquido-gas, la fase α representa la fase gas y la cantidad N_α^i es entonces nula. La posición de la superficie de separación influye sobre los valores el exceso de superficie. Gibbs eligió un lugar de la superficie de separación de tal forma que el exceso de superficie del disolvente sea nulo.

3.1.1 Tensiómetro de gotas

Cuando una gota de un fluido está en contacto con otro fluido, la gota siguiente presenta efectos combinados de la tensión de superficie que es la fuerza que presenta una gota a tener una forma esférica y la de la gravitación que es la que tiende a alargarla o a aplanarla. De esta forma la gota asimétrica se puede expresar mediante la ecuación de Laplace que representa la forma analítica sobre los ejes cartesianos:

$$\frac{1}{x} \frac{d(x \operatorname{sen} \theta)}{dx} = \frac{2}{b} - cz \quad (3.1.1.1)$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas para todo punto del perfil de la gota. El origen de coordenadas está considerado en el ápice de la gota, b es el radio de curvatura del ápice, θ el ángulo de la tangente del perfil, c es una constante relacionada con el número capilar que se define como $c = g \Delta\rho/\gamma$, donde g es la aceleración de la gravedad, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre los fluidos estudiados y γ la tensión interfacial.

3.1.2 Balanza de Langmuir

La balanza de Langmuir es una adaptación de la lámina de Wilhelmy y permite medir la tensión de superficie de la interfase aire-agua. La tensión de superficie es dependiente de la densidad de las moléculas de tensioactivos presentes en la interfase.

La balanza está constituida por una cuba (denominada de Langmuir) que se llena con un tampón determinado y que dispone de un dispositivo para medir la tensión (lamina de Wilhelmy). Cuando una gota de un fluido está en contacto con otro fluido, la gota siguiente presenta efectos combinados de la tensión

A) Lamina de Wilhelmy

Consiste en una lámina delgada que se sumerge en el interior de un líquido, poniéndose de manifiesto la tensión de superficie por el menisco que se forma a lo largo de su perímetro (figura 3.1.2.1).

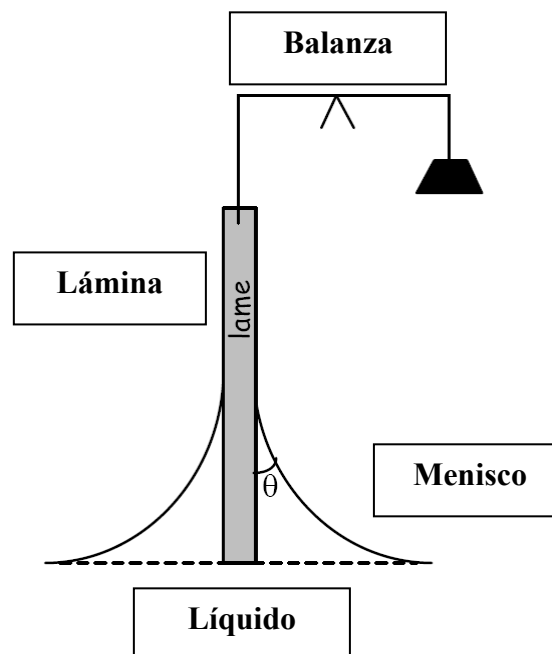


Figure 3.1.2.1. Esquema (vista lateral) de una lamina de Wilhelmy en la superficie de un líquido.

El balance de fuerzas verticales muestra que el peso, w , que el menisco soporta por la lámina es igual a la fuerza proporcionada por la superficie. Esta fuerza es igual a la componente vertical de la tensión de superficie $\gamma \cos \theta$, donde θ es el ángulo de contacto con la lamina, multiplicado por el perímetro de la lamina p .

$$F = p \times \gamma \times \cos \theta \quad (3.1.2.1)$$

La medida del peso del menisco permite conocer la tensión de superficie, lo cual puede hacerse utilizando una balanza de precisión. Su uso es simple, particularmente en aquellos casos donde el ángulo de contacto es nulo (lamina de platino, de vidrio o de

papel absorbente). La fuerza medida F sólo depende del ángulo de contacto y la relación simplificada puede escribirse:

$$\gamma = \frac{F}{p} \quad (3.1.2.2)$$

El peso de un líquido actuando sobre la lámina es finalmente directamente proporcional a la tensión de superficie. Esta técnica permite medir la tensión de superficie en función del tiempo en que la lámina crea un menisco con el líquido. La tensión depende de la temperatura con lo que las medidas deben realizarse siempre a temperatura controlada.

B) Balanza de Langmuir

La Balanza de Langmuir está constituida por: una cuba de teflón en la que la superficie y el volumen varían según el tipo de balanza, una o dos barreras móviles de teflón monitorizadas por un motor las cuales varían la superficie de la cuba y permite hacer variar la densidad de las moléculas en la interfase y, por último, por un dispositivo para medir la tensión superficial (lámina de Wilhelmy).

Los tensioactivos forman una capa en la superficie del agua. Al depositar moléculas anfífilas en la superficie, varias situaciones son posibles en función del carácter hidrofóbico de las moléculas. Si las moléculas son parcialmente solubles en la fase acuosa, este es el caso de la mayoría de las proteínas, un equilibrio se establece entre las concentraciones en la subfase y en la interfase, hablándose entonces de capa de Gibbs. Si las moléculas no son solubles en la fase acuosa y forman un film monomolecular en la superficie se habla entonces de film de Langmuir.

La presencia de esta capa disminuye la energía de superficie. La presión de superficie, π se define como la diferencia de tensión entre la tensión de superficie de la subfase sola γ_0 y la subfase cubierta de moléculas, γ .

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.1.2.3)$$

La tendencia de los tensioactivos a acumularse en la interfase favorece la expansión de la interfase y disminuye la tensión de superficie. La balanza de Langmuir permite realizar el estudio termodinámico de estas capas superficiales, que suelen ser caracterizadas por tres variables termodinámicas: la presión de superficie π expresada en mN/m, el área disponible por molécula A en m²/molécula y la temperatura T .

Las características de una monocapa sobre la superficie de agua son estudiadas midiendo las modificaciones de la presión de superficie en función de la compresión de esta monocapa.

La variación de la presión de superficie en función del área ocupada por molécula se llama “isoterma de presión-superficie”, realizándose la compresión a temperatura constante (de ahí el nombre de isoterma). La forma de la isoterma es característica de las moléculas presentes en el film. La isoterma se puede descomponer generalmente en tres regiones distintas (figura 3.1.2.1). Tras el depósito inicial sobre la fase acuosa si no se aplica ninguna presión externa sobre la monocapa las moléculas forman el equivalente a un haz de dos dimensiones (2D), que puede ser descrito por:

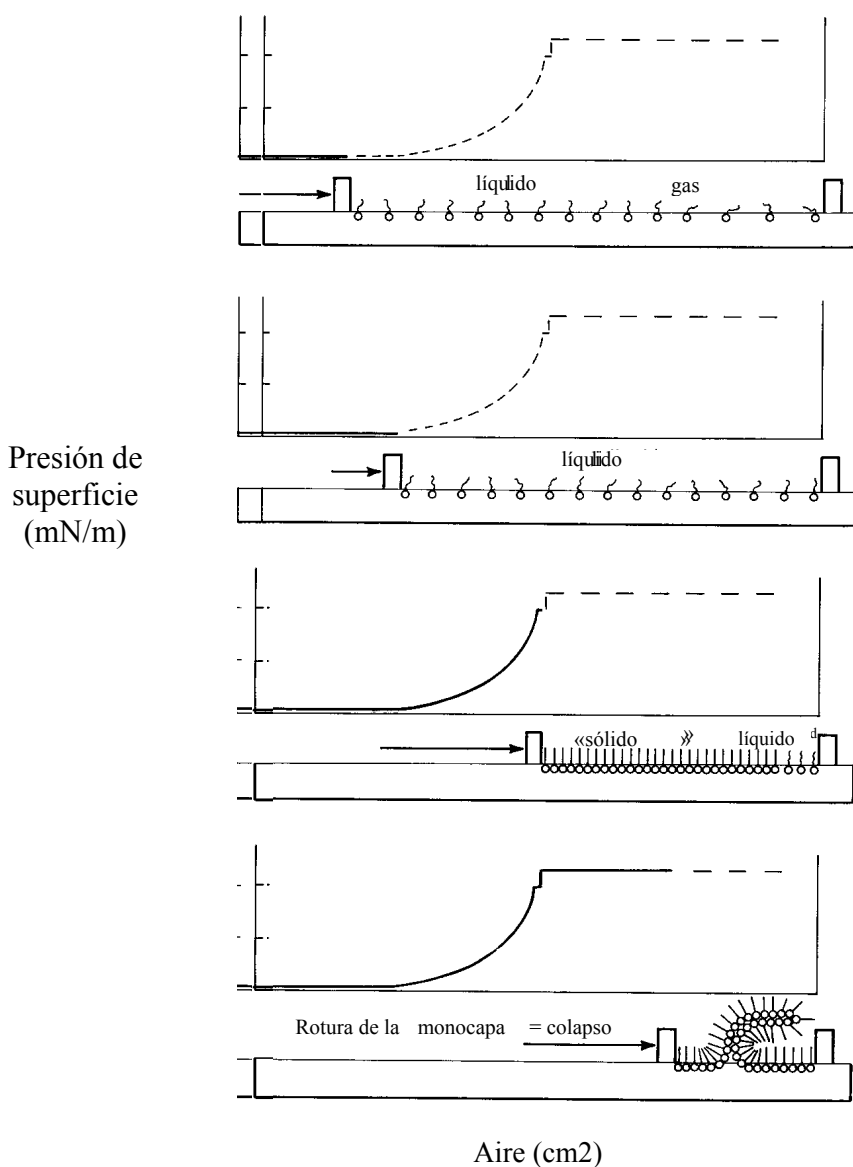


Figure 3.1.2.1. Cambios de estado de los tensioactivos en una interfase durante la compresión. (Sherman, 1968).

$$\Pi A = KT \quad (3.1.2.4)$$

donde π es la presión de superficie, A es el área molecular, K la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. En compresión, las moléculas interactúan y se comportan como un líquido en 2D. Con el cierre continuo de barreras, el aumento de la presión lleva una reorganización, comportándose la monocapa como un cuasi-sólido. Finalmente, la presión de transición, π_c , se alcanza cuando la capa interfacial llega a ser incompresible. Las fuerzas ejercidas sobre la capa deben ser suficientemente fuertes para confinar únicamente en 2D y las moléculas sean expulsadas del plano de la monocapa, hacia la subfase (en el caso de que las moléculas sean más hidrofílicas) o hacia el aire (en el caso que las moléculas sean más hidrofóbicas). Sin embargo, la transición no es uniforme a través de la monocapa, sino que generalmente es iniciada cerca del borde de las barreras, en las esquinas de la cuba o en la lámina de Wilhelmy. Normalmente, una capa “colapsada” está constituida por superficies grandes de monocapas no colapsadas con algunas “crestas de montañas”, donde las monocapas han sido aplastadas juntas para formar agregados voluminosos, bastante similares a un desplazamiento orogénico como la formación de montañas como consecuencia del choque entre dos placas tectónicas.

3.2 Proteínas en la interfase

La mayoría de los coloides alimentarios son estabilizados por una capa de proteínas adsorbidas en la interfase aceite-agua o aire-agua.

3.2.1. Adsorción en la interfase

Para comprender el papel de las proteínas, es necesario identificar los parámetros moleculares que contribuyen a la formación de las capas interfaciales. Para el estudio de estas capas es conveniente estudiar las diferentes etapas que conducen a su formación:

- 1.- Transferencia de los tensioactivos de la fase acuosa u oleosa hacia la interfase.
- 2.- Adsorción de los tensioactivos en la interfase.

3.- Reagrupamiento estructural de los tensioactivos adsorbidos. Esta etapa es especialmente importante en el caso de proteínas. La tensión superficial disminuye, no sólo por la adsorción de nuevos tensioactivos, sino también por la razón de cambios conformacionales de las proteínas ya adsorbidas (figura 3.2.1.1).

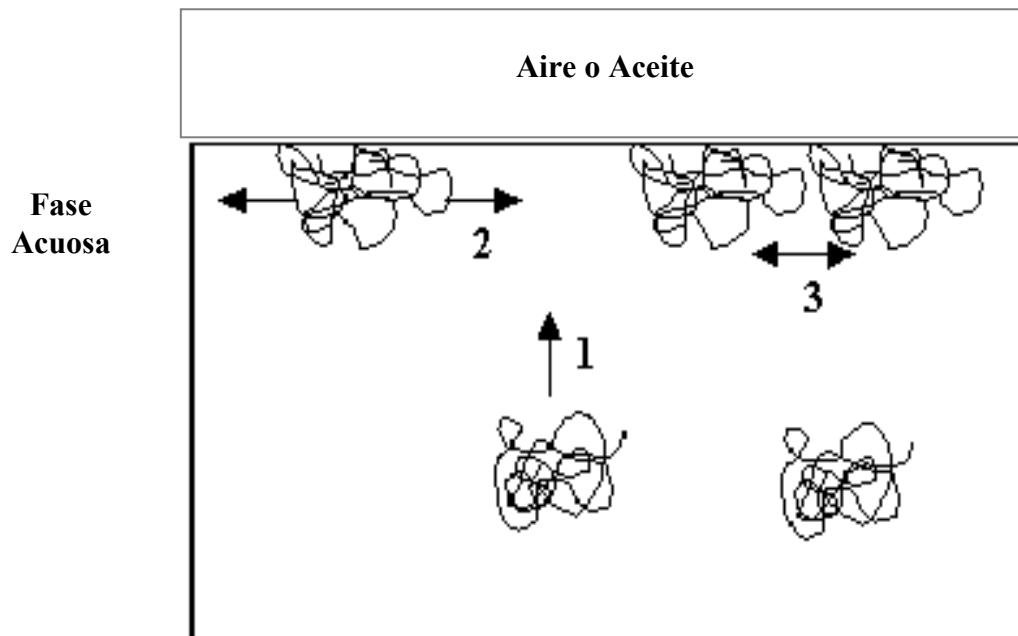


Figura 3.2.1.1. Esquema de la adsorción de una proteína en la interfase aire-agua o aceite-agua:
 1.- Transporte a la interfase
 2.- Adsorción
 3.- Reordenación (interacción proteína-proteína)

A continuación, se detalla cada una de las etapas anteriores:

Transporte

El transporte de las proteínas en la fase acuosa hacia la interfase depende del tamaño de las moléculas, de la viscosidad de la solución y de la temperatura. El proceso responsable de esta transferencia puede ser la difusión o la convección. En régimen estacionario, los fenómenos de convección son generalmente nulos y se puede decir que el transporte de proteínas hacia la interfase está prácticamente controlado por la difusión (Dickinson, 1996). Sin embargo, en el caso de la formación de una emulsión, las proteínas son transportadas por convección hacia la interfase aceite-agua gracias a un flujo dinámico debido al homogenizador.

El tiempo característico de difusión es más importante en el caso de proteínas que en el de tensioactivos, debido a la masa molecular más elevada de las proteínas que reducen su movilidad, y a los cambios conformacionales durante la adsorción.

Adsorción y reordenación en la interfase

Las proteínas se adsorben lentamente en la interfase en comparación con los tensioactivos simples. Por su composición las proteínas son moléculas anfifílicas y están compuestas por partes hidrofóbicas e hidrofílicas. Cuando las proteínas se diluyen en la fase acuosa, se adsorben espontáneamente en la interfase para minimizar el contacto desfavorable entre sus segmentos no polares y la fase acuosa (Dickinson, 1996). Su adsorción se rige por interacciones hidrofóbicas.

En la interfase aceite-agua, los aminoácidos hidrofóbicos interactúan con las moléculas de aceite y las interacciones intramoleculares son dirigidas hacia la fase lipídica. Las proteínas pierden su estructura terciaria durante la adsorción para conservar lo esencial de su estructura secundaria. Solo una parte de las proteínas adsorbidas está en contacto directo con la interfase, el resto de la proteína está desplegada en la fase acuosa.

El primer factor clave que condiciona una buena actividad superficial de la interfase es la solubilidad de las proteínas elegidas en la fase acuosa para formar las emulsiones. La hidrofobicidad y la flexibilidad del esqueleto constituyen las otras dos cualidades de un buen emulsionante proteico (Dickinson, 1996). La combinación de todos estos parámetros va a determinar las propiedades interfaciales de las proteínas.

Las proteínas que poseen una fuerte hidrofobicidad alcanzan una saturación de la interfase en algunos minutos y son mejores agentes de superficie que las proteínas hidrofílicas donde el tiempo de colocación en la interfase es de algunas horas como consecuencia de un tiempo de desnaturalización más importante (Beverung y col., 1999). Por otro lado, se acepta que los mejores emulsionantes proteicos alimentarios poseen estructuras desordenadas y flexibles (Dickinson, 1996).

3.2.2. Naturaleza de las proteínas adsorbidas

La naturaleza de las proteínas (globulares o flexibles) influye sobre la velocidad de la adsorción en la interfase. Debido a su estructura rígida, las proteínas globulares, se propagan poco en la interfase en comparación con las proteínas flexibles. De hecho, las

proteínas globulares tienen un tiempo de difusión nulo comparado con el tiempo de reordenación de las proteínas que constituye el factor limitante para estas proteínas. En el caso de las proteínas flexibles, es la velocidad de difusión de la fase acuosa el factor limitante (Martín y col., 2002) (Figura 3.2.2.1).

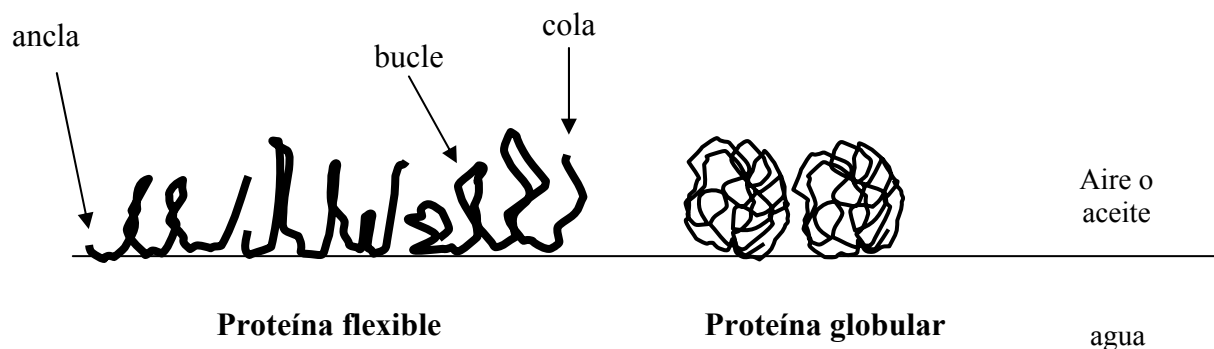


Figura 3.2.2.1. Representación esquemática de la conformación de diferentes proteínas en una interfase aire-agua o aceite-agua.

1. Proteínas flexibles

Las proteínas flexibles se adsorben en la interfase según el modelo de anclajes-bucles-colas. Los residuos cargados son localizados en las regiones de la proteína que bañan la fase acuosa y los grupos apolares en la región no acuosa de la interfase (Dickinson, 1996). Las proteínas flexibles se distinguen por su estructura tridimensional muy móvil que le permite adaptarse a la zona interfacial que deben cubrir. La estructura y la concentración de proteínas de la capa interfacial formada dependen de la cantidad de proteínas disponibles para cubrir la zona interfacial creada.

2. Proteínas globulares

Las proteínas globulares, debido a su rigidez, conservan la estructura secundaria y terciaria en la interfase. Su adsorción no se rige por el mismo modelo que las proteínas flexibles. Así, se despliegan parcialmente y lentamente para optimizar los contactos energéticamente favorables entre los residuos no polares y la interfase conservando esencialmente su estructura secundaria o una parte de su estructura terciaria debido a los enlaces intramoleculares fuertes. Las proteínas globulares forman en la interfase monocapas bidimensionales muy densas pero deformables, de estructura parecida a las proteínas nativas en disolución e interactuando entre ellas.

Así, las proteínas globulares pueden clasificarse entre proteínas “duras” y “blandas”. Esta teoría se elaboró para diferenciar el comportamiento de las proteínas globulares con respecto a su desnaturalización y su adsorción. Las reorganizaciones en la interfase son inexistentes para proteínas “duras” que son compactadas en la capa adsorbida. Por el contrario, las proteínas “blandas” tienen una estructura nativa en parte alterada debido a la adsorción y ellas se despliegan mejor en la interfase.

4. EMULSIONES

4.1 Introducción

Una emulsión es un sistema heterogéneo que posee un líquido inmisible disperso en forma de pequeñas gotas en el otro. En estos sistemas se pueden distinguir la fase presente en forma de gotas que se denomina fase discontinua, interna o dispersa y la fase en forma de matriz donde se suspenden las gotas, constituye la fase cerrada, continua o externa. (Ullmann's Enciclopedia of Industrial Chemistry, 1987). En la práctica debe contener un tercer componente, un emulsionante, que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar acuosa.

Normalmente las emulsiones alimentarias están formadas por dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite en agua) con uno de los líquidos dispersos en el otro. En la mayoría de los alimentos, los diámetros de las gotas permanecen entre 0,1 y 100 μm (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Friberg y Larsson, 1997).

Las emulsiones se pueden clasificar en función de la distribución espacial relativa de la fase acuosa y la oleosa:

- Un sistema constituido por gotas de aceite en el interior de una fase acuosa se denomina emulsiones de aceite en agua (o/w). Ej. Leche, salsas, mayonesas...
- Un sistema constituido por gotas de agua dispersas en aceite son emulsiones de agua en aceite (w/o). Ej. Margarina, mantequilla...
- Existen emulsiones polifásicas o múltiples, llamadas así por contener en la fase interna otra fase dispersa en ella. (w/o/w ó o/w/o) (Garti, 1997).
- Micro emulsiones (Bokström y col., 1986) donde existe una fase líquida isotrópica con una micro estructura específica formada espontáneamente y cuyo diámetro es menor de 0,01 μm (Robb, 1982).
- Emulsión espontánea es aquella que se forma sin un aporte suplementario de energía mecánica y cuyo diámetro medio alrededor de 0,1 μm .

4.2 Formación de emulsiones

La formación de emulsiones es un proceso complejo donde actúan una gran cantidad de variables, que actúan en la eficacia del proceso y en las propiedades del producto final.

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles separados en una emulsión o reducir el tamaño de gotas en una emulsión ya existente, es conocido como homogeneización. En la industria alimentaria, este proceso es normalmente llevado a cabo en unos dispositivos mecánicos denominados homogeneizadores, que someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica, por ejemplo, válvulas de alta presión o molinos coloidales (Loncin y Merson, 1797; Walstra, 1983; Schubert y Karbstein, 1994; Walstra y Smulder, 1998).

Se puede considerar la emulsificación en 3 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.

Dependiendo de la naturaleza del material de partida se puede separar la homogeneización en dos categorías.

1. La homogeneización primaria que consiste en la creación de la emulsión a partir de dos fases líquidas separadas Ej. mayonesas
2. La homogeneización secundaria que consiste en la reducción del tamaño de gotas de las emulsiones ya existentes. Ej. Leche

También es muy usada la acción de crear la emulsión en dos pasos, creando inicialmente unas gotas grandes y posteriormente otro homogeneizador para reducir el tamaño de las gotas.

En cualquier caso los pasos críticos son la ruptura de las gotas y su coalescencia, ambas favorecidas por una intensa agitación. (Walstra y Smulder, 1997).

Para formar una emulsión que sea cinéticamente estable por un periodo razonable de tiempo, se debe prevenir la unión de las gotas formadas. Esto se consigue normalmente teniendo una concentración suficiente de emulsionante presente durante el

proceso de homogeneización. El emulsionante se adsorbe sobre la superficie de las gotas formando una capa superficial que impide que las gotas se acerquen lo suficiente para coalescer. (McClements, 2004).

De acuerdo con Janssen y Meijer (1995) el proceso de deformación y rotura de las gotas durante el proceso de emulsificación está regido por un número capilar local, que establece la relación entre el esfuerzo de cizalla, τ , ejercido sobre la gota por el flujo exterior que tiende a producir deformación y rotura, y el esfuerzo interfacial, σ/R , o la presión de Laplace, $2\sigma/R$, que tiende a impedir la deformación de las gotas:

$$Ca = \frac{\tau R}{\sigma} = \frac{\eta_c \dot{\gamma} R}{\sigma} \quad (4.2.1)$$

donde η_c es la viscosidad de la fase continua, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de cizalla siendo σ la tensión interfacial y R el radio de las gotas de fase dispersa.

Para un sistema dado, es posible definir un valor crítico para el número Capilar, Ca_{crit} , como el valor a partir del cual comienza la rotura de las gotas. Si una emulsión tiene un número Capilar por encima del valor crítico (ej. altas velocidades de cizalla o gotas de gran tamaño), se produce la rotura de las gotas. En caso contrario, podrán deformarse pero sin llegar a la rotura de las mismas. El valor crítico del número Capilar de una emulsión en ausencia de emulsionante depende principalmente de la relación de viscosidades de la fase continua y dispersa (Janssen y col., 1994; Karbstein y Schubert, 1995a; Williams y col., 1997; Grace, 1982). Como se puede observar en la figura 3.2.1 el valor de Ca_{crit} para esfuerzos de cizalla presenta un mínimo cuando la relación de viscosidades η_d/η_c está entre el 0,1 y 1. Las gotas resisten a la rotura a bajas relaciones de viscosidad ($<0,05$) debido a que pueden adoptar formas extremadamente alargadas antes que su rotura tenga lugar. A altas relaciones de viscosidad (>5) las gotas son resistentes a la rotura debido a que no tienen suficiente tiempo para deformarse en una determinada dirección puesto que las gotas pueden adoptar rápidamente una nueva orientación y alterar la distribución de esfuerzos de rotura que actúan sobre ellas. La rotura de las gotas tiene lugar a relaciones de viscosidad intermedias.

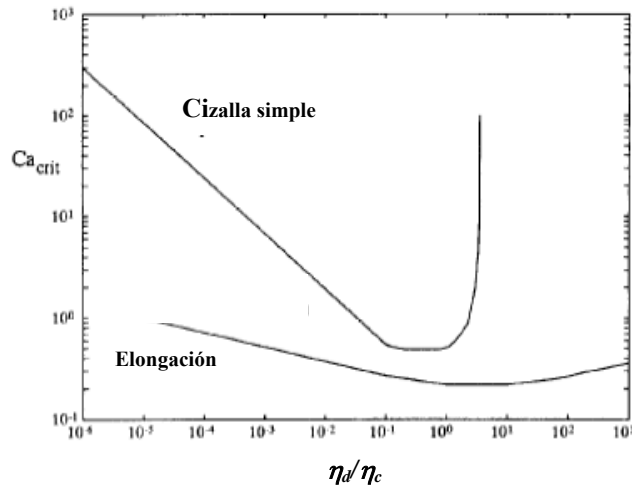


Figura 4.2.1. Número capilar crítico para rotura de gota en función de la relación de viscosidades entre las fases continua y dispersa, tanto para cizalla simple como elongacional.

Durante el proceso de emulsificación tanto el número capilar (Ca) como el número de Reynolds (Re) decrecen como resultado de la reducción de escala y el incremento en la viscosidad, respectivamente. Pueden considerarse las siguientes etapas:

- En primer lugar tiene lugar el alargamiento de las gotas de fase dispersa cuando Ca es mucho menor que un valor crítico, Ca_{crit} , por encima del cual el esfuerzo local es predominante. Cualquier deformación de las gotas conduce a un incremento de la presión de Laplace. En este caso la presión de la parte cóncava de la superficie curva de la internas, es mayor que en el lado convexo en una cantidad $2\sigma/R$.
- El segundo proceso es consecutivo y tiene lugar cuando las gotas alargadas se rompen ocurriendo cuando $Ca > Ca_{crit}$. Este valor de Ca_{crit} depende de la relación de viscosidades entre la fase dispersa y continua (figura 4.2.1). Para romper las gotas debe aplicarse un gradiente de presión equivalente a la presión de Laplace a través de una distancia r , del orden de $2\sigma/r^2$. Los gradientes de velocidad o de presión deben ser suministrados por agitación. Mientras más pequeñas sean las gotas, más intensa debe ser la agitación. Por lo tanto, durante la emulsificación tendrá lugar un movimiento turbulento, a no ser que la viscosidad del medio continuo sea muy alta.

- Por último se lleva a cabo la coalescencia de las gotas dispersas cuando $Ca \ll Ca_{crit}$.

En resumen, se puede comentar que los aspectos más importantes para la formación de la emulsión son: agitación mecánica suficiente al sistema, el equilibrio entre el proceso de formación de gotas y la coalescencia y el papel del emulsionante.

4.3 Variables influyentes en la emulsificación

En cualquier proceso de emulsificación hay que tener en cuenta tres factores. En primer lugar la elección de las condiciones de procesado (energía aplicada, temperatura, tiempo y protocolo); en segundo lugar, la selección del equipo, el cual determina el mecanismo de rotura de gotas y, finalmente, la elección del tipo y concentración de emulsionante y de cada una de las fases.

1. Energía aplicada

En general, para la preparación de emulsiones se requiere energía mecánica. De esta forma, normalmente, un aumento de la energía aplicada produce un descenso del tamaño de gota, asociado con un aumento de viscosidad de la emulsión y de sus propiedades reológicas, lo que suele traducirse en una mayor estabilidad. (Halling, 1981; Franco y col., 1995). La energía suministrada suele controlarse mediante la densidad energética que es el aumento de la energía disipada por unidad de volumen, que puede dar idea de la eficiencia de la emulsificación (McClements, 2004).

Este efecto no se produce de forma ilimitada. Así, a partir de cierto tamaño que depende de las condiciones del sistema agua-aceite y de las condiciones de procesado, no es posible reducir más el tamaño de las gotas.

Incluso, en algunas ocasiones un incremento de la energía aplicada supone un efecto contrario como consecuencia de la exposición del sistema a excesivas temperaturas y elevadas presiones. Esto es particularmente acusado en emulsiones que tienden a formar estructuras tipo gel en el medio continuo, que puede ser destruida mediante una agitación excesiva (Gallegos y col., 1996). El incremento excesivo de la energía aplicada puede provocar un mayor grado de coalescencia durante la emulsificación, simultáneamente a la ruptura de gotas (Franco y col., 1995).

Un incremento de la energía suministrada supone también un incremento en los costes de procesado y por tanto, un alejamiento del óptimo de funcionamiento que debe tenerse en cuenta factores tales como el tamaño de gota y propiedades reológicas para alcanzar estabilidad, tiempo óptimo y costes.

2. **Temperatura**

La temperatura puede influir en el proceso de emulsificación de diferentes formas.

La viscosidad tanto de la fase acuosa como del aceite depende de la temperatura y por tanto el tamaño mínimo de gotas que se produce puede alterarse a causa de una variación de la relación de viscosidades. Normalmente la viscosidad del aceite disminuye más rápidamente que con la agitación térmica que la viscosidad del agua por lo que para una emulsión de aceite en agua, se facilita el proceso de rotura de gotas a altas temperaturas. Además un incremento en la temperatura puede provocar una ligera reducción en la tensión interfacial entre las fases acuosa y oleosa que facilita la producción de gotas más pequeñas y la movilidad de éstas. Por otro lado, un aumento de temperatura puede favorecer también la recoalescencia (Sánchez y col., 2000; Bengoechea y col., 2006).

Además en el caso de 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 (Franco y col., 1998).

3. **Tiempo**

En general un aumento del tiempo de emulsificación se traduce en un aumento de la energía total suministrada al sistema por lo que el efecto es similar provocando un descenso del tamaño de gota y de la polidispersión de la distribución. (Franco y col., 1995). Por lo general, se llega a un punto en que un aumento del tiempo no produce una significativa mejora en la disminución de tamaño; aumentando sensiblemente el coste del proceso.

Además un aumento del tiempo de emulsificación de manera excesiva puede ocasionar un deterioro de la película interfacial además de un calentamiento de la emulsión, provocando los efectos comentados en el apartado anterior.

4. **Protocolo de preparación.**

Hall y Dawson (1940) demostraron que la forma de añadir las fases y el emulsionante influye sobre el proceso de emulsificación. Además es un hecho conocido que es posible emulsionar más cantidad de aceite añadiendo éste de forma intermitente o lentamente (Robinson, 1924).

5. **Tipo y geometría del emulsificador**

Existen numerosos tipos de emulsificadores que pueden ser usados durante la homogeneización. La elección de un homogeneizador determinado para una aplicación en particular depende de un gran número de factores, incluyendo la distribución de tamaño de gotas deseada, el consumo de energía, las propiedades fisicoquímicas de las fases y del producto final y los costes...Se debe seleccionar el más apropiado atendiendo a las características deseadas en el producto final (Karbtein y Schubert, 1995b; Schubert, 1997).

Hay que destacar, también que la geometría de las turbinas o agitadores influye también en la ruptura de las gotas de aceite durante la emulsificación según el tipo de deformación predominante que imponga al sistema.

En el apartado 3.4 se abordará una descripción de las características más importantes de algunos de los equipos de emulsificación más empleados.

6. **Tipo y concentración de emulsionante**

Muchos tipos distintos de emulsionantes pueden elegirse presentando, cada uno de ellos, diferentes características durante la homogeneización. Estos emulsionantes se suelen adsorber en la superficie de las gotas reduciendo su tensión interfacial formando una membrana protectora que evita que las partículas se acerquen para coalescer. De esta forma, mientras más rápido se adsorba el emulsionante mayor es la reducción de la tensión interfacial, y menor el tamaño de las gotas que puede producir una determinada densidad de energía.

La elección del emulsionante se puede basar en la velocidad de adsorción en la interfase (Schubert y Armbruster, 1992), la capacidad para reducir la tensión interfacial y la resistencia a la coalescencia de la capa interfacial que forma, que depende de sus

propiedades estructurales y fisicoquímicas (Walstra, 1983; McClements, 2004). Otros factores también influyen en la elección del tipo de emulsionante como son la resistencia durante la homogeneización, la capacidad de proporcionar estabilidad a largo plazo, la posible aplicación legal o el coste.

La cantidad de emulsionante favorece la adsorción de este en la interfase pudiendo distinguir dos regiones (Tcholakova y col., 2002):

1. Emulsionante insuficiente. Cuando la concentración de emulsionante está limitada, no hay suficiente emulsionante para cubrir toda la superficie interfacial generada por el homogenizador y por tanto, el factor controlante que genera el tamaño de gota de la emulsión es la concentración de emulsionante independientemente de la energía suministrada al sistema.

2. Exceso de emulsionante. Cuando la concentración de emulsionante se encuentra en exceso el tamaño de gota es relativamente independiente de la concentración de emulsionante y depende principalmente de la densidad de energía impuesta por el homogenizador.

7. Propiedades de ambas fases

La composición y propiedades fisicoquímicas de ambas fases, oleosa y acuosa, influyen en el tamaño de gota obtenido durante la emulsificación. (Phipps, 1985; Walstra y Smulder, 1998). 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 para unas condiciones dadas (Braginsky y Belevitzkaya, 1996).

La tensión interfacial depende tanto del tipo de aceite, debido a de las diferentes estructuras moleculares que poseen o por la presencia de impurezas superficialmente activas, como de la composición de la fase acuosa que puede contener una gran variedad de componentes, tales como sales, ácidos, bases, burbujas de gas, etc. (Walstra, 1983; Banks y Muir, 1988). Muchas de estas impurezas alterarán el tamaño de las gotas a causa de su influencia no sólo en la tensión interfacial, sino en la reología, la estabilidad a la coalescencia o la cinética de adsorción.

Entre todas las propiedades a considerar cabría destacar la influencia de las propiedades reológicas de ambas fases durante la emulsificación que afectan a la

facilidad con que las gotas se rompen como consecuencia de una deformación aplicada por el emulsificador. (McClements, 2004).

En conclusión, el conocimiento de la composición tanto de la fase acuosa como la oleosa de una emulsión como el papel que juega cada componente durante la emulsificación es importante para optimizar el tamaño de gotas producido por un homogeneizador.

8. **Fracción en volumen de fase dispersa**

Generalmente el diámetro medio aumenta al hacerlo la fracción en volumen (ϕ) si las demás condiciones se mantienen constantes, pero a menudo este efecto es pequeño. Aunque este parámetro ejerce influencia en el proceso de emulsificación y en las propiedades de la emulsión formada, el parámetro que más influye en éstos es la relación entre la concentración de emulsionante y la fracción en volumen de fase dispersa (Djakovic y Dokic, 1977; Halling, 1981). El efecto de la fracción en volumen de fase dispersa se comentará posteriormente en el apartado dedicado a Reología de emulsiones.

4.4 **Equipos de homogeneización**

Existen diferentes tipos de dispositivos homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. Cada uno de estos dispositivos tiene sus propias ventajas e inconvenientes, y es más apropiado para uno u otro tipo de material. La elección de un homogeneizador particular depende de la escala de producción (industrial o de laboratorio), la naturaleza de los materiales de partida, la distribución de tamaños de gota deseada, las propiedades físico-químicas requeridas del producto final, y de los costes (materia prima, operación y mantenimiento del equipo) (Karbstein y Schubert, 1995b; Schubert, 1997). Por ejemplo, uno de los factores más importantes a la hora de elegir es la densidad de energía y la eficiencia para crear emulsiones con pequeños tamaños de gota. Una representación característica del equipo homogeneizador se obtiene a partir de la relación que existe entre el tamaño de gota ($d_{3,2}$) y la densidad de energía (E_v) (figura 4.4.1).

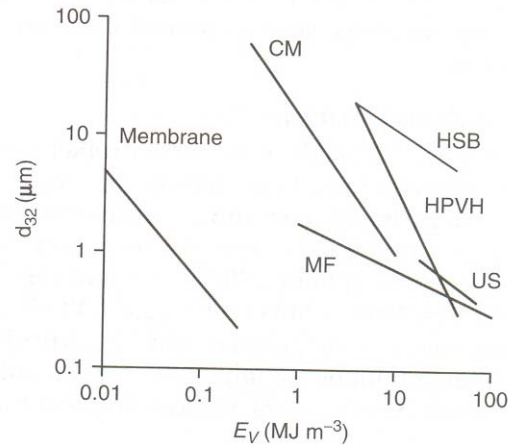
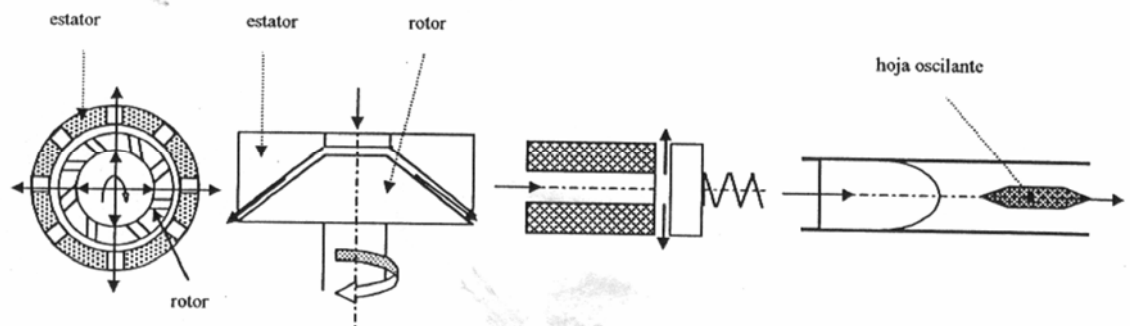


Figura 4.4.1. Comparación de las características de los diferentes homogeneizadores mecánicos. Variación del tamaño de gota con la densidad de energía: HPVH = válvula homogeneizadora de alta presión; CM = molino coloidal; US = homogeneizador ultrasónico; HSB = mezclador de alta velocidad; MF = microfluidizador.

A continuación, se muestran los emulsificadores más empleados en la actualidad en la industria alimentaria (Figura 4.4.2):



4.4.2. Distintos equipos emulsificadores: (a) homogeneizador "Ultra Turrax", (b) molino coloidal, (c) homogeneizadores de presión, (d) emulsificador ultrasónico.

1. Mezcladores simples y agitadores

Los líquidos a homogeneizar se sitúan en un recipiente, provisto de un agitador que rota a alta velocidad (Loncin y Merson, 1979; Brennan y col., 1980; Fellows, 1988).

Una rápida rotación genera una combinación de gradiente de velocidad longitudinal, rotacional y radial en los líquidos, que rompe la interfase, favorece su mezclado y divide de las gotas formadas en otras de menor tamaño (Fellows, 1988). Existe una gran variedad de mezcladores que difieren fundamentalmente en la geometría del sistema impulsor (paletas, hélices, turbinas,...). El mezclado generalmente

proporciona un incremento de la temperatura de la emulsión debido a la transformación de energía mecánica en calor como consecuencia de la disipación viscosa. En general, son sistemas que requieren el empleo de agentes de gran capacidad emulsionante.

Hay que distinguir en los utilizados a escala industrial constituidos por grandes tanques recubiertos por donde recircula un fluido de termostatación y los utilizados a escala de laboratorio como los agitadores rotor-estator tipo “Ultra Turrax” (Wiedman y Blenke, 1976), que aplican velocidades comprendidas entre 3.000 y 20.000 rpm.

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 espaciado del hueco entre el rotor y el estator, la velocidad de rotación o utilizando superficies rugosas o dentadas (Gopal, 1968).

3. **Homogeneizadores de válvula a alta presión**

Estos homogeneizadores son adecuados para materiales de viscosidad media y baja, especialmente cuando se requiere un tamaño de gota pequeño. 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 forma 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 han 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 emplean ondas ultrasónicas de elevada energía que generan 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 de alta intensidad, pero sólo dos de ellos se suelen utilizar en la industria alimentaria: traductores piezoeléctricos y generadores de propulsión a chorro de líquidos (Gopal, 1968). 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 gotas dependen de la velocidad de inyección, del tamaño y diseño de la boquilla dispersante, de la viscosidad de ambas fases y de la tensión interfacial.

6. **Microfluidización**

Esta técnica es capaz de crear emulsiones con un tamaño de gota extremadamente pequeño directamente partiendo de las fases acuosa y oleosa individualmente (Dickinson y Stainsby, 1982). Flujos de ambas fases son acelerados a alta velocidad y se hacen chocar con una superficie, causando un mezclado en forma de gotas. Se usa especialmente a escala de laboratorio para preparar emulsiones cuando la cantidad de materiales de partida es limitada o de alto coste. (Dickinson y Stainsby, 1982).

7. Homogeneizadores de membrana

En este tipo de dispositivo se hacen pasar dos líquidos inmiscibles por una membrana de vidrio que contiene un tamaño de poro uniforme. El tamaño de gota formado depende del tamaño de los poros de la membrana y la tensión interfacial entre las fases acuosas y oleosas (Kandori, 1995).

La gran ventaja de estos dispositivos es la capacidad de producir emulsiones con distribuciones de gota muy estrecha y una alta eficiencia energética, debido a una pérdida menor energía por disipación viscosa.

4.5 Estabilidad de emulsiones

Termodinámicamente, una emulsión es inestable debido al gran área interfacial que presenta, con lo que las partículas de la fase dispersa tienden a la agregación espontánea, por lo que se busca que sean cinéticamente estables para la aplicación que se le designa. Uno de los trabajos más importantes en la industria alimentaria consiste en estudiar la estabilidad de las emulsiones.

Este término se refiere a la capacidad de una emulsión a resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. La estabilidad es un concepto relativo que depende, de la escala de tiempo que se esté considerando. Hay emulsiones que solo necesitan permanecer estable durante pocos segundos, minutos o horas y otras deben ser estables hasta años.

Una emulsión se considera estable si su distribución de tamaño de gotas o elemento de volumen observado permanece constante con el tiempo (Schubert y Engel, 2004). Es importante diferenciar entre estabilidad física, química y microbiana.

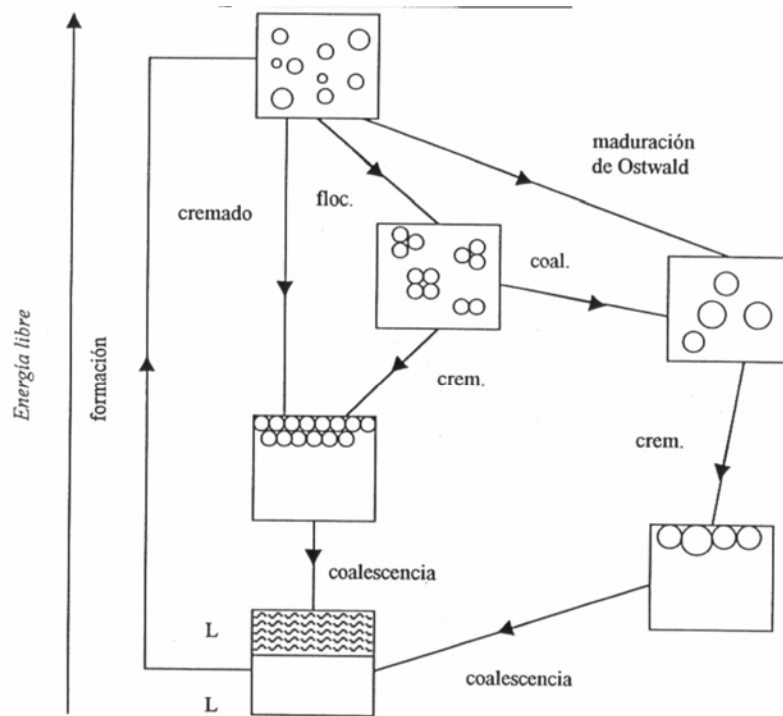
- La estabilidad química refleja la resistencia a los cambios químicos. Normalmente la oxidación de grasas y aceites es la reacción crítica para el deterioro de las emulsiones. La adición de antioxidantes y protectores contra las influencias externas como la luz o el excesivo calor mejora la estabilidad química

- La estabilidad microbiana refleja la resistencia a cambios causados por la actividad microbiana. Esta es especialmente importante en emulsiones de aceite en agua, puesto que agua en aceite no se observa un gran crecimiento debido a lo pequeño de las gotas.
- La estabilidad física se refiere a la ausencia de alteraciones de la distribución espacial u organización estructural de las moléculas. Modificaciones en la estabilidad química o microbiológica suelen producir problemas de estabilización física.

Es muy complicado predecir cuantitativamente la estabilidad de las emulsiones a lo largo del tiempo, y se suele comprobar principalmente con estudios prácticos.

4.5.1 Mecanismos de desestabilización de emulsiones

Cremado, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, inversión de fase y maduración de Ostwald son ejemplos de desestabilización física (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996, 2003) mientras que oxidación e hidrólisis son ejemplos comunes de desestabilización química (Fennema, 1996; McClements y Decker, 2000). El desarrollo de una estrategia para prevenir cambios indeseables en las propiedades de una emulsión alimentaria en particular depende del mecanismo fisicoquímico predominante responsables de los cambios. A continuación se exponen algunos de los procesos más importantes que provocan desestabilización (figura 4.5.1.1):



4.5.1.1 Procesos de desestabilización de emulsiones.

Cremado. En emulsiones o/w resulta de la acción de la gravedad o de un campo centrífugo sobre las gotas de densidad menor que la del medio de dispersión. El fenómeno equivalente en una emulsión w/o se denomina sedimentación. El resultado final del cremado es un gradiente vertical de concentración de gotas dentro de la muestra. Cuando las gotas no son demasiado pequeñas se separa una capa de crema concentrada en la superficie de la emulsión.

Floculación. Este proceso es la agregación de gotas, bajo la acción de fuerzas atractivas actuando entre ellas, sin cambios en la distribución de tamaño de partículas. La floculación de las gotas puede afectar a la estabilidad de una emulsión de diferentes formas (Dickinson, 1988). 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). A concentraciones intermedias son posibles ambas situaciones, dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre gotas.

Coalescencia. Es el proceso de unión de gotas floculadas o cremadas para formar gotas más grandes. Es el principal mecanismo por el que la emulsión se mueve hacia su estado más estable termodinámicamente, porque lleva consigo una disminución del área de contacto entre las fases acuosa y oleosa. El proceso es análogo a la coagulación en una suspensión y se produce por la eliminación de la delgada película de líquido (agua o aceite) dispuesta entre gotas vecinas dentro de un flóculo o de la capa cremada.

Coalescencia parcial (van Boekel y Walstra, 1981) puede ocurrir si las gotas de la emulsión contienen partículas sólidas en tal cantidad y disposición que, en vez de fluir juntas dentro de gotas esféricas más grandes, en su lugar, se agrupan dentro de agregados no esféricos.

La inversión de fases implica un cambio en la estructura de la emulsión de o/w a w/o o viceversa, como consecuencia de un cambio de temperatura o de concentración de uno de los componentes, o por adición de un nuevo componente al sistema. Puede considerarse que lo que tiene lugar realmente, al producirse este fenómeno, es una coalescencia de gotas de la fase dispersa y una re-emulsificación posterior de la otra fase.

La maduración de Ostwald es el crecimiento de gotas más grandes a expensas de las más pequeñas en una emulsión polidispersa. Esto ocurre por difusión de componentes solubles en la fase dispersa a través de la fase continua (Kabalnov y Shchukin, 1992; Taylor, 1995). 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 materia es despreciable (Dickinson y Stainsby, 1982).

La oxidación de lípidos conduce a productos rancios y potencialmente tóxicos y además pueden promover desestabilización física en algunas emulsiones. Además la oxidación de lípidos puede propiciar la oxidación de proteínas adsorbidas y no adsorbidas en una emulsión, alterando sus propiedades nutricionales y funcionales (Rampon y col., 2001). Se han desarrollado estrategias para retardar la oxidación de los lípidos como incorporar antioxidantes o como controlar las condiciones de almacenamiento.

La hidrólisis enzimática puede alterar la estabilidad y propiedades fisicoquímicas de las emulsiones alimentarias, especialmente cuando afectan a proteínas adsorbidas sobre la superficie (Euston y col., 2001; Van der Ven y col., 2001).

4.5.2 Fuerzas que actúan entre las gotas

Muchas de las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de las emulsiones alimentarias son fuertemente afectadas por las interacciones atractivas y repulsivas entre gotas. Las fuerzas interparticulares en emulsiones surgen principalmente, debido a tres tipos de interacciones: atractivas, repulsivas y estéricas (Rahalkar, 1992). Entre todas las fuerzas que actúan sobre las gotas se pueden destacar:

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.

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 el proceso de cremado.

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).

Interacciones de van del Waals. Estas 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 pueden actuar entre cuerpos macroscópicos, que contengan un gran número de moléculas, tales como gotas de una emulsión.

Interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones 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 a 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).

Fuerzas electrostáticas. Las gotas de muchas emulsiones tienen superficies cargadas eléctricamente, debido a la adsorción de emulsionantes iónicos o que son susceptible 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. Estas interacciones repulsivas pueden clasificarse como interacciones de “esferas rígidas” o como interacciones de “esferas deformables”.

La interacción de “esferas rígidas” que se produce cuando la doble capa formada alrededor de las gotas es fina y está pobremente desarrollada. En este caso, cuando las gotas se aproximan hay poca variación de la energía de interacción, hasta alcanzar distancias en separaciones muy pequeñas, a las que se produce una fuerte repulsión electrostática y la energía de interacción aumenta rápidamente hasta un valor infinito.

En el caso de una interacción de “esferas deformables”, las interacciones se producen entre dobles capas gruesas y extensas, pudiendo ser el radio efectivo de la gota (radio de la gota más el espesor de la doble capa) varias veces el radio de la gota. Las emulsiones alimentarias como las mayonesas y salsas de ensaladas, suelen estar estabilizadas electrostáticamente, siendo la mayoría de las interacciones totales de este tipo.

Fuerzas estéricas. Las fuerzas de interacción estéricas están presentes cuando las partículas poseen una capa adsorbida de alto peso molecular. Muchas emulsiones alimentarias contienen espesantes que pueden actuar también como estabilizantes

estéricos. Estos estabilizantes son compuestos químicos normalmente de naturaleza macromolecular que hidratados en la fase acuosa confieren a la emulsión una estabilización física durante un tiempo prolongado. Pero la estabilización estérica es importante incluso en ausencia de estabilizantes. La presencia de estabilizantes estéricos en la interfase conduce, normalmente, a un aumento de la extensión de la doble capa, aumentando las interacciones estéricas. Debido a la presencia de una doble capa adsorbida, las gotas no llegan a acercarse lo suficiente como para que se produzca la coagulación como consecuencia de las fuerzas atractivas de van del Waals. Así, la estabilización estérica tiende a minimizar las interacciones atractivas. Cuando la capa adsorbida es grande, las interacciones se parecen a las que tendrían esferas deformables, que se caracterizan por una doble capa extendida en las que las fuerzas de van del Waals juegan un papel menor. Aquellos factores que tienden a incrementar la estabilidad de una emulsión conducen a un aumento de la viscosidad y/o viscoelasticidad. En general, la presencia de un emulsionante tiende a aumentar la rigidez de las gotas suspendidas, de manera que se produce menos distorsión y menos circulación interna entre gotas.

4.6 Propiedades físicas de las emulsiones

Existe una gran variedad de propiedades físicas que contribuyen a la caracterización de una emulsión. Entre ellos deben mencionarse la fracción de volumen de fase dispersa, las propiedades interfaciales, propiedades eléctricas y ópticas, la cristalinidad e interacciones de las gotas...En este apartado se destaca la distribución de tamaño de gotas, puesto es la que se ha considerado en el desarrollo posterior del trabajo.

1. Distribución de tamaño de gotas

Las emulsiones se pueden caracterizar por su distribución de tamaño de gotas. Esta distribución determina propiedades importantes como la vida media, apariencia, textura, flavor, color... (Dickinson y col., 1989; Karbstein y Schubert, 1995a). De esta forma se puede afirmar que las características primarias de las partículas tales como la distribución de tamaño de gota, la forma de las partículas, densidad, propiedades superficiales, propiedades de la fase continua, la concentración y estado de agregación gobiernan las propiedades secundarias de los sistemas complejos (Svarovsky, 2000).

En el tamaño de gotas hay que distinguir entre emulsiones que tienen igual tamaño (monodispersas) y emulsiones que presentan una distribución de tamaños (polidispersas). Dos emulsiones pueden tener el mismo tamaño medio y propiedades diferentes como consecuencia de las diferencias en la distribución de tamaños de gota. De esta forma, en la caracterización de la emulsión se utilizan dos tipos de parámetros. Uno que representa un tamaño medio de gota y otro para representar el grado de dispersión con respecto a ese valor medio.

En la tabla 4.6.1 se muestran las expresiones correspondientes a diámetros medios como representación de las distribuciones de tamaños de partículas en sistemas coloidales (Orr, 1983).

Tabla 4.6.1 Definiciones de los diferentes diámetros de gotas o partículas más utilizados en sistemas coloidales

Nombre del diámetro	Definición
Diámetro medio numérico	$d_{1,0} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}$
Diámetro medio área-volumen (Diámetro de Sauter)	$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$
Diámetro medio fracción en volumen-longitud (Diámetro volumétrico)	$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$

De ellos los más importantes en la emulsión son el de Sauter que suele relacionarse con parámetros reológicos y el diámetro volumétrico en emulsiones bimodales. Un parámetro que cuantifica la polidispersidad de la muestra es el valor de la uniformidad, U , que informa sobre la desviación de tamaños con respecto a la mediana de la distribución.

$$U = \frac{\sum V_i |d(v,0,5) - d_i|}{d(v,0,5) \sum V_i} \quad (4.6.1)$$

donde $d(v,0,5)$ es la mediana de la distribución y V_i es el volumen de las gotas con un diámetro d_i .

Un valor de U próximo a cero corresponde a una emulsión monodispersa. A medida que aumenta la polidispersidad el parámetro U crece.

Hay muchas técnicas para obtener información del tamaño de las gotas presentes en la emulsión. De hecho los nuevos avances en electrónica e informática han conducido al desarrollo de técnicas experimentales que permiten determinar los tamaños y distribución de tamaños con bastante exactitud. El diámetro de las gotas, en función del número de gotas de un diámetro determinado se puede determinar por medio de microscopía óptica, electrónica y fuerza atómica (Stanley y col., 1993; Kirby y col., 1995; Kalab y col., 1995; Smart y col., 1995; Morris y col., 2001); el diámetro en función del área superficial por medidas de dispersión de la luz (Farinato y Rowell, 1983; Hunter, 1986; Hiemenz y Rajagopalan, 1997); como número de gotas frente a volumen por resistencia eléctrica (Walstra y Oortwijn, 1969; Lines, 1994; McClements, 2001); en términos de diámetro frente a masa por transmisión de rayos X junto a técnicas de sedimentación (Hendrix y Orr, 1972) y quizás por cromatografía hidrodinámica y un largo etcétera de diferentes técnicas.

5. GELES

5.1 Introducción

Una de las propiedades funcionales más importantes en las proteínas es la gelificación. La capacidad de una proteína para desnaturalizarse, formar agregados y gelificar, al ser sometida a tratamiento térmico, de presión, de modificación de pH, etc., contribuye a la consistencia, estructura y textura de una gran variedad de sistemas.

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).

Una discusión de la gelificación requiere la definición de algunos términos asociados al fenómeno y que involucran la interacción entre proteínas en competencia con la interacción proteínas-disolvente (Hermasson, 1978).

Agregación: término general en el que participan diferentes tipos de interacción proteína-proteína incluyendo la floculación, coagulación y gelificación.

Floculación: agregación al azar de proteínas sin cambios estructurales. La interacción entre proteínas ocurre por lo general por una disminución de las fuerzas de repulsión electrostática entre las cadenas.

Coagulación: agregación al azar de proteínas desnaturalizadas. Conduce a la formación de un entramado de gel heterogéneo o coágulo.

Gelificación: agregación ordenada de proteínas con importantes cambios conformacionales. Las moléculas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteica ordenada.

En la industria alimentaria la gelificación normalmente consiste en un proceso de calentamiento-enfriamiento de una dispersión proteica de concentración apropiada, dicho proceso se lleva a cabo en tubos de ensayos, latas selladas, envoltorios para salchichas, etc. Las condiciones de temperatura y tiempo a utilizar son propias de cada proteína y estarán determinadas por la temperatura de desnaturalización de la misma en las condiciones del ensayo.

La gelificación térmica puede ocurrir durante el calentamiento (proteínas de soja, yema de huevo, proteínas de lactosueta) o tras un proceso de enfriamiento (gelatina, lisozima) dependiendo de la proteína y de las condiciones de gelificación.

La concentración de proteínas es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de los geles. La mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima, por debajo de la cual no gelifican. El tipo y las propiedades de los geles se ven afectados por el pH, el tipo y concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos.

5.2 Gelificación

La gelificación se considera como el proceso de formación de un gel. En la fabricación de geles destaca principalmente la gelificación térmica aunque cada vez está adquiriendo mayor importancia la gelificación a presión. Además existen otros tipos de gelificación como la provocada por cambios en el pH o la química.

La gelificación térmica se produce en varias etapas: Desnaturalización desde el estado nativo, agregación de proteínas desnaturalizadas y formación de enlaces intermoleculares (reticulación). Cuando la extensión de agregados y asociaciones entre agregados es suficiente se forma un entramado tridimensional que conduce a la formación del gel. Para que se produzca agregación sólo es necesaria una desnaturalización parcial como se ha comprobado en miosinas (Chan y col., 1992) o en proteínas globulares (Clark, 1986 y 1998). Algunas proteínas con múltiples dominios de diferente estabilidad térmica pueden presentar un mecanismo de gelificación mucho más complejo.

En la formación del gel pueden participar distintos tipos de enlaces:

- Puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amida de las cadenas peptídicas. Al aumentar la temperatura se produce la rotura de un gran número de puentes de hidrógeno, perdiendo estabilidad la estructura de las proteínas. Además, al

hidratarse, las cadenas polipeptídicas inmovilizan una gran cantidad de moléculas de agua.

- Interacciones electrostáticas, que participan en gran medida en la formación de fibras de miosina (Miroshinichenko y col., 2000). La adición de sal produce repulsiones entre filamentos de miosina que conducen a su disociación, lo cual favorece la posterior formación del gel (Lanier y col., 2005). La presencia de iones calcio, aunque no induce la gelificación, contribuye a la consistencia del gel formando puentes de calcio entre cargas negativas de segmentos proteicos adyacentes.

- Interacciones hidrofóbicas, o interacciones proteína-proteína en medio acuoso, que aumentan con la temperatura (al menos hasta 60°C). La formación de interacciones hidrofóbicas entre moléculas de proteína se produce como respuesta de su hidrofobicidad superficial, favorecida por la desnaturalización. Algunos de los grupos hidrofóbicos de la proteína, que en la configuración nativa estaban orientados hacia el interior, quedan expuestos al medio (Clark, 1998; Clark y col., 2001). Para minimizar su exposición al agua y reducir la entropía del sistema se produce la asociación de porciones hidrofóbicas de moléculas adyacentes dando lugar a la unión o enlace de las proteínas que conducen a la formación de agregados y en condiciones adecuadas a la formación de un gel. La formación de interacciones hidrofóbicas junto a la de puentes disulfuro constituye el principal mecanismo de formación de geles de surimi mediante procesado térmico o de alta presión (Gilleland y col., 1997).

- Enlaces covalentes. Por encima de 40°C, los enlaces más importantes en la formación de geles son los puentes disulfuro intermoleculares, que se producen por la oxidación de dos grupos sulfhidrilos (de moléculas de cisteína) de cadenas proteicas adyacentes. Existen aditivos que favorecen la formación de puentes disulfuro (como los compuestos oxidantes), o el intercambio de puentes disulfuro intramoleculares a intermoleculares (aminoácidos como la cistina o la cisteína, dependiendo de los grupos predominantes). En cambio otros aditivos (como el bisulfito sódico o el ácido ascórbico) actúan como reductores rompiendo puentes disulfuros. Otros enlaces covalentes entre moléculas de miosina que pueden contribuir al reforzamiento de geles con proteínas miofibrilares son los que se forman como consecuencia de la actividad enzimática de la transglutaminasa endógena. Su actividad está favorecida a baja temperatura y mediante la adición de iones calcio (Lanier y col., 2005)

Por otro lado, cabe destacar la gelificación a presión. El efecto de la presión (100-1000 MPa) sobre la estructura de las proteínas en disolución está suscitando un gran interés durante los últimos años debido al enorme interés de la industria alimentaria en la tecnología de mínimo procesado (Balny y Masson, 1993; Silva y Weber, 1993; Gross y Jaenicke, 1994; Van Camp y Huyghebaert, 1995; Ledward y col., 1995; Galazka y col., 1997; Fernández-Martín y col., 1997; Messens y col., 1997, Dumoulin y col., 1998; Parés y col., 2000; Montero y col., 2002; Zhan y col., 2003; Puppo y col., 2004; Toldra y col., 2004; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2004). La tecnología de alta presión hidrostática (UHP) resulta atractiva por su potencial en el desarrollo de nuevos procesos de conservación y modificación de alimentos (Mertens y Knorr, 1992; Cano y De Ancos, 2005). Además de desnaturalizar las proteínas y solidificar los lípidos, esta tecnología contribuye a mejorar la calidad (textura y estructura) de geles alimentarios (Fuchigami y Teramoto, 2003), y puede emplearse para desestabilizar biomembranas e inactivar microorganismos sin usar tratamiento térmico, cuestión de máximo interés para la industria al no verse afectados por la presión las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (contenido vitamínico, sabor, color, aroma, etc.).

5.3 Tipos de estructura de geles

Los geles se pueden clasificar en dos grandes grupos, los formados por una red de filamentos finos y los geles agregados o particulados. Los primeros están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteínas y el grosor de los filamentos es muy pequeño de tal forma que estos geles son transparentes.

La figura 5.3.1a ilustra la microestructura de un gel de filamentos finos que involucran la asociación física (no covalente) entre las cadenas proteicas. Esta estructura típica de muchos polisacáridos, es poco común en los geles proteicos salvo para las gelatinas. Estos geles retienen mucha agua y son termorreversibles. La figura 5.3.1b muestra la estructura de filamentos finos característicos de proteínas globulares. En este caso las moléculas se asocian de forma covalente y no covalente conformando un filamento de pequeñas partículas. La figura 5.3.1.c ilustra geles agregados o particulados. La formación de geles agregados ocurre a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico, por desnaturalización parcial de la proteína o por la presencia de sales (Hermansson y Langton, 1993). Los geles agregados son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua.

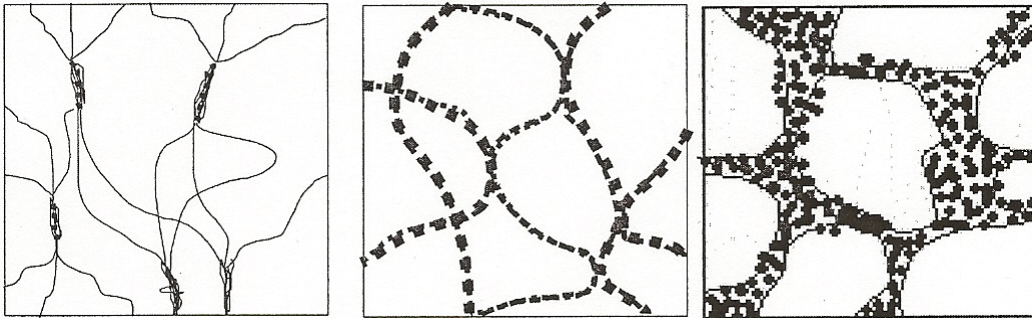


Figura 5.3.1. Diagrama de los diferentes tipos de microestructura de geles proteicos. (a) Filamentos finos por asociación física, (b) filamentos finos de proteínas globulares y (c) geles agregados.

5.4 Caracterización de geles

Los geles se pueden caracterizar desde el punto de vista macroestructural o microestructural. Por lo general hace falta aplicar más de una metodología para caracterizarlos adecuadamente.

La evaluación macroestructural involucra la medida de propiedades físicas y químicas del sistema como un todo. La caracterización a nivel molecular a nivel molecular del sistema requiere una medida de las propiedades relacionadas con las transformaciones moleculares durante la formación del gel. Entre la evaluación macroestructural y la molecular, se puede definir una región que podemos llamar “microestructural” que implica el seguimiento de reacciones y de cambios físicos que no pueden ser observados a simple vista. Las técnicas más importantes y utilizadas de caracterización de geles se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 5.4.1. Técnicas para la caracterización de geles

Caracterización Macroestructural	Caracterización Microestructural
Viscoelasticidad	Microscopía electrónica de barrido (SEM)
Textura	Microscopía electrónica de transmisión(TEM)
Propiedades de flujo	Microscopía óptica
Retención de agua	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Viscoelasticidad
Solubilidad	Electroforesis

A continuación se van a exponer una breve descripción de las mismas sin tener en consideración aquellas constituidas por su estudio reológico que serán tratadas en el apartado II.8 correspondiente a reología de geles.

5.4.1 Capacidad de retención de agua

Los métodos más usados se basan en la aplicación de una fuerza externa (presión o centrifugación) y medición de la cantidad de agua liberada por el gel o en la succión capilar, en la cual el agua es absorbida por un material poroso (Jáuregui y col., 1981). Se calcula la pérdida de agua como: $(\text{peso de líquido perdido/peso del gel}) \times 100$, o bien se determina el agua inicial que contiene el gel y se calcula el agua retenida como $(\text{peso de líquido perdido/peso de agua inicial}) \times 100$.

La ruptura de estructura es muy baja, ya que la fuerza centrífuga actúa solo en la liberación del agua y los efectos de compresibilidad son bajos. El agua es transportada por la fuerza de gravedad y la cantidad liberada no depende de la diferencia de densidad entre el gel y la fase continua).

Para cada tipo de gel deben estandarizarse las condiciones de centrifugación (fuerza y tiempo) y tamaño de la muestra a fin de asegurar la eliminación del agua no retenida sin daño a la estructura del gel (Kocher y Foegeding, 1993).

5.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Esta técnica permite medir la energía suministrada a una sustancia (muestra) y a un material de referencia en función del tiempo o la temperatura, mientras que la sustancia y el material de referencia son sometidos a un programa controlado de calentamiento.

Permite determinar el grado de desnaturalización de las proteínas, la temperatura y la entalpía de desnaturalización.

La desnaturalización se observa como un pico endotérmico siendo el área de la endoterma el cambio de entalpía del proceso y la temperatura de transición térmica la correspondiente al pico de la misma.

Siendo la desnaturalización una etapa necesaria en la gelificación de proteínas, especialmente globulares, esta técnica permite estudiar los efectos de la composición del medio (sales, ácidos, polisacáridos, etc.) en la desnaturalización de las proteínas. También permite caracterizar el grado de desnaturalización logrado bajo diferentes condiciones de gelificación.

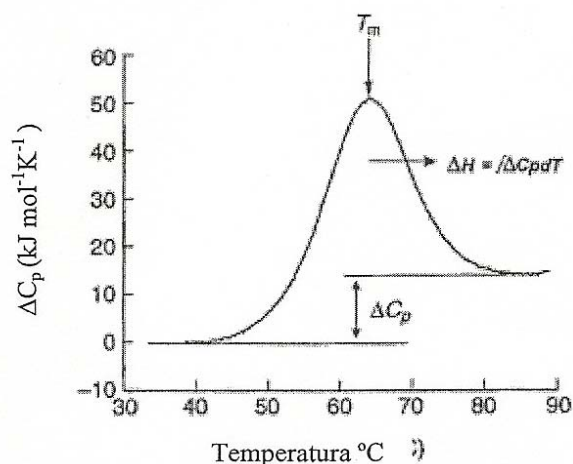


Figura 5.4.2.1 Termograma típico de una solución diluida de proteína.

En la figura 5.4.2.1 se muestra el termograma típico de una solución diluida de proteína, en el cual la proteína sufre una transición desde un estado compacto (proteína nativa) a baja temperatura, a un estado desplegado (proteína desnaturalizada) a alta temperatura. La temperatura T_m corresponde a la temperatura media de desnaturalización de la proteína, ΔC_p es la diferencia de capacidad calorífica entre el estado nativo de la proteína y la capacidad calorífica de la proteína desnaturalizada y ΔH es el cambio de entalpía asociado al proceso.

5.4.3 Solubilidad

Existen diferentes medios y procedimientos experimentales para separar y cuantificar la proteína soluble. La solubilidad de la mayoría de las proteínas depende del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos. La importancia de estudiar la proteína soluble de los geles radica en el estudio de cómo el estado fisicoquímico de sus moléculas puede ser alterado por el calentamiento, procesamiento, secado y condiciones de almacenamiento. El conocimiento de las características de solubilidad, en distintas condiciones y disolventes, es muy útil en la selección de las condiciones óptimas de fabricación y proporciona información que resulta útil para la optimización de las condiciones de procesado, además revela el efecto del tratamiento térmico sobre sus aplicaciones potenciales.

5.4.4 Microscopía

La microscopía electrónica permite conocer la forma y grosor de los filamentos proteicos. Pero no puede precisar estructuras moleculares concretas o la forma que adopta cada molécula cuando forman parte del gel.

Como es bien sabido, previo a la utilización de técnicas de microscopía electrónica es necesario la eliminación o fijación del agua contenida en la muestra. Dicho proceso de eliminación o fijación del agua puede modificar el gel de tal manera que lo que luego se observa no sea representativo. Hermansson y Langton (1993) recomiendan que cada gel se investigue por distintas técnicas de microscopía electrónica y se sepa diferenciar la estructura real del gel de los cambios introducidos en la preparación de las muestras.

El agua puede ser solidificada por congelación rápida, sin formación detectable de cristales de hielo. La formación de redes proteicas artificiales inducidas por formación de cristales de hielo es bastante común. Un método alternativo es fortalecer químicamente la estructura de red de gel y reemplazar el agua por disolventes que puedan ser secados en su punto crítico para microscopía electrónica de barrido (SEM) o polimerizados posteriormente y seccionados finamente para microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La tabla 5.4.4.1 indica las técnicas microscópicas utilizadas para la visualización y caracterización de la estructura de los geles (Hermansson y Langton, 1993).

Tabla 5.4.4.1. Análisis de la microestructura de geles. (SEM: Microscopía electrónica de de barrido; TEM: Microscopía electrónica de transmisión; LM: Microscopía óptica)

TIPO GEL	TÉCNICA MICROSCOPIA
Muy agregado	SEM, TEM
Filamentos finos	(SEM), TEM
Geles compuestos	SEM, LM, TEM
ESTRUCTURA	TÉCNICA MICROSCOPIA
Agregados	Grabado por congelado
Dominios mixtos	Seccionado fino
Superfilamentos	Tinción negativa
Filamentos	Técnicas con micas
Moléculas	Inmuno-técnicas

Tanto la microscopía electrónica de barrido como la de transmisión se pueden utilizar de forma complementaria. En microscopía electrónica de transmisión se

visualiza la superficie de fractura, en forma tridimensional y permite distinguir agregados de moléculas y espacios vacíos. En TEM se visualiza un plano de corte; la profundidad es pequeña pero de alta resolución de detalles estructurales. La microscopía electrónica de barrido es adecuada para geles opacos como los formados por partículas agregadas. La microscopía electrónica de transmisión es necesaria para la visualización de geles transparentes para los cuales es necesaria una mayor resolución.

Tanto en SEM como en TEM, las muestras se fijan químicamente para preservar la estructura original y se deshidratan.

6. CONCEPTOS BÁSICOS DE REOLOGÍA

6.1 Introducción

La Reología, fue un concepto introducido por Bingham (1929), que se define como la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales (Macosko, 1994). La palabra Reología significa etimológicamente estudio del flujo (del griego “rheos”: fluir y “logos”: ciencia).

La mecánica clásica engloba a los materiales deformables en dos grupos: sólidos elásticos y fluidos viscosos (líquidos y gases). Hoy en día se sabe que entre estos casos límite se abre un amplio espectro de tipos de materiales con distintos comportamientos, dando lugar al nacimiento de la Reología como ciencia propia que caracteriza a estos materiales. Todos los materiales tienen propiedades reológicas, de ahí su relevancia en muchos campos de estudio como el procesado de plásticos, la industria de pinturas, cosmética, alimentaria... (Steffe, 1996).

La reología como ciencia alcanzó su mayor desarrollo en la segunda mitad del siglo XX debida a la aparición de nuevos materiales: plásticos, soluciones de polímeros, etc. cuyo comportamiento dinámico no podía explicarse mediante leyes clásicas.

Las propiedades reológicas del material son establecidas analizando la relación entre el esfuerzo o deformación aplicado a un material y el flujo y/o deformación resultante. (Whorlow, 1992). La sollicitación mecánica aplicada puede representarse matemáticamente mediante el esfuerzo, en cuyo caso la respuesta dinámica del material se cuantifica mediante la deformación o la velocidad de deformación; o bien, mediante una deformación, en cuyo caso la respuesta que se obtiene es un esfuerzo.

Uno de los casos más sencillos de deformación es el denominado “cizalla simple” que resulta apropiado para entender correctamente los conceptos de “esfuerzo” y “deformación”.

6.2 Cizalla simple

La relación entre esfuerzo y deformación o velocidad de deformación puede obtenerse mediante el ensayo de cizalla simple. Este tipo de deformación es generada cuando un material está comprendido entre dos placas paralelas separadas una distancia “ h ”.

En este caso, la placa superior es sometida a una fuerza, “ F ”, que le obliga a desplazarse linealmente una distancia x , mientras que la placa inferior se mantiene en reposo (Dealy, 1982). Si no hay deslizamiento en la superficie de las placas cada elemento del material sufrirá una deformación que viene expresada como:

$$\gamma = dx/dy \quad (6.2.1)$$

de donde γ es la deformación por cizalla, 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 :

$$\gamma = x/h \quad (6.2.2)$$

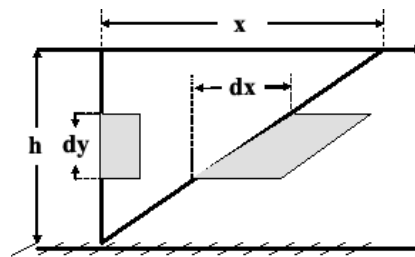


Figura 6.2.1. Deformación por cizalla simple

Las propiedades mecánicas del material definen una única relación entre esfuerzo y deformación. Así que, si estas propiedades son independientes de la posición, es decir el material es homogéneo, un esfuerzo uniforme requiere una deformación uniforme en el estado estacionario (Darby, 1976).

En el estudio reológico de fluidos, se somete al material a una cizalla continua aplicando una fuerza constante en la dirección x , adquiriéndose una velocidad constante, v . De esta forma, la velocidad de un elemento de material se expresa mediante la relación siguiente:

$$v = dx/dt \quad (6.2.3)$$

De esta forma la velocidad de cizalla o deformación viene dada por la expresión:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\left(\frac{dx}{dy}\right)}{dt} = \frac{d\left(\frac{dx}{dt}\right)}{dy} = \frac{dv}{dy} \quad (6.2.4)$$

Que en definitiva puede transformarse en la siguiente expresión:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\left(\frac{x}{h}\right)}{dt} = \frac{\left(\frac{dx}{dt}\right)}{h} = \frac{v}{h} \quad (6.2.5)$$

Es decir, en cizalla simple la velocidad de cizalla es constante a través del material.

Como v y h pueden ser medidos sin perturbar el flujo en modo alguno, es fácil someter, en principio, a un material a una deformación con velocidad de cizalla conocida. Sin embargo, para producir un movimiento totalmente uniforme por cizalla simple es necesario que las dos placas paralelas sean de extensión infinita.

6.3 Tensores esfuerzo, deformación y velocidad de deformación

Tanto el esfuerzo como la deformación y la velocidad de deformación deben expresarse mediante tensores.

6.3.1 Tensor esfuerzo

Se sabe que el esfuerzo no es más que una magnitud que mide la relación entre una fuerza por unidad de superficie. Tanto la fuerza como la superficie son magnitudes direccionales que pueden ser representadas por sendos vectores con las tres componentes correspondientes al espacio tridimensional. Por ello, para definir completamente el esfuerzo es necesario especificar nueve componentes, que resultan de la aplicación de cada componente del vector fuerza sobre cada una de las tres componentes del vector superficie. El esfuerzo es, por tanto, un tensor de segundo orden

que se representa por σ_{ij} y se denomina tensor de tensiones pudiendo representarse en forma matricial:

$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (6.3.1.1)$$

Cada componente requiere especificar: magnitud, dirección y orientación. En este tensor cada componente se representa mediante dos subíndices. El primer subíndice i se refiere a la orientación de la cara sobre la que actúa la fuerza en el elemento material y el segundo j indica la dirección de la fuerza. Como consecuencia de la condición de equilibrio entre pares de fuerzas, el tensor es simétrico, $\sigma_{ij} = \sigma_{ji}$, por lo que sólo seis de las nueve componentes son independientes.

En base a esto se puede establecer que sobre un elemento material pueden actuar dos tipos de esfuerzos (Darby, 1976; Dealy, 1982):

-Esfuerzos normales que se refieren a la componente en dirección perpendicular a la superficie considerada

-Esfuerzos de cizalla o cortantes que son las componentes tangenciales a dichas superficies.

Así, el tensor esfuerzo σ_{ij} se puede descomponer en la suma de un tensor isótropo, σ , y uno anisótropo, τ_{ij} relacionados de la siguiente forma (Dealy, 1982):

$$\sigma_{ij} = \sigma \delta_{ij} + \tau_{ij} \quad (6.3.1.2)$$

donde δ_{ij} es el tensor unitario o delta de Kronecker cuyos valores son:

$$\delta_{ij} = 1 \text{ si } i = j \quad (6.3.1.3)$$

$$\delta_{ij} = 0 \text{ si } i \neq j \quad (6.3.1.4)$$

- El esfuerzo isótropo, σ , es perpendicular a todas las superficies del material sobre el que actúa y con la misma magnitud en todas las direcciones. Puede provocar cambios de volumen en el elemento, pero no cambios de forma.
- El esfuerzo anisótropo, τ_{ij} , puede tener componentes que actúan normal o tangencialmente a varias superficies del material, correspondientes a esfuerzos

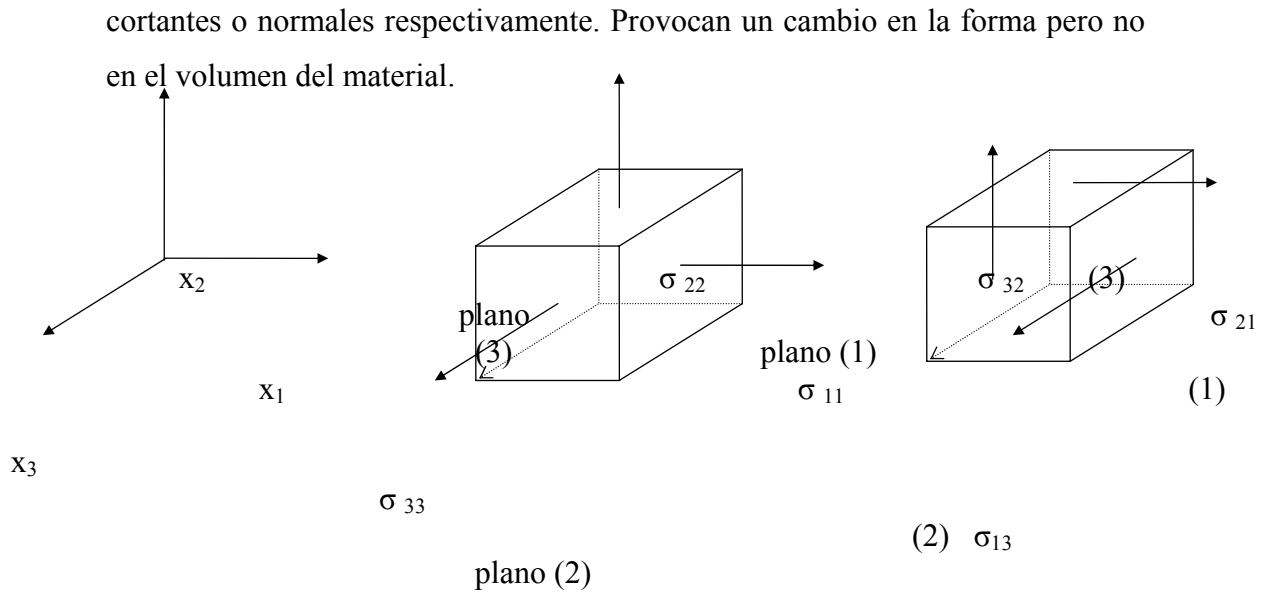


Figura 6.3.1.1. Componentes del tensor esfuerzo

6.3.2 Tensores deformación y velocidad de deformación

La deformación, γ , y la velocidad de deformación, $\dot{\gamma}$, pueden contemplarse como la expresión matemática de la respuesta de un material al esfuerzo aplicado sobre éste.

La deformación es una medida cuantitativa de la extensión con la que un elemento de material ha sido deformado. La magnitud está determinada por el desplazamiento relativo de los puntos, y es por tanto una magnitud adimensional, ya que se expresa como el cociente entre el incremento de separación y la separación inicial entre los puntos. Puesto que tanto el numerador como el denominador de ese cociente son vectores con tres componentes en un espacio tridimensional, al igual que el esfuerzo, la deformación debe ser un tensor de segundo orden, con nueve componentes. Se habla entonces de tensor deformación y tensor de velocidad de deformación.

Así, el tensor deformación, e_{ij} , al igual que el esfuerzo, es un tensor simétrico pudiendo descomponerse en la suma de un tensor isótropo, e , y uno anisótropo, γ_{ij} :

$$e_{ij} = e\delta_{ij} + \gamma_{ij} \quad (6.3.2.1)$$

donde δ_{ij} es el tensor unitario o delta de Kronecker.

- La componente isótropa, e , es perpendicular a todas las superficies del material sobre el que actúa y con la misma magnitud en todas las

direcciones. Esta deformación provoca un cambio de volumen en el elemento, pero no un cambio de forma.

- La componente anisótropa, γ_{ij} , puede tener componentes que actúan normal o tangencialmente a varias superficies del material, correspondientes a esfuerzos cortantes o normales respectivamente. Provocan un cambio en la forma pero no en el volumen del material.

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

$$\dot{e}_{ij} = d(e_{ij})/dt \quad (6.3.2.2)$$

En cizalla simple estos tensores se simplifican bastante, adoptando las siguientes expresiones matriciales:

$$\gamma_{ij} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{dx_1}{dx_2} & 0 \\ \frac{dx_1}{dx_2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \dot{\gamma}_{ij} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{dv_1}{dv_2} & 0 \\ \frac{dv_1}{dv_2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (6.3.2.3)$$

6.4 Caracterización reológica de un material

Ya se ha comentado que deformación y velocidad de deformación son, respectivamente, las respuestas dinámicas características de sólidos y fluidos. Por deformación se entiende el cambio de forma o volumen experimentado por un cuerpo bajo la acción de un sistema de fuerzas; y por velocidad de deformación, una deformación continua en el tiempo.

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

Ecuación constitutiva. Esta ecuación 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, describiéndolo 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.

6.5 Clasificación de los distintos comportamientos reológicos

Atendiendo a la relación entre esfuerzo aplicado y deformación o velocidad de deformación se puede establecer una clasificación de los materiales. Tradicionalmente los materiales se clasificaban en dos grupos:

Sólidos elásticos y fluidos viscosos (líquidos y gases), pero esto no son más que dos casos límites ideales ya que existe un amplio espectro de comportamientos intermedios.

De esta forma una clasificación más amplia de los materiales puede ser la establecida a continuación:

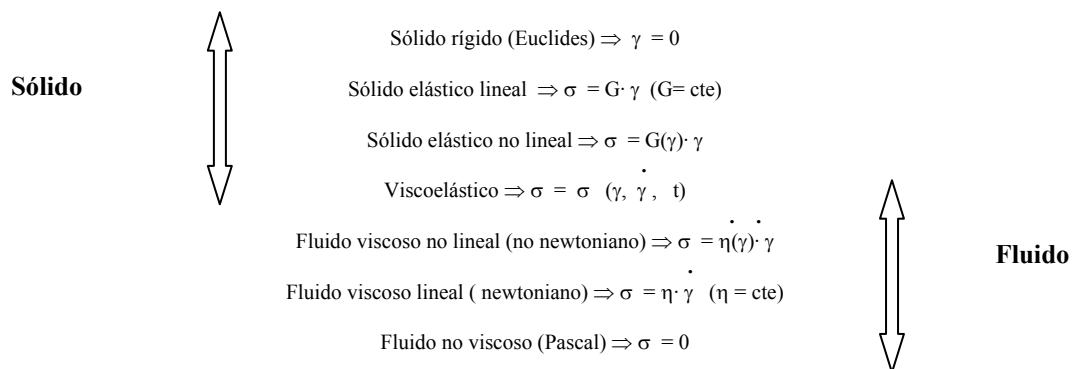


Figura 6.5.1. Clasificación de los materiales según su comportamiento reológico en cizalla simple.

La situación no es tan sencilla porque 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.

6.5.1 Comportamiento en flujo estacionario

A) Fluidos newtonianos

Los fluidos newtonianos hacen referencia a un líquido ideal y reciben este nombre en honor a Isaac Newton, científico que describió su comportamiento. (Whorlow, 1992; Macosko, 1994; Rao, 1995). Para este tipo de fluidos el esfuerzo de cizalla es proporcional a la velocidad de deformación, cumpliendo la denominada ley de Newton:

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (6.5.1.1)$$

donde μ es la constante de proporcionalidad, la viscosidad, que no es más que la resistencia al flujo. Esta viscosidad es una propiedad reológica del material denominada viscosidad dinámica o newtoniana, que depende de la naturaleza del material y de las condiciones de presión y temperatura pero no de las condiciones de flujo.

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).

De esta forma, un fluido es newtoniano cuando al aplicar un esfuerzo éste continúa fluyendo mientras se le aplica el esfuerzo. Una vez que se le retira el esfuerzo, el líquido continuará fluyendo hasta que la energía cinética almacenada en el interior se disipe como calor debido a la fricción. En este caso no hay recuperación elástica del material una vez que el esfuerzo aplicado se le retira, con lo que no vuelve a su posición original. Por este motivo un fluido newtoniano debería ser incompresible (su volumen no cambia cuando se le aplica una fuerza), isotrópico (las mismas propiedades en todas las direcciones) y homogéneo.

Presentan este comportamiento los sistemas micelares globulares, las disoluciones en las que no intervienen componentes macromoleculares, las disoluciones muy diluidas y, en general, sistemas con estructura sencilla (Gallegos, 1982).

B) Fluidos no newtonianos

Todos los fluidos cuyo comportamiento reológico no pueda ser descrito mediante la ecuación del apartado anterior se define como fluido no newtoniano. En este caso el

cociente entre el esfuerzo τ y $\dot{\gamma}$ se conoce como viscosidad aparente y varía con la velocidad de cizalla y/o tiempo de cizalla.

$$\eta(\dot{\gamma}) = \tau/\dot{\gamma} \quad (6.5.1.2)$$

Esta dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla se debe a una variación de la estructura del fluido, generalmente compleja, cuando hay un cambio en la velocidad de cizalla. A velocidades de cizalla lo suficientemente bajas se puede esperar que la variación de estructura sea insignificante y que la dependencia de la viscosidad con la velocidad de cizalla pueda llegar a desaparecer.

Presentan este tipo de comportamiento disoluciones que contienen macromoléculas, emulsiones, suspensiones concentradas, cristales líquidos y fases micelares... (Asada y Onigi, 1983; Ahuja, 1984; Marrucci, 1984; Gallegos y col., 2002).

Los fluidos no newtonianos se pueden clasificar por la forma en que varía τ con $\dot{\gamma}$ o según varía η con $\dot{\gamma}$ (Figura 6.5.1.1).

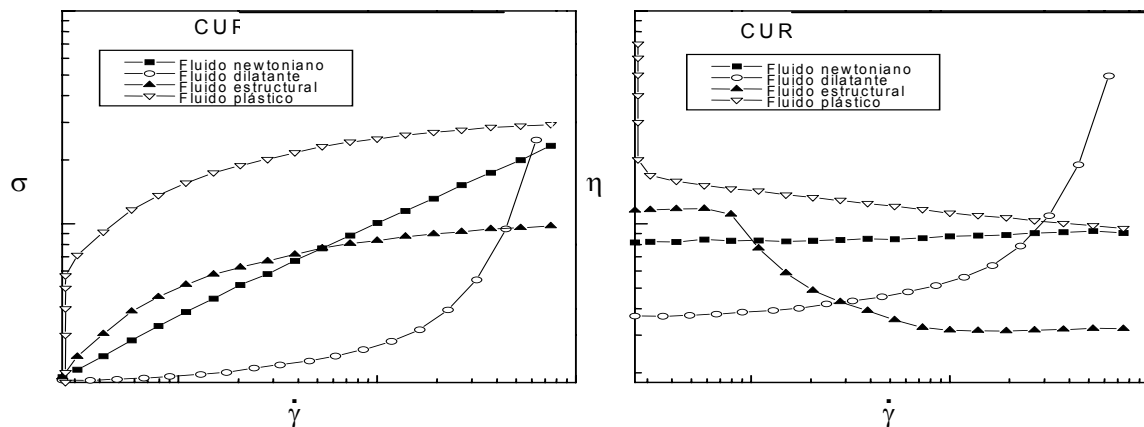


Figura 6.5.1.1 Representaciones del esfuerzo y viscosidad aparente para distintos tipos de materiales.

1. Fluidos pseudoplásticos. Es el más típico comportamiento no ideal que exhiben, entre otros, las emulsiones alimentarias. Se manifiesta por un descenso de la viscosidad aparente de un fluido al aumentar la velocidad de cizalla (“shear thinning”).

La situación más general puede venir representada por una curva de flujo caracterizada por tres zonas bien diferenciadas (Reiner, 1960). La primera, a bajas velocidades de cizalla, donde el comportamiento es newtoniano, representado por una viscosidad constante denominada viscosidad límite a velocidad de cizalla cero, η_0 ; una zona intermedia con características pseudoplásticas donde hay un descenso de

viscosidad; y otra región newtoniana caracterizada por una viscosidad límite a altas velocidades de cizalla, η_{∞} .

Las diferentes regiones se relacionan con cambios en la estructura del material al aumentar la velocidad de cizalla. Muchos fluidos están formados por estructuras complejas distribuidas al azar en estado quiescente, manteniendo un estado desordenado que provoca una cierta resistencia al flujo. Al someter estos fluidos a una determinada cizalla se produce una orientación, o deformación, de sus estructuras en la dirección del esfuerzo aplicado, que se traduce en un descenso de la resistencia al flujo, y por tanto, de la viscosidad aparente. Cuando la tensión aplicada es suficientemente pequeña, no se produce orientación preferencial de las moléculas, lo que se corresponde con el comportamiento newtoniano a bajas velocidades de cizalla. Igualmente, a velocidades de cizalla elevadas, las distintas estructuras están totalmente destruidas con respecto a su estado inicial, lo que explica que no se produzca un descenso de viscosidad, manteniéndose un valor constante de viscosidad, η_{∞} .



Figura 6.5.1.2. Dispersiones en reposo y fluyendo a través de un tubo.

Este tipo de comportamiento se presenta en disoluciones de polímeros, suspensiones de partículas, emulsiones, etc. (Hudson y Ferguson, 1994; Madiedo y col., 1994).

2. Fluidos dilatantes. Este comportamiento es mucho menos común que el pseudoplástico. Se manifiesta por un incremento en la viscosidad aparente a medida que la velocidad de cizalla aumenta. (“shear thickening”).

La dilatancia se puede apreciar en emulsiones o suspensiones de partículas sólidas y proteínas y ciertas disoluciones de polímeros y tensioactivos donde las partículas se empaquetan fuertemente unidas (Hunter, 1989; Ferguson y Kemblowski, 1991). A

menudo va acompañado de zonas de comportamiento lineal y pseudoplástico, dependiendo de los valores de la velocidad de cizalla considerados. Este comportamiento aparece en suspensiones altamente concentradas de partículas en un líquido. El fenómeno puede ocurrir también cuando las partículas en una emulsión llegan a estar floculadas a causa de un incremento en la frecuencia de colisión.

En reposo, el espacio que ocupa el líquido entre las partículas es mínimo. A baja velocidad de cizalla, la fricción entre las partículas es relativamente baja porque el líquido actúa como lubricante. Sin embargo, a alta velocidad de cizalla, el movimiento de unas partículas respecto a las otras aumenta la fricción entre las mismas, aumentando la viscosidad (Pal, 1996).

3. Materiales plásticos. Este tipo de materiales presentan propiedades elásticas almacenando cierta cantidad de energía, cuando se someten a una cantidad de esfuerzo cortante menor que un determinado valor umbral, τ_0 . Por el contrario este tipo de material fluye mientras que fluye cuando se supera este esfuerzo umbral. (Hoffmann, 1974). Esto se puede asociar con la destrucción de un entramado estructural solo cuando una tensión aplicada supera el valor de las fuerzas atractivas que mantienen la red tridimensional.

Por ejemplo, los alimentos que presentan este comportamiento normalmente consisten en una red de agregados moleculares o partículas dispersas en una matriz de líquido (Clark, 1987; Edwards y col., 1987; Tung y Paulson, 1995). De esta forma solo fluyen cuando el valor de la tensión externa supera el valor de las fuerzas atractivas que mantiene la red tridimensional. Como otros ejemplos se pueden citar la margarina y la mantequilla que consisten en una red de diminutos cristales de grasa dispersos en una fase líquida de aceite (Moran, 1994). Por debajo de un cierto esfuerzo aplicado hay deformación en la muestra, pero los débiles enlaces no se rompen hasta que no supera un determinado esfuerzo. También se pueden mencionar las pinturas, pastas, cristales líquidos... (Van Wazer y col., 1963; Yoshimura y col., 1987; Cheng, 1986).

La existencia del esfuerzo umbral fue cuestionada por Barnes y Walters (1985) sosteniendo que utilizando reómetros capaces de medir velocidades de cizalla muy bajas es posible apreciar cómo fluyen los materiales aparentemente plásticos. No obstante, el concepto del umbral de fluencia sigue siendo de utilidad práctica, sobre todo a nivel industrial y de control de calidad (Muñoz, 1992). Pero aunque resulte un parámetro

reológico interesante de cara a aplicaciones químico-ingenieriles, en ningún caso puede ser considerado una función del material. (Barnes, 1992, 1998; Cheng, 1987; Astarita, 1990).

Los intentos de más éxito en la descripción matemática del comportamiento de flujo en estado estacionario de fluidos no newtonianos son fundamentalmente empíricos. Sería mucho más satisfactorio poder obtener estas funciones a partir de teorías basadas en la estructura molecular, pero la mayoría de los materiales de mayor interés reológico son extremadamente complejos y las teorías que los explican están muy simplificadas y son inadecuadas para representar el comportamiento reológico real. Por ello, hasta el momento, las observaciones empíricas constituyen las fuentes más útiles de información.

6.5.2 Comportamiento dependiente del tiempo de cizalla

Hay muchos sistemas, y en concreto emulsiones alimentarias cuya viscosidad aparente depende no sólo de la velocidad de deformación sino también del tiempo en el que el fuerza fue aplicado. (Lapasin, 1980; Beneyto y col., 1980; Quemada y col., 1984):

$$\eta = \eta(\dot{\gamma}, t) \quad (6.5.2.1)$$

La dependencia de la reología de líquidos con el tiempo esta normalmente asociada con alguna clase de proceso de relajación (Hunter, 1993; Mewis y Macosko, 1994). Cuando se aplica una fuerza externa a un sistema que se encuentra en equilibrio, el material requiere cierto tiempo para alcanzar una nueva condición de equilibrio, la cual está caracterizada por un tiempo de relajación, τ_R . Cuando el tiempo de medida es del mismo orden que el tiempo de relajación es posible observar cambios en las propiedades del sistema con el tiempo.

Entre los fenómenos reológicos dependientes del tiempo se encuentran los siguientes:

-Tixotropía: Se trata de un fenómeno reversible en el que la viscosidad disminuye con el tiempo de cizalla, pero al cesar la cizalla, la viscosidad recupera su valor inicial (Groves y Ahmad, 1976). Este comportamiento lo suelen mostrar sistemas dispersos en los que la fase dispersa está formada por partículas agregadas, mediante fuerzas débiles, situación frecuente en emulsiones alimentarias.

-Antitixotropía: En este caso la viscosidad aumenta con el tiempo de cizalla y tras el cese de la cizalla se tiende a recuperar con el tiempo la viscosidad inicial. Se da en suspensiones de partículas altamente concentradas y suele asociarse al comportamiento dilatante.

-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 en el que no se alcanza una recuperación completa con el tiempo de la viscosidad inicial, al cesar la cizalla. Se trata de un fenómeno irreversible, al menos parcialmente.

6.5.3 Viscoelasticidad

A) Introducción

Ya se ha comentado en la clasificación la existencia de sólidos y líquidos. Así un sólido elástico es aquel que al retirarle el esfuerzo aplicado recupera su forma original y por el contrario, un líquido viscoso puro disipa toda su energía. Muchos sistemas y en particular emulsiones alimentarias no son ni líquidos puros ni sólidos puros, sino que presentan propiedades intermedias (Sherman, 1968, 1970; Dickinson, 1992; Walstra, 2003). Los materiales viscoelásticos presentan simultáneamente comportamientos elásticos y viscosos, con lo que se pueden distinguir ambas componentes en un material. En este tipo de materiales, parte de la energía es almacenada como energía mecánica en el material, y parte es disipada en forma de calor. Por esta razón, cuando una fuerza se aplica a un material viscoelástico éste no adopta simultáneamente sus nuevas dimensiones ni vuelve instantáneamente a su estado inicial no deformado. El material puede permanecer deformado incluso cuando el esfuerzo se ha retirado. De esta forma los esfuerzos son función, no sólo de la deformación instantánea, sino también de la historia de la deformación (fluidos con memoria).

El estudio de las viscoelasticidad implica establecer relaciones entre el esfuerzo, la deformación y el tiempo. En el caso de que tanto el esfuerzo como la deformación sean infinitesimales y las relaciones entre ambas magnitudes en función del tiempo se puedan describir mediante ecuaciones diferenciales lineales de coeficientes constantes,

el comportamiento se denomina viscoelástico lineal. Esto implica que la relación entre la deformación y el esfuerzo es sólo función del tiempo y no de la magnitud del esfuerzo (Darby, 1976; Barnes y col., 1989).

B) 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. Sin embargo, a pesar de esta limitación, los modelos analógicos resultan extraordinariamente útiles para comprender la respuesta de un material viscoelástico a una sollicitación mecánica.

Los elementos mecánicos convencionales que representan los comportamientos viscoso y elástico lineales son el muelle y el amortiguador hidráulico.

El muelle representa al comportamiento del sólido elástico de Hooke en el que el esfuerzo es proporcional a la deformación, siendo el factor de proporcionalidad el módulo de Young, G .

$$\sigma = G\gamma \quad (6.5.3.1)$$

El amortiguador hidráulico representa el comportamiento viscoso. En éste, la fuerza (esfuerzo) aplicada es proporcional a la velocidad de extensión (velocidad de deformación), describiendo así la ley de Newton y siendo el factor de proporcionalidad la viscosidad dinámica.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (6.5.3.2)$$

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 las más importantes.

1º) 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 (Maxwell, 1867).

El esfuerzo en ambos elementos es el mismo, mientras que la deformación total es la suma de la deformación elástica, γ_s , y la deformación del fluido, γ_d :

$$\gamma = \gamma_s + \gamma_d \quad (6.5.3.3)$$

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:

$$\sigma + \lambda \frac{d\sigma}{dt} = \eta \dot{\gamma} \quad (6.5.3.4)$$

donde $\lambda = \eta / G$ es un tiempo característico del material denominado tiempo de relajación.

Cuando se aplica a un elemento de Maxwell un esfuerzo constante, se produce un incremento instantáneo de la deformación, (causado por el amortiguador), seguido de un lento incremento, causado por el muelle. Sin embargo, se produce un flujo neto, debido a la presencia del pistón. Por tanto, un elemento de Maxwell representa a un líquido viscoelástico.

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

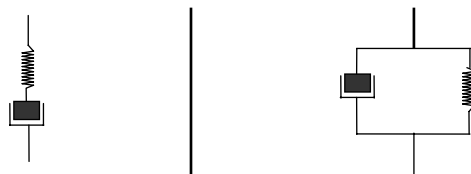


Figura 6.5.3.1 Representación del modelo de Maxwell y Voigt respectivamente.

2º) 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:

$$\sigma = \sigma_s + \sigma_d \quad (6.5.3.5)$$

El modelo queda definido por la ecuación diferencial:

$$\frac{\sigma}{G} = \lambda' \dot{\gamma} + \gamma \quad (6.5.3.6)$$

en la cual $\lambda = \eta / G$ es el tiempo de retardación y es también un parámetro característico del material.

En un elemento de Voigt, cuando el esfuerzo cesa, no se produce una desaparición instantánea de la deformación, ya que la relajación de la deformación en el muelle se encuentra impedida por la presencia del amortiguador. Sin embargo, finalmente se produce una recuperación total de la deformación, ya que no es posible generar un flujo sin romper el muelle. Por lo tanto, el elemento de Voigt representa a un sólido viscoelástico. La escala de tiempo necesaria para observar esta respuesta se corresponde con el tiempo de retardación.

3º) Modelo de Maxwell generalizado

El comportamiento de la mayoría de los materiales viscoelásticos no puede ser descrito mediante un único tiempo de relajación. Según este modelo el material tiene una distribución de tiempos de relajación (Thomson, 1888; Wiechert, 1951) lo cual resulta mucho más adecuado para 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. Para cada uno de los elementos colocados en paralelo:

$$\sigma_i + \lambda_i \frac{d\sigma_i}{dt} = \eta_i \dot{\gamma} \quad (6.5.3.7)$$

siendo:

$$\sigma = \sum_{i=1}^n \sigma_i \quad (6.5.3.8)$$

$$\eta = \sum_{i=1}^n \eta_i = \sum_{i=1}^n \lambda_i G_i \quad (6.5.3.9)$$

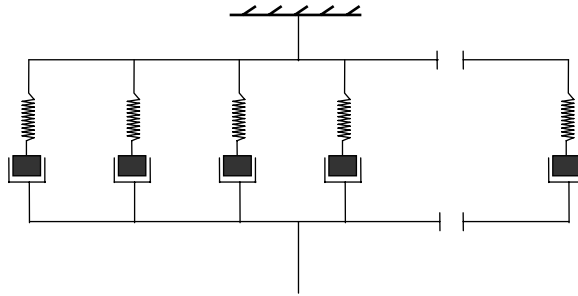


Figura 6.5.3.2. Esquema del modelo de Maxwell generalizado.

4º) Modelo de Voigt generalizado

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

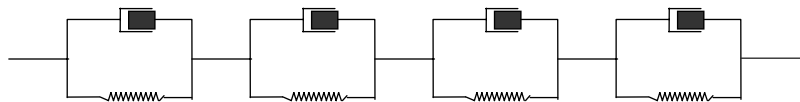


Figura 6.5.3.3. Esquema del modelo de Voigt generalizado.

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

C) Ensayos viscoelásticos fundamentales

Existen dos tipos fundamentales de ensayos experimentales que son comúnmente utilizados para caracterizar las propiedades viscoelásticas de los materiales: uno basado en medidas de transitorio y otro en medidas dinámicas (Whorlow, 1992). Dentro de los ensayos transitorios se pueden encontrar ensayos de relajación de esfuerzo y de fluencia o “creep”.

1º) Fluencia (“Creep”) y recuperación

Este ensayo consiste en aplicar una deformación constante al material y estudiar el cambio de sus dimensiones con el tiempo (fluencia), representado los resultados en una curva de deformación con el tiempo (Sherman, 1968, 1970). Se estudia la respuesta de la deformación tras el cese del esfuerzo aplicado:

$$J(t) = \gamma(t) / \sigma \quad (6.5.3.10)$$

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

Si se trata de un sólido elástico se alcanza instantáneamente una situación donde $J(t)$ no varía con el tiempo, obteniéndose un valor de equilibrio J_0 . Los líquidos viscosos puros originan una función lineal:

$$J(t) = J_e^o + t / \eta \quad (6.5.3.11)$$

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

Normalmente se pueden distinguir tres regiones:

1. Una región de deformación elástica en la cual los enlaces entre las partículas se recuperan elásticamente
2. Una región en la cual algunos enlaces se rompen y otros se recuperan.
3. Una tercera región donde los enlaces están rotos y el material únicamente fluye.

Este tipo de ensayo suele estar acompañado del estudio del comportamiento del material a lo largo del tiempo cuando el esfuerzo se ha retirado dando lugar al ensayo de recuperación. Esta recuperación es total para los sólidos elásticos, nula para los viscosos puros y parcial para el caso de los viscoelásticos (figura 6.5.3.4).

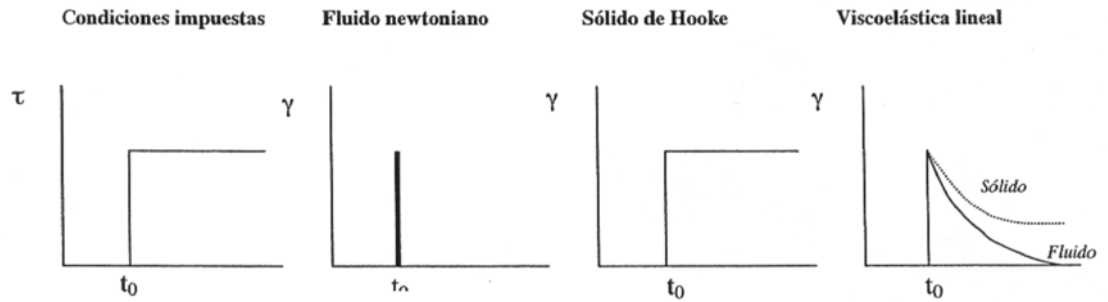


Figura 6.5.3.4. Respuestas típicas en ensayos de fluencia viscosa.

2º) Relajación de esfuerzo

Este tipo de ensayo consiste en aplicar una deformación constante a la muestra y medir el esfuerzo necesario para al material con esta deformación en función del tiempo:

$$G(t) = \sigma(t) / \gamma \quad (6.5.3.12)$$

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 ; mientras que para un líquido viscoso puro la relajación se produce instantáneamente. Los materiales viscoelásticos presentan valores de $G(t)$ intermedios entre ambos extremos dependiendo de la estructura interna del material (figura 6.5.3.5).

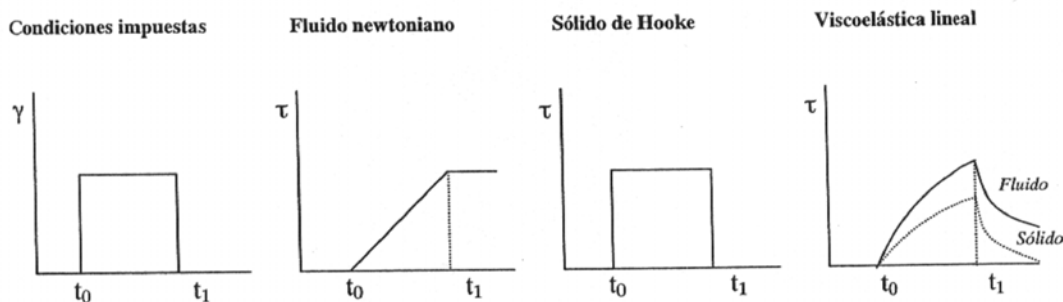


Figura 6.5.3.5. Comportamientos típicos en un ensayo de relajación del esfuerzo.

3º) Ensayos dinámicos

El uso de ensayos dinámicos para caracterizar las propiedades reológicas de los materiales ha llegado a ser una rutina en muchos laboratorios como consecuencia del

desarrollo comercial de sofisticados reómetros dinámicos. Además estas medidas dinámicas proporcionan un método prácticamente no destructivo para determinar las componentes elástica y viscosa de un material (Elliot y Ganz, 1977). En un ensayo dinámico se aplica un esfuerzo sinusoidal a un material y la resultante deformación sinusoidal se mide, o viceversa (Tung y Paulson, 1995; Liu y Masliyah, 1996).

En este caso la muestra se somete a una deformación por cizalla oscilatoria de tipo sinusoidal:

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \tag{6.5.3.13}$$

El esfuerzo que desarrolla el material varía con la frecuencia ω de la misma forma pero existe un desfase δ con respecto a la deformación comprendido entre 0 y $\pi/2$ radianes. Para sólidos elásticos ideales el desfase es cero y para líquidos viscosos puros el desfase es $\pi/2$ radianes y en el caso de materiales viscoelásticos presenta un valor intermedio (Figura 6.5.3.6).

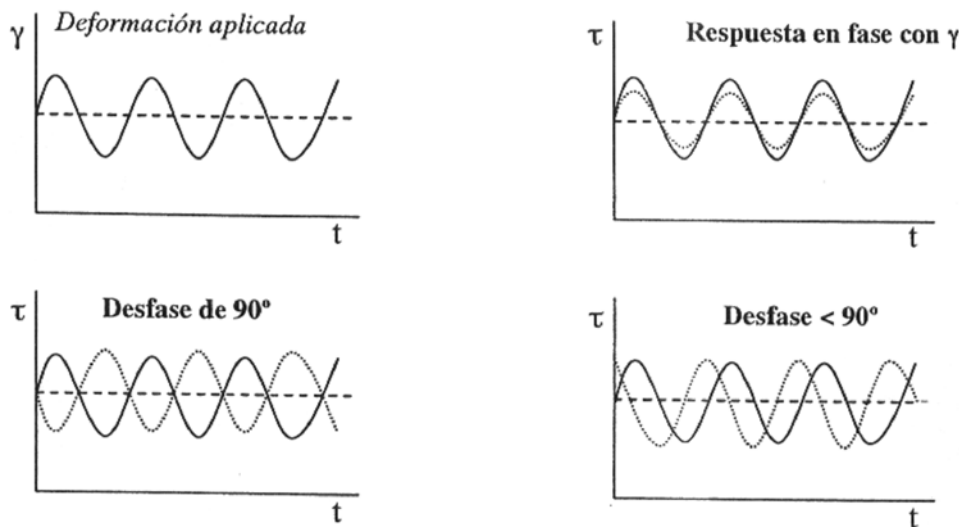


Figura 6.5.3.6. Respuesta de los fluidos viscoelásticos en un ensayo de cizalla oscilatoria.

Un medio conveniente de manipulación de las variables dinámicas es en términos de sus equivalentes complejas. Así la deformación y el esfuerzo oscilatorio serán:

$$\gamma(\omega t) = \gamma_0 e^{j\omega t} = \gamma_0 [\cos \omega t + j \text{sen } \omega t] = \gamma'(\omega) + j \gamma''(\omega) \tag{6.5.3.14}$$

$$\sigma(\omega t) = \sigma_0 e^{j(\omega t + \delta)} = \sigma_0 [\cos(\omega t + \delta) + j \text{sen}(\omega t + \delta)] = \sigma'(\omega) + j \sigma''(\omega) \tag{6.5.3.15}$$

donde σ_0 y γ_0 son las amplitudes del esfuerzo y la deformación, las primas representan la parte real y las dobles primas la parte imaginaria de las cantidades complejas.

Las relaciones entre estas componentes del esfuerzo oscilatorio y la deformación son la base para las definiciones de varias funciones del material. Así el módulo de cizalla complejo, G^* , se define como la relación entre el esfuerzo oscilatorio y la deformación oscilatoria (Ferry, 1980):

$$G^* = \frac{\sigma(\omega t)}{\gamma(\omega t)} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos \delta + j \operatorname{sen} \delta) = G'(\omega) + jG''(\omega) \quad (6.5.3.16)$$

La componente en fase, G' , representa el carácter elástico del material y por ello es llamado módulo de almacenamiento (puesto que la energía elástica es almacenada y puede ser recuperada). La componente fuera de fase, G'' , representa el carácter viscoso, y es llamado módulo de pérdidas (ya que la energía viscosa es disipada o perdida). La tangente del ángulo de desfase, δ , suele denominarse tangente de pérdidas:

$$\operatorname{tg} \delta = \sigma'' / \sigma' = G'' / G' \quad (6.5.3.17)$$

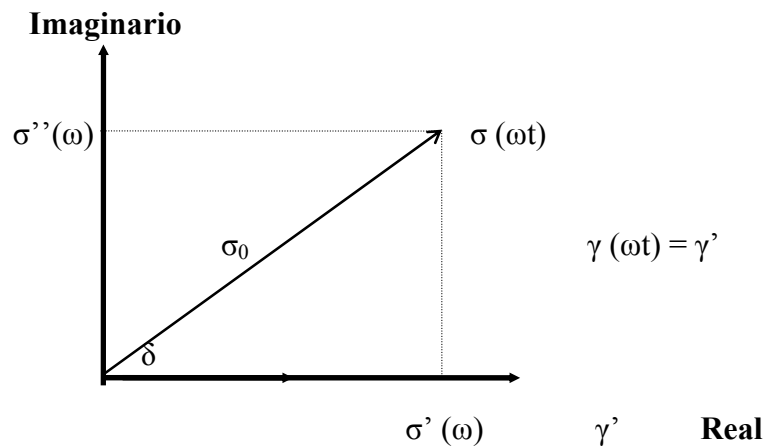


Figura 6.5.3.7. Representación del esfuerzo y deformación en coordenadas imaginarias.

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.

Otra función viscoelástica muy utilizada es la viscosidad compleja $\eta^*(j\omega)$, que viene definida en términos de esfuerzo y velocidad de deformación:

$$\eta^*(j\omega) = \frac{\sigma(\omega t)}{\dot{\gamma}(\omega t)} = \eta'(\omega) - j\eta''(\omega) \quad (6.5.3.18)$$

cuyas componentes real e imaginaria son respectivamente:

$$\eta' = G''/\omega \quad \text{y} \quad \eta'' = G'/\omega \quad (6.5.3.19)$$

Puesto que las funciones resultantes de los ensayos de relajación del esfuerzo, fluencia y oscilatorio son medidas diferentes de las mismas propiedades, no son independientes, sino que están interrelacionadas (Ferry, 1980).

Las funciones viscoelásticas definidas anteriormente no son adecuadas, en general, para materiales sometidos a deformaciones continuas y de gran amplitud (flujo). Por ello, la validez de las funciones viscoelásticas lineales debe considerarse restringida a deformaciones y/o velocidades de deformación de pequeña magnitud. Una de las principales ventajas de los ensayos viscoelásticos lineales es que proporcionan información del comportamiento del material en un estado en que su estructura permanece prácticamente inalterada.

Consecuentemente, una amplia variedad de métodos instrumentales han sido desarrollados para caracterizar sus propiedades reológicas. Hay que elegir el tipo de instrumento más adecuado basándose en: tipo de deformación que se aplica a la muestra las propiedades reológicas que pueden medir, la naturaleza de las muestras que pueden medir, su coste, sensibilidad, rango de esfuerzos de cizalla accesible y procesamiento de datos (Whorlow, 1992; Steffe, 1996; Rao, 1999; Roberts, 2003). En muchas aplicaciones industriales es necesario tener instrumentos que tomen medidas rápidas, de bajo coste fácilmente reproducibles más que datos fundamentalmente absolutos (Sherman, 1970; Rao, 1995, 1999). Existen instrumentos de análisis cada vez más sofisticados para medir propiedades viscoelásticas de una gran cantidad de materiales. El uso de técnicas cada vez más generalizadas está propiciando valiosos puntos de vistas en cuanto a los factores que influyen en la reología de materiales muy diversos.

6.6 Principio de superposición de Boltzman

Anteriormente se han definido funciones del material cuando tenía lugar un cambio simple del esfuerzo o la deformación. A continuación se mostrará como las mismas funciones pueden describir la respuesta del material a una serie de cambios que ocurren a diferentes tiempos.

Si se considera la función $\gamma(t)$ representativa de una causa que actúa sobre un sistema y $\sigma(t)$ el efecto resultante, una variación en la causa $\Delta\gamma$ en un tiempo t' produce el correspondiente efecto $\Delta\sigma$ un tiempo más tarde, t , lo que puede expresarse como:

$$\Delta\sigma(t) = \Psi(t-t')\Delta\gamma(t') \quad (6.6.1)$$

donde $\Psi(t-t')$ es la denominada “función de influencia” que es una propiedad del sistema que relaciona causa y efecto.

El principio de superposición de Boltzman establece que una serie de cambios en alguna causa, cada uno ocurientes a diferentes tiempo, contribuyen acumulativamente al efecto resultante algún tiempo después (Darby, 1976). Si el sistema es lineal, el efecto total puede representarse como combinación lineal de cada contribución:

$$\sigma(t) = \sum_i \Delta\sigma_i = \sum_i \Psi(t-t')\gamma(t_i') \quad (6.6.2)$$

Cuando los cambios en la causa ocurren de forma continua, el sumatorio puede ser reemplazado por una integral:

$$\sigma(t) = \int_{\gamma(-\infty)}^{\gamma(t)} \Psi(t-t')d\gamma(t') = \int_{-\infty}^t \Psi(t-t')\dot{\gamma}(t')dt' \quad (6.6.3)$$

6.7 Ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal en cizalla simple

Es importante resaltar que todas las ecuaciones de viscoelasticidad lineal que a continuación se detallan no están en forma tensorial, sino que son relaciones entre las componentes de cizalla de cada tensor. Si la causa, $\gamma(t')$, es la deformación por cizalla y el efecto, $\sigma(t)$, el esfuerzo de cizalla, la función influencia es entonces el módulo de

relajación $G(t-t')$, función decreciente de $(t-t')$. La ecuación del apartado anterior expresa entonces que el valor del esfuerzo a tiempo t depende de la historia de deformación completa.

Para un fluido viscoelástico se tiene que:

$$\lim_{(t-t') \rightarrow \infty} G(t-t') = 0 \quad (6.7.1)$$

En este caso existe una ecuación alternativa expresada en términos de la deformación más que en la velocidad de deformación:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t m(t-t') \gamma(t') dt' \quad (6.7.2)$$

donde $m(t-t')$ es la función memoria, que se relaciona con el módulo de relajación de la siguiente forma:

$$m(t-t') = \frac{d[G(t-t')]}{dt'} \quad (6.7.3)$$

Por el contrario, si se considera como la causa el esfuerzo y como el efecto la deformación por cizalla se obtiene:

$$\gamma(t) = \int_{\sigma(-\infty)}^{\sigma(t)} J(t-t') d\sigma(t') = \int_{-\infty}^t J(t-t') \sigma(t') dt' \quad (6.7.4)$$

donde la función influencia en este caso es la capacitancia, $J(t-t')$.

Estas expresiones generales engloban las expresiones diferenciales particulares obtenidas a partir de modelos analógicos. Así, puede demostrarse que la ecuación diferencial de in fluido de Maxwell puede convertirse en forma integral por medio de transformadas de Laplace. La expresión es del tipo:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G \cdot e^{-(t-t')\lambda} \gamma(t') dt' \quad (6.7.5)$$

Así que, para este caso particular se tiene que:

$$G(t-t') = G \cdot e^{-(t-t')\lambda} \quad (6.7.6)$$

Estas ecuaciones son las denominadas ecuaciones constitutivas de la viscoelasticidad lineal en cizalla simple (Darby, 1976; Larson, 1988; Tschoegl, 1989). A partir del conocimiento del módulo de relajación, de la función memoria o de la función capacitancia puede saberse, tras una historia de deformación previa, la relación entre el esfuerzo y la deformación en un experimento de cizalla simple, siempre que la relación entre estos sea lineal y no dependiente de la magnitud del esfuerzo (Ferry, 1980). Por lo tanto, las funciones viscoelásticas anteriores sólo son adecuadas para velocidades de deformación de pequeña magnitud.

6.8 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 λ_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:

$$G(t) = G_e + \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) e^{-t/\lambda} d \ln \lambda \quad (6.8.1)$$

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, $L(\lambda')$:

$$J(t) = J_g + \int_{-\infty}^{\infty} L(\lambda') (1 - e^{-t/\lambda'}) d \ln \lambda' + \frac{t}{\eta_0} \quad (6.8.2)$$

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 han desarrollado otros métodos para obtener espectros de relajación y retardación de una forma más exacta.

7. REOLOGÍA DE EMULSIONES

7.1 Introducción

Las emulsiones alimentarias suelen ser sistemas de enorme complejidad que pueden exhibir una gran variedad de comportamiento reológicos, que van desde fluidos newtonianos de baja viscosidad (leche o zumos) hasta sólidos vítreos (margarina refrigerada) pasando por comportamientos viscosos no lineales con fenómenos de pseudoplasticidad, dilatancia, o tixotropía y comportamientos viscoelásticos tipo gel (Dickinson y Stainsby, 1982; De Kee y col., 1983; Dickinson, 1992; McClements, 2003). En definitiva el comportamiento reológico de una emulsión alimentaria depende tanto del tipo y concentración de ingredientes que contiene como de las condiciones de procesado y almacenamiento que ha experimentado (McClements, 2004).

Por otro lado, el conocimiento de las propiedades reológicas de las emulsiones resulta esencial para el diseño de operaciones de procesado (bombeo, mezclado, intercambio de calor, etc.). Además las propiedades reológicas son frecuentemente utilizadas para analizar la organización estructural y las interacciones de los componentes de la emulsión y proporcionan información muy útil en relación con la calidad y característica del producto final (estabilidad, textura, sabor, etc.).

7.2 Factores que afectan a la reología de la emulsión

A continuación, se exponen algunos de los parámetros que más influyen sobre la reología de las emulsiones.

7.2.1 Concentración de la fase dispersa

La concentración de la fase dispersa es uno de los parámetros que individualmente más influye sobre la reología de las emulsiones. De esta forma se conoce que la viscosidad de emulsiones no floculadas aumenta con la fracción en volumen de la fase dispersa debido a que la presencia de gotas aumenta la energía disipada asociada con el flujo de fluido (Mewis y Macosko, 1994; Larson, 1999). Por tanto, atendiendo a la concentración de fase dispersa se pueden distinguir emulsiones diluidas y emulsiones concentradas:

En las emulsiones diluidas el movimiento de traslación de las gotas es grande, produciéndose sólo contactos ocasionales entre gotas. De esta forma una emulsión diluida tiene baja viscosidad y es generalmente newtoniana. A bajas concentraciones de fase dispersa, la viscosidad aumenta linealmente con la fracción en volumen de fase dispersa de acuerdo con la ecuación de Einstein.

Las emulsiones concentradas tienen alta viscosidad. Al aumentar la concentración de la fase dispersa las colisiones entre gotas llegan a ser frecuentes. Como consecuencia de la proximidad de las gotas las interacciones entre éstas comienzan a ser significativas y afectan a las propiedades reológicas de la emulsión. De esta forma a medida que aumenta la concentración de fase dispersa llega un momento en el que se produce un aumento brusco de la viscosidad. Por encima de una fracción en volumen de fase dispersa crítica, las gotas se empaquetan tan juntas que no pueden fluir fácilmente. Por encima de esta concentración la viscosidad aumenta de manera muy significativa pudiendo llegar a un ordenamiento específico en la emulsión concluyendo en una estructura altamente desarrollada. A veces las emulsiones pueden presentar comportamiento tipo sólido viscoelástico.

Las emulsiones pueden presentar un amplio intervalo de concentraciones de fase dispersa: desde la leche con comportamiento newtoniano con menor del 1% hasta mayonesas con un 70-80%. De ahí que las emulsiones sean altamente viscosas 10-100kPa s y viscoelásticas con una fuerte componente elástica.

El comportamiento no newtoniano en emulsiones se cree que está relacionado con la formación de flóculos de partículas dispersas (Sherman, 1970; Pal, 1992). Cuando el flóculo está formado, inmoviliza una significativa cantidad de fase continua dentro de éste. Como consecuencia, la concentración de fase dispersa efectiva es mayor que la verdadera concentración. Debido a esto las emulsiones no newtonianas tienen una mayor viscosidad que las newtonianas con la misma concentración. Al aumentar la velocidad se rompen los flóculos y se libera fase continua inmovilizada en el interior. Llega un momento que todos los flóculos se han roto y toda la fase continua se ha liberado con lo que la emulsión se comporta como un fluido newtoniano. A esto se pueden añadir otros efectos que pueden afectar a la viscosidad, como puede ser la hidratación.

Se pueden consultar una gran cantidad de expresiones que predicen la viscosidad de la emulsión en función de la concentración de la fase dispersa y de la velocidad de cizalla (Tadros, 1994).

7.2.2 Reología de las fases

La influencia que ejercen las viscosidades de la fase continua y de la fase dispersa, sobre la viscosidad global de la emulsión, no son totalmente independientes.

Fase continua. La viscosidad de las emulsiones suele ser directamente proporcional a la viscosidad de la fase continua. Consecuentemente, cualquier alteración en la reología de la fase continua tiene su correspondiente influencia en la reología de la emulsión final, de forma que la viscosidad relativa es suficiente para definir esta dependencia. Sin embargo, la inmovilización en flóculos de la fase continua o la adsorción de una cantidad significativa de emulsionante en la interfase es suficiente para alterar la viscosidad efectiva de la fase continua. En muchas ocasiones se añaden estabilizantes que actúan sobre la reología de la fase continua para incrementar las interacciones entre partículas y mejorar la estabilidad.

Fase dispersa. La reología de la fase dispersa tiene menor influencia directa sobre la reología en la mayoría de las emulsiones alimentarias como consecuencia de que las gotas se encuentran cubiertas por una membrana viscoelástica que provoca un comportamiento similar al de esferas rígidas (Tadros, 1994; Walstra, 1996, 2003). Indirectamente sí tiene una participación importante en el proceso de formación de emulsiones. Como se comentó anteriormente el tamaño de la gota final de la emulsión depende de la relación de viscosidades que por tanto condiciona las propiedades reológicas.

En emulsiones concentradas de aceite en agua, como las mayonesas, la reología de las gotas puede jugar un papel importante. En estos sistemas, las gotas pueden deformarse mediante la aplicación de un esfuerzo y por tanto una emulsión que contiene gotas fluidas se esperaría que tuviera menor resistencia a la deformación que una suspensión que contiene partículas rígidas.

En resumen, cualquier factor que influya sobre el comportamiento reológico de las fases y, más específicamente, sobre el grado de interacción entre ellas, tendrá una influencia significativa sobre las propiedades reológicas de la emulsión (Darby, 1984).

7.2.3 Tamaño, forma y distribución de tamaños de gota

La influencia del tamaño y forma de las gotas y de la distribución de tamaño de gotas sobre la reología depende de la fracción en volumen de fase dispersa y de la naturaleza de las interacciones coloidales.

En general, cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será la superficie disponible y habrá una mayor interacción. Como resultado, las emulsiones con menor tamaño de gota tienden a ser más viscosas y viscoelásticas. Esto está relacionado con el cambio de propiedades reológicas que se produce en una emulsión alimentaria, al someterse a una homogeneización. Se ha encontrado que la influencia del tamaño de gota sobre la viscosidad de la emulsión es mayor a bajas fracciones en volumen en emulsiones w/o y, por el contrario, es mayor a altas fracciones en volumen en emulsiones o/w (Sherman, 1960).

En emulsiones muy concentradas, que exceden la concentración requerida para un empaquetamiento compacto al azar de las gotas, puede haber una distorsión de la forma de éstas que puede jugar un papel importante en la reología de estas emulsiones. Las gotas líquidas que forman la parte dispersa de la emulsión, bajo fuerzas de cizalla, se pueden distorsionar a una forma elipsoidal. El grado de distorsión que puede ocurrir es función de la intensidad de la velocidad de cizalla, tensión interfacial, tamaño de partícula y relación de viscosidades entre la fase interna y externa (Darby, 1984). Estos efectos de deformación pueden afectar especialmente a los efectos elásticos.

Otro efecto importante es la polidispersión, que afecta principalmente a la fracción de empaquetamiento máximo, ya que las gotas pequeñas pueden ocupar los espacios disponibles entre esferas grandes. Este empaquetamiento más eficiente conduce a una menor resistencia estructural al flujo y menor viscosidad. Como resultado, las emulsiones polidispersas son menos viscosas (y menos estables) que las correspondientes monodispersas para la misma fracción en volumen. La viscosidad de una emulsión con una distribución de tamaños estrecha puede llegar a ser tres órdenes de magnitud mayor que una polidispersa (Hennoek y col., 1984). Sin embargo, es difícil separar la influencia que, sobre la reología, tiene la dispersión de tamaños y la debida a otros factores, al menos en el caso de las emulsiones. Por ejemplo, el paso de una emulsión polidispersa a través de un homogeneizador puede cambiar la polidispersión, pero también puede cambiar el tamaño medio de gota, puede aumentar el área

interfacial, disminuir la concentración de emulsionante por unidad de área interfacial, espesor de la doble capa y otros parámetros estructurales.

7.2.4 Interacciones entre gotas

Las interacciones entre gotas es uno de los factores más importantes para determinar su comportamiento reológico. Las propiedades reológicas de una emulsión dependen, por tanto, de la magnitud relativa y del alcance de interacciones atractivas (principalmente van der Waals, hidrofóbica...) y repulsivas (principalmente electrostática, estérica y fluctuación térmica) entre las gotas. La manipulación de las interacciones entre las gotas se puede usar como control eficiente de las propiedades reológicas de la emulsión alimentaria.

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 constante dieléctrica baja.

En emulsiones más concentradas, la doble capa puede interaccionar 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 interaccionar, 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.

7.2.5 pH

En general, cuando se reduce el pH en emulsiones estabilizadas por proteínas, aumenta el diámetro de gotas y disminuye la viscosidad y los valores de las funciones viscoelásticas, lo que se relaciona con una baja velocidad de difusión de la proteínas hacia la interfase, debido a un cierto grado de desnaturalización de de la proteína (Waniska y Kinsella, 1985). En dicho punto isoeléctrico la proteína presenta la menor solubilidad (Bacon y col., 1990), reduciéndose la concentración de proteína efectiva capaz de adsorberse en la interfase, aumentando así el diámetro de gotas.

8. REOLOGÍA DE GELES

8.1 Introducción

La reología se plantea como una herramienta fundamental tanto en el seguimiento experimental del proceso de gelificación como en la caracterización final de los geles. Las técnicas más utilizadas para el seguimiento del proceso de gelificación son las medidas reológicas de baja deformación. Uno de los problemas más complejos en la caracterización de geles es la determinación de la transición sol/gel o punto gel. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requisitos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del intervalo de respuesta lineal y debe proveer magnitudes físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica. Estos requisitos eliminan a los métodos transitorios como las medidas de fluencia viscosa “creep” o las de relajación del esfuerzo, quedando solamente los métodos reológicos dinámicos, en los cuales se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria, como la única alternativa de seguimiento de la gelificación. Así, los ensayos de curado, en los que se registran los módulos viscoelásticos lineales G' y G'' a frecuencia constante, han sido utilizados frecuentemente para seguir la transición sol-gel durante el calentamiento de disoluciones de proteínas (Clark y col., 1982; Tokita y col., 1984; Egelandsdal y col., 1986; Sánchez y Burgos, 1997; Kavanagh y col., 2002).

Sin embargo, mayor variedad de técnicas reológicas se pueden aplicar para la caracterización de los geles. Así, técnicas como los ensayos de obtención del espectro mecánico, ensayos de fluencia o curvas de flujo han demostrado la utilidad en la caracterización de geles en función de variables tales como la concentración de proteína (Lefevbre y col., 1998; Weijers y col., 2002), la fuerza iónica (Verheul y col., 1998; Neiser y col., 1998), tipo de sal (Neiser y col., 1998; Puppo y col., 1999a y 1999b), o el pH (Neiser y col., 1998; Puppo y col., 1998, 1999a y 1999b). También existen estudios que aplican grandes deformaciones mediante técnicas de compresión o torsión para estudiar los perfiles de deformación y rotura de la estructura (Marshall y Vaisey, 1972; Szczesniak, 1975; Foegeding, 1993; Bowland y Foegeding, 1995). Una caracterización completa de un gel alimentario requiere la determinación de sus propiedades texturales. La textura de un alimento es una de las propiedades sensoriales que contribuye en

mayor medida a la aceptabilidad del alimento (Bourne, 2002). Las técnicas texturométricas más utilizadas someten a la muestra a un ensayo de compresión uniaxial o a un doble ciclo de compresión (ensayo TPA), para obtener parámetros texturales (cohesividad, consistencia, cremosidad, fragilidad, gomosidad, masticabilidad, etc.), muchos de los cuales han sido relacionados con la estructura (Blanshard y Mitchell, 1988; Aguilera y Stanley, 1999), propiedades reológicas (Sherman, 1979; Rao, 1992) y percepción sensorial (Meilgaard y col., 1999; Rosenthal, 1999).

8.2 Técnicas reológicas para el seguimiento de la gelificación

8.2.1 Reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación

La cizalla oscilatoria de pequeña amplitud permite el seguimiento del proceso de gelificación ya que las pequeñas deformaciones no afectan a la estructura del material. La geometría cono y placa no es recomendable en sistemas sometidos a calentamiento para inducir la gelificación, debido a que hay una distancia muy pequeña entre el cono y la placa. Los sistemas de placas paralelas y Couette son los más utilizados para el seguimiento de la gelificación (Ross-Murphy, 1995).

En estos ensayos la muestra, usualmente un fluido, se coloca entre dos placas paralelas cuya temperatura puede ser controlada. Una de las placas oscila a una frecuencia de oscilación constante. La deformación sinusoidal aplicada causa un grado de cizallamiento en ella y la señal de respuesta que se obtiene es diferente en fase y amplitud. Se obtienen dos parámetros independientes: el módulo de almacenamiento G' (en fase) que es la parte real del módulo complejo y el módulo imaginario (fuera de fase) G'' , también llamado módulo de pérdidas. El módulo G' es una medida de la cantidad de energía almacenada elásticamente en la estructura. El módulo G'' es una medida de la pérdida de energía asociada al comportamiento viscoso.

8.2.2 Caracterización de la transición sol-gel: el punto gel

A medida que el gel se va formando, G' , G'' van variando y pueden ser registradas en función del tiempo. En el estado fluido G'' será mayor que G' . Conforme aumenta la temperatura, G' y G'' empiezan a aumentar, siendo más rápido el incremento en G' (Figura 8.2.2.1). Para un cierto tiempo t_g , G' y G'' se cruzan y G' se hace mucho mayor que G'' . El punto de cruce se podría considerar de forma aproximada el tiempo en el

que ocurre la gelificación (punto gel). Sin embargo, en muchas ocasiones esta zona no puede ser determinada experimentalmente. En estos casos, suele utilizarse como criterio para la determinación del punto, un rápido incremento de la pendiente de G' . Otro parámetro reológico utilizado y que se obtiene de la relación entre los módulos G' y G'' , es la tangente de pérdida ($\tan \delta$), definida como el cociente entre el módulo de pérdidas y el de almacenamiento. Además, existen en la literatura otros criterios más precisos que han sido utilizados por diversos autores para la determinación del punto gel (Lopes da Silva y col., 1998; Kavanagh y col., 2000).

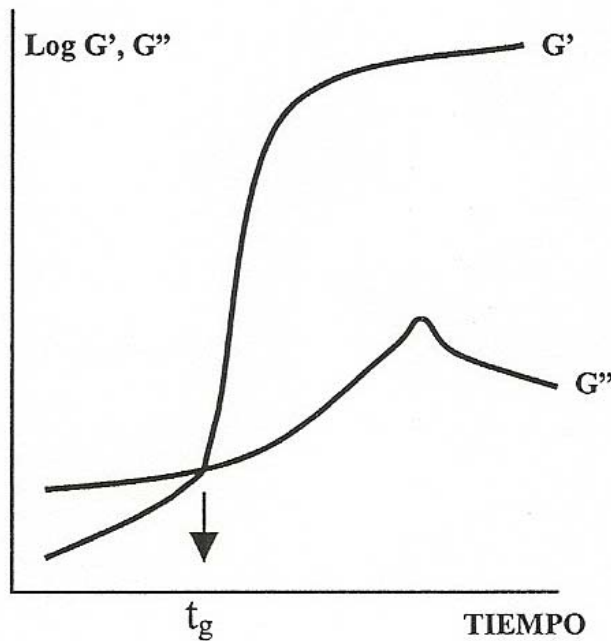


Figura 8.2.2.1 Curva típica de G' y G'' en función del tiempo obtenida durante el proceso de gelificación.

Sin duda el método más aceptado para la determinación del punto gel es el de Winter-Chambon. En dicho método el comportamiento visocelástico lineal se puede describir por la ecuación reológica denominada “Gel equation” (Winter y Chambon, 1986).

$$\tau = S \int_{-\infty}^t (t - t')^{-\Delta} \dot{\gamma}(t') dt' \quad (8.2.2.1)$$

donde S es un parámetro denominado dureza del gel y Δ es el exponente crítico de la red. En consecuencia, el módulo de relajación y los módulos dinámicos en función de la frecuencia y el tiempo son:

$$G(t) = St^{-\Delta} \quad (8.2.2.2)$$

$$G'(\omega) = k_1 \omega^\Delta \quad (8.2.2.3)$$

$$G''(\omega) = k_2 \omega^\Delta \quad (8.2.2.4)$$

Según el criterio de Winter-Chambon, el punto gel es aquel donde la $\text{tg}\delta$ ($=G''/G'$) es independiente de la frecuencia.

8.3 Técnicas reológicas para la caracterización de geles

8.3.1 Viscoelasticidad

Para la determinación de las propiedades viscoelásticas de un material se usan dos tipos de métodos: métodos dinámicos (oscilatorios) y métodos transitorios (ensayos de fluencia “creep” y relajación del esfuerzo).

A) Ensayos dinámicos

Son los ensayos más empleados para la caracterización del comportamiento viscoelástico de los geles, permiten la caracterización mecánica de los geles y el estudio del proceso de gelificación in-situ.

Los ensayos dinámicos permiten obtener el espectro mecánico de un gel, es decir, la variación de G' y G'' en función de la frecuencia. Así desde el punto de vista reológico, un gel es un material viscoelástico, para el que G' es mayor que G'' en función de la frecuencia (Morris, 1989). Existen multitud de trabajos, entre los que cabría destacar los siguientes (Richardson y Ross-Murphy, 1981; Paulson y col., 1990; Rosalina y Bhattacharya, 2002).

B) Ensayos de fluencia “Creep”

El estudio de geles mediante esta técnica presenta una serie de dificultades de tipo experimental. Debido a esto, hay escasez de información en la literatura (Blanshard y Mitchell, 1976; Braudo y col., 1984), siendo la mayoría de estos trabajos de estudio de biopolímeros y más concretamente sobre el estudio de gelatinas y geles de polisacáridos (Higgs y Ross-Murphy, 1990; Normand y Ravey, 1997). Los estudios sobre geles térmicos son aún más escasos. Aunque existen ciertos trabajos que se deberían tener en cuenta donde se combinan resultados de ensayos dinámicos con los de ensayo de

fluencia (Richardson y Ross-Murphy, 1981; Kitabatake y col., 1989; Lefebvre y col., 1998; Kavanagh y col., 2002).

C) Relajación del esfuerzo

Cuando se somete un material viscoelástico a una deformación constante y se deja relajar con el tiempo, el esfuerzo resultante tenderá a disminuir exponencialmente. Un líquido viscoso puro relaja completamente, mientras que los materiales viscoelásticos no relajan completamente y siempre se queda un cierto valor de esfuerzo residual.

Las curvas de relajación de un material proporcionan información acerca de la rigidez del material que se esté estudiando. Los ensayos de relajación de larga duración ($t > 20$ min.) resultan difíciles de desarrollar para geles, ya que estos no son físicamente estables y tienden a intercambiar agua con el ambiente. En consecuencia, los ensayos de relajación de geles suelen ser de corta duración.

Al igual que ocurre con los ensayos de fluencia existe escasa literatura y quizás cabría destacar entre otros trabajos los de Peleg, 1979; Mancini y col, 1999.

8.3.2 Perfil de textura

El análisis del perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo consiste en dos ciclos de compresión consecutivos, imitando el proceso de masticación.

Un pequeño cilindro de gel (aproximadamente 2 cm. de diámetro y 0,8 cm. de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro tipo Prensa Instron, o similar, sobre el que actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura determinada. La determinación del perfil de textura involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante, durante las cuales se registra la evolución de la fuerza.

En la figura 8.3.2.1 se muestra el perfil de textura típico, del cual se pueden evaluar, entre otros, los siguientes parámetros principales (Bourne, 1978):

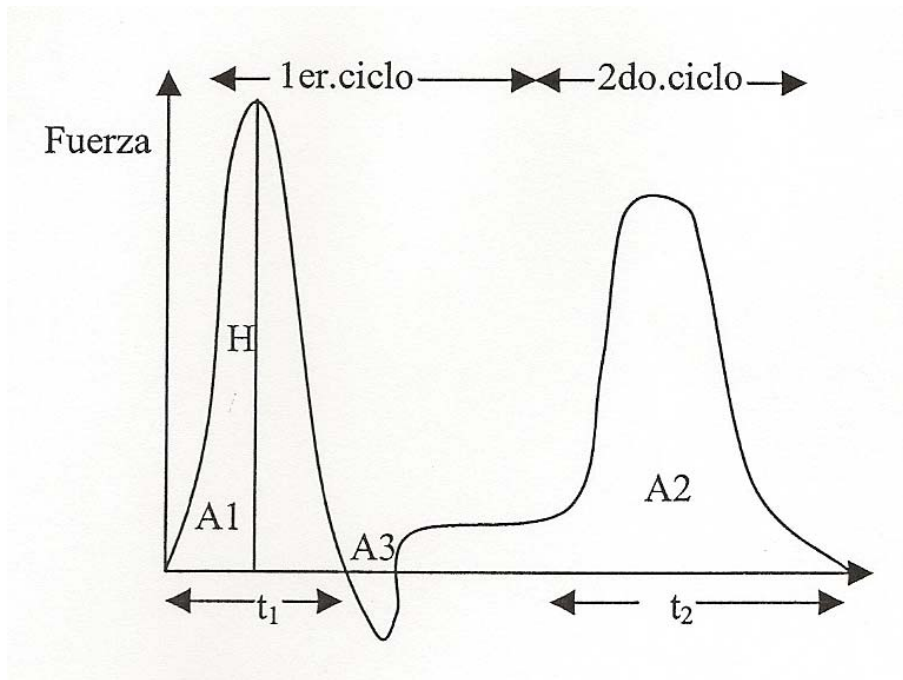


Figura 8.3.2.1 Perfil de textura.

Dureza (H): Es la resistencia a la compresión. Es la fuerza que debe aplicarse para lograr una determinada deformación.

Cohesividad (A_2/A_1): Es función directa del trabajo necesario para vencer las uniones internas del material.

Elasticidad (t_2/t_1): Es la habilidad para recuperar la forma original.

Adhesividad (A3): Trabajo necesario para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie de un gel y la superficie de otros materiales.

III. Desarrollo experimental

1. MATERIALES

1.1 Harina de cangrejo

Como materia prima se ha utilizado harina procedente del cangrejo rojo de las marismas del Guadalquivir, *Procambarus Clarkii* (Género *Astacus*) (Fig. 1.1.1), proporcionada directamente por ALFOCAN S.L. (Isla Mayor, Sevilla, España). Dicho cangrejo presenta las características que se describen a continuación:

- **Nombre común:** Cangrejo rojo, cangrejo de las marismas, cangrejo de Lousiana.
- **Área de origen:** U.S.A.
- **Identificación:** 1 espolón característico, 2 pinzas muy espinosas y 3 suturas longitudinales del caparazón, unidas o ligeramente separadas.
- **Coloración:** Normalmente es “rojo vino”, aunque pueden encontrarse tonalidades marrón-verdosas.



Figura 1.1.1. Cangrejo rojo (*Procambarus Clarkii*)

1.2 Aceite

El aceite utilizado para la preparación de las emulsiones corresponde a un aceite comercial, *Koipesol S.A.* (España).

1.3 Reactivos

Se utilizaron diferentes tipos de reactivos químicos comerciales, todos ellos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA):

- Reactivos para la modificación y ajuste de pH como el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio preparados en disoluciones a diferentes concentraciones.
- Agentes desnaturizantes como el dodecilsulfato sódico (SDS) y β -mercaptoetanol (β -ME).

- Reactivos comerciales para electroforesis como la acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato sódico para la creación del gel de electroforesis, patrón de electroforesis, diferentes colorantes como el azul de bromofenol y el Coomassie R-250 así como otros reactivos para la preparación de las disoluciones (Trizma Base y glicina) o para la decoloración del gel (etanol, metanol o ácido acético)
- Diferentes tipos de sales como carbonato de sodio, sulfato de cobre y tartrato sódico-potásico utilizados para la determinación de la solubilidad, sulfato de sodio y de cobre para método Kjeldhal, Na_2EDTA y borato sódico para la preparación de tampones, disoluciones de sorbato-benzoato para evitar la desestabilización microbiana y KCl para la determinación de microscopia electrónica.
- Reactivos específicos para la caracterización y cuantificación de proteínas como el Folin-Ciocalteu o la seroalbúmina bovina (BSA).

2. METODOS

2.1 Preparación de muestras

2.1.1 Harina de cangrejo

La harina de cangrejo es suministrada directamente por ALFOCAN S.A. (Isla Mayor, Sevilla, España), y es preparada a partir de excedentes de cangrejo a escala planta piloto. La parte cárnica se separa inicialmente del exoesqueleto y es triturada formando una pasta líquida, que se seca en tambor rotatorio a temperaturas entre 150 y 160°C durante un tiempo prolongado obteniendo un polvo de baja humedad.

2.1.2 Aislado de cangrejo

El aislado de cangrejo se obtiene a partir de la harina de cangrejo tamizada a 600 μm . En primer lugar se lleva a cabo una etapa de desengrasado con hexano. Muestras de relación 1 a 10 (harina a hexano) en peso eran extraídas 3 veces con hexano a 30°C durante periodos de 8 horas. Posteriormente, la harina es puesta en platos donde se lleva a cabo la eliminación total del hexano mediante evaporación durante un periodo de 24 horas. La harina de cangrejo desengrasada que se obtiene se disuelve en agua (relación harina:agua a 1:10 p/v) obteniendo disoluciones de un pH 6,6. Estas dispersiones son ajustadas hasta un valor de pH igual a 11 con NaOH al 25%, agitadas a temperatura ambiente durante 2 horas y centrifugadas a 9000 g y 4°C en una centrífuga RC5C

Sorvall centrifuge (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA). Los sobrenadantes se separan y el resto se resuspende de nuevo con agua destilada ajustando de nuevo el pH a 11 y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Se ajusta el pH de ambos sobrenadantes, tanto el inicial como el procedente del lavado, a un valor de 3,4 (punto isoeléctrico de las proteínas) con HCl 6N, permaneciendo toda la noche a 4°C y agitación magnética suave. Al día siguiente se centrifuga a 9000 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se desecha el sobrenadante y se conserva el sólido. Este sólido se lava y posteriormente se resuspende con poca cantidad de agua destilada (Bengoechea y col., 2008; Romero y col., 2009). La resuspensión se congela a -80°C y se liofiliza en un liofilizador Freeze Mivile 3 (VIRTIS, USA).

2.1.3 Emulsiones

Se han preparado emulsiones de aceite de girasol en agua, utilizando la harina de cangrejo tamizada como emulsionante. La concentración de aceite se ha mantenido siempre en el 75% en peso (p/p). Se han preparado emulsiones con diferente concentración de harina de cangrejo, entre 0,25 y 6,25 % (p/p). La cantidad de agua se ha ajustado en función de la concentración de harina utilizada.

Durante la presente memoria se han seguido dos métodos de preparación de emulsiones, uno por emulsificación directa y otro por emulsificación indirecta. El protocolo experimental para el proceso de emulsificación directa ha sido el siguiente:

- En primer lugar se dispersa la harina en agua destilada a temperatura ambiente y posteriormente, tras un periodo de 5 minutos de agitación suave se adiciona la cantidad necesaria de NaOH (2M) para ajustar el pH a 11,5, y se vuelve a agitar durante 5 minutos. Posteriormente, se añaden unas gotas de disolución 1:1 al 0,2 % (V/V) de sorbato/benzoato, para evitar la desestabilización microbiana.
- La etapa de emulsificación se lleva a cabo en un homogeneizador Ultra-Turrax T50 (Ika, Alemania) (Figura 2.1.3.1) cuyo elemento dispersante es un dispositivo rotor- estator, S50NH-G45F. Este equipo genera un gran aporte de energía mecánica aunque tiene el inconveniente de no registrar el par de torsión durante el proceso. La agitación comienza unos 20 s antes de la adición de aceite, para asegurar un mezclado homogéneo de la fase continua. Este mezclado previo favorece la fluidificación de la fase continua que por lo general presenta un comportamiento pseudoplástico.

- A continuación, se adiciona el aceite durante 7 minutos, de los cuales la alimentación de aceite tarda unos 6 minutos dedicando el último minuto para homogeneizar la emulsión. Este proceso se ha realizado en un baño termostático a la temperatura de 20°C.



Figura 2.1.3.1. Sistema homogeneizador Ultraturax T-50.

Todas las emulsiones se han preparado usando una fase continua a pH 11,5. Para valores de pH diferentes a 11,5 se ha seguido un método de emulsificación indirecto. Dicho método comienza justo después de la preparación de la emulsión explicada anteriormente. Así, en primer lugar, tras la preparación de la emulsión a pH 11,5, se mantiene una etapa de maduración para favorecer el desarrollo de una estructura que permita su estabilidad a largo plazo. Posteriormente, se añade HCl (2M) con el objeto de ajustar el pH requerido y se realiza una agitación suave para asegurar la homogeneización evitando la coalescencia inducida por cizalla.

Las cantidades preparadas de las distintas emulsiones se almacenan a 4°C durante 24 horas, al cabo de la cuales se realizan las medidas reológicas y de distribución de tamaño de gota, salvo en el caso de determinados estudios de la evolución de las emulsiones en cortos periodos de tiempo.

2.1.4 Geles

Se prepararon dispersiones acuosas (10% p/p en proteína) del aislado de proteínas de cangrejo y, posteriormente, se ajustó el pH de las dispersiones a 2, 3,5, 6, 8, 10 y 11,5 con HCl 2 N o NaOH 2 N. En el caso de pH 6 se prepararon dispersiones de proteínas a diferentes concentraciones (6, 8, 10, 12 y 15 % p/p). Las dispersiones preparadas eran parcialmente desgasificadas por centrifugación a 1000g durante 1 min. a 15°C (Xiong y Kinsella, 1990), siendo posteriormente resuspendidas cuidadosamente con una varilla de vidrio y volcadas a tubos de vidrio (25 mm. de diámetro interno y 10 cm. de altura) que están cerrados por ambos extremos con tapones de goma.

La gelificación térmica se lleva a cabo por calentamiento de los tubos a 90°C en un baño termostatzado Phoenix (Haake, Alemania) durante 30 min. (Damodaran, 1988) y enfriadas posteriormente en un baño de agua a 15°C. Los geles se mantienen luego a 4°C durante 24-48 h antes de los análisis (Puppo y col., 1995), salvo en el caso de determinados estudios de la evolución de los geles en cortos periodos de tiempo.

2.2 Técnicas de caracterización

2.2.1 Harina de cangrejo

A) Granulometría

La distribución de tamaños de grano ha sido estudiada sometiendo a la harina de cangrejo a un proceso de tamizado con una batería de tamices de distinta luz de malla entre 20 y 1700 micras (C.I.S.A. Barcelona).

B) Composición

Los métodos utilizados son los recomendados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1995). Las determinaciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado.

El contenido de nitrógeno total se ha determinado por el método de Kjeldahl (figura 2.2.1.1) tras centrifugar durante 10 minutos a 1400 g. El contenido en proteínas se ha obtenido multiplicando el nitrógeno total por el factor de conversión de nitrógeno a proteína, 6,25.

El contenido de cenizas se ha calculado por gravimetría, incinerando las muestras a 550 °C en mufla durante 36-48 horas y comprobando el peso restante.

El contenido de humedad se ha determinado de acuerdo con los métodos estándares calculando por diferencia el peso inicial y final de la muestra una vez desecada a 105 °C durante 24 horas en una estufa.

El contenido de lípidos se determinó con el método Soxhlet (figura 2.2.1.2) mediante extracciones repetidas usando como disolvente hexano.



Figura 2.2.1.1 Montaje de método de determinación de proteínas (Kjeldhal).



Figura 2.2.1.2 Montaje de método de determinación de lípidos (Soxhlet).

El contenido en hidratos de carbono se ha obtenido por diferencia.

C) Solubilidad

Se determinó la solubilidad de las proteínas presentes en las muestras de harina de cangrejo en distintos disolventes y distintos pH del medio: agua (a pH 2, 6,7 y 10); una disolución al 1% SDS; una disolución al 1% de β -ME; y una disolución al 1% de ambos productos químicos a pH nativo. El método de análisis utilizado ha sido una adaptación del método de Lowry (Peterson, 1979; Faranahky, 2003) que consiste en la formación de un complejo entre la proteína soluble y el reactivo Folin-Ciocalteau en medio alcalino. Para ello se han tomado 0,1 g de muestra, mezclándolos con 10 mL de disolvente y agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras han sido centrifugadas durante 10 minutos a 1500 g y filtradas con papel Whatman N° 4. Una muestra de 0,4 mL se colocó en un tubo de ensayo seco y se diluyó con agua hasta 10 mL. La disolución de proteínas (0,5 mL) se mezcló con 2,5 mL de una disolución alcalina de cobre (49 mL de hidróxido sódico 0,2 M + 49 mL de carbonato de sodio al 4% + 1 mL de sulfato de cobre al 1% y 1 mL de tartrato sódico-potásico al 2%) y se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 0,25 mL de Folin-Ciocalteau (10 mL de Folin-Ciocalteau + 10 mL de agua) y se esperó durante 30 minutos. Tras este periodo, las muestras se pasaron a una cubeta de 3 mL. La cantidad de proteína se detectó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, tomando como blanco agua destilada con la misma cantidad de Folin-Ciocalteau y utilizando una curva de calibrado para la que se usa BSA (Mohammed y col., 2000). El equipo utilizado para medir la absorbancia es un espectrofotómetro de doble haz, Perkim-Elmer (Hitachi, USA).

D) Punto Isoeléctrico

Se ha determinado el punto isoelectrico de la proteína mediante un detector de carga superficial Mutek PCD03-pH (BTG Mutek GMBH, Alemania). Para ello se han preparado distintas muestras de harina dispersas en agua a una concentración del 1%. El equipo es capaz de medir diferencias de potencial (en mV) que se generan cuando los iones contrarios adheridos a la superficie de las partículas cargadas en disolución son separados bajo la acción de la cizalla. El punto isoelectrico se ha determinado cuando el valor del potencial es nulo, lo que indica la ausencia de iones contrarios en la superficie de las partículas debido a que todas las cargas existentes en la muestra están neutralizadas (Figura 2.2.1.2).

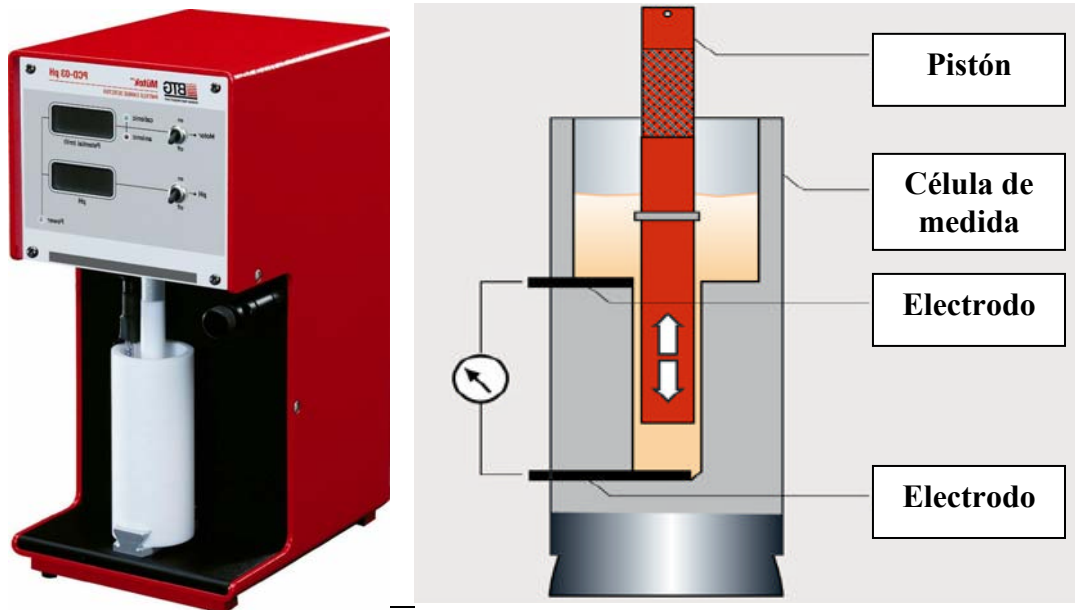


Figura 2.2.1.3 Detector de carga superficial Mutek PCD03-pH

E) Densidad de las dispersiones acuosas

La densidad de la fase continua ha sido calculada de manera aproximada, tomando volúmenes concretos de fase continua mediante una micropipeta Eppendorf-Ntheler-Hinz GMBH (Hamburgo, Alemania), que proporciona una precisión de $\pm 0,5\%$ y pesando la cantidad seleccionada en una balanza de precisión Mettler A160 (Mettler Toledo GMBH, USA). El hecho de no utilizar un densímetro, como en el caso del aceite, es debido a la presencia de partículas en la fase continua y al elevado pH que pueden dañar al dispositivo de medida.

F) Viscosidad de las dispersiones acuosas

Se han llevado a cabo medidas de curvas de flujo en intervalo de velocidades entre $0,1$ y 300 s^{-1} . Estas medidas se han realizado en un equipo de velocidad de deformación controlada RV20-CV100 (Termo-Haake BmbH, Alemania) (Figura 2.2.1.4) usando para ello sensores de flujo Couette, del tipo Mooney-Ewart, ME-30 y ME-15, en función de las viscosidades de las muestras. La temperatura se ha controlado mediante un baño termostatzado.



Figura 2.2.1.4 Reómetro de velocidad controlada CV100

2.2.2 Aislado de cangrejo

A) Composición

Los métodos utilizados son los recomendados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1995). Las determinaciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado.

El contenido de proteínas, cenizas, humedad y lípidos se ha determinado siguiendo los mismos procedimientos descritos en el apartado 2.2.1B, para la harina de cangrejo.

El contenido en hidratos de carbono se ha obtenido de nuevo por diferencia.

B) Solubilidad y punto isoelectrico

Para la determinación de la solubilidad en función del pH y, por consiguiente, del punto isoelectrico del aislado de cangrejo, se preparan dispersiones acuosas de proteínas (0,96 g/40 mL) ajustando el pH a 4, 6, 8, 10 y 12 con NaOH 6N y a pH 2 con HCl 6N. Las muestras se homogenizan y luego se centrifugan durante 15 min. a 10000g a 15 °C y se lleva a cabo un análisis del sobrenadante usando un microanalizador de nitrógeno LECO CHNS-932 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA) (Bengoechea y col., 2008). El contenido en proteínas se ha determinado multiplicando el nitrógeno total por el factor de conversión de nitrógeno a proteína, 6,25 (Etheridge y col., 1998). El porcentaje de proteína soluble se calcula a partir de la relación de proteína en el sobrenadante con respecto al total de proteínas. El punto isoelectrico se calcula como el mínimo que resulta al representar los porcentajes de proteínas solubles frente al pH.

De forma similar se calcula el porcentaje de proteínas solubles en agua o en diferentes disoluciones amortiguadoras:

- Disolución amortiguadora pH 2,0 (0,03 M fosfato).
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA)
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,5% SDS
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,5% SDS + 1 % β-Mercaptoetanol.
- Disolución amortiguadora pH 10,0 (0,1 M Borato sódico).

C) Electroforesis

Los ensayos de electroforesis se han realizado utilizando geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (1970). El sistema de geles está formado por un gel continuo del 10% (gel separador) y un gel de concentración del 4% (gel apilador). Los geles se preparan entre dos placas de vidrio perfectamente limpias (lavar en solución concentrada de detergente, enjuagar con agua destilada en abundancia y etanol). Se usaron las disoluciones amortiguadoras de 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 y 0.1% SDS para la preparación del gel separador y 0,125 M Tris-HCl, pH 6.8 y 0.1% SDS para la preparación del gel compactador. Los geles preparados alcanzan aproximadamente una altura de 10 cm (2 cm superiores para el gel de concentración y 8 cm inferiores para el gel separador). Una vez añadido los geles, se espera entre 15 y 30 min. para que se lleve a cabo la polimerización dependiendo de la concentración del gel y de la temperatura ambiente (más lenta en días en fríos). Cuando se lleva a cabo la deposición del gel superior se añade un peine para formar las calles retirándolo cuando el gel está totalmente formado. Las muestras se prepararon mezclando las disoluciones de proteínas extraídas en los mencionados disolventes en solubilidad (2.2.2. B), en proporción 1:1 v/v con amortiguador de muestra a pH 6,8 (0,125M Tris-HCl, 0,1% SDS, 40% v/v de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol), con o sin 5% β-Mercaptoetanol y calentándolas a 100°C durante 5 min. Las muestras preparadas se siembran en diferentes cantidades (5, 10 y 15 μL) con una pipeta Hamilton en cada una de las calles. Los geles utilizados han sido preparados en un

equipo Mini Protean IV y desplazados en un buffer 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine, y 0.1% SDS pH 8.3 a voltaje constante de 200 V con un Power-Pack 300 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Las bandas de proteínas se han visualizado tiñéndolas por inmersión del gel en una solución de Azul de Coomassie R-250 (Serva) al 0,05% p/v con metanol, ácido acético y agua. Los geles obtenidos se fijan y colorean con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% en agua/metanol/ácido acético (5:5:20) durante 12 h y luego se decolorean con metanol 25% (p/v) y ácido acético 10% (p/v). Cuando se necesita mayor sensibilidad la coloración puede ser realizada con solución de plata (Morrisey, 1981; Wray y col., 1981). A pesar de ser de cien veces más sensible que el Coomassie, la coloración con plata es cara y laboriosa. Los pesos moleculares de las fracciones de proteínas extraídas se han determinado en geles SDS- PAGE, teniendo en cuenta la relación existente entre el logaritmo del peso molecular de la proteína y la movilidad electroforética, utilizando como patrón analítico "*Protein Plus Protein Standards*" (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

Los geles pueden ser almacenados indefinidamente en solución decolorante o secos entre hojas de celofán, usándose secadores de geles comerciales o de acuerdo con los procedimientos descritos en la bibliografía (Juang y col., 1984; Samal, 1987). Los geles pueden ser fácilmente secados después e deshidratarlos durante algunos minutos en solución con 70% (p/p) de etanol, 10% de ácido acético glacial (p/p) y 10% glicerol (p/p). A continuación los geles son colocados entre dos hojas de celofán previamente humedecidas con etanol, usándose como soporte una placa de vidrio. La parte excedente de celofán es doblada hacia atrás y asegurada con otra placa de vidrio. El "sándwich" es entonces envuelto en papel absorbente y mantenido a temperatura ambiente durante una semana; luego los geles pueden ser retirados y, por ejemplo, pegados en cartón blanco debidamente identificado. Para que este procedimiento funcione es esencial que el papel celofán sea de buena calidad.

D) Reología de dispersiones

D.1 Dispositivos empleados

Los ensayos de caracterización reológica de dispersiones se han realizado en un equipo de deformación controlada ARES (TA Instruments, USA) (Figura 2.2.2.1). La temperatura se controla mediante un sistema Peltier conectado a un baño termostaticado. Los sistemas sensores utilizados son del tipo placa-placa con un

diámetro de 25 mm y superficie rugosa para evitar la aparición de deslizamiento (Figura 2.2.2.2). El gap utilizado en el caso de placa placa es de 1 mm mientras que el caso del cono placa viene marcada por el sistema sensor.



Figura 2.2.2.1 Reómetro de deformación controlada ARES.



Figura 2.2.2.2 Sistema sensor plato-plato 25 mm. rugoso.

D.2 Ensayos reológicos

- Ensayos viscoelásticos dinámicos

En primer lugar, se ha realizado un barrido de deformación (0,0625-300%) para determinar el intervalo viscoelástico lineal a una frecuencia de 1Hz. A continuación, se ha llevado a cabo un barrido de frecuencia (100-0,02 s⁻¹) a una deformación inferior a la deformación crítica que asegure la permanencia en el intervalo viscoelástico lineal.

D.3 Protocolo de medida

En todos los casos se han efectuado las determinaciones experimentales el mismo día de preparación de las dispersiones. Las muestras de dispersiones tras ser agitadas para corregir posibles desestabilizaciones, son colocadas en el reómetro. Después de esto el sensor se lleva hasta la posición de medida. Para evitar el secado de la muestra, se añade aceite de vaselina en las inmediaciones del sensor y se rodea con una cubierta diseñada específicamente para este fin.

Al menos dos replicados fueron llevados a cabo para cada determinación reológica.

2.2.3 Caracterización interfacial

A) Tensiómetro de gotas

Las medidas de tensión de superficie se realizaron en un tensiómetro de gotas KSV Instruments LTD (Helsinki, Finlandia) desarrollado originariamente por Benjamins y col. (1996). Un tensiómetro de gota puede ser utilizado en modo gota pendiente o montante, adosada a una jeringa y que se coloca en el interior de la cubeta. En este caso, las medidas fueron realizadas en el modo de gota montante (figura 2.2.3.1). Las muestras son colocadas en una cubeta de cuarzo de (4 x 1 x 1) y termostalizadas a 20°C. En la medida de la tensión interfacial es mucho más precisa si la gota formada es grande, de hecho si la gota es pequeña, sólo se forma una gota esférica.

El volumen de la gota es ajustado gracias a un micrómetro de tornillo controlado por un motor. Una fuente luminosa uniforme ilumina la gota y la imagen de contorno es grabada por una cámara asociada a un ordenador. La imagen es numerada y tratada por un programa Cam 2000 con el objetivo de analizar el contorno de la gota.

La proteína de cangrejo fue estudiada en un intervalo de concentraciones desde 0,01 a 1 g/L, para valores de pH 2 y 8.

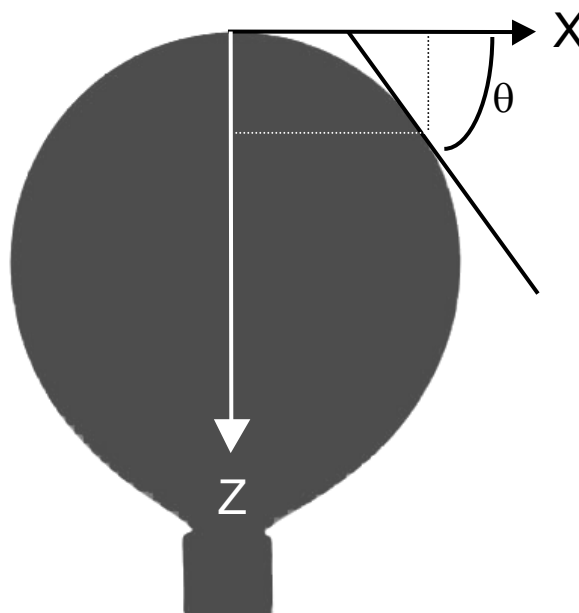


Figura 2.2.3.1. Cálculo de la tensión superficial de una gota montante a partir del estudio de su contorno.

B) Balanza de Langmuir

La balanza de Langmuir utilizada (modelo Nima 601 BAM, Nima Technology LTd, Coventry, Reino Unido) está constituida por una cuba de PTFE (teflón) de superficie 700 cm^2 y volumen de 47 mL , y por un controlador de temperatura. Dos barreras móviles de teflón controladas por un motor de precisión se desplazan sobre la cuba y permiten controlar la densidad de las moléculas en la interfase. La lámina utilizada en las medidas ($2 \times 1 \text{ cm}$) (sensor de presión), está constituida por un papel de filtro Whatman 43 completamente mojado, con un ángulo de desviación nulo. Las medidas permiten representar la presión de superficie en función del área comprimida entre las barreras.

Por experiencias previas, se ha elegido trabajar con la mitad de la cuba, es decir, con 350 cm^2 . Al final de la compresión, el área se reduce a 40 cm^2 llegando a una relación de compresión de $8,75$. La velocidad de desplazamiento de las barreras se fija en $40 \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$.

La deposición de las proteínas sobre la superficie de la cuba de Langmuir se efectúa con la ayuda de una microjeringa con la deposición de pequeñas gotas muy próximas a la superficie y distribuidas regularmente sobre ella. Tras la deposición de la

disolución estudiada, tiene lugar la etapa de adsorción-reorganización. Cuando la presión superficial no evoluciona más (tiempo de espera de una hora) se lleva a cabo la etapa de compresión. Todos los sistemas son estudiados a 20°C.

Las disoluciones se preparan a una concentración de 5g/L tanto a pH 2 como 8 y se depositan diferentes cantidades de esta disolución.

2.2.4 Emulsiones

A) Caracterización del aceite

A.1 Viscosidad del aceite

Se han realizado curvas de flujo en un amplio intervalo de velocidades de cizalla, desde 0,1 a 500 s⁻¹, en un reómetro de esfuerzo controlado, AR2000 (TA Instruments USA) (Figura 2.2.4.1). El sistema sensor utilizado es un sistema cono-placa, con un cono de 60 mm. de diámetro, 1° de ángulo y el gap marcado por el cono placa.. Al menos dos replicados fueron llevados a cabo para cada determinación reológica.



Figura 2.2.4.1. Reómetro de esfuerzo controlado AR2000

A.2 Densidad del aceite

Las medidas de densidad del aceite han sido realizadas termostalizando el aceite a diferentes temperaturas entre 20 y 60°C. El dispositivo empleado ha sido un densímetro,

Densito 30P (Mettler Toledo GMBH, Suiza). Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

B) Medidas de Backscattering

Las medidas de Backscattering se realizaron en un analizador vertical QuickScan (Vertical Scan Analyzer) de la firma Beckman Coulter. Para la realización de las medidas, se colocan las muestras de emulsiones en una célula de medida que está constituida por un tubo de vidrio cilíndrico. Las medidas consisten en la aplicación de una fuente de luz sobre el tubo donde se coloca la muestra, obteniéndose el Backscattering y la Transmisión en función de la altura de la muestra (la altura total del tubo es de 60mm) (Mengual y col., 1999; Pan y col., 2002).



Figura 2.2.4.2. Analizador vertical QuickScan.

Todas las medidas fueron realizadas a 20°C. Puesto que las emulsiones se mantienen almacenadas a 4°C, antes de llevar a cabo cada medida es necesario un tiempo de espera de 2 horas fuera del frigorífico para que se alcance la temperatura deseada, en este caso, 20°C.

C) Medidas de distribución de tamaño de gotas (DTG)

Las medidas de tamaño de gota se han llevado a cabo en un analizador MasterSizer X de la firma Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido). (Figura 2.2.4.2).



Figura 2.2.4.2 Analizador de tamaño de gotas Mastersizer X.

Este equipo utiliza una técnica que consiste en una medida de la dispersión de la luz láser al atravesar las partículas dispersas en un medio, y mediante el patrón de difracción registrado se obtienen las curvas de distribución de tamaños de gota, usándose para ello sistema de lentes. Se ha empleado una lente de 100 mm para registrar la dispersión del láser, que detecta tamaños de gota entre 0,1 y 200 μm .

Antes de realizar la medida es preciso realizar una dilución de la emulsión. Para ello se ha seguido un procedimiento descrito por Puppo (Puppo y col., 2005) que emplea como medio dispersante una disolución 0.05M de Tris-HCl a pH 8 con 1% de dodecil sulfato sódico (SDS). Se han utilizado 11,5 mL de disolución por cada 0,5 g de emulsión. La utilización de un tensioactivo aniónico como el SDS permite el desplazamiento de la proteína de la interfase por el tensioactivo generando repulsiones electrostáticas que favorecen la defloculación. Esta dispersión se añade a la unidad de preparación de muestra, que contiene aproximadamente 750 mL de agua destilada, operando siempre a temperatura ambiente. Cada una de las determinaciones fueron llevadas a cabo como mínimo dos veces.

D) Ensayos reológicos de emulsiones

A continuación se describirán tanto los dispositivos utilizados como los ensayos realizados y los protocolos de medida.

D.1 Dispositivos empleados

Los dispositivos empleados así como los sistemas sensores utilizados fueron los mismos que se utilizaron para las medidas reológicas de dispersiones. (Figura 2.2.2.1 y Figura 2.2.2.2).

D.2 Ensayos reológicos

- Ensayos viscoelásticos dinámicos

En primer lugar, se ha realizado un barrido de deformación (0,0625-300%) para determinar el intervalo viscoelástico lineal a una frecuencia de 1Hz. A continuación, se ha llevado a cabo un barrido de frecuencia (100-0,02 s⁻¹) a una deformación inferior a la deformación crítica que asegure la permanencia en el intervalo viscoelástico lineal.

- Rampas de Temperatura

Se han realizado rampas de temperatura a diferentes velocidades de calentamiento (1, 5, 8 y 10°C/min.) entre 20°C y una temperatura máxima que ha oscilado entre 65 y 90 °C, dentro del intervalo viscoelástico lineal. Así mismo se han efectuados rampas de temperatura incluyendo etapas de calentamiento, de temperatura constante y de enfriamiento (la velocidad de enfriamiento en todos los casos fue de 10°C/min), así como ensayos en los que se combinan varios ciclos de calentamiento/enfriamiento. Se han llevado a cabo también ensayos de barridos de deformación (0,0625-300% a 1Hz) a distintas temperaturas para comprobar la permanencia en el intervalo viscoelástico lineal.

D.3 Protocolo de medida

En todos los casos se han efectuado las medidas a 20°C manteniendo un tiempo de espera previo de 30 minutos fuera del frigorífico. Posteriormente las muestras termostalizadas fueron introducidas en el elemento de medida con la ayuda de una espátula y una vez alcanzada la posición de medida del sensor, se les dejó un tiempo de reposo de 10 minutos. Con todas las medidas se ha realizado el mismo protocolo de manera que asegure la misma historia termoreológica. Para evitar el secado de la muestra, se añade aceite de vaselina en las inmediaciones del sensor y se rodea con una cubierta diseñada específicamente para este fin.

Al menos dos replicados fueron llevados a cabo para cada determinación reológica.

E) Medidas de Microscopia Confocal

La microscopía Confocal permite la observación de secciones ópticas en muestras de cierto grosor a las que deja inalteradas. La microscopía confocal (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) permite la reconstrucción tridimensional de la muestra. Las emulsiones preparadas en Ultra-Turrax T50 se situaron sobre un porta adecuado y se procedió a su observación a través de un microscopio True Confocal Scanner (TCS) de la firma Leica Microsystems (Heidelberg, Alemania). Para enfocar la muestra se utilizó el objetivo más potente (X100) y un láser de Argón, con una longitud de onda de unos 488 nm para la excitación de ésta, registrando la emisión en el intervalo de 520 y 687 nm. No ha sido necesaria la utilización de ningún marcador fluorescente puesto que las proteínas estudiadas presentaban autofluorescencia, efecto común en algunas proteínas alimentarias (Bengoechea y col., 2006). De esta forma se distinguen zonas oscuras que corresponden a las gotas de aceite y una fase acuosa brillante donde se encuentran las proteínas.



Figura 2.2.4.2 Microscopio confocal True Confocal Scanner (TCS) de Leica Microsystems (Heidelberg, Alemania)

F) Tratamiento térmico

Para estudiar el efecto del calor sobre la estabilidad de las emulsiones, éstas fueron sometidas a distintos tratamientos térmicos.

En primer lugar las emulsiones preparadas se introducen en tubos de ensayo y se espera 24 horas. A continuación, se introducen los tubos en un baño a 65 °C controlando la velocidad de subida de temperatura mediante una sonda de temperatura (Crison TM

65) introducida en el centro de la emulsión, registrando así la variación de la temperatura con el tiempo. Al sacar las emulsiones del baño caliente se introducen posteriormente en el baño a 20 °C controlando de nuevo la temperatura. Una vez enfriada hasta 20°C se realizan medidas de barridos de deformación a 1 Hz, se introducen en el frigorífico para su conservación y seguimiento con el tiempo de almacenamiento (1, 30 y 60 días), tras los cuales se vuelven a repetir los barridos de deformación a 1 Hz.

2.2.5 Geles

A) Capacidad de retención de agua

Se cortan trozos de gel (0,3-1,3 g) y se equilibran estos trozos sobre membranas de dispositivo de acrílico (Nylon plain, 5,0 µm pores, Micronsep) colocadas en la posición intermedia de tubos de centrifuga. Se determina la pérdida de agua por diferencia de pesada antes y después de centrifugar a 120 x g durante 5 min. a 15°C sobre tubos de centrifugas (Quéguiner y col., 1989). La capacidad de retención de agua (WHC) se expresa como el porcentaje de agua que queda retenido en el gel respecto de la cantidad inicial de agua del gel. Se deben realizar al menos cuatro determinaciones por cada muestra.

B) Solubilidad de geles

Se toman muestras de geles de aislado de proteínas y se dispersan en una proporción de 1% p/v de proteína en agua o en diferentes disoluciones amortiguadoras:

- Disolución amortiguadora pH 2,0 (0,03 M fosfato).
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA)
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,5% SDS
- Disolución amortiguadora pH 8,0 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,5% SDS + 1 % β-Mercaptoetanol.
- Disolución amortiguadora pH 10,0 (0,1 M Borato sódico)

Las muestras se homogenizan con agitador magnético a temperatura ambiente durante 30 min y luego se centrifugan 15 min a 10.000 x g a 15 °C. La solubilidad (S)

de la proteína se determina analizando el contenido proteico de los sobrenadantes y se expresa como:

$$S = (P_s * 100) / P_e \quad (2.2.5.1)$$

donde P_s es la proteína del sobrenadante y P_e es la proteína del extracto.

Se llevaron a cabo cuatro extracciones independientes con cada disolvente, obteniéndose los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar. La concentración de proteína se determinó espectroscópicamente a 280 nm, en un espectrofotómetro Perkim-Elmer (Hitachi, USA), con un coeficiente de extinción $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 4,84. El valor del coeficiente de extinción se calculó mediante el siguiente procedimiento:

Se seca la proteína y se prepara una solución de 1 mg/ml en agua. Se mide la absorbancia (A) contra un blanco. Se determina la concentración proteica de dicho extracto por el método Kjeldahl. Usando la ecuación Lambert – Beer:

$$A = E_{280} b C \quad (2.2.5.2)$$

y conocidos la absorbancia (A) por espectrofotometría, el camino óptico ($b = 1\text{cm}$) y la concentración (C) por Kjeldahl se calcula E_{280} para cada uno de los extractos. Se calcula un coeficiente para cada extracto y el E calculado se utiliza para determinar la concentración de proteínas de los diferentes extractos a partir de medidas directas de absorbancia. Las determinaciones espectrofotométricas se realizan por cuadruplicado.

C) Electroforesis

Se aplica el mismo método descrito en el apartado 2.2.2 C), pero en este caso las muestras corresponden a los extractos procedentes de la solubilidad de los geles de aislado de cangrejo obtenidos (2.2.4. B).

D) Ensayos reológicos de geles

D.1 Dispositivos empleados

Los dispositivos empleados así como los sistemas sensores utilizados fueron los mismos que se utilizaron para las medidas reológicas de dispersiones (Figura 2.2.2.1 y Figura 2.2.2.2) y que fueron también utilizados para las medidas de emulsiones.

D.2 Ensayos reológicos

- Ensayos viscoelásticos dinámicos

Los ensayos viscoelásticos dinámicos llevados a cabo en geles son similares a los desarrollados con dispersiones de aislado (2.2.2.D) En primer lugar, se ha realizado un barrido de deformación (0,0625-300%) para determinar el intervalo viscoelástico lineal a una frecuencia de 1Hz. A continuación, se ha llevado a cabo un barrido de frecuencia (100-0,02 s⁻¹) a una deformación inferior a la deformación crítica que asegure la permanencia en el intervalo viscoelástico lineal.

- Rampas de Temperatura

Se han realizado rampas de temperatura para simular el proceso de gelificación en el propio el reómetro. Este proceso fue realizado de forma similar para todos los sistemas y consta de los siguientes pasos:

- El primer paso consiste en una rampa de temperatura realizada a velocidad de calentamiento constante (1,5 °C/min.) desde 20 a 90°C.
- Posteriormente se lleva a cabo un rápido descenso de la temperatura (10°C/min.) desde 90 a 20°C.
- Finalmente, se establece una etapa de equilibrado de 10 min. en el ciclo de temperatura.

Para asegurar el adecuado control de la deformación, se realizaron barridos de deformación (0,0625-300 %) en diferentes regiones, asegurando la permanencia de las muestras dentro del intervalo viscoelástico lineal durante todo el ciclo de temperatura.

D.3 Protocolo de medida

En todos los casos se han efectuado las medidas a 20°C manteniendo un tiempo de espera previo de 30 minutos fuera del frigorífico. Posteriormente, los geles termostatizados fueron cortados y colocados en el dispositivo de medida (el diámetro de los geles es igual al diámetro del sistema sensor). Una vez que el sensor alcanza la posición de medida, controlando la fuerza normal que se ejercen sobre los mismos, se les deja un tiempo de reposo de 10 minutos. Con todos los geles se ha seguido el mismo protocolo de manera que se asegura que tengan la misma historia termoreológica. Para evitar el secado de la muestra, se añade aceite de vaselina en las inmediaciones del sensor y se rodea con una cubierta diseñada específicamente para este fin.

Al menos dos replicados fueron llevados a cabo para cada determinación reológica.

E) Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se toman muestras de geles y se conservan durante 24 h en glutaraldehído al 2,5 %. Se les agrega rojo de rutenio 0,1 % en peso y KCl 0,025 mol/dm³. Se dejan 72 h. para llevar a cabo la fijación primaria. Se lavan varias veces con solución de KCl 0,025 mol/dm³. Se seccionan en trozos de 1 mm³ y se introducen en solución de OsO₄ 2% durante 2 h, periodo en el que tiene lugar la fijación secundaria. Se lavan con agua destilada durante 1 h (aquellas muestras que poseen un pH diferente al neutro, son lavadas con un buffer de su correspondiente pH) y se procede a una deshidratación creciente, en frío (4°C), con acetona 25, 50 y 70% y a temperatura ambiente con acetona 90% durante 10 min. Se hacen tres lavados de 30 min cada uno, con acetona 100%. Las muestras se someten luego a un secado por punto crítico en un equipo Polaron. Se montan sobre cinta doble faz en portamuestras de bronce. Seguidamente se evapora oro en un equipo de evaporación de metales en plasma de Argón. Las muestras se almacenan en desecador. La observación se realiza en un microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 (Holanda).

2.3 Estudio Estadístico

Al menos se han realizado dos replicados de cada ensayo considerando durante el estudio un nivel de significación de $p=0,05$. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de t Student y un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$).

IV. Análisis y Discusión de Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS PROTEICOS

1.1 Harina de cangrejo

El proceso de fabricación de la harina de cangrejo consiste básicamente en dos etapas: una primera etapa de trituración de la que se obtiene una pasta que es separada del exoesqueleto, seguida de una etapa de secado en tambor rotatorio a temperatura elevada (150-160°C).

Tanto el tiempo de residencia del producto en el tambor de secado como las condiciones térmicas a las que se ve sometida la harina durante dicho proceso, son factores determinantes de las propiedades de la harina por lo que se consideró de gran importancia, abordar una caracterización de la harina, que influye información sobre su composición, solubilidad en distintos disolventes y/o propiedades físico-químicas.

1.1.1 Granulometría

Se ha realizado una clasificación por tamaños mediante la utilización de una batería de tamices. La frecuencia acumulativa de tamaños se ajusta a una función tipo sigmoideal típica de un proceso de trituración o molienda con un máximo entre 250 y 300 μm . La frecuencia acumulativa pudo ajustarse a una ecuación sigmoideal, similar a la de Harris (Svarovsky, 2000), representada por la siguiente expresión:

$$fc = 1 - \frac{1}{1 + (d/d_{1/2})^p} \quad (1.1.1.1)$$

donde fc es la frecuencia acumulativa, d es el tamaño de las partículas en micras, $d_{1/2}$ es la mediana de la distribución, que corresponde a un valor de la frecuencia acumulativa de 0.5 y p es un parámetro de ajuste relacionado con la dispersión. Cuanto mayor sea p menor es la dispersión en el tamaño de la harina. Los valores de $d_{1/2}$ y p han sido respectivamente 285 μm y 2,3 (figura 1.1.1.1).

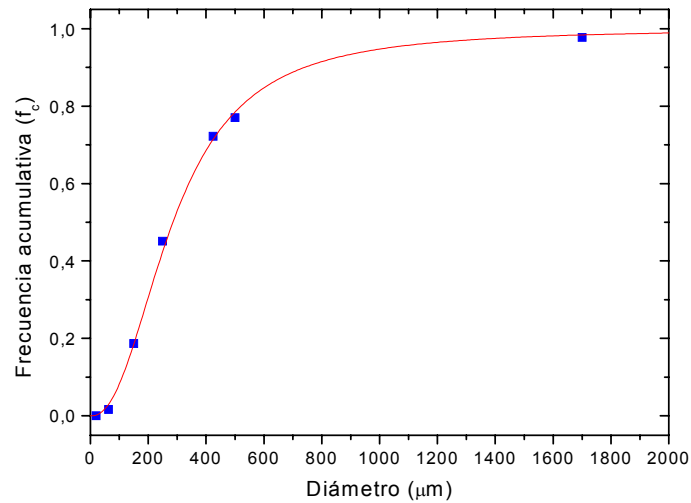


Figura 1.1.1.1. Variación de la frecuencia acumulativa con respecto al tamaño de partícula

1.1.2 Composición

Se realizó un análisis de la composición de las distintas fracciones de harina obtenidas a partir de la operación de tamizado. Se observó un ligero descenso del contenido lipídico, así como un pequeño aumento de humedad y de la presencia de hidratos de carbono en las muestras de mayor tamaño, siendo el contenido de cenizas ligeramente superior en la fracción de finos. Como consecuencia, existe una tendencia a obtener un máximo en el contenido proteico en las fracciones intermedias aunque esta variación carece de significación estadística.

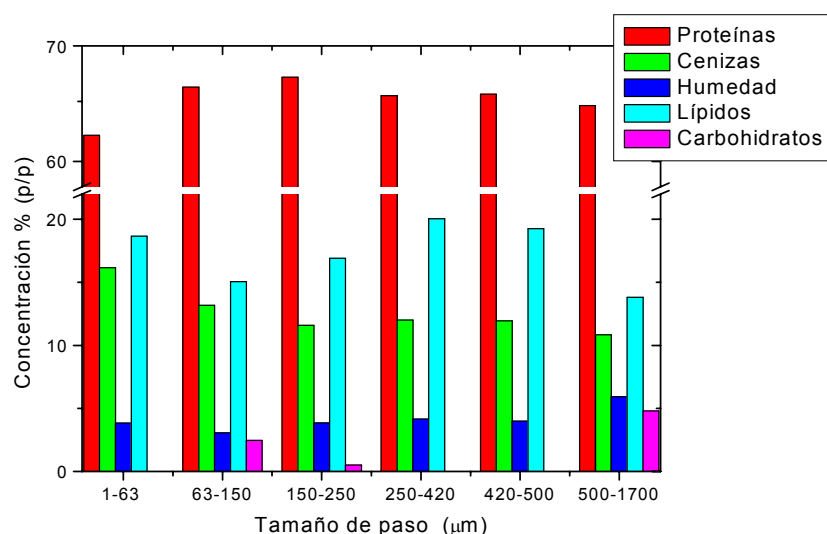


Figura 1.1.2.1. Composición de la harina en función del tamaño de paso por la batería de tamices.

A partir de estos resultados se decidió utilizar la harina de cangrejo tamizada utilizando un tamiz único de 600 µm, cuyo rechazo era inferior al 15% en peso. La composición media para esta harina, que se utilizó tanto para la preparación de las emulsiones como para la preparación del aislado, es la siguiente:

Tabla 1.1.2.1. Composición de la harina utilizada (en %(p/p))

Proteína (Nx6, 25)	64,15 %
Cenizas	13,43 %
Humedad	3,56 %
Lípidos	18,86 %
Hidratos de carbono (por diferencia)	< 0,01 %

Debe remarcar el elevado contenido de proteínas de la harina, lo que hizo plantear la posibilidad de ser muy útil para posibles aplicaciones alimentarias.

1.1.3 Solubilidad de las proteínas

Se ha estudiado la solubilidad de la harina en agua en función del pH y del tipo de disolvente. Los disolventes empleados han sido disoluciones de dodecil sulfato sódico (SDS) (1% (p/p)) y β-mercaptoetanol (1% (p/p)). Para ello, se utilizó una modificación del método de Lowry para el análisis del contenido proteico (Peterson, 1979; Faranahky,

2003). Como se puede observar en la figura 1.1.3.1, el estudio de solubilidad indica que un 25% de la proteína de cangrejo es soluble a pH nativo (6-7), proporción que como era de esperar aumenta a pH alcalino. Sin embargo los valores ácidos de pH producen una menor solubilidad lo cual sugiere una mayor proximidad al punto isoeléctrico.

Por tanto, el pH ejerce una influencia destacable sobre la solubilidad de la proteína. De esta forma, a pH alcalino, en el que el sistema se encuentra suficientemente alejado del punto isoeléctrico, la solubilidad aumenta considerablemente gracias a la contribución de las interacciones electrostáticas. Sin embargo, en este caso, el efecto del aumento del pH sobre el aumento de la solubilidad es menor de lo esperado, probablemente debido a la presencia de sales que actuarían apantallando las interacciones electrostáticas. Este hecho habrá que tenerlo en cuenta a la hora de realizar el proceso de fabricación de emulsiones.

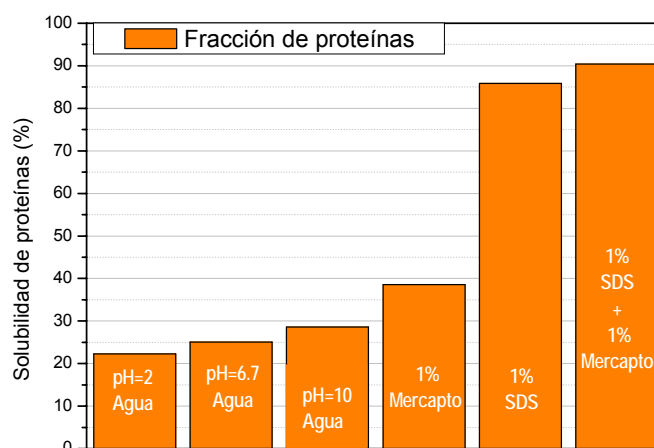


Figura 1.1.3.1. Solubilidad de las proteínas a distintos pH y en distintos disolventes.

La presencia de SDS en disolución hace que la superficie de las moléculas de proteína se encuentre cargada negativamente, favoreciendo las fuerzas repulsivas entre las moléculas que contrarrestan las interacciones atractivas débiles tales como los puentes de hidrógeno y cualquier tipo de interacción de carácter hidrofóbico. Como resultado, se produce un aumento de solubilidad que en este caso es notable ya que se alcanza un valor del 85%. El β -mercaptoetanol en cambio es un agente reductor que se usa para romper enlaces covalentes del tipo puentes disulfuro. El efecto de este agente no es tan

importante en la harina estudiada, ya que la solubilidad de las proteínas no alcanzan el 40%. La combinación de ambos agentes SDS y β -mercaptoetanol eleva la solubilidad hasta valores ligeramente superiores al 90%. Como se puede apreciar el efecto del SDS sobre la solubilidad de la proteína es claramente superior como consecuencia de la rotura de entrelazamientos de agregados y flóculos de proteínas. Estos resultados confirman la importancia de la presencia de interacciones hidrofóbicas en la formación de agregados insolubles presentes en la harina de cangrejo. Esto lleva a pensar que una cizalla importante podría aumentar la solubilidad por rotura de estos entrelazamientos. A su vez, se concluye que solo una pequeña cantidad de enlaces covalentes, tales como puentes disulfuro, se rompen cuando se usa un agente reductor.

También se analizó la solubilidad en los distintos disolventes de muestras sometidas a un tratamiento térmico consistente en una rampa de temperatura a 3°C/min hasta 100 y 160°C (figura 1.1.3.2). En todos los casos se produjo una reducción significativa de la solubilidad con el procesado térmico. Este resultado indica la formación de entrecruzamientos entre las moléculas de proteína a temperatura elevada, lo cual sugiere un cierto potencial para ciertas aplicaciones como la extrusión de la harina estudiada.

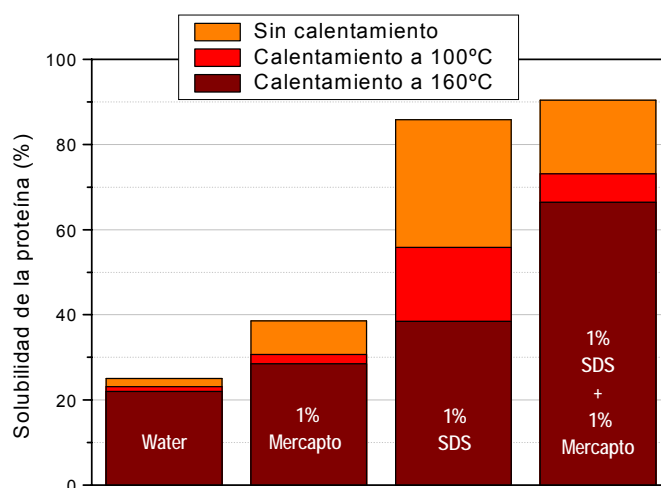


Figura 1.1.3.2. Solubilidad de las proteínas a diferentes tratamientos de temperatura.

Se observa claramente que un calentamiento provoca una disminución de la solubilidad en todos los casos. Sin embargo, parece que el efecto de la disminución de la

solubilidad de las proteínas procesadas térmicamente es más importante al emplear SDS que cuando se usa el β -mercaptoetanol. Este efecto debe ser consecuencia de una disminución en la rotura de los entrelazamientos, puesto que se produce una disminución bastante importante de la solubilidad en disolución del 1% (p/p) de SDS para muestras tratadas térmicamente. Esta disminución puede ser debida a la aparición de agregación entre las proteínas, probablemente por interacciones covalentes fuertes como puentes de disulfuro, en la etapa de calentamiento que únicamente son anuladas con la adición del β -mercaptoetanol.

1.1.4 Punto Isoeléctrico

En la figura 1.1.4.1 se presentan los resultados obtenidos mediante el detector de carga superficial en un campo de alta cizalla.

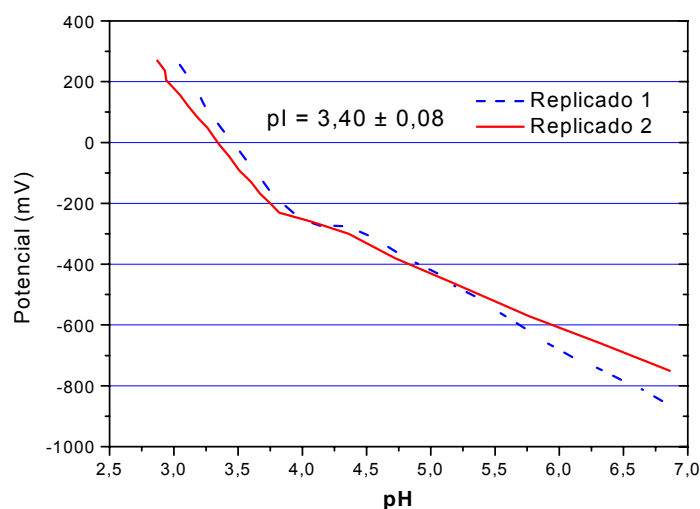


Figura 1.1.4.1. Variación de la carga superficial con el pH.

Este potencial eléctrico va aumentando desde valores negativos, a pH casi neutro, hasta valores positivos, a pH suficientemente bajo, similar a los resultados con potencial zeta obtenidos por Petursson y col. 2004 con proteínas de bacalao. Así, un valor nulo de potencial indica la ausencia de iones contrarios en la superficie de las partículas debido a que todas las cargas existentes en la muestra están neutralizadas. Esta situación

corresponde al punto isoeléctrico, que para la proteína de cangrejo se alcanza a un valor de pH de $3,40 \pm 0,08$.

1.1.5 Densidad de las dispersiones acuosas

En este apartado se expone la variación de la densidad de dispersiones de harina en agua a pH nativo, con la temperatura y la concentración. Para cada concentración se ha medido la densidad en el intervalo de temperaturas que se alcanza durante la emulsificación. Todos los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1.1.5. Valores de la densidad (kg/m^3) para sistemas de diferentes concentraciones a distintas temperaturas.

	2 % (p/p)	5 % (p/p)	10 % (p/p)	15% (p/p)	20% (p/p)	25% (p/p)
20°C	1001,1	1005,9	1022,5	1029,3	1045,9	1056,0
30°C	997,3	1004,2	1019,8	1026,3	1044,5	1054,1
40°C	993,5	1002,4	1016,9	1024,6	1043,3	1052,9
45°C				1022,5		
50°C					1041,6	1051,7

Existe un apreciable aumento de la densidad a medida que aumenta la concentración de harina y un ligero descenso con el aumento de temperatura.

1.1.6 Viscosidad de las dispersiones acuosas

A) Variación de la viscosidad con la concentración

Se ha estudiado la variación de la viscosidad de la fase continua en función de la concentración de harina y a un valor de pH igual a 11,5. Los resultados se exponen en la figura 1.1.6.1, apareciendo claramente un aumento de la viscosidad aparente a medida que aumenta la concentración de fase continua en todo el intervalo de velocidades de cizalla estudiado.

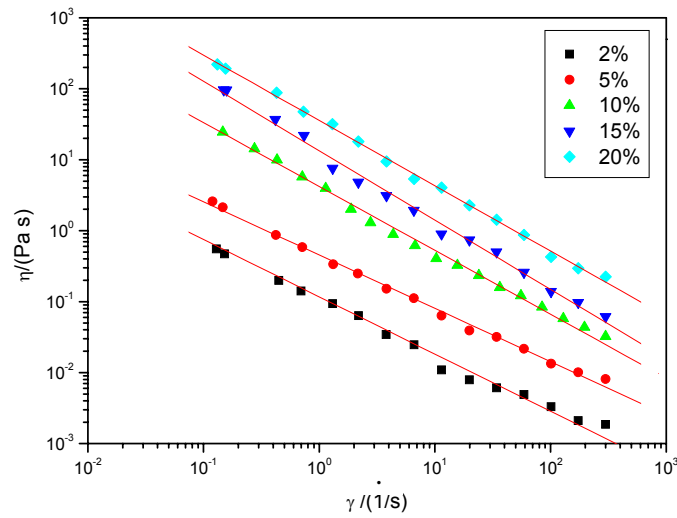


Figura 1.1.6.1. Curvas de flujo para sistemas a diferente concentración (% (p/p)) de harina.

Se ha realizado un ajuste de los valores de viscosidad aparente, η , en función de la velocidad de cizalla $\dot{\gamma}$, al modelo de Ostwald-De Waele:

$$\eta = \eta_1 \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (1.1.6.1)$$

donde η_1 es la viscosidad aparente estimada por la regresión a 1 s^{-1} y n es el índice de flujo, relacionado con la pendiente de caída de viscosidad ($n-1$).

En la figura 1.1.6.2 se representan los valores de los parámetros del modelo potencial en función de la concentración de harina de cangrejo.

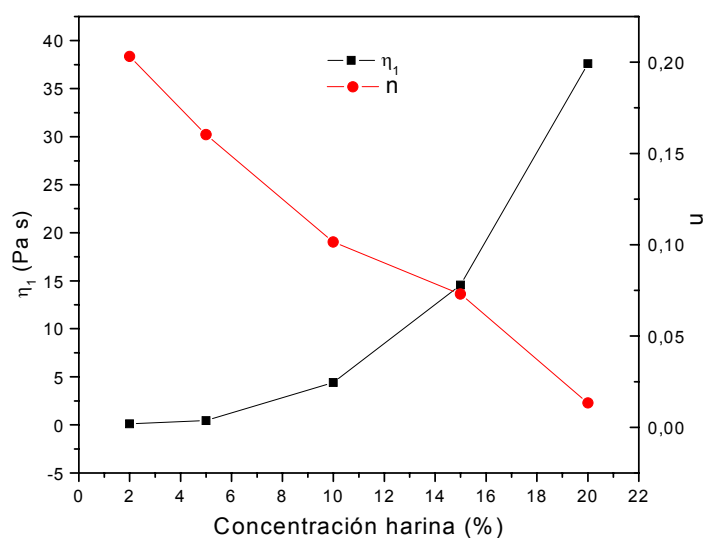


Figura 1.1.6.2. Evolución del índice de flujo y la viscosidad a una velocidad de cizalla de $1s^{-1}$ en función de la concentración de harina.

Al aumentar la concentración se produce un claro descenso del índice de flujo aumentando, por tanto, las características pseudoplásticas y además se produce el aumento de viscosidad aparente mencionado anteriormente. Se obtienen, por tanto, dispersiones cada vez más viscosas pero más sensibles a la cizalla.

B) Variación de la viscosidad con la temperatura

En la figura 1.1.6.3 se representa la variación de la viscosidad con la velocidad de cizalla a distintas temperaturas. Se ha elegido la fase continua de 20 % (p/p) porque es la que corresponde al 5 % (p/p) de harina en la emulsión considerada como referencia.

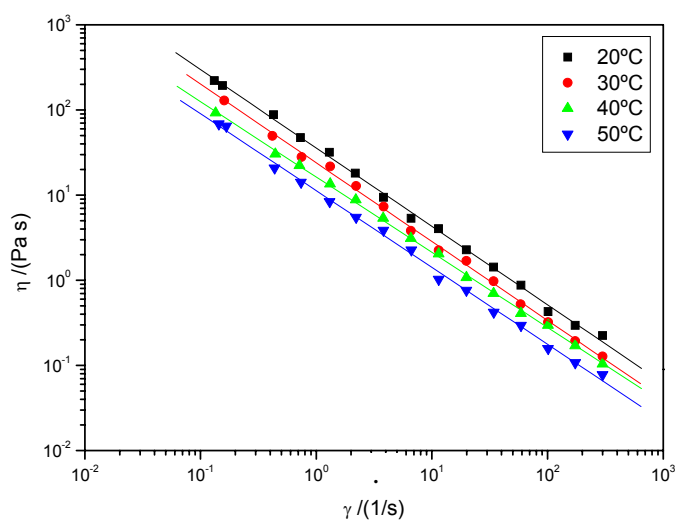


Figura 1.1.6.3. Curvas de flujo para el sistema de 20% (p/p) de harina a diferentes temperaturas.

Como ocurría con la viscosidad del aceite se produce un aumento de la viscosidad a medida que disminuye la temperatura. De nuevo se realiza un ajuste al modelo potencial de Ostwald-De Waele y en la figura 1.1.6.4 se exponen los valores de n y η_1 , observando en este caso una dependencia muy importante con la velocidad de cizalla.

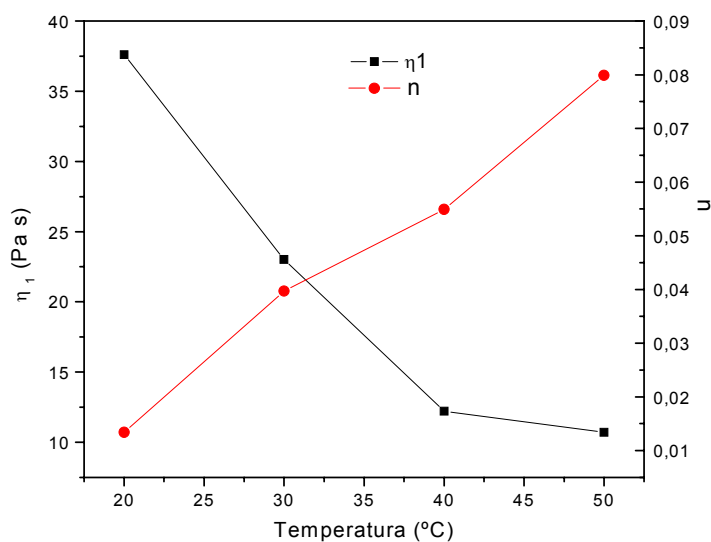


Figura 1.1.6.4. Evolución del índice de flujo y de la viscosidad a una velocidad de cizalla de 1s^{-1} en función de la temperatura para una concentración del 20%(p/p).

La variación de la viscosidad a 1 s^{-1} con la temperatura sigue una dependencia tipo Arrhenius, que es muy frecuente en dispersiones:

$$\eta_1 = A \exp(-B/T) \quad (1.1.6.2)$$

donde A es el coeficiente preexponencial con un valor de $2,27 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y el parámetro B es la pendiente y alcanza un valor de 4184 K.

1.2 Aislado de cangrejo

El aislado de cangrejo procede de la harina de cangrejo tamizada a $600 \mu\text{m}$ con un operación inicial de desengrasado con hexano seguido por un proceso de solubilización alcalina y precipitación isoelectrica, tal como se expuso en la parte de desarrollo experimental (apartado 2.1.2).

Con el objeto de evaluar las características de este aislado y para considerar su utilidad en la fabricación de geles se consideró de especial importancia estudiar algunas características del mismo como su composición, solubilidad en distintos disolventes, punto isoelectrico y propiedades reológicas de sus dispersiones acuosas.

1.2.1 Composición

Se realizó un análisis de la composición del aislado obtenido a partir de muestras procedentes de diferentes lotes. Los resultados de la composición media del aislado, junto con los resultados obtenidos para la harina de cangrejo se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 1.2.1.1. Composición del aislado de cangrejo comparada con la de la harina de la que procede (% (p/p)).

	Aislado	Harina
Proteína (Nx6,25) (%)	$90,61 \pm 2,14$	$64,15 \pm 1,68$
Cenizas (%)	$3,98 \pm 0,24$	$13,43 \pm 0,75$
Humedad (%)	$4,45 \pm 0,69$	$3,56 \pm 0,34$
Lípidos (%)	$0,96 \pm 0,08$	$18,86 \pm 0,80$
Hidratos de carbono (por diferencia) (%)	$< 0,01$	$< 0,01$

El método de preparación utilizado produce un incremento de casi un 50% de proteínas llegando a tener un producto considerado como aislado con una concentración

de proteínas muy elevada (superior al 90%). Este producto se consideró adecuado para el estudio de las proteínas procedentes del cangrejo así como para la fabricación de geles.

1.2.2 Solubilidad y punto isoeléctrico

Se ha estudiado la solubilidad del aislado en agua en función del pH y del tipo de disolvente. A partir de los datos de solubilidad en función del pH se determina el punto isoeléctrico de la proteína. La figura 1.2.2.1 muestra la curva de solubilidad tanto para la harina de cangrejo como para el aislado de cangrejo en función del pH.

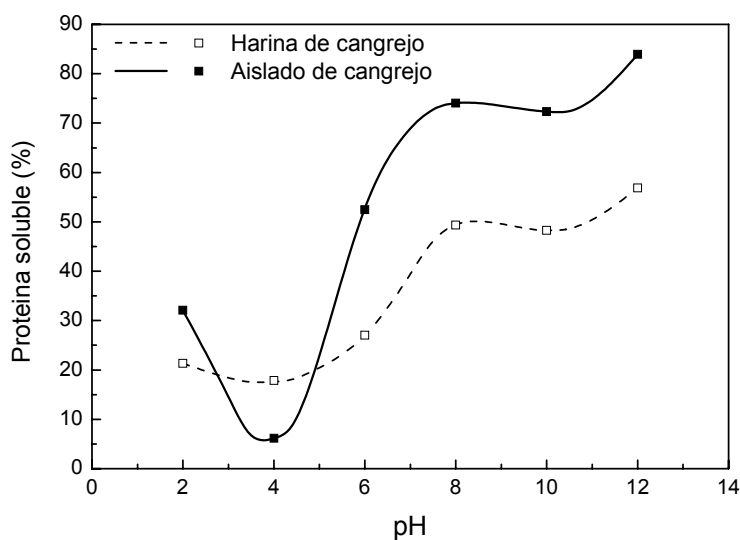


Figura 1.2.2.1. Curva de solubilidad para la harina de cangrejo y aislado de cangrejo en función del pH.

Ambos sistemas proteicos presentan un comportamiento típico entre pH 2 y pH 8, mostrando una curva de solubilidad con forma de U cuyo mínimo corresponde al punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico se obtiene a pH cercano a 3,5. Dicho valor es consistente con el valor de 3,4 obtenido para la harina de cangrejo obtenido en un detector de carga superficial (apartado IV 1.1.4). El mínimo es más pronunciado en el caso del aislado de harina de cangrejo porque la mayoría de la proteína soluble se pierde durante el proceso de preparación. Ambas curvas de solubilidad muestran también un segundo mínimo a pH cercano a 10, seguido de un incremento con el pH. Este hecho se puede relacionar con la presencia de un punto isoeléctrico correspondiente a los

segmentos lineales de la miosina en torno a 10,5 (Choi y Park, 2002; Lin y Park, 1998). Estos resultados sugieren que los segmentos lineales (“rod segments”) de las proteínas miofibrilares tienden a agregarse en esas condiciones y juegan un papel importante en la solubilidad de la proteína a pH alcalino.

Por otro lado, se estudió la solubilidad del aislado de proteína en diferentes disolventes, obteniendo los datos que se reflejan en la tabla 1.2.2.1:

Tabla 1.2.2.1. Solubilidad del aislado de cangrejo en diferentes disolventes (en % (p/p)).

Disolución pH 2 HCl	Agua	Buffer pH 8	Buffer pH 8 SDS	Buffer pH 8 + SDS + β - Mercaptoetanol	Buffer pH 10
30,4 \pm 5,3	9,5 \pm 1,2	79,3 \pm 5,3	91,3 \pm 4,8	98,1 \pm 2,1	76,4 \pm 6,0

Se observa que la solubilidad más pequeña se obtiene con agua donde no se altera el pH de forma significativa y la proteína es poco soluble ya que se encuentra en el punto isoeléctrico. A medida que nos alejamos del punto isoeléctrico (pH 2 y pH 8) aparecen mayores valores de solubilidad de proteínas. La utilización de buffer a pH 8 con SDS permite incrementar significativamente la solubilidad de las proteínas gracias a la rotura de enlaces no covalentes. El hecho de usar SDS más β -Mercaptoetanol no produce un incremento muy importante con respecto a utilizar sólo SDS. Esto vuelve a remarcar la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la formación de agregados insolubles y la pequeña participación de los enlaces covalentes. Estos resultados son similares a los obtenidos con la harina (apartado IV 1.1.3). Por otro lado, se observa de nuevo valores más bajos de la solubilidad con la disolución amortiguadora a pH 10 al igual que obtuvimos en el caso de la curva de solubilidad (Figura 1.2.2.1).

1.2.3 Electroforesis

En este apartado se estudia la electroforesis del aislado de cangrejo para conocer que proteínas forman parte de dicho aislado. En las siguientes figuras se exponen los resultados de las electroforesis de los extractos solubles del aislado utilizando diferentes disoluciones tampones.

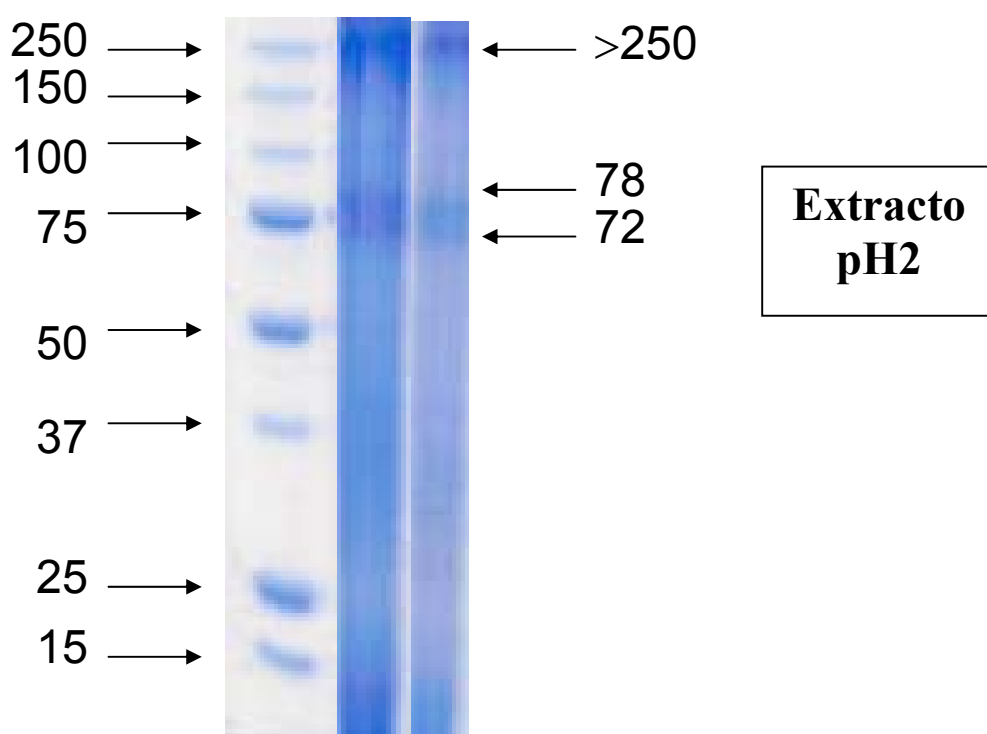


Figura 1.2.3.1. Electroforesis del extracto soluble de aislado de harina de cangrejo extraído con disolución amortiguadora pH2 de 0,03M de fosfato.

En estas proteínas se observan agregados de peso molecular mayor de 250 kD, además de distinguirse dos bandas a 78 y 72 kD. No se llega a observar ninguna especie de bajo peso molecular, por lo que puede concluirse que las proteínas se encuentran agregadas.

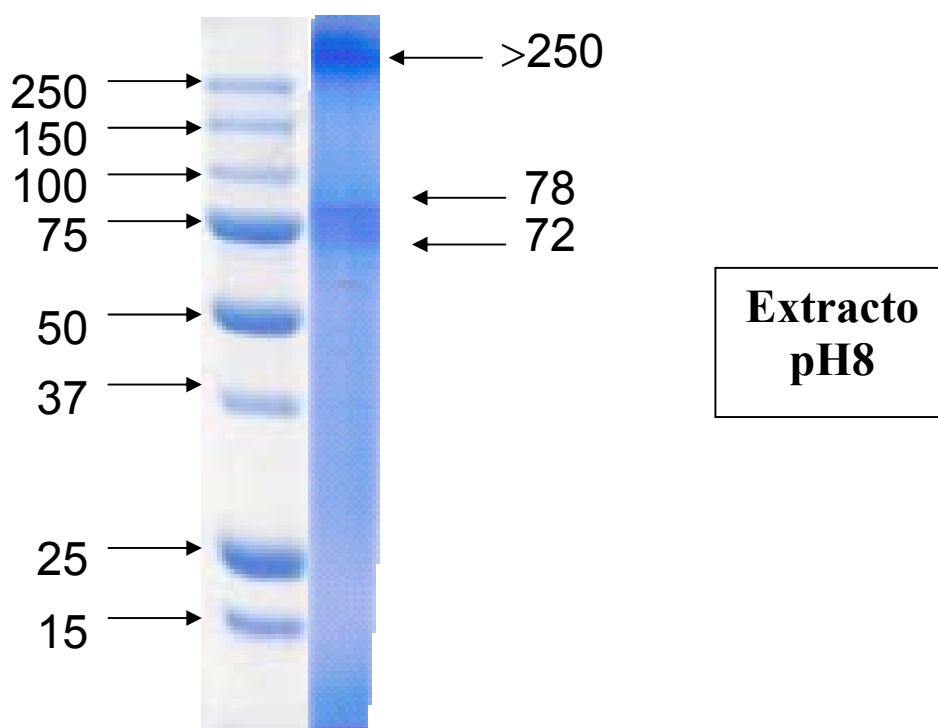


Figura 1.2.3.2. Electroforesis del extracto soluble de aislado de harina de cangrejo extraído con disolución amortiguadora pH8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA)

En este caso, parece que existen proteínas formando agregados de alto peso molecular junto con las correspondientes bandas de 78 y 72 kD. Es un resultado similar al que se producía a pH2 pero con más intensidad, probablemente porque la solubilidad del aislado a pH 8 es superior que a pH2 (figura 1.2.2.1).

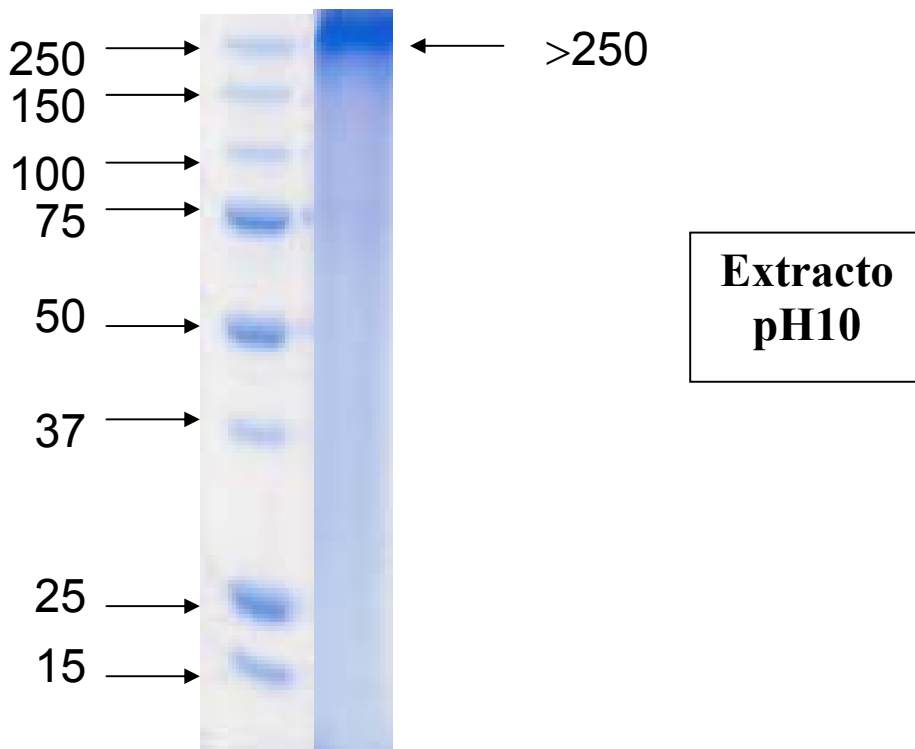


Figura 1.2.3.3. Electroforesis del extracto soluble de aislado de harina de cangrejo extraído con disolución amortiguadora pH10 de 0,1M de borato sódico.

En la figura 1.2.3.3 sólo se ven los agregados lo cual puede estar relacionado con la reducción de la solubilidad a ese pH que se observa en la figura 1.2.2.1, relacionada a su vez con el punto isoeléctrico de los segmentos lineales de las proteínas miofibrilares que generan una tendencia a la agregación de estas proteínas.

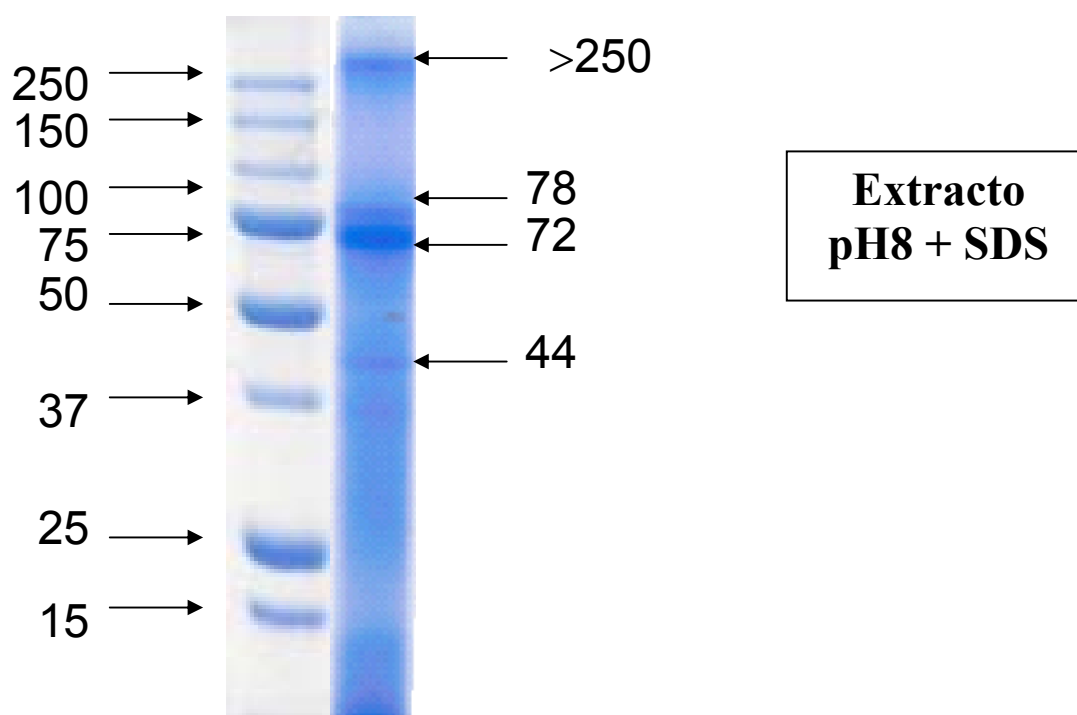


Figura 1.2.3.4. Electroforesis del extracto soluble de aislado de harina de cangrejo extraído con disolución amortiguadora pH8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS

En este caso aparecen las mismas bandas que con el extracto a pH8 pero las bandas de 78 y 72 kDa aparecen mucho más intensas. También aparece la banda anteriormente mencionada a elevado peso molecular, pero con mucha más intensidad y además surge una nueva banda a un peso molecular de 44 kD que puede relacionarse con la banda correspondiente a la actina.

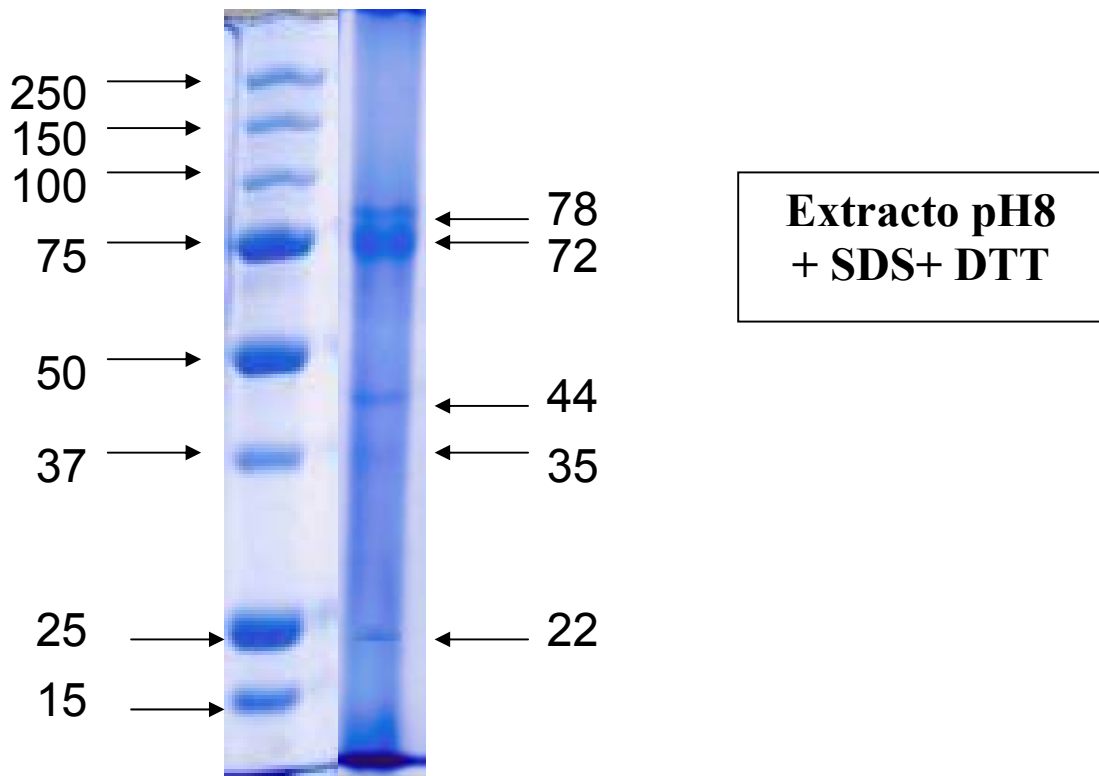


Figura 1.2.3.5. Electroforesis del extracto soluble de aislado de harina de cangrejo extraído con disolución amortiguadora pH8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS + 1,00% β-Me

En esta ocasión, los agregados de alto peso molecular restantes se disocian con el β-Me, observándose claramente el aumento de las bandas de 78 y 72 kD y en menor proporción de las de 44, 35 y 22 kD, correspondientes ya a especies monoméricas.

1.2.4 Reología de dispersiones

En este apartado se presentan las propiedades viscoelásticas dinámicas de las dispersiones de aislado de cangrejo que son la base para la preparación de los geles de proteínas. Este estudio permitirá comparar el comportamiento de estas dispersiones con los resultados obtenidos tras la aplicación de tratamientos térmicos a dichas dispersiones. Así, se analiza el comportamiento de las dispersiones en función de dos variables: la concentración y el pH.

A) Influencia de la concentración de proteínas de aislado

Para el estudio de la influencia de la concentración se fijó un valor de pH igual a 6 y se estudiaron diferentes valores de concentraciones de proteínas (6, 8, 10, 12 y 15 % (p/p)). Previamente a la realización de ensayos viscoelásticos dinámicos, se efectuaron barridos de deformación con el objeto de determinar el intervalo viscoelástico lineal de los sistemas (figura 1.2.4.1). A continuación se determinaron los valores de deformación crítica (γ_c) que marcan el final de dicho intervalo. La deformación crítica se ha determinado representando la deformación frente al esfuerzo y realizando una regresión lineal. El valor de la deformación a partir del cual hay una desviación mayor del 5% con respecto al ajuste lineal se toma como valor de deformación crítica (apartado IV.3.2.1).

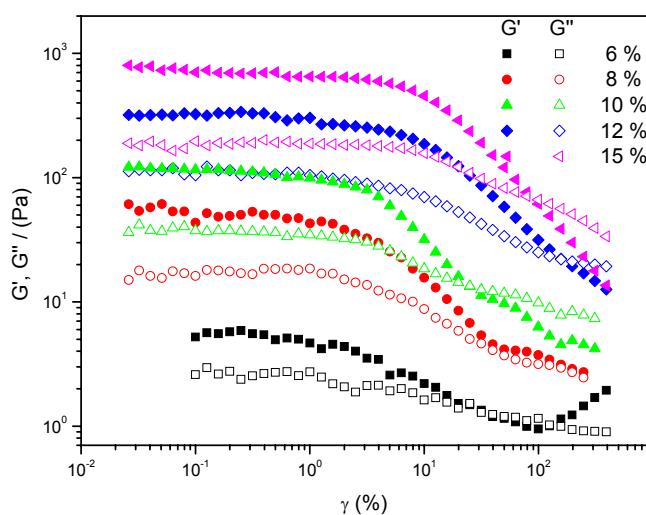


Figura 1.2.4.1. Barridos de deformación para dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo a pH 6 y diferentes concentraciones de proteínas (6, 8, 10, 12 y 15% (p/p)).

En la tabla 1.2.4.1 se presentan los valores de deformación crítica obtenidos:

Tabla 1.2.4.1. Evolución de la deformación crítica de las dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo a pH 6 y diferentes concentraciones de proteínas (6, 8, 10, 12 y 15% (p/p))

Concentración de proteína (% (p/p))	γ_c (%)
6	1,12 ± 0,34
8	1,42 ± 0,26
10	3,55 ± 0,57
12	4,25 ± 0,49
15	5,01 ± 0,53

Se observa un incremento en la deformación crítica a medida que se aumenta la concentración de proteínas. A continuación, se realizaron barridos de frecuencia a deformaciones inferiores a la crítica, presentándose los resultados en la figura 1.2.4.2.

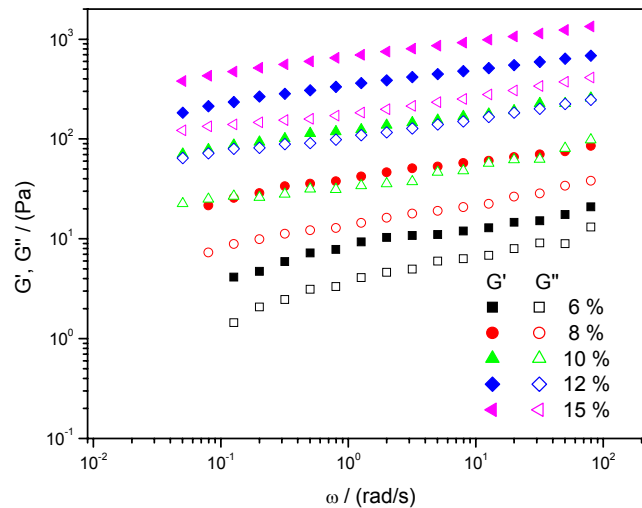


Figura 1.2.4.2. Barridos de frecuencia para dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo a pH 6 y diferentes concentraciones de proteínas (6, 8, 10, 12 y 15% (p/p)).

En primer lugar debe destacarse la permanencia de G' por encima de G'' en todo el intervalo de frecuencias. Esto elimina la posibilidad de observar transiciones sol-gel durante el proceso de gelificación como el punto de cruce de ambos módulos viscoelásticos (Pilosof, 2000). Este hecho puede ser debido al proceso de secado de harina en tambor rotatorio utilizado en la producción de la harina de cangrejo, que produce una importante desnaturalización y agregación de las proteínas del concentrado.

Se observa un importante incremento de los módulos viscoelásticos lineales, que llega a ser incluso de dos órdenes de magnitud, cuando la concentración de proteínas de aislado pasa del 6 al 15% (p/p). Sin embargo, todas estas dispersiones muestran una similar respuesta viscoelástica que corresponde a un comportamiento de gel débil, donde G' es en todos los casos superior a G'' , mostrando una evolución casi paralela en todo el intervalo de frecuencia. Además, la pendiente funciones viscoelásticas con la frecuencia es muy baja. Se observa también cierto incremento en el carácter predominantemente

elástico de las dispersiones a medida que se produce un incremento en la concentración de aislado de proteínas.

B) Influencia del pH

En la figura 1.2.4.3 y en la tabla 1.2.4.2 se muestran de nuevo los barridos de deformación y los valores de las deformaciones críticas, respectivamente, para dispersiones con un 10% en peso de proteínas de aislado de cangrejo en función del pH.

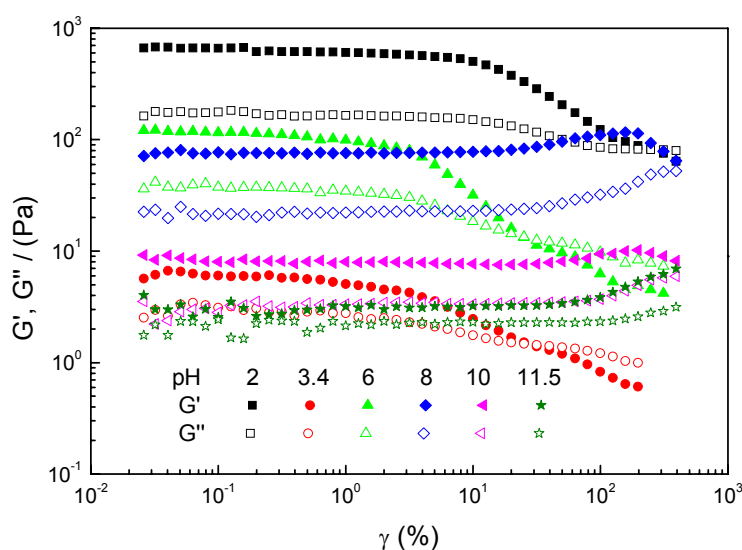


Figura 1.2.4.3. Barridos de deformación para dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo (10% (p/p)) en función del pH (2, 3.4, 6, 8, 10 y 11.5)

De nuevo se muestran los valores de la deformación crítica para cada uno de los sistemas estudiados:

Tabla 1.2.4.2. Evolución de la deformación crítica de las dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo (10% (p/p)) en función del pH (2, 3.4, 6, 8, 10 y 11.5)

pH	γ_c (%)
2	$7,94 \pm 2,45$
3,4	$3,16 \pm 0,83$
6	$3,55 \pm 0,57$
8	$50,07 \pm 4,56$
10	$53,76 \pm 3,24$
11,5	$56,17 \pm 4,15$

Como puede observarse en la tabla, se obtienen valores mínimos de deformación crítica en las cercanías del pI y mayores a valores de pH alcalinos.

Una vez elegidos las deformaciones dentro de intervalo viscoelástico lineal, se llevan a cabo los barridos de frecuencia (figura 1.2.4.4).

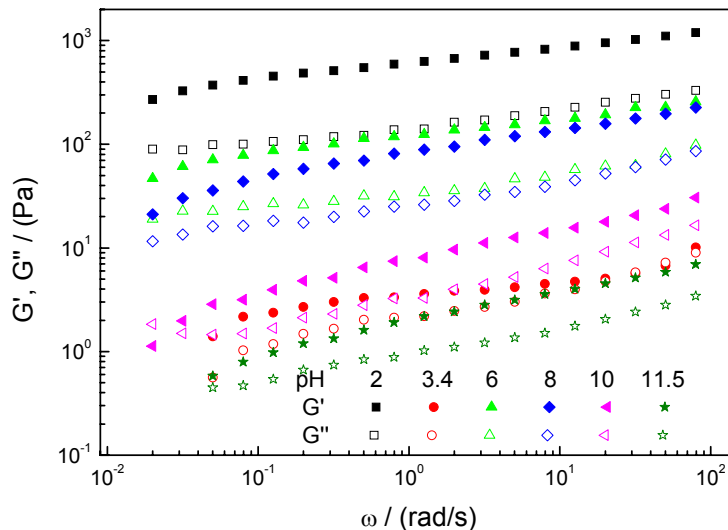


Figura 1.2.4.4. Barridos de frecuencia para dispersiones de proteínas de aislado de cangrejo a 10%(p/p) de concentración y diferentes valores de pH (2, 3.4, 6, 8, 10 y 11.5)

Se observa como los mayores valores de G' y G'' y la menor dependencia con la frecuencia corresponde a las dispersiones preparadas a pH 2, en las cuales la superficie proteica se encuentra cargada positivamente. Sin embargo, el comportamiento es análogo al de los sistemas estudiados a diferentes concentraciones (Figura 1.2.4.2). Un importante cambio en el comportamiento se produce en el punto isoeléctrico, quizás como consecuencia de la ausencia de interacciones electrostáticas, ya que la carga superficial de las moléculas de proteínas es cero. En estas condiciones se produce una agregación de proteínas como se puede observar en la curva de solubilidad (Figura 1.2.2.1). Como consecuencia de todo esto, se produce un pronunciado descenso en G' y G'' , dando lugar a una microestructura muy débil. De hecho, el sistema no es completamente estable a pH 3,4, produciéndose separación de fases para valores de tiempo más prolongados.

Un incremento en el pH por encima del punto isoeléctrico genera cargas negativas en las superficies de las moléculas. De esta manera, los sistemas recuperan el comportamiento de gel viscoelástico débil, presentando de nuevo un importante nivel de estabilidad frente a la separación de fases. Un mayor incremento en el pH provoca un continuo descenso en G' y G'' , así como una reducción del carácter gel de las dispersiones. Se alcanzan valores más altos de tangente de pérdidas y hay una tendencia hacia un punto de cruce entre G' y G'' a valores bajos de frecuencia. Dicho comportamiento puede estar relacionado con la disminución de la solubilidad mencionada anteriormente, que se produce a valores de pH superiores a 8, debido a la probable agregación de los segmentos lineales (“rod segments”) de las proteínas miofibrilares.

1.3 Caracterización interfacial

1.3.1 Caracterización aceite-agua

El objetivo en este apartado fue la evaluación de las propiedades interfaciales para el estudio de la adsorción de la proteína de cangrejo en función de la concentración, obteniéndose el valor de la concentración de saturación.

En la figura 1.3.1.1 se muestra la cinética de adsorción de la harina de cangrejo a pH 2 y 8 tanto en coordenadas lineales como semilogarítmicas, pudiéndose observar una disminución de la tensión interfacial a lo largo del tiempo hasta llegar a una zona de valores constantes de ésta.

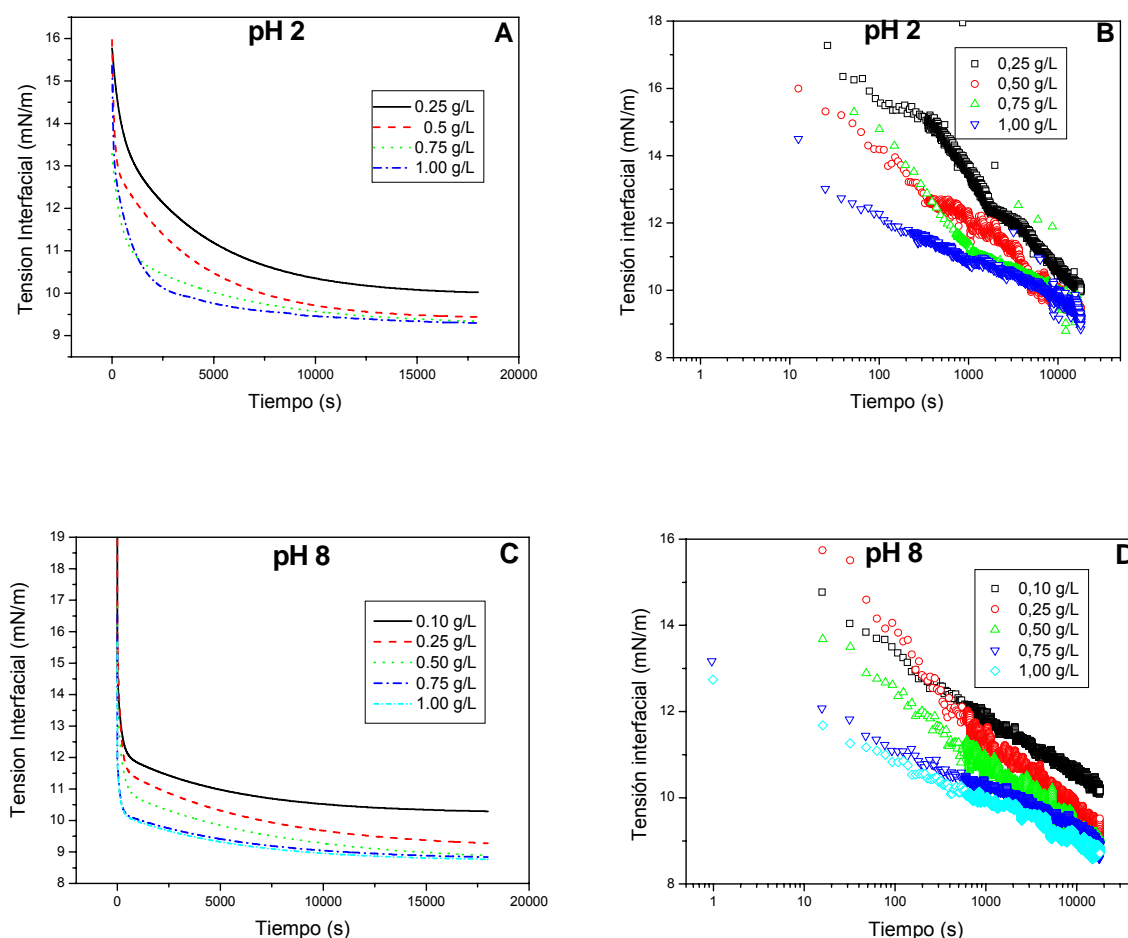


Figura 1.3.1.1. Cinética de adsorción de proteínas de cangrejo a pH 2 y 8 en la interfase aceite-agua en función de la concentración de proteínas (0,1-1,0 g/L). (A) y (B) Cinéticas lineal y semilogarítmica, respectivamente, a pH 2; (C) y (D) Cinéticas lineal y semilogarítmica, respectivamente, a pH 8.

Atendiendo a las figuras anteriores, se puede observar una evolución parecida para todas las concentraciones estudiadas, no existiendo un periodo de inducción en ninguno de los casos y siendo el descenso de la tensión más rápido para el caso de las concentraciones más altas de proteínas. De esta forma, parece que la difusión de las proteínas en la interfase se produce de una manera instantánea. Se observa que tras el periodo estudiado se llega a una situación prácticamente estable (en el que se mantiene constante el valor de la tensión), con lo que se puede concluir que ya se ha producido completamente la formación de la interfase. Tras la zona de alta pendiente de disminución de la tensión, se puede observar otra menos acusada en la que tienen lugar cambios conformacionales, así como la formación de multicapas. Puede considerarse que

el equilibrio se considera que se obtiene a partir de unas 5 horas aproximadamente (18000 segundos).

En la figura 1.3.1.2 se presenta el cálculo de la concentración de saturación, representando la tensión de equilibrio en función de la concentración de proteínas de cangrejo.

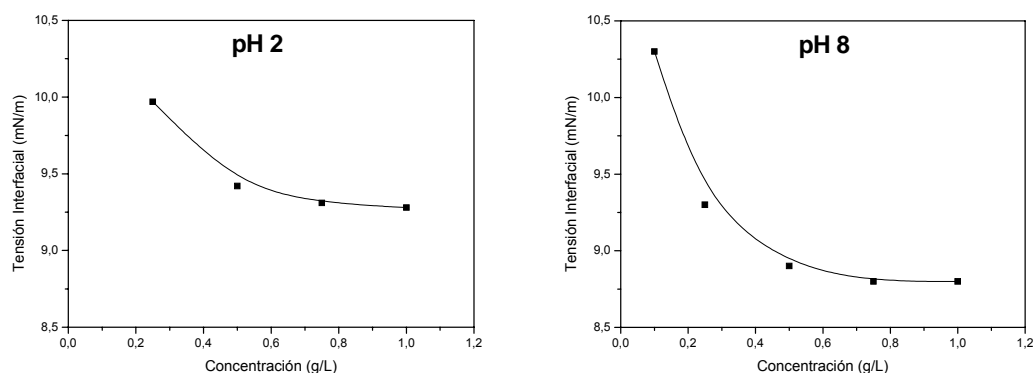


Figura 1.3.1.3 Tensión interfacial en función de la concentración en la interfase de aceite-agua para la proteína de cangrejo a pH 2 y 8.

Puede observarse como en ambos casos se alcanza la concentración de equilibrio a partir de una concentración de 1g/L. Sin embargo existen diferencias importantes en cuanto a la tensión de equilibrio. En el caso de la disolución a pH 2 la tensión de equilibrio es 9,28 mN/m mientras que a pH 8 es de 8,80 mN/m. Con esto se concluye que atendiendo a la tensión, la proteína de cangrejo es más eficiente a pH 8 puesto que presenta menor tensión interfacial que para un valor de 2.

Los valores obtenidos de la tensión son relativamente bajos con lo que el film es estabilizado rápidamente aunque para ello es necesaria una concentración relativamente alta de proteínas para ello.

1.3.2 Caracterización aire-agua

En este apartado se considera el estudio de las isotermas de compresión y expansión de la interfase aire-agua. En la figura 1.3.2.1 se observan las isotermas obtenidas para las proteínas de cangrejo a pH 2 y pH 8.

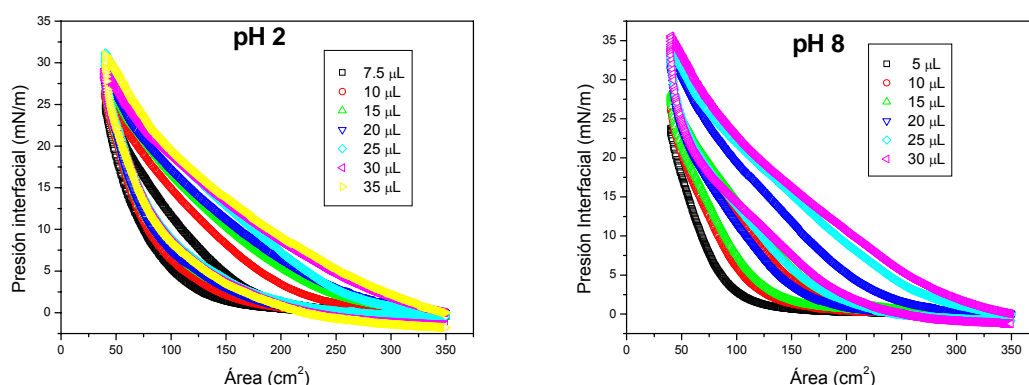


Figura 1.3.2.1. Isotermas de compresión-expansión de monocapas de diferentes cantidades de harina de cangrejo a pH 2 y 8.

En ambos casos se muestra una evolución similar de la presión interfacial con el aumento de la concentración de proteínas, pudiéndose sólo destacar el incremento de la presión interfacial a medida que aumenta la concentración de proteínas. Las cantidades sembradas en ambos casos son similares. Si se comparan las isotermas de compresión para ambos pH a una concentración determinada (30 μL), se obtiene el resultado de la figura 1.3.2.2.

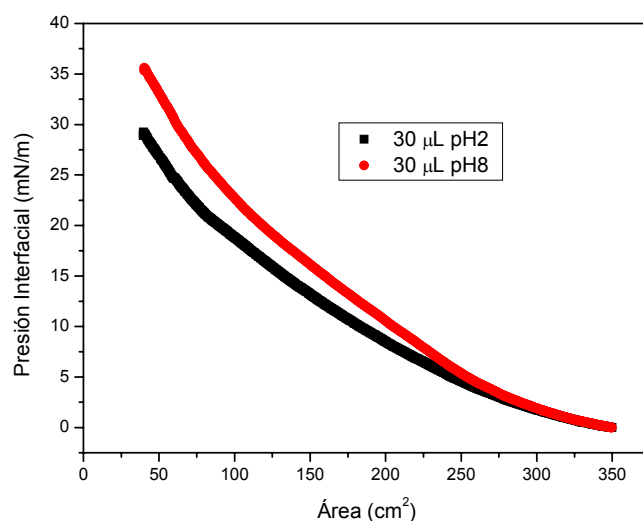


Figura 1.3.2.2. Comparación de isotermas de compresión de monocapas con la misma cantidad de harina de cangrejo a pH 2 y 8.

Atendiendo a la forma de estas isothermas, parece que el comportamiento es similar para ambos valores de pH, por lo que el proceso de compresión de las proteínas en ambos casos es similar, aunque el incremento en la presión interfacial es superior en el caso de pH 8, presentando mejores propiedades interfaciales aire-agua.

Por tanto, se llega a la conclusión de que la proteína de cangrejo, presenta mejores propiedades interfaciales a pH 8 que a pH 2 acompañadas de una mayor solubilidad. Esto plantea el hecho de que las mejores propiedades funcionales de estas proteínas pueden encontrarse a pH básico. Este hecho nos puede ayudar en la búsqueda de las condiciones óptimas de emulsificación.

2. EMULSIONES

2.1 Caracterización del aceite

2.1.1 Composición

La fase dispersa de todas las emulsiones estudiadas ha sido aceite de girasol y su composición varía ligeramente de una marca comercial a otra. A continuación, se presenta la composición típica de un aceite de girasol comercial.

Tabla 2.1.1.1. Composición típica del aceite de girasol utilizado.

Acidez (% p/p)	0,08°
Ácidos grasos (% p/p)	
Linoleico	60,27
Oleico	27,50
Palmítico	6,60
Behénico	3,90
Aráquico	0,26
Palmitoleico	0,14
Gadoleico	0,12
Mirístico	0,07
Linolénico	0,07
Láurico	0,01
Esteroles (% p/p)	
B-Sitosterol	62,88
D7-Estigmastenol	20,95
Campesterol	8,17
Estigmasterol	6,87
Colesterol	0,10

2.1.2 Densidad

Dada la importancia del control de temperatura durante el proceso de emulsificación, se determinaron, mediante picnometría los valores de la densidad del aceite en función de la temperatura. El proceso se realiza a distintas temperaturas obteniéndose 3 replicados de densidad con la temperatura. En la tabla 2.1.2.1 se presentan los valores medios e intervalos de confianza ($p=0,05$) obtenidos.

Tabla 2.1.2.1. Valores de la densidad en función de la temperatura para el aceite de girasol utilizado.

Temperatura (°C)	Densidad (kg/m ³)
20	923,5 ± 0,7
30	919,4 ± 0,5
40	917,7 ± 0,5
50	916,6 ± 0,3
60	915,7 ± 0,8

Se observa, como era de esperar, que existe una disminución de la densidad al aumentar la temperatura, aunque esta es moderada.

2.1.3 Viscosidad

Se ha determinado la viscosidad del aceite de girasol, que presenta comportamiento newtoniano, a diferentes temperaturas abarcando todo el intervalo que puede alcanzarse durante el proceso de emulsificación. Como puede observarse en la figura 2.1.3.1, en la que se representa la variación de la viscosidad newtoniana (μ) en función de la temperatura, se produce un descenso muy importante de viscosidad al aumentar la temperatura.

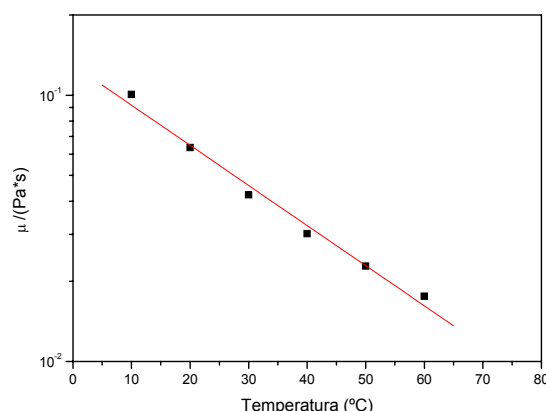


Figura 2.1.3.1. Variación de la viscosidad del aceite con la temperatura

Estos resultados puede ajustarse a una ecuación tipo Arrhenius:

$$\mu = A \exp(-B/T) \quad (2.2.1)$$

de esta ecuación se determina el valor preexponencial $A = -8,74 \cdot 10^{-7}$ Pa·s y el parámetro $B = 3283$ K.

2.2 Emulsiones estabilizadas con harina

2.2.1 Selección de condiciones de emulsificación

Se han preparado emulsiones con una concentración del 75% (p/p) de aceite, 5% (p/p) de harina y 20% (p/p) de agua destilada. Las condiciones estudiadas para emulsionar son las indicadas en el proceso de preparación a 6000 r.p.m. en un sistema emulsificador UT-T50. La adición de aceite tiene lugar durante 6 minutos y, posteriormente, la emulsión se homogeneiza durante 1 minuto. Se han realizado pruebas a diferentes valores de pH observando una alta dependencia de este. No ha sido posible obtener emulsiones estables a valores de pH menores a 11, lo que puede atribuirse, al menos en parte, a que el proceso de obtención de la harina altera mucho las condiciones emulsionantes de las proteínas de la harina. Aun siendo la emulsificación directa sólo posible a pH elevado, se ha desarrollado un método indirecto de preparación de emulsiones estables a distintos valores de pH, incluido el intervalo de pH alimentario (3-8).

Finalmente y debido a lo expuesto anteriormente, se toma a la emulsión con 75% (p/p) de aceite, 5% (p/p) de harina y 20% (p/p) de agua destilada a pH 11,5, como la **emulsión de referencia**.

A) Selección de parámetros

Se han seleccionado una serie de parámetros que informan sobre diferentes características de estas emulsiones y que resultan de interés para su aplicación.

A.1 Distribución de tamaños de gotas

Como parámetros representativos de la distribución de tamaños de gota (DTG) se han elegido dos tipos de diámetros: **el diámetro de Sauter, $d_{3,2}$** y **el diámetro volumétrico, $d_{4,3}$** . En primer lugar se elige el **diámetro de Sauter** porque es el diámetro más utilizado para estudiar emulsiones y tiene una relación inversa con la superficie específica de la emulsión. Además se incorpora el **diámetro volumétrico**, especialmente indicado para los sistemas bimodales cuya caracterización empleando únicamente el diámetro de Sauter no resulta suficiente.

Las expresiones de ambos diámetros son:

$$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2.2.1.1)$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.2.1.2)$$

donde n_i es el número de gotas con un tamaño d_i .

Finalmente, se ha elegido como parámetro representativo de la polidispersidad de la muestra la **uniformidad (U)**. La uniformidad señala la desviación de los tamaños de gota de la mediana de la distribución, y viene definida por la siguiente ecuación:

$$U = \frac{\sum V_i |d_{1/2} - d_i|}{d_{1/2} \sum V_i} \quad (2.2.1.3)$$

donde V_i es la frecuencia volumétrica relativa para la clase de tamaño i y $d_{1/2}$ es la mediana de la distribución. De esta forma los valores cercanos o superiores a 1 corresponderían a emulsiones muy polidispersas y un valor de 0 correspondería a una emulsión con un único tamaño de gota.

En la figura 2.2.1.1 se observan los resultados de las curvas de DTG donde se representa el porcentaje volumétrico (%(V/V)) frente al tamaño de gota de una emulsión de referencia medida al día siguiente de su preparación.

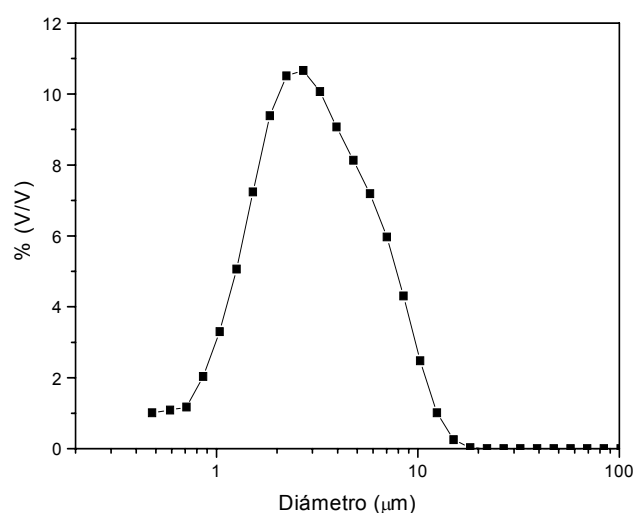


Figura 2.2.1.1. Curva de distribución de tamaño de gota para la emulsión de referencia.

Esta emulsión base presenta una distribución de tamaño unimodal con valores moderados del diámetro de Sauter y Volumétrico ($d_{3,2} = 2,04 \mu\text{m}$ y $d_{4,3} = 3,31 \mu\text{m}$ y una uniformidad de 0,64).

A.2 Parámetros viscoelásticos

En primer lugar se ha determinado el intervalo viscoelástico lineal de la emulsión el cual informa sobre la estructura inalterada de la misma. Para ello, se han realizado barridos de deformación para calcular la **deformación crítica** (γ_c) que delimita la longitud o extensión de la zona viscoelástica lineal. En la figura 2.2.1.2 se representan los resultados de los módulos de almacenamiento y pérdidas (G' , G'') y de la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) obtenidos mediante este ensayo para la emulsión de referencia. Puede observarse la existencia de un extenso intervalo viscoelástico lineal en el que dichas funciones permanecen independientes de la deformación.

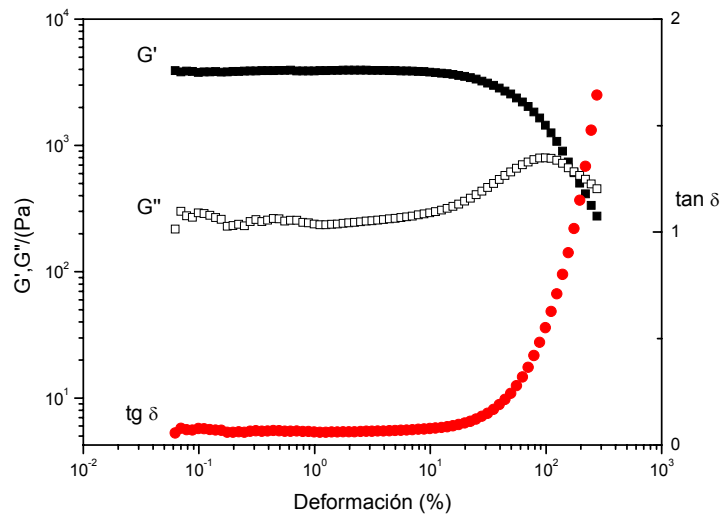


Figura 2.2.1.2. Barridos de deformación de emulsión de referencia.

En la figura 2.2.1.3 se presenta un ejemplo de como se ha calculado esta deformación crítica. Así, se representó la deformación frente al esfuerzo y se realizó una regresión lineal. El valor de la deformación a partir del cual hay una desviación mayor del 5% con respecto al ajuste lineal se toma como valor de deformación crítica en los cálculos posteriores.

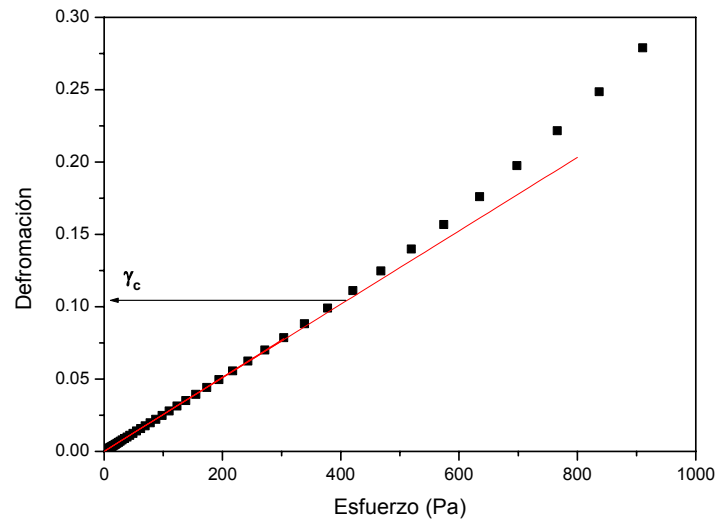


Figura 2.2.1.3. Cálculo de la deformación crítica mediante la representación de la deformación frente al esfuerzo.

En la figura 2.2.1.4 se representan los valores de G' , G'' y $\text{tg } \delta$ obtenidos mediante ensayos de barrido de frecuencia para la emulsión de referencia.

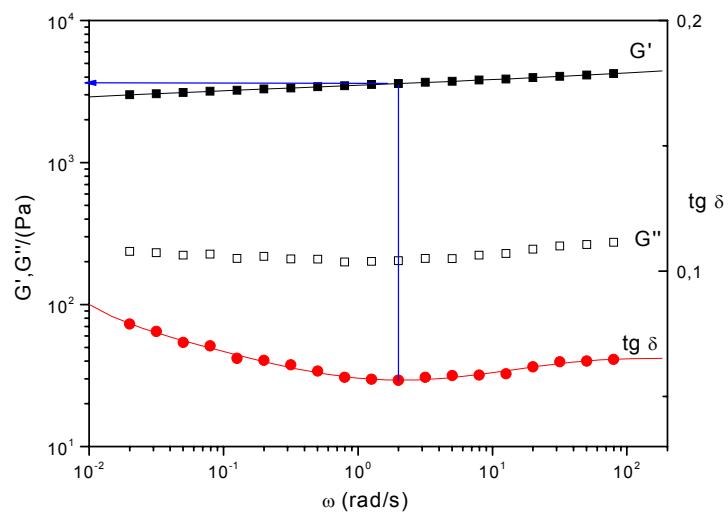


Figura 2.2.1.4. Barrido de frecuencia para la emulsión de referencia.

Las emulsiones estudiadas presentan un comportamiento típico de emulsiones concentradas o/w con un alto grado de floculación tales como mayonesas (Gallegos y col., 1992; Guerrero y Ball, 1994), salsas estabilizadas con yema de huevo (Muñoz y Sherman, 1992; Franco y col., 1995; Moros y col., 2003) y emulsiones concentradas estabilizadas con proteínas vegetales (Franco y col., 2000; Raymundo y col., 2002; Bengoechea y col., 2006). Estas emulsiones se caracterizan por una respuesta viscoelástica lineal correspondiente a la región plateau del espectro de relajación. Esta región se caracteriza por una pequeña dependencia del módulo elástico de la frecuencia y valores de G' muy superiores a G'' (aproximadamente de un orden de magnitud). Además, G' presenta una variación potencial con la frecuencia mientras que G'' presenta un valor mínimo y una tendencia a un punto de corte con G' a baja frecuencia, el cual no se alcanza en ningún caso en el intervalos de frecuencia estudiado. La aparición de esta amplia zona “plateau” evidencia el desarrollo de una estructuración que favorece la estabilidad de la emulsión. (Dickinson, 1989; Franco y col., 1995).

El **módulo plateau** (G_N^0) es un parámetro característico del material que se puede obtener, de forma aproximada, a partir del módulo de almacenamiento, G' correspondiente al mínimo del módulo de pérdida, G'' , o de la **tangente de pérdidas**, $\text{tg } \delta$ con la frecuencia (Wu, 1989).

$$G_N^0 = G' |_{\text{tg } \delta \rightarrow \min} \quad (2.2.1.4)$$

siendo $\text{tg } \delta = G''/G'$, proporcionando este parámetro una relación entre la componente viscosa y elástica de la emulsión.

Otro parámetro que se ha elegido para el estudio de las propiedades viscoelásticas de las emulsiones es el valor mínimo de la tangente de pérdidas:

$$\text{tg } \delta = G''/G' | \rightarrow \min \quad (2.2.1.5)$$

Este parámetro se ha elegido para comprobar la relación entre los módulos de pérdida y almacenamiento al valor de frecuencia correspondiente al módulo plateau.

El último parámetro seleccionado es n' que hace referencia al valor de **la pendiente de G' frente a la frecuencia**, ambos en escala logarítmica. Su cálculo es sencillo mediante el cálculo del exponente de la ley potencial que relaciona G' y ω (frecuencia). El valor de n' contribuye a caracterizar el grado de estructuración de la emulsión.

$$G' = G'_0 \omega^{n'} \quad (2.2.1.6)$$

B) Resultados Estadísticos

Con el fin de estudiar la variabilidad de la emulsión de referencia, se ha realizado un estudio estadístico sobre todos y cada uno de los parámetros seleccionados. Para este estudio se ha llevado a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), utilizando diferentes replicados de 5 lotes distintos de la misma emulsión. Se ha empleado un test de comparación de medias para identificar aquellos que resulten significativamente diferentes. Finalmente se han calculado una serie de parámetros estadísticos, tanto interlotes como intralotes. Entre ellos se han elegido la media, los límites de confianza y el coeficiente de variación.

Para ello, se han preparado cinco lotes de la emulsión de referencia (75% (p/p) de aceite vegetal y 5% (p/p) de harina), utilizando en todos los casos el mismo protocolo de preparación anteriormente descrito (velocidad de agitación de 6000 r.p.m., pH de 11,5 y temperatura de 20°C). Con cada uno de estos lotes se han efectuado distintos replicados de las medidas de distribución de tamaño de gotas y ensayos viscoelásticos dinámicos descritos en el apartado experimental (Apartado III.2.2.4).

En la tabla 2.2.1.1 aparecen los resultados experimentales de los parámetros expuestos para cada lote y replicado.

Tabla 2.2.1.1. Resultado de parámetros de estudio estadístico.

Lote	Replicado	$d_{3,2}$ (μm)	$d_{4,3}$ (μm)	U	γ_c (%)	G_N^0 (Pa)	$\text{tg } \delta$ min	n'
1	A	2,04	3,31	0,639	11,16	3468	0,0556	0,0397
1	B	1,93	3,5	0,703	10,27	3417	0,0619	0,0457
1	C	2,02	3,35	0,635	10,94	3451	0,0653	0,0484
2	A	2,14	3,67	0,673	11,04	3253	0,0537	0,0402
2	B	2,13	3,44	0,600	10,13	3410	0,0518	0,0393
3	A	1,92	3,37	0,706	13,22	3403	0,0614	0,0452
3	B	2,01	3,45	0,666	12,64	3434	0,0634	0,0479
3	C	1,98	3,59	0,708	11,13	3337	0,0640	0,0481
3	D	2,19	3,78	0,681	12,01	3395	0,0608	0,0462
3	E	2,17	4,03	0,728	10,31	3299	0,0605	0,0445
4	A	2,01	3,53	0,718	10,21	3362	0,0531	0,0386
4	B	1,96	3,75	0,800	9,542	3140	0,0559	0,0399
5	A	2,06	3,42	0,654	12,28	3840	0,0553	0,0477
5	B	1,99	3,21	0,608	10,51	3851	0,0593	0,0438
5	C	1,95	3,14	0,617	12,56	4074	0,0674	0,0395

El estudio se ha hecho de manera independiente para todos los parámetros. La determinación de un determinado factor se considera significativa cuando la probabilidad, p , para ese factor es menor que 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.

En la tabla 2.2.1.2 se exponen los resultados del análisis de varianza para cada uno de los parámetros que se han considerado de interés en el estudio para el caso de los parámetros relacionados con la distribución de tamaño de gotas.

Tabla 2.2.1.2. Resultado ANOVA para los parámetros seleccionados en la distribución de tamaño de gotas.

Diámetro de Sauter ($d_{3,2}$)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Interlotes	4	$3,26 \cdot 10^{-2}$	$8,15 \cdot 10^{-3}$	1,373	0,31067
Intralotes	10	$5,94 \cdot 10^{-2}$	$5,94 \cdot 10^{-3}$		
Diámetro volumétrico ($d_{4,3}$)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Internotes	4	$3,43 \cdot 10^{-1}$	$8,58 \cdot 10^{-2}$	2,526	0,10695
Intralotes	10	$3,40 \cdot 10^{-1}$	$3,41 \cdot 10^{-2}$		
Uniformidad (U)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Internotes	4	$2,75 \cdot 10^{-2}$	$6,88 \cdot 10^{-3}$	5,506	0,01318
Intralotes	10	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$		

Se puede observar como para el diámetro de Sauter y volumétrico las medidas no son significativamente diferentes al nivel 0,05. Sin embargo, no ocurre lo mismo con U donde las medias sí son significativamente diferentes y al menos uno de los lotes ha producido desviaciones significativas con respecto al resto de lotes. Para ello se realiza un test de comparación de medias para determinar cual lote se desvía, en concreto el test de Bonferroni (Kuehl, 2000). El resultado de la aplicación de este test proporciona que el lote 4 es significativamente distinto, con lo que si se elimina el lote 4 el análisis de varianza no reflejaría valores significativamente diferentes.

En la tabla 2.2.1.3 se presentan los valores de medias, límites de confianza y coeficientes de variación tanto de interlotes como intralotes.

Tabla 2.2.1.3. Resultados estadísticos para los parámetros seleccionados en la distribución de tamaño de gotas.

Diámetro de Sauter ($d_{3,2}$)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	2,033	$4,26 \cdot 10^{-2}$	4,14
Intralotes	2,033	$4,82 \cdot 10^{-2}$	$3,73 \pm 1,46$
Diámetro volumétrico ($d_{4,3}$)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	3,503	0,1140	6,43
Intralotes	3,503	0,1495	$3,77 \pm 1,26$
Uniformidad (U)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	$6,57 \cdot 10^{-1}$	$2,61 \cdot 10^{-2}$	7,65
Intralotes	$6,57 \cdot 10^{-1}$	$3,69 \cdot 10^{-2}$	$4,43 \pm 0,96$

Los valores de cada parámetro estadístico correspondiente a interlotes incluyen todos los replicados de los lotes utilizados. Por otro lado, los intralotes se determinan a partir de las medias de cada uno de los lotes calculando la media, el límite de confianza y el coeficiente de variación a partir de estas medias. Se observa como el coeficiente de variación intralotes es inferior a interlotes puesto que dentro de un lote hay menos variación que si estudiamos lotes diferentes.

En la tabla 2.2.1.4 se presentan los resultados para los parámetros correspondientes a medidas reológicas.

Tabla 2.2.1.4. Resultado ANOVA para los parámetros seleccionados en las medidas reológicas.

Deformación crítica (γ_c)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Interlotes	4	9,812	2,453	2,958	0.0748
Intralotes	10	8,292	0,829		
Módulo Plateau (G_N^0)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Interlotes	4	7529242	188235	25,661	0,00003
Intralotes	10	73355	7335		
Tangente de delta mínimo ($tg \delta_{min}$)					
Parámetros	Grados Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Interlotes	4	$1,83 \cdot 10^{-4}$	$4,57 \cdot 10^{-5}$	3,259	0,0590
Intralotes	10	$1,40 \cdot 10^{-4}$	$1,40 \cdot 10^{-5}$		
Pendiente (n')					
	Grados libertad	Suma cuadrados	Cuadrado de la media	F	p
Interlotes	4	$1,09 \cdot 10^{-4}$	$2,73 \cdot 10^{-5}$	3,217	0,06096
Intralotes	10	$8,48 \cdot 10^{-5}$	$8,48 \cdot 10^{-6}$		

De nuevo se obtiene que no hay diferencias significativas salvo para el caso del módulo Plateau (G_N^0). Aplicando de nuevo el test de Bonferroni se llega a la conclusión de que el lote 5 es el que produce la desviación.

En la tabla 2.2.1.5 aparecen los parámetros estadísticos para los ensayos reológicos.

Tabla 2.2.1.5. Resultados estadísticos para los parámetros seleccionados en las medidas reológicas.

Deformación crítica (γ_c)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	11,20	$5,38 \cdot 10^{-1}$	9,49
Intralotes	11,20	$3,45 \cdot 10^{-1}$	$5,53 \pm 1,98$
Módulo Plateau (G_N^0)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	3488	118,77	6,73
Intralotes	3488	74,36	$1,77 \pm 0,99$
Uniformidad (U)			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	$5,93 \cdot 10^{-2}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$	7,82
Intralotes	$5,93 \cdot 10^{-2}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	$4,31 \pm 2,29$
Pendiente (n')			
Parámetros	Media	Límite de confianza (0,05)	Coefficiente de variación (%)
Interlotes	$4,36 \cdot 10^{-2}$	$1,82 \cdot 10^{-3}$	8,24
Intralotes	$4,36 \cdot 10^{-2}$	$2,14 \cdot 10^{-3}$	$4,34 \pm 2,62$

C) Influencia del tiempo tras la preparación de la emulsión

En este apartado se van a estudiar las variaciones que se producen en los parámetros seleccionados en el apartado anterior 2.2.1 tanto por efecto del tiempo de envejecimiento (tiempo transcurrido de la preparación de la emulsión) como por la temperatura de almacenamiento.

Para realizar este estudio se ha utilizado la emulsión de referencia de la que se seleccionan dos partes alícuotas. Una de ellas se almacena a 5°C y otra a temperatura ambiente (20°C). En ambos casos se analiza la variación con el tiempo, tras la emulsificación, de los parámetros seleccionados.

C.1 Curvas de distribución de tamaño de gotas

En la figura 2.2.1.5 se puede observar como, independientemente de las condiciones de almacenamiento, la emulsión recién preparada posee tamaños de gota más pequeños y una menor polidispersidad, que las almacenadas. Se produce, por tanto, una cierta coalescencia. Esta coalescencia se evidencia con valores de U más elevados y un cierto aumento de los valores de los diámetros a lo largo del tiempo, apreciando finalmente una tendencia hacia valores constantes de estos parámetros.

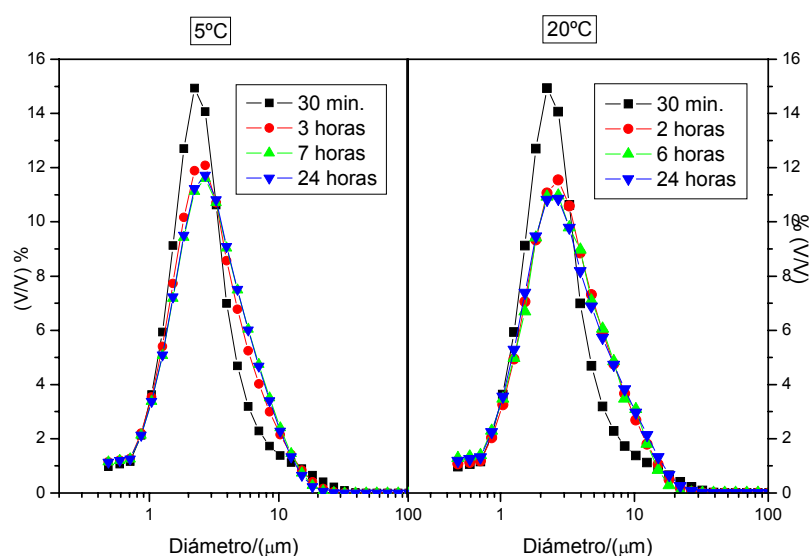


Figura 2.2.1.5. Evolución de curvas de distribución de tamaño de gotas para alícuotas de la emulsión de referencia preparada a 6000 r.p.m. almacenadas a 5 y 20°C.

En la figura 2.2.1.6 se representa la evolución a lo largo del tiempo de los parámetros $d_{3,2}$, $d_{4,3}$ y U para las emulsiones almacenadas en frío y a temperatura ambiente.

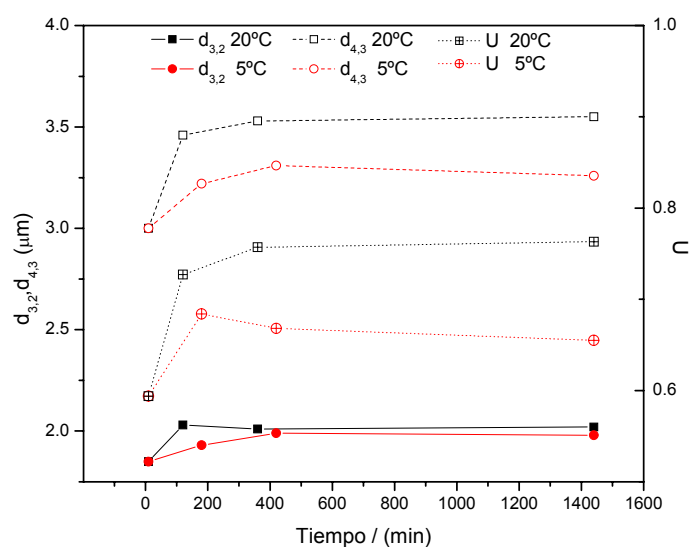


Figura 2.2.1.6. Evolución de los parámetros $d_{3,2}$, $d_{4,3}$, y U en función del tiempo para alicuotas de la emulsión de referencia preparada a 6000 r.p.m. almacenadas a 5 y 20°C.

La emulsión almacenada en frigorífico presenta menores valores de tamaño de gota, aunque no significativamente diferentes, y una mayor uniformidad (menor valor de U). Este último efecto sí tiene significación estadística. La evolución de los parámetros de DTG se produce en los primeros minutos tras la emulsificación, ya que a partir de las dos horas no aparecen diferencias significativas en los tamaños de gotas con mayores tiempos de almacenamiento. Esta evolución puede atribuirse a un proceso de coalescencia entre gotas, favorecido por el alto grado de empaquetamiento de gotas en la emulsión y por la menor viscosidad de la emulsión recién preparada. Además, el almacenamiento en frío disminuye dicha evolución ya que el aumento de viscosidad tiende a inhibir el proceso de coalescencia. En consecuencia, la DTG obtenida finalmente resulta sensible a la temperatura de almacenamiento utilizada.

C.2 Medidas viscoelásticas lineales

En la figura 2.2.1.7 se presentan los espectros mecánicos obtenidos a lo largo del tiempo tras el proceso de emulsificación. Como puede observarse no aparecen diferencias apreciables en la forma de los distintos espectros.

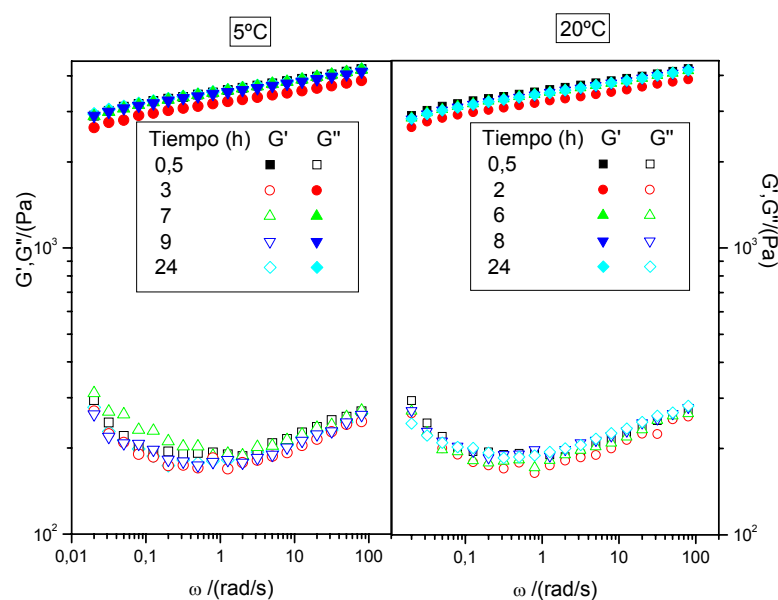


Figura 2.2.1.7. Evolución de los barridos de frecuencia para alícuotas de la emulsión de referencia preparada a 6000 r.p.m. almacenadas a 5 y 20°C.

En la figura 2.2.1.8 aparece la evolución de los parámetros reológicos seleccionados en este estudio.

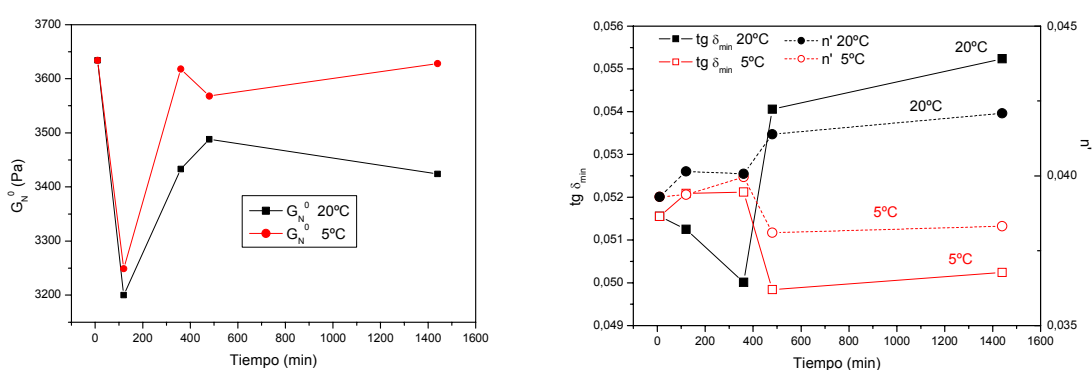


Figura 2.2.1.8. Evolución de los parámetros G_N^0 , $\text{tg } \delta_{\text{min}}$ y n' en función del tiempo para alícuotas de la emulsión de referencia preparada a 6000 r.p.m. almacenadas a 5 y 20°C.

Aparentemente, no existen diferencias apreciables en los valores de G' y G'' . Sin embargo, puesto que se trata de variaciones intralotes el coeficiente de variación que habrá que considerar es menor (por ejemplo del orden del 2% para G_N^0 , en concreto como se puede apreciar en el estudio estadístico de $1,77 \pm 0,99$). Las variaciones de G' son superiores al 2% en todo el intervalo de frecuencia estudiado. Por tanto, las diferencias en los valores del mínimo en G' que aparece trascurridas 3 horas tras la emulsificación resulta estadísticamente significativo.

Como se puede observar se produce un descenso de las funciones viscoelásticas, llegando el módulo plateau hasta un mínimo, acompañado de un incremento en el tamaño de gota como se observó en el apartado anterior. Este descenso sigue con un importante incremento en G_N^0 hasta un valor prácticamente constante mientras que no se encuentra evolución en la distribución de tamaños. Este comportamiento puede atribuirse a un proceso de floculación entre segmentos de proteínas localizados o en las interfases que rodean las gotas de aceite o en la fase continua, gracias a que la cantidad de proteínas se encuentra en exceso sobre la necesaria para saturar la interfase (McClements, 2004). Este proceso de floculación conduce a un reforzamiento de la estructura de red formada entre las gotas, que impide la coalescencia.

La emulsión almacenada a 20°C presenta un aumento de los valores de la tangente de pérdidas y de la pendiente, n' , con el tiempo, lo que se traduce en un mayor carácter viscoso.

Con estos datos se pretende definir tanto las condiciones de almacenamiento más adecuadas, como el tiempo mínimo que se debe esperar para el estudio de este tipo de emulsiones. De esta forma la temperatura de almacenamiento ha sido elegida a 5°C y las medidas viscoelásticas se han llevado a cabo 24 horas después del proceso de emulsificación, tiempo más que suficiente para permitir la finalización del aparente proceso de floculación.

D) Estudio del mecanismo de desestabilización

Una vez seleccionadas las condiciones de emulsificación, se realizaron medidas de “Back Scattering” (BS) con el objetivo de analizar los mecanismos de

desestabilización de las emulsiones estabilizadas con harina de cangrejo. Así se prepararon emulsiones con 75 % (p/p) de aceite vegetal a pH 11,5 a 6000 rpm y baja concentración de proteínas (0,25 y 1 % (p/p)). En la figura 2.2.1.9 se presentan los resultados de BS para las emulsiones anteriores.

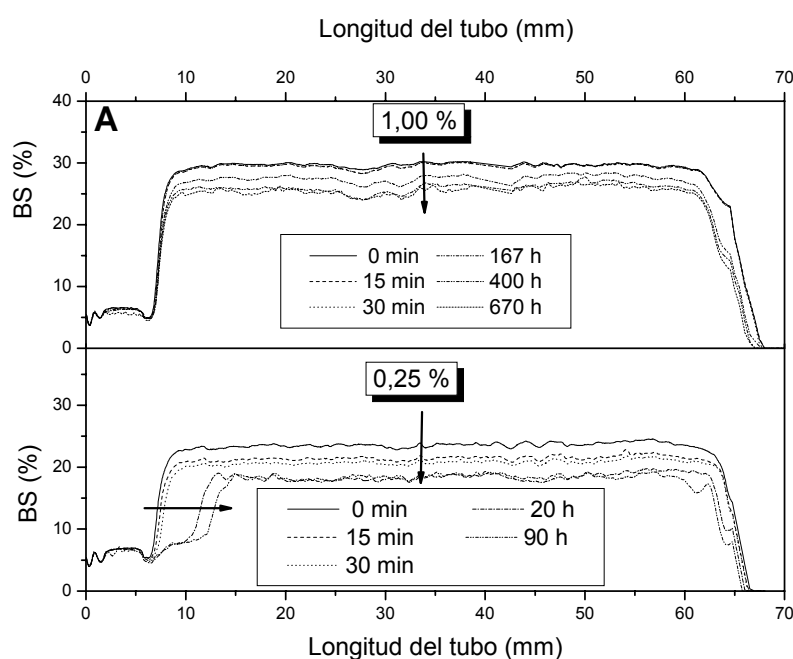


Figura 3.2.1.9. Evolución de los resultados de backscattering obtenidos a 20°C para emulsiones que contienen 75 % (p/p) de aceite y 0,25 o 1,00 % (p/p) de proteínas de cangrejo preparadas a 6000 rpm en función del tiempo.

En ambos casos, se observa un importante proceso de coalescencia, caracterizado por una reducción en los valores de BS a lo largo del tiempo. Además, en la emulsión con menor concentración de proteínas se observa una disminución de los valores de BS en la parte inferior del tubo a lo largo del tiempo. Esta disminución es la evidencia de un incremento en el tamaño de la capa acuosa y consecuentemente del cremado de la emulsión (Mengual y col., 1999; Palazolo y col., 2005). Este proceso de cremado no se observa en la escala de tiempo experimental de las emulsiones cuando la concentración de proteínas es elevada.

Para estudiar la evolución de los valores de BS con el tiempo se utiliza el BS relativo que se define como:

$$BS_{rel} = BS(t) / BS_0 \quad (3.2.1.7)$$

donde BS_0 y $BS(t)$ son los valores medios de los BS obtenidos para el tiempo inicial y el tiempo t , respectivamente, a la altura media del tubo. Dicha evolución de BS_{rel} en función del tiempo para las dos emulsiones consideradas (0,25 y 1,00 % (p/p)) se presenta en la figura 2.2.1.10.

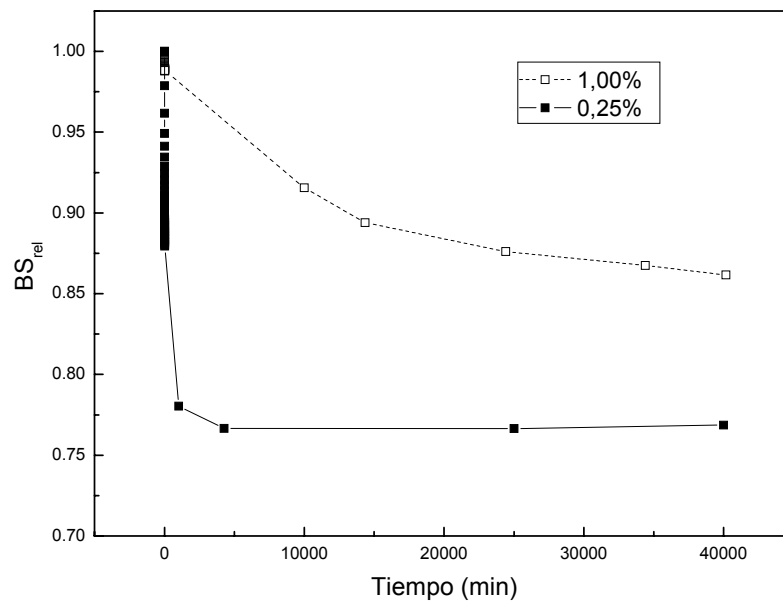


Figura 2.2.1.10. Evolución a lo largo del tiempo de los resultados de BS_{rel} obtenidos a 20°C para emulsiones que contienen 75 % de aceite y 0,25 o 1,00 % de proteínas de cangrejo preparadas a 6000 rpm.

En dicha figura puede observarse un acusado descenso inicial de los valores de BS relativo en función del tiempo seguido de una zona más estable. Esta reducción es más importante a las concentraciones más bajas de proteínas donde la coalescencia entre las gotas de aceite es evidente. Un incremento en la concentración de proteínas atenúa de forma importante el mecanismo de coalescencia, el cual, además, parece limitado a los primeros momentos después de la emulsificación, como puede observarse para la emulsión menos concentrada en proteína. Como era de esperar a concentraciones más elevadas, como 5 % p/p, hay un cierto grado importante de inhibición del proceso de cremado.

2.2.2 Influencia de la velocidad de agitación

Con el fin de evaluar la influencia que ejerce la energía suministrada, sobre las características finales y el procesado de emulsiones aceite en agua, se han fabricado emulsiones a diferentes velocidades de agitación comprendidas entre 3000 y 10000 r.p.m.

Para realizar este estudio se ha elegido la emulsión de referencia considerada que contiene 75% (p/p) de aceite vegetal, 5% (p/p) de harina y 20% (p/p) de agua destilada a pH 11,5. Todas las emulsiones fueron procesadas en un Ultraturrax UT-T50 utilizando un recipiente refrigerado a la temperatura de 20°C. La única variable modificada ha sido la velocidad de giro del rotor.

A) Consumo de potencia y densidad de energía

Evidentemente, un incremento de la velocidad de agitación en el equipo de homogenización supone un incremento en el consumo de energía durante el proceso.

La energía consumida durante el proceso de emulsificación puede obtenerse registrando las variaciones de la intensidad de corriente eléctrica a lo largo del tiempo. La potencia consumida en cada instante se obtiene multiplicando la intensidad de corriente por la diferencia de potencial eléctrico cuyo valor se mantiene en 220 ± 8 V.

En la figura 3.2.2.1 se representan los valores de potencia consumida en función del tiempo de procesado. También se expone el porcentaje de aceite que resta por añadir al sistema en cada instante que se calcula de la siguiente forma:

$$Y_o(\%) = \left(1 - \frac{M_o(t)}{M_{o,T}} \right) \cdot 100 \quad (2.2.2.1)$$

donde $M_o(t)$ es la masa de aceite que ya ha sido añadido en el instante t a la fase continua con una masa M_c (dispersión acuosa de harina de cangrejo) y $M_{o,T}$ es la cantidad total de aceite en la emulsión final.

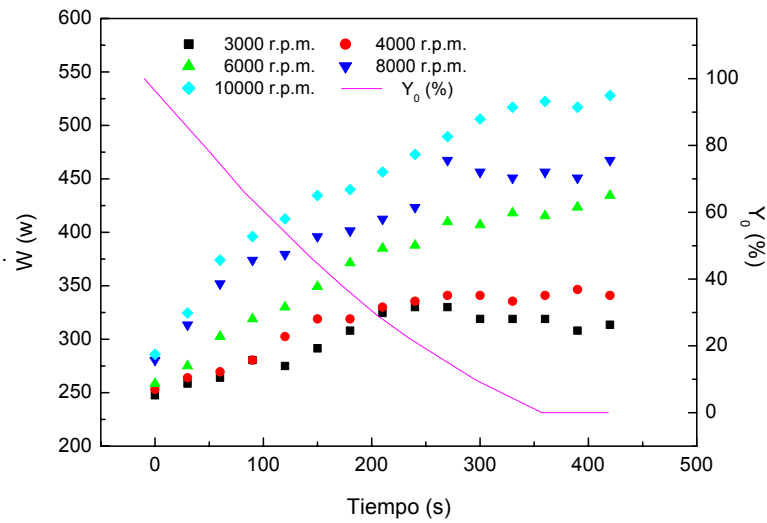


Figura 2.2.2.1. Evolución del consumo de potencia y del porcentaje de aceite que queda por añadir en función del tiempo para emulsiones procesadas a diferentes velocidades de agitación.

Se observa como el aumento del número de revoluciones por minuto conlleva un aumento de la potencia consumida. A medida que se añade la fase dispersa se produce un importante incremento en el consumo de potencia que tiende a estabilizarse al final del proceso. Esta zona constante es más acusada y más extensa a menores valores de velocidad de agitación e inexistente a la mayor velocidad de procesado. Tras finalizar la adición de aceite, existe un periodo de homogeneización de un minuto de duración en el que el consumo de potencia tiende a mantenerse constante.

En la figura 2.2.2.2, se observa como el aumento en el consumo de potencia lleva asociado un aumento de la temperatura con el tiempo debido a la energía mecánica disipada, que se transforma irreversiblemente en calor. La temperatura se ha determinado en cada instante colocando una sonda de temperatura en el interior del recipiente de la emulsión y en contacto permanente con ésta.

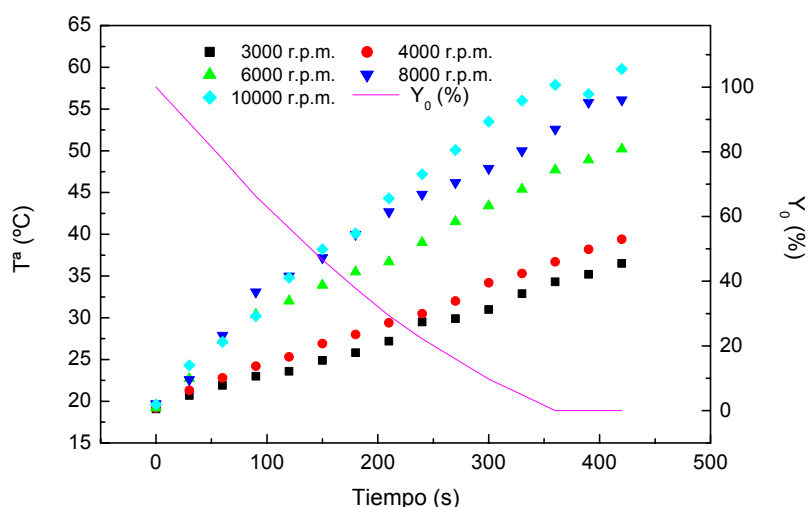


Figura 2.2.2.2. Evolución de la temperatura y del porcentaje de aceite que queda por añadir en función del tiempo para emulsiones procesadas a diferentes velocidades de agitación.

Este aumento de temperatura se produce a pesar de que la operación de emulsificación se realiza dentro de un baño termostático a temperatura constante (20°C) que retira cierta cantidad de calor del sistema.

Es importante registrar la temperatura para determinar la densidad de la emulsión durante el proceso de emulsificación. La densidad de la emulsión se estima a partir de las densidades de la fase continua y oleosa, ya que el valor de la densidad a lo largo del proceso de emulsificación es necesario para el cálculo de la densidad de energía.

En el presente análisis, la densidad de energía suministrada por unidad de volumen, E_v , ha sido calculada de la siguiente forma:

$$E_v = \int_0^t \frac{\dot{W}(c, N, t)}{M_c / \rho_c(c, t) + M_o(t) / \rho_o(t)} dt \quad (2.2.2.2)$$

donde

\dot{W} es la potencia consumida, que se determina a partir de diferencia de potencial eléctrico y de la intensidad de corriente determinada en función del tiempo; c es la concentración de harina; N es el número de revoluciones por minuto;

M_c es la masa de la fase continua, constante durante todo el proceso, (75 gr. de fase continua / 225 gr. de aceite; ρ_c es la densidad de la fase continua; depende de la concentración de ésta para cada temperatura; $M_o(t)$ es la masa de la fase oleosa al tiempo t (la variación de la masa de aceite en el sistema a lo largo del tiempo ha sido calibrada previamente); y ρ_o es la densidad de la fase oleosa, constante para cada temperatura.

En la ecuación 2.2.2.2 se han considerado volúmenes aditivos en función del tiempo, es decir, el volumen de la emulsión para cada instante se estima como la suma del volumen de fase continua y el volumen de aceite. Se han realizado algunas medidas que constatan dicha estimación. Se ha calculado la variación entre la densidad de la emulsión obtenida suponiendo aditividad de volúmenes y la densidad obtenida experimentalmente. Las diferencias encontradas entre el valor estimado y el experimental han sido del orden del 2%.

Se ha mantenido siempre la misma duración para el proceso de emulsificación (6 minutos de adición de aceite constante y 1 minuto de agitación de la emulsión).

El valor de la integral numérica de la ecuación 2.2.2.2 da como resultado la densidad de energía. En la figura 2.2.2.3 se representa la gráfica de cálculo de la densidad de energía para el caso de 6000 r.p.m., correspondiente a la emulsión de referencia.

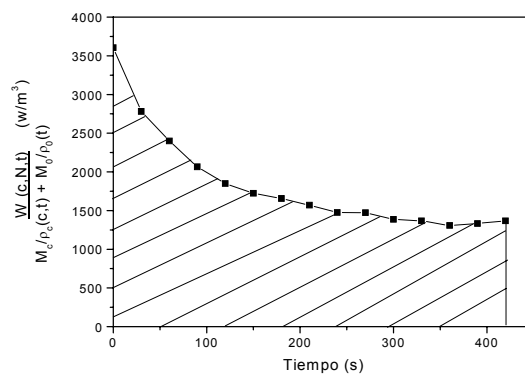


Figura 2.2.2.3. Evolución de la densidad de energía a lo largo del tiempo para la emulsión de referencia procesada a 6000 r.p.m.

Los resultados de densidad energética obtenidos, a partir de los cálculos realizados de la densidad de energía para cada número de revoluciones, se presentan en la siguiente tabla 2.2.2.1 y figura 2.2.2.4. Puede observarse una variación prácticamente lineal de la densidad de energía frente al número de revoluciones.

Tabla 2.2.2.1. Evolución de la densidad de energía con la velocidad de agitación del homogeneizador para emulsiones de referencia.

Velocidad de agitación (r.p.m.)	E_v ($J 10^{-8}/m^3$)
3000	6,31
4000	6,58
6000	7,46
8000	8,34
10000	9,05

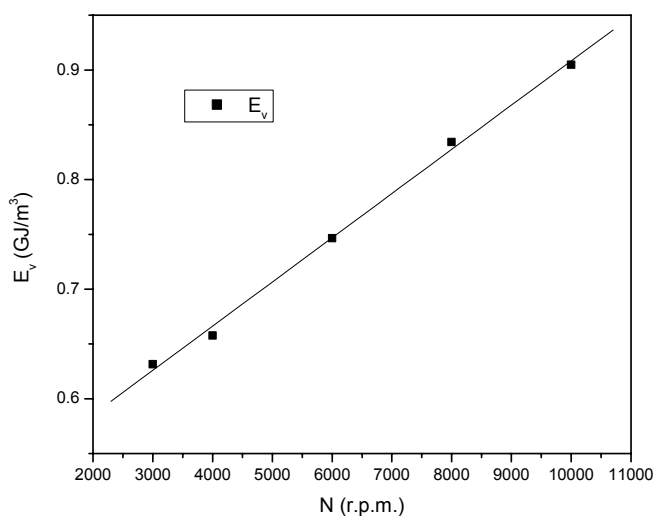


Figura 2.2.2.4. Evolución de la densidad de energía con la velocidad de agitación del homogeneizador para emulsiones de referencia.

Por tanto, la energía suministrada al sistema es empleada para el mezclado del aceite y la fase continua, la rotura de las gotas y para la disipación de la energía. Por lo que respecta al mezclado es más eficaz al aumentar la energía suministrada. Es conocido que la rotura de las gotas no tiene lugar a menos que E_v supere un valor crítico, el cual depende de la presión de Laplace de las gotas. Si la densidad de potencia neta está por debajo del valor crítico en algún lugar del homogeneizador, entonces la rotura de las gotas no existe y la energía es desaprovechada (McClements, 2004). Por último, la disipación de energía es controlada por la variación de la temperatura durante la emulsificación, a pesar de que esta emulsificación se efectúa en un baño termostatzado a 20°C.

B) Curvas de distribución de tamaño de gotas

En la figura 2.2.2.5 se observa que la distribución de tamaños de gotas de la emulsión final depende en gran medida de la energía suministrada y, por tanto, de la velocidad de agitación a la que se lleva a cabo el proceso de emulsificación.

También puede observarse que dentro del intervalo de velocidad de agitación estudiado, todas las emulsiones presentan una DTG unimodal. Un aumento en el

número de revoluciones provoca un desplazamiento de las curvas de distribución hacia valores más pequeños de tamaño de gota.

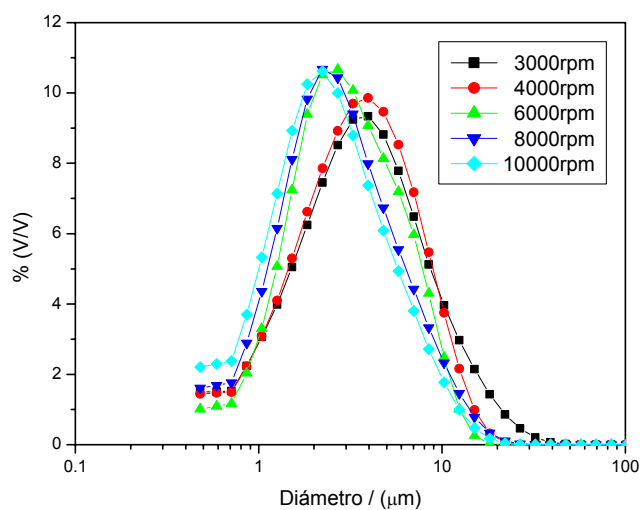


Figura 2.2.2.5. Evolución de curvas de distribución de tamaño de gotas para emulsiones de referencia procesadas a diferentes velocidades de agitación.

En la figura 2.2.2.6 se representan los valores de los parámetros de las curvas de distribución de tamaños de gotas en función de la velocidad de agitación, en la que se observa una disminución continua de los diámetros $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$. En cambio, para la uniformidad U , se obtiene un mínimo en U para 6000 r.p.m., aunque no existan grandes diferencias numéricas en los valores de U , exceptuando el obtenido a la menor velocidad de agitación.

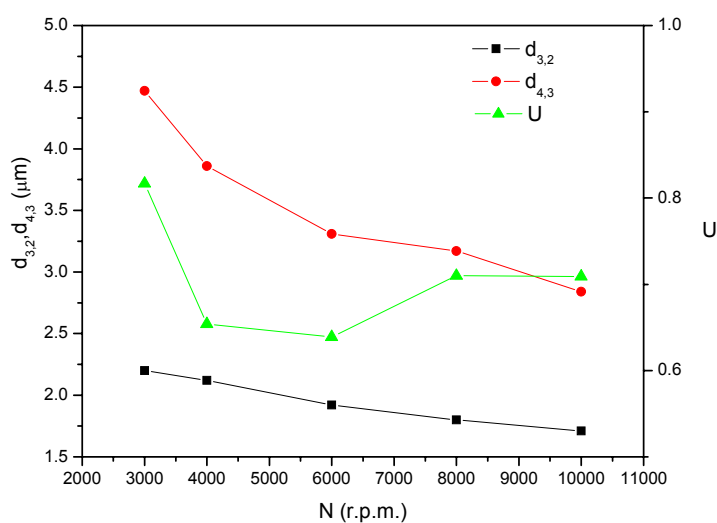


Figura 2.2.2.6. Evolución de los parámetros $d_{3,2}$, $d_{4,3}$, y U para emulsiones de referencia procesadas a diferentes velocidades de agitación.

Estos resultados pueden explicarse considerando el equilibrio entre rotura y coalescencia de las gotas que se produce en el proceso de emulsificación. Al aumentar la energía suministrada al sistema se produce un desplazamiento del equilibrio hacia una mayor rotura de las gotas de la emulsión (Sánchez y col., 1998). Esta mayor rotura de gotas supone un incremento de la superficie específica. Sin embargo el exceso de proteínas presente en la fase continua posibilita que se ocupe la interfase y se establezca la emulsión (McClements, 2004), como ya se comentó anteriormente. No existe una evolución de U con el número de revoluciones sino que permanece prácticamente constante, siendo ligeramente superior para el caso de 3000 r.p.m.

El método más usado para caracterizar la eficiencia energética de los homogeneizadores consiste en evaluar la relación entre el diámetro de gotas de Sauter obtenido tras de la emulsificación y la cantidad de energía suministrada a lo largo del proceso. La relación entre ambos parámetros suele ser de tipo potencial (Walstra, 1983; McClements, 2004; Schubert y Engel, 2004). En la figura 2.2.2.7 se representa la variación del diámetro $d_{3,2}$ con la densidad de energía para una concentración de emulsionante constante.

Se puede observar que la variación del tamaño de gotas con la densidad de energía se ajusta a una relación potencial:

$$d_{3,2} = aE_v^{-b} \quad (2.2.2.3)$$

donde las constantes a y b dependen del tipo de emulsionante, las propiedades de la fase continua, de la fase dispersa y del equipo de emulsificación usado. Esta ecuación potencial ha sido usada por otros autores para una gran variedad de homogeneizadores mecánicos (Walstra, 1983; Schubert y Engel, 2004).

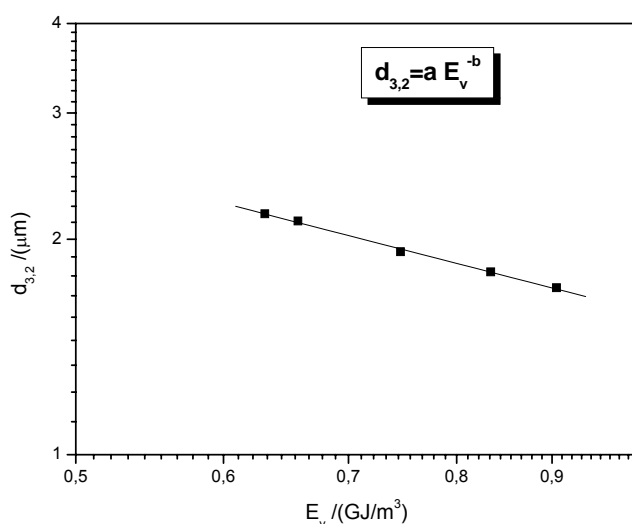


Figura 2.2.2.7. Variación del diámetro de gotas con la densidad de energía consumida para emulsiones de referencia procesadas a diferente velocidad de agitación.

El valor del exponente b es igual a 0,6 siendo similar al obtenido por Choplin (Comunicación privada) para un homogeneizador análogo al utilizado en este estudio. Otros autores, en cambio, sugieren una dependencia menor de la densidad energética para este tipo de homogeneizadores con una pendiente del orden de 0,4 (Walstra, 1983). Por último, destacar que los valores de la densidad de energía presentados en este trabajo son superiores a los encontrados en la bibliografía. Una posible explicación a esta diferencia puede ser la mayor duración del proceso de emulsificación utilizado, superior a la de otros procesos de emulsificación descritos en la bibliografía.

C) Propiedades viscoelásticas lineales

En la tabla 2.2.2.2 se representan los valores de la deformación crítica en función de la velocidad de agitación. Como puede apreciarse existe un amplio intervalo viscoelástico lineal que no depende significativamente de la velocidad de procesado.

Tabla 2.2.2.2. Evolución de la deformación crítica con la velocidad de agitación del homogeneizador para emulsiones de referencia.

Velocidad de agitación (r.p.m.)	γ_c (%)
3000	11,26
4000	11,78
6000	11,16
8000	11,49
10000	11,87

En cambio la velocidad de agitación si influye de forma cuantitativa en las funciones viscoelásticas lineales como puede apreciarse en la figura 2.2.2.8, en la que se representan los espectros mecánicos para diferentes velocidades de procesado. Un aumento de la velocidad de agitación produce un aumento de G' y G'' independientemente de la frecuencia considerada. Sin embargo, el aumento de velocidad de agitación no parece afectar a la forma de los espectros mecánicos.

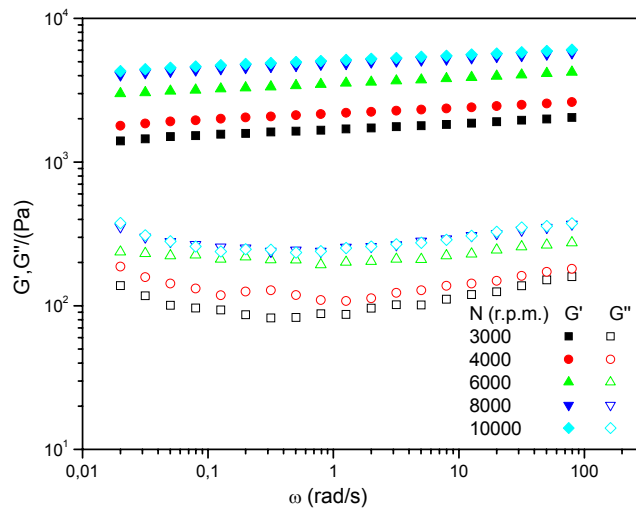


Figura 2.2.2.8. Evolución de los espectros mecánicos para emulsiones de referencia procesadas a diferentes velocidades de agitación.

En la figura 2.2.2.9 se representan las variaciones de los parámetros viscoelásticos lineales con la velocidad de agitación. Tan sólo se observa una variación significativa en el módulo plateau, que aumenta considerablemente con la energía suministrada.

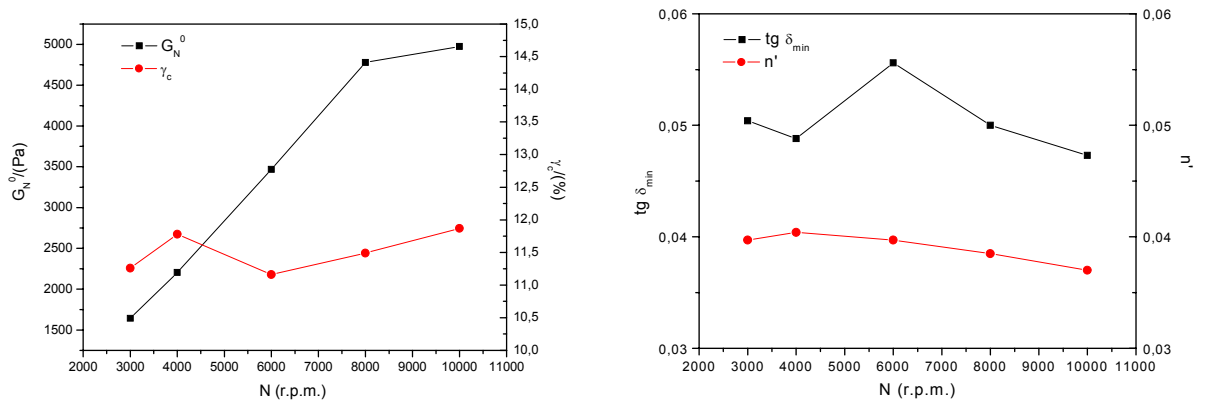


Figura 2.2.2.9. Evolución de los parámetros G_N^0 , γ_c , $tg \delta_{min}$ y n' para emulsiones de referencia procesadas a diferentes velocidades de agitación.

Tanto el aumento del módulo plateau como la disminución del tamaño de gota al aumentar la velocidad de rotación durante el procesado puede ser relacionadas con un aumento de la estabilidad de la emulsión (Franco y col., 1995).

En la siguiente figura 2.2.2.10 se presenta la variación de la densidad de energía, diámetro de gota y módulo plateau en función de la velocidad de agitación. Puede observarse como el aumento de los valores de E_v y módulo plateau son prácticamente paralelos. El incremento en la energía suministrada al sistema supone un incremento en la superficie interfacial específica, por una disminución del tamaño de gota, que conduce a unas interacciones más fuertes entre gotas (Rahalkar, 1992) y un aumento del módulo plateau a causa del reforzamiento del entramado tridimensional (Franco y col., 1995; Bengoechea y col., 2006).

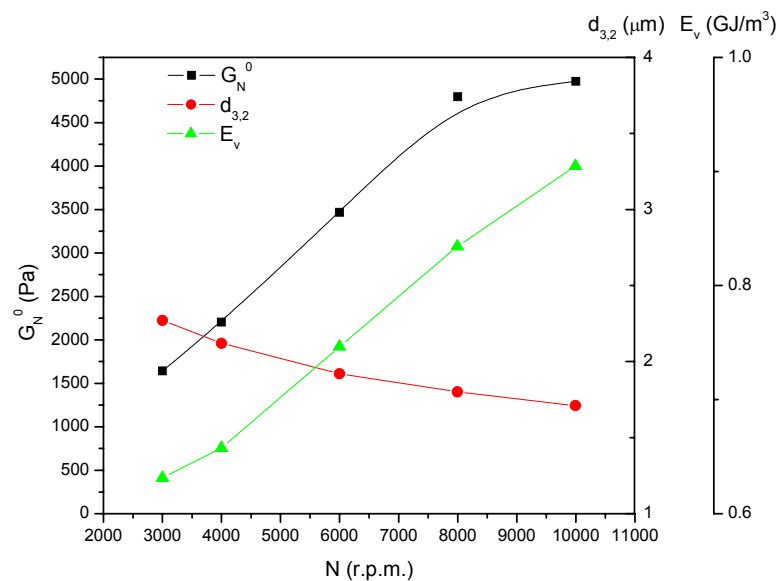


Figura 2.2.2.10. Evolución de los parámetros de la densidad de energía, distribución de tamaños de gotas y propiedades viscoelásticas para emulsiones de referencia procesadas a diferentes velocidades de agitación.

2.2.3 Influencia de la concentración de harina

El objetivo prioritario de este apartado es discutir la influencia del contenido de harina de cangrejo sobre la estabilidad y propiedades viscoelásticas lineales de las emulsiones finales.

Para realizar este estudio se han preparado emulsiones que contiene 75% (p/p) de aceite vegetal a pH 11,5 y con unas concentraciones de harina que oscilan entre 0,25 y 6,25% (p/p), equivalentes aproximadamente a unos valores de concentración de proteína que oscilan entre 0,15 y 4,0% (p/p) aproximadamente (sabiendo que la harina posee aproximadamente un 65% (p/p) de proteína). Todos los procesos de emulsificación se realizan en un tanque discontinuo inmerso en un baño termostático a 20°C.

A) Consumo de potencia y densidad de energía

Se ha registrado la variación de la potencia a lo largo del tiempo para cada uno de los sistemas durante la preparación de la emulsión, en función de la concentración de fase continua.

En la figura 2.2.3.1 se observa un aumento de la potencia consumida al aumentar la concentración de la fase continua, debido al incremento de la viscosidad de la misma.

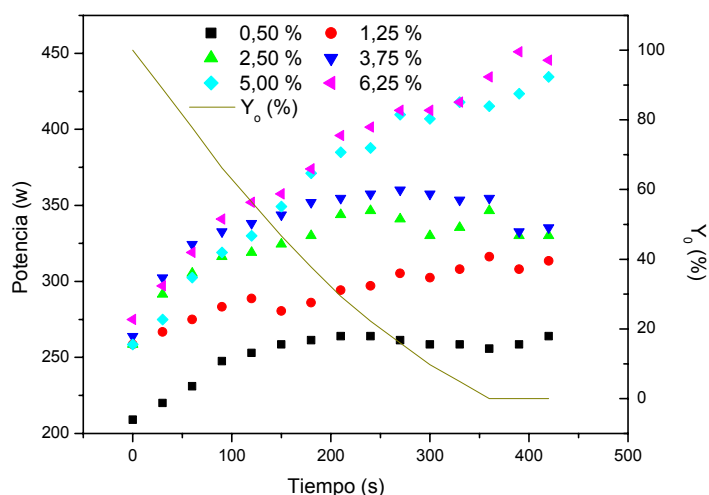


Figura 2.2.3.1. Evolución del consumo de potencia y del porcentaje de aceite que queda por añadir en función del tiempo para emulsiones a diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

La variación cualitativa de las curvas de potencia es similar a la de las curvas anteriormente descritas, existiendo una tendencia a obtener un valor constante de potencia consumida que resulta más difícil de alcanzar a medida que aumenta la concentración de emulsionante.

De nuevo se ha registrado la variación de la temperatura a lo largo del tiempo de emulsificación (figura 2.2.3.2). Se observa que al aumentar la viscosidad de la fase continua, se produce un mayor incremento de temperatura. Este incremento, debido a la disipación de energía mecánica que se transforma en calor, oscila entre 20 y 35°C en las condiciones del estudio.

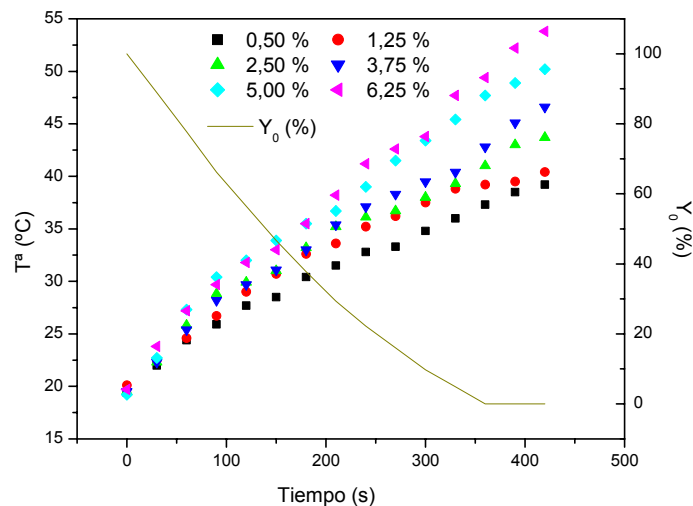


Figura 2.2.3.2. Evolución de la temperatura y del porcentaje de aceite que queda por añadir en función del tiempo para las emulsiones a diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

A partir de estos resultados, se ha determinado la variación de la densidad de energía requerida en el proceso de emulsificación para cada una de las emulsiones usando el procedimiento descrito en el apartado IV 2.2.2 A.

En la figura 2.2.3.3 se observa la variación de la densidad de energía con la concentración. A medida que aumenta la concentración de harina, aumentan las propiedades viscosas de la fase continua a la que se añade la fase dispersa, lo cual provoca un incremento del consumo de energía que se traduce en valores mayores

de densidad de energía. Se puede ver que a partir de una concentración de 2,50 % se obtiene una dependencia lineal entre E_v y la concentración de harina (C).

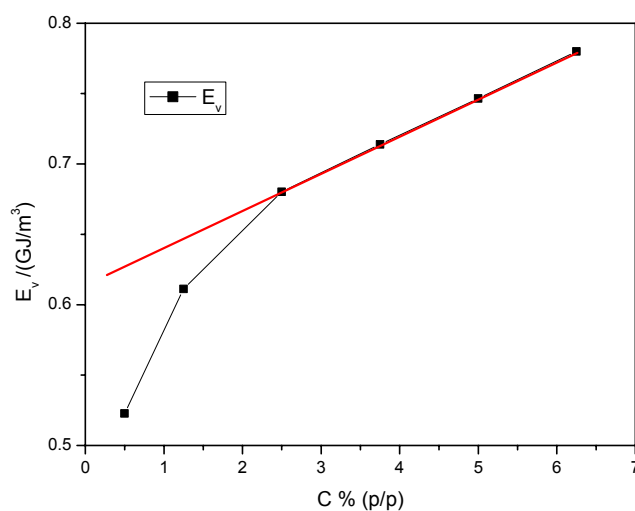


Figura 2.2.3.3. Evolución de la densidad de energía con la concentración de harina para emulsiones a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

B) Curvas de distribución de tamaño de gotas

En la figura 2.2.3.4 se pueden observar los perfiles de DTG en función de la concentración de harina, obtenidos al día siguiente de la preparación de la emulsión. Una reducción en la concentración provoca una evolución desde emulsiones unimodales a bimodales. El primer pico está localizado entre 1 y 3 μm , mientras que el segundo se desplaza hacia valores mayores a medida que se reduce la concentración. De hecho se observa como ambos picos se solapan a altas concentraciones de proteínas.

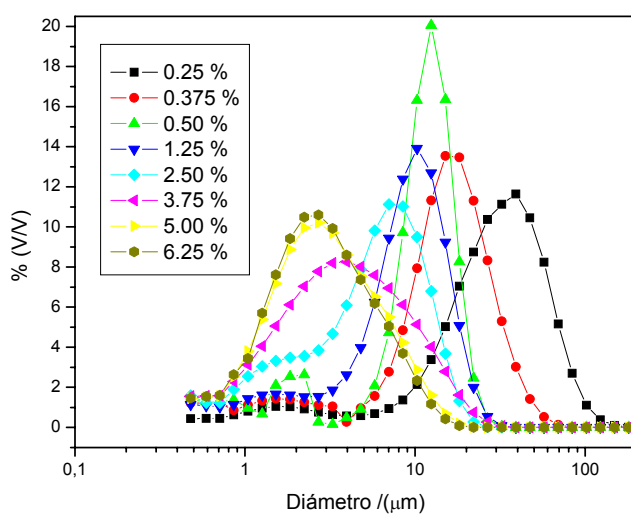


Figura 2.2.3.4. Evolución de curvas de distribución de tamaño de gotas para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Como puede observarse en la figura hay una clara evolución hacia una disminución del tamaño de gota a medida que aumenta la concentración de emulsionante presente.

En la figura 2.2.3.5 aparecen los resultados de los parámetros de DTG para diferentes concentraciones de harina.

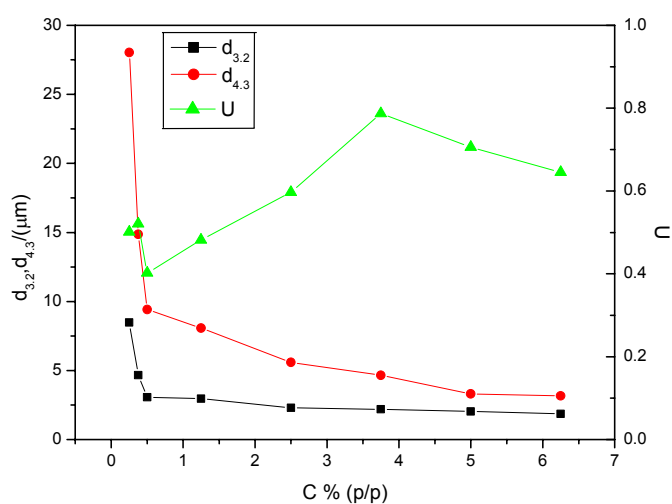


Figura 2.2.3.5. Evolución de los parámetros $d_{3,2}$, $d_{4,3}$, y U para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

La evolución del tamaño de gotas con la concentración refleja un cambio de comportamiento para valores de concentración menores de 0,50 %. Por debajo de esta concentración se produce un acusado incremento en el tamaño de gotas. Este cambio de comportamiento puede atribuirse a una situación de exceso de emulsionante a partir del 0,50 %, en el que el tamaño de gotas es relativamente independiente de la concentración (Tcholakova y col., 2003). De esta forma el 80 % de la reducción de tamaño del diámetro $d_{3,2}$ en el intervalo de concentración estudiado (0,25-6,25% (p/p)) tiene lugar duplicando la concentración de harina de cangrejo desde 0,25 a 0,50 % (p/p). Estos valores concuerdan con los obtenidos por Petursson y col., (2004) para la formación de emulsiones estabilizadas con proteínas de bacalao. Se ha comprobado también que para valores menores de 0,25 % (p/p) de concentración de harina se obtienen emulsiones inestables que presentan separación de fases pocas horas después de la emulsificación.

La relación de uniformidad también experimenta un cambio de comportamiento a partir de una concentración del 0,50 % a la que aparece un mínimo significativo. En esta concentración se obtiene la máxima separación de los dos picos de la DTG (figura 2.2.3.4). A partir de este valor comienza a producirse un solapamiento entre los dos picos que dan lugar a un crecimiento del parámetro U hasta un valor de 3,75 % de harina. Se puede observar que esta concentración coincide con el comienzo del perfil unimodal de la DTG. Posteriores aumentos de concentración conducen a un estrechamiento del pico de DTG que dará lugar a una reducción del parámetro U.

En la figura 2.2.3.6 se puede observar que, tanto con la concentración de harina como con la velocidad de emulsificación, existe una relación de tipo potencial entre el valor del diámetro de Sauter, $d_{3,2}$ y la densidad de energía, E_v . En dicha gráfica también se compara el ajuste potencial cuando se varía la concentración de harina y se mantiene constante la velocidad de agitación (N), y el ajuste presentado en el apartado IV 2.2.2.B (figura 2.2.2.7), en el que se variaba la velocidad de agitación y se mantenía constante la concentración. Puede observarse como para la variación de la concentración se obtiene un exponente igual a 2,

mientras que en el caso de la velocidad de agitación el exponente obtenido era de 0,6.

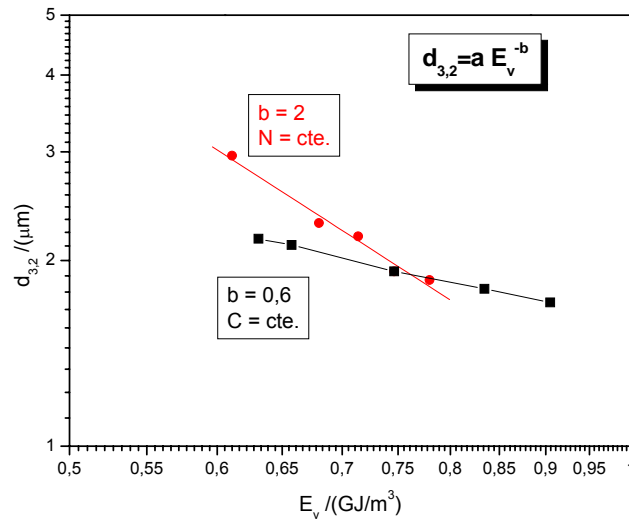


Figura 2.2.3.6. Variación del diámetro de gotas con la densidad de energía para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

C) Propiedades viscoelásticas lineales

En la tabla 2.2.3.1 se recogen los valores de deformación crítica (γ_c) donde se puede observar que las emulsiones con menor concentración de emulsionante (0,25 y 0,375 %) presentan valores sensiblemente inferiores al resto. A partir de 0,50 % de harina la deformación crítica permanece prácticamente constante.

Tabla 2.2.3.1. Evolución de la deformación crítica para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Concentración de harina en la emulsión (% en peso)	γ_c (%)
0,25	4,21
0,375	4,34
0,50	9,68
1,25	10,03
2,50	10,02
3,75	9,89

5,00	11,16
6,25	10,07

En la figura 2.2.3.7 se observa la evolución que experimentan los valores de los módulos viscoelásticos lineales, G' y G'' al aumentar la concentración de emulsionante.

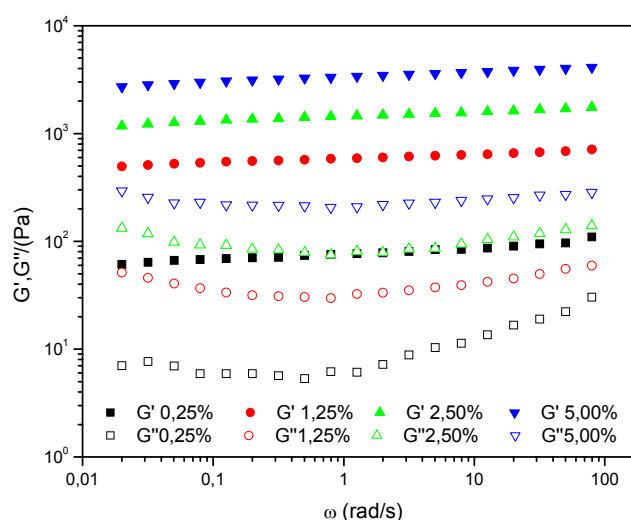


Figura 2.2.3.7. Evolución de los espectros mecánicos para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Como puede apreciarse se produce un aumento acusado de los valores de G' y G'' (de dos órdenes de magnitud) con el incremento de la concentración. Además, se produce una extensión de la zona plateau del espectro mecánico en la que el mínimo de G'' se suaviza progresivamente con la concentración. Ambos efectos pueden relacionarse con el reforzamiento del entramado estructural de la emulsión.

En la figura 2.2.3.8 se presentan los valores de los parámetros reológicos obtenidos a partir de ensayos viscoelásticos dinámicos. El módulo plateau aumenta constantemente con la concentración, si bien parece producirse un cambio de tendencia a 0,50 %, similar a lo que se obtuvo para los parámetros de la DTG y la deformación crítica.

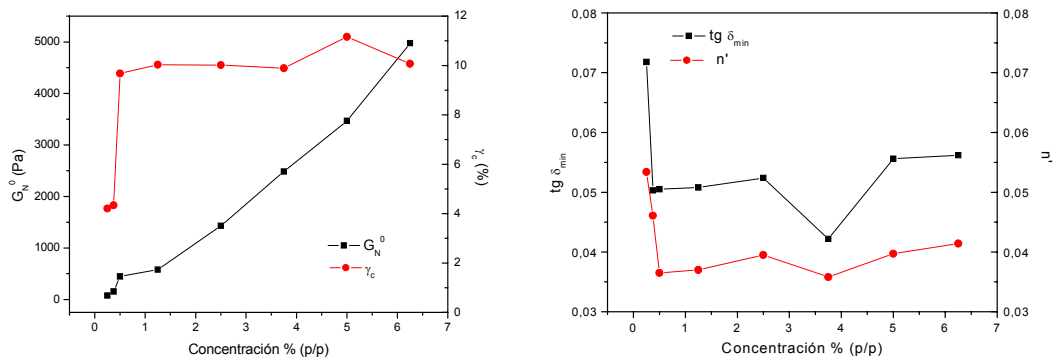


Figura 2.2.3.8. Evolución de los parámetros G_N^0 , γ_c , $\text{tg } \delta_{\min}$ y n' para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

En cuanto a los valores de $\text{tg } \delta_{\min}$, n' y γ_c todas las emulsiones presentan valores muy parecidos a diferencia especialmente, de nuevo, de la de 0,25 y 0,375 % (p/p) donde se pueden apreciar valores significativamente más altos para los dos primeros parámetros y más bajos para el tercero.

A partir de una concentración de harina de 0,50%, que probablemente corresponde una situación de exceso de emulsionante, los valores de deformación crítica, tangente de delta y n' permanecen constantes, o con una ligera tendencia a su incremento.

D) Correlación de parámetros reológicos con microestructurales

Una vez evaluados los parámetros correspondientes a la DTG y a las propiedades viscoelásticas lineales, en el presente apartado se intentará correlacionar dichos resultados con algunos parámetros estructurales.

En la figura 2.2.3.9 se representa los parámetros más significativos de los apartados estudiados donde se resalta una evolución bastante similar del módulo de plateau y la densidad de energía.

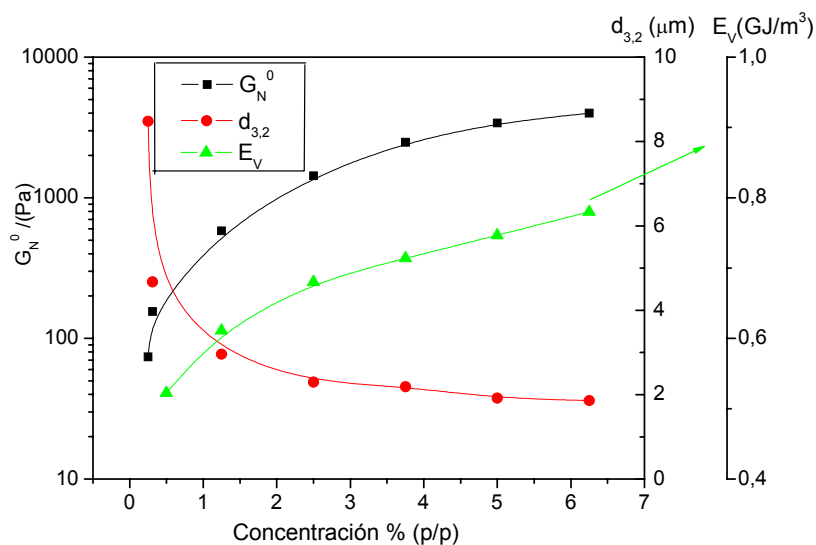


Figura 2.2.3.9. Evolución de los parámetros densidad de energía, diámetros de Sauter y modulo Plateau para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Princen y Kiss (1986) propusieron una ecuación que relaciona el modulo de cizalla elástico a baja deformación con la tensión interfacial, la fracción volumétrica de fase dispersa y el diámetro medio de Sauter, para emulsiones polidispersas altamente concentradas. Algunos autores han usado con éxito esta ecuación para correlacionar parámetros reológicos y estructurales para emulsiones estabilizadas con tensioactivos (Pal, 2006; Pons, Solans y Tadros, 1995; Princen y Kiss, 1986; Sánchez y col., 1998) o con tensioactivos poliméricos (Perrin, 2000; Mason, Lacasse, Levine, Grest Bibette y Weiltz, 1997). Estos últimos autores, trabajando con emulsiones concentradas monodispersas estabilizadas con SDS han obtenido una curva maestra universal para la evolución de G' que obedece a la siguiente relación:

$$G' \propto \frac{2\sigma}{d_{3,2}} \cdot \phi(\phi - \phi_0) \quad (2.2.3.1)$$

donde ϕ es la fracción en volumen de aceite, σ es la tensión y ϕ_0 es la fracción de volumen de máximo empaquetamiento que tiene un valor de 0,64 para esferas monodispersas empaquetadas al azar. De esta forma, se considera que la reología de las emulsiones está gobernada por una red tridimensional de películas

interfaciales que siguen las ecuaciones de Princen y Kiss o Mason y colaboradores. Algunos autores han querido extrapolar este estudio a emulsiones estabilizadas con proteínas (Bressy, Hebraud, Schmitt y Bibette, 2003; Dimitrova y Leal-Calderon, 2001 y 2004). Sin embargo, los valores obtenidos experimentalmente para el módulo elástico son muy superiores a los que predice la ecuación de Mason, posiblemente debido a la existencia de algún factor que produce un aumento adicional de la elasticidad de la emulsión. Estudios previos con emulsiones concentradas estabilizadas con aislado de soja o gluten, utilizaron el modelo de Mason para correlacionar los valores de los parámetros microestructurales y el módulo de plateau, obteniéndose, un ajuste adecuado pero sobrestimando los valores del módulo plateau para las emulsiones más concentradas de gluten (Bengoechea y col., 2006).

A partir de estos resultados previos, se representó el módulo de plateau, G_N^0 , calculados de acuerdo con la ecuación 2.2.3.1 y los valores experimentales en función de la concentración de harina de cangrejo (figura 2.2.3.10).

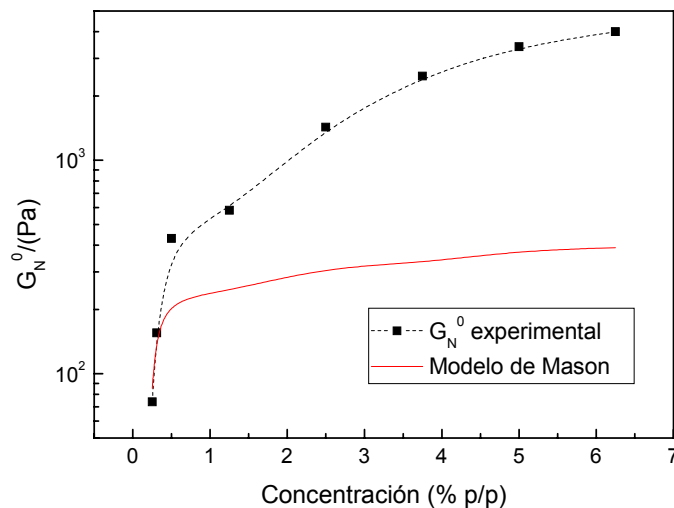


Figura 2.2.3.10. Evolución del módulo de plateau en función de la concentración de harina de cangrejo para emulsiones que contienen 75 % (p/p) de aceite procesadas a 6000 r.p.m.

Como se puede observar los valores experimentales muestran una importante desviación sobre los calculados a partir de una concentración de harina por encima

del 0,50 % (p/p). Estas desviaciones, las cuales aumentan con el contenido de proteínas, coinciden con el valor de la concentración a partir de la cual existe una saturación evidente de la interfase y no pueden ser explicadas únicamente teniendo en cuenta el espesor de la capa interfacial. Dimitrova y col. (2004) surgieron que las capas de proteínas en la superficie de las gotas contribuyen a la elasticidad de la emulsión. Para demostrar este efecto, se añadieron diferentes cantidades de tensioactivo aniónico (SDS) a una emulsión de harina de cangrejo (2,5 % (p/p), pH 11,5 y velocidad de procesado de 6000 r.p.m.) con el objetivo de desplazar las moléculas de proteína de la interfase rompiendo los flóculos. El desplazamiento de la proteína de la interfase por un emulsionante de bajo peso molecular es un fenómeno bien conocido, descrito por Chen y Dickinson (1998). Para ello, se ha realizado un estudio tanto de las propiedades viscoelásticas lineales como de los tamaños de gota de las emulsiones. En la figura 2.2.3.11 se muestran los resultados obtenidos de los barridos de frecuencia para las emulsiones con adición de diferentes cantidades de SDS.

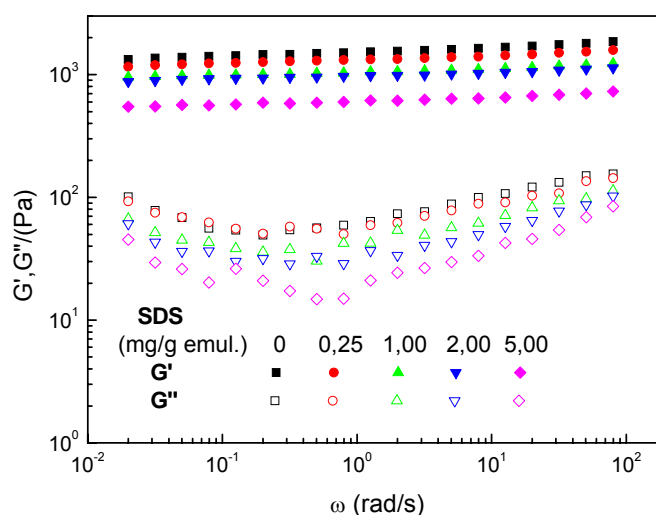


Figura 2.2.3.11. Influencia de la adición de SDS en los módulos de almacenamiento y pérdidas obtenidos a 20°C en función de la frecuencia, para una emulsión que contiene 75 % (p/p) de aceite y 2,5 % (p/p) de harina de cangrejo procesada 6000 r.p.m.

Se observa un importante descenso en G' y G'' con el contenido de SDS que puede ser atribuido al proceso de defloculación. A su vez se realizaron medidas de tamaño de gotas añadiendo defloculante, tal como se mostró en la parte experimental (apartado III 2.2.4 C) y sin adición. Se observó que las emulsiones presentan un índice de floculación de 6 que se reduce a 1 (no floculación) para las emulsiones con concentraciones más elevadas de SDS. Los resultados de los parámetros obtenidos se pueden observar en la tabla 2.2.3.2.

Tabla 2.2.3.2. Valores de los parámetros G_N^0 y $d_{3,2}$ con y sin defloculante para una emulsión con diferentes cantidades de SDS que contiene 75 % (p/p) de aceite y 2.5 % (p/p) de harina de cangrejo procesadas a 6000 r.p.m.

SDS (mg / g. emulsión)	G_N^0 (Pa)	$d_{3,2}$ sin defloculante (μm)	$d_{3,2}$ con defloculante (μm)
0	1453,17	8,34	2,38
0,25	1265,27		
1	999,18		
2	938,49		
5	599,02	2,27	2,31

La reducción en los valores experimentales de G_N^0 experimental se puede observar en la figura 2.2.3.12.

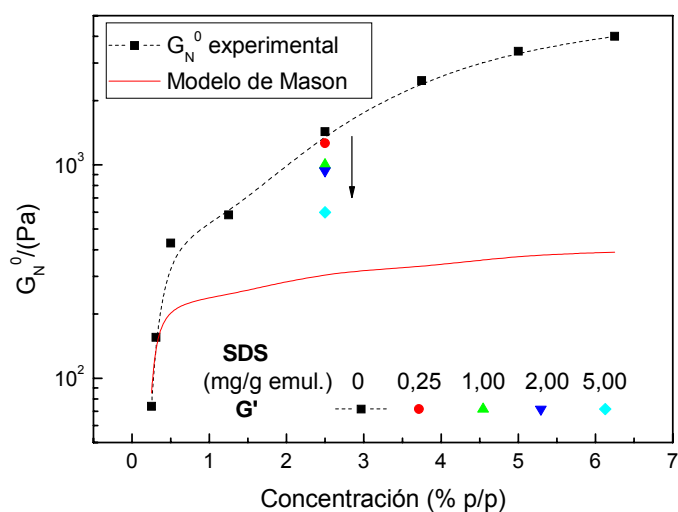
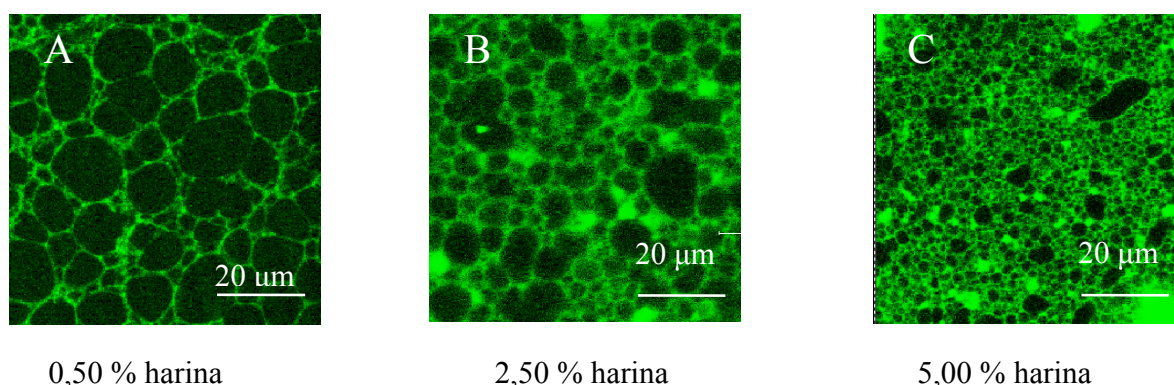


Figura 2.2.3.12. Evolución del módulo de plateau en función de la concentración de harina de cangrejo y de la concentración de SDS para emulsiones que contienen 75 % (p/p) de aceite procesadas a 6000 r.p.m. (La flecha indica la dirección del aumento de SDS).

Se obtiene una reducción para los mayores valores de contenido de SDS alrededor del 60%, sin embargo, como se puede observar no llega al alcanzar el nivel predicho por la ecuación de Mason. Este fenómeno puede ser debido al incremento de la consistencia de la fase continua producido por el desplazamiento de las proteínas de la interfase, aunque las fuerzas de depleción debido al exceso de proteínas pueden también actuar en estos sistemas.

E) Microestructuras y apariencia visual de las emulsiones

En la figura 2.2.3.13 se presentan las imágenes obtenidas usando microscopia Confocal (CLSM) para emulsiones preparadas a diferente concentración de harina. Puede observarse con claridad como se produce una reducción de tamaño de gota a medida que aumenta la concentración de harina.



0,50 % harina

2,50 % harina

5,00 % harina

Figura 2.2.3.13. Imágenes de microscopía Confocal (CLSM) obtenidas para emulsiones que contienen diferente concentración de harina (p/p) a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

La región de área brillante corresponde a la presencia de proteínas que presentan autofluorescencia. En el seno de la fase acuosa (continua) se encuentra una fase oscura correspondiente a las gotas de aceite de la fase dispersa. Como se puede apreciar se produce una extensión de las zonas autofluorescentes al aumentar la concentración de emulsionante. Este efecto debe estar relacionado con el exceso de proteínas superior al necesario para saturar la interfase, que se produce a partir de una concentración de harina de 0,50 % (p/p). Las imágenes proporcionadas por microscopía confocal muestran que se trata de emulsiones muy floculadas similares a las obtenidas para emulsiones de soja y gluten (Bengoechea y col., 2006). Langton y col. (1999) obtuvieron imágenes similares para muestras no diluidas de emulsiones muy concentradas estabilizadas con yema de huevo, en las que la morfología de la fase acuosa fue descrita en términos de una red de agregados de proteínas de yema.

En la figura 2.2.3.14 se muestra la evolución de la apariencia visual de las emulsiones con la concentración de harina. Como puede apreciarse, se produce una evolución muy acusada desde emulsiones con una apariencia de fluido (0,25 y 0,375 % (p/p)) a emulsiones cuya apariencia es típica de emulsiones concentradas tipo mayonesas (entre 0,50 y 1,25 % (p/p)) y emulsiones tipo gel para concentraciones mayores al 1,25 % (p/p).

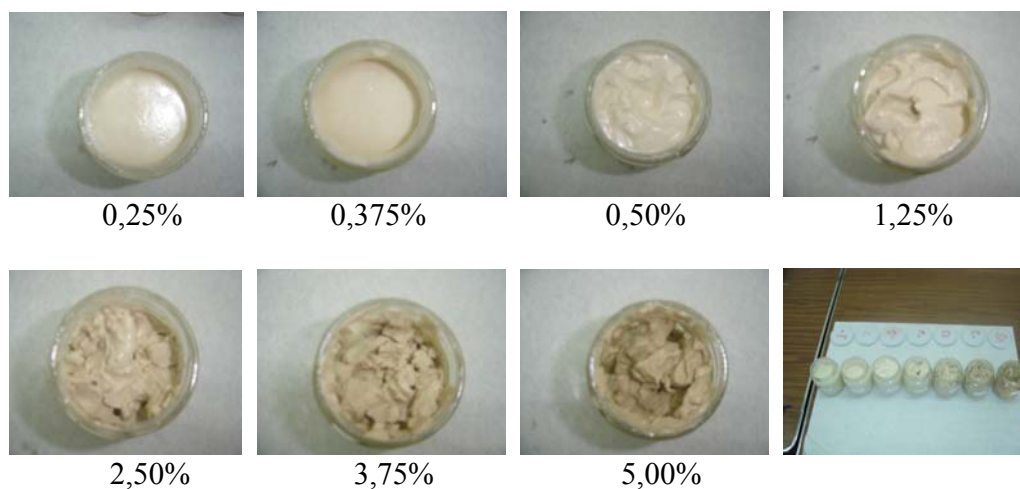


Figura 2.2.3.14. Apariencia visual de emulsiones que contienen diferente concentración de harina (p/p) a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

F) Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad física es la propiedad más importante de las emulsiones. Para estudiar la estabilidad con el tiempo, se han preparado emulsiones a pH 11,5 y a diferente concentración de harina que fueron almacenadas a 5°C tras su preparación. Se llevaron a cabo medidas de las propiedades viscoelásticas lineales y de la distribución de tamaño de gotas a lo largo del tiempo de almacenamiento. Para estudiar la evolución con el tiempo se utilizaron los parámetros de DTG y viscoelasticidad lineal seleccionados en el apartado IV 2.2.1.

En la siguiente gráfica (figura 2.2.3.15) se observa la evolución de G_N^0 y del diámetro de Sauter ($d_{3,2}$) con el tiempo de almacenamiento. Ambos parámetros proporcionan una información suficientemente fiable por lo que dicha gráfica puede ser considerada un diagrama de estabilidad.

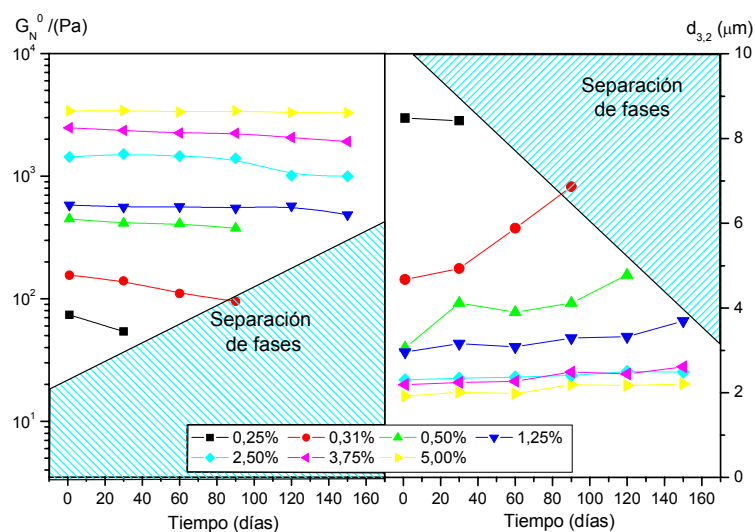


Figura 2.2.3.15. Diagrama de estabilidad. Evolución de G_N^0 y $d_{3,2}$ en función del tiempo para emulsiones que contienen diferente concentración de harina (p/p) a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Como puede observarse, las emulsiones estudiadas son muy estables por encima de una concentración crítica (1.25 % en peso aproximadamente) sin que ninguna evolución significativa del módulo de Plateau o tamaño de gota tuviera lugar tras 5 meses. Esto conlleva que ningún tipo de desestabilización física fuese detectado. Sin embargo, por debajo de un valor crítico de concentración de harina de cangrejo, se produce un descenso del módulo Plateau, así como un aumento en el $d_{3,2}$ con el tiempo, seguidos de la aparición de dos fases (una oleosa en la parte superior y otra acuosa en la inferior) debido al proceso de cremado. Estos efectos en G_N^0 y $d_{3,2}$, y, por tanto, en la estabilidad se hacen más evidentes a medida que disminuye la concentración de emulsionante. En el diagrama de estabilidad se ha señalado aquella región donde la probabilidad de cremado es muy elevada. Como conclusión puede observarse en la figura 2.2.3.15, que para valores de $G_N^0 > 1000$ Pa y $d_{3,2} < 3 \mu\text{m}$ se obtienen emulsiones muy estables, al menos en un periodo de 5 meses.

De igual forma se pueden establecer regiones de estabilidad considerando la evolución de la deformación crítica, γ_c y del diámetro volumétrico, $d_{4,3}$, (figura 2.2.3.16) aunque la correspondencia entre estos parámetros y la estabilidad no parece tan fiable como en el caso anterior. De nuevo se observa que la

concentración límite para el cambio de comportamiento frente al cremado corresponde al 1,25 % en peso de harina. Por encima de esta concentración, se observan valores superiores de γ_c e inferiores de $d_{4,3}$. Los valores críticos de estabilidad pueden deducirse a partir de los resultados representados en la figura 2.2.3.16 y son 8 % y 10 μm para la deformación crítica y el diámetro volumétrico, respectivamente. A estos valores críticos corresponde una concentración de harina que como se ha comentado anteriormente se encuentra en el 1,25 % en peso aproximadamente.

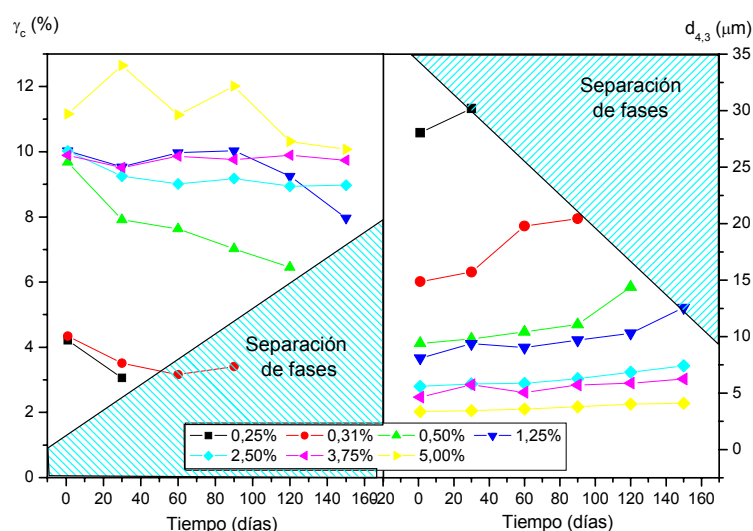


Figura 2.2.3.16. Diagrama de estabilidad. Evolución de γ_c y $d_{4,3}$ a lo largo del tiempo para emulsiones que contienen diferente concentración de harina a pH 11,5 procesadas a 6000 r.p.m.

Para el resto de parámetros estudiados (U , $\text{tg } \delta_{\text{min}}$ y n') no se obtienen evoluciones que permitan establecer valores críticos que delimiten regiones de estabilidad.

2.2.4 Influencia de la modificación del pH

En este apartado se estudia la influencia del pH sobre el procesamiento de emulsiones de harina de cangrejo. Como se comentó anteriormente el proceso de emulsificación directa a valores intermedios de pH no es posible con el sistema UT-T50. Las proteínas tienden a estabilizar las gotas mediante la combinación de

repulsiones electrostáticas y estéricas, siendo su eficacia particularmente sensible al pH y a la fuerza iónica (Petursson y col., 2004). Por consiguiente, es especialmente importante tener en consideración el punto isoeléctrico de la proteína, que se encuentra a pH en torno a 3,4 (Apartado IV 1.1.4).

La baja capacidad emulsionante de la proteína a pH cercano al punto isoeléctrico puede atribuirse a la débil participación de las interacciones electrostáticas y a la baja solubilidad de las proteínas en esas condiciones (algo menos del 25% al pI). También debe tenerse en cuenta la desnaturalización de las proteínas durante el proceso de fabricación de la harina debido a las elevadas temperaturas que se alcanzan en el horno rotatorio (unos 160°C). Este hecho ha sido confirmado por la ausencia de pico endotérmico en las pruebas de DSC realizadas.

En consecuencia, para conseguir emulsiones estables con este producto debe explorarse algún procedimiento de mejora de la funcionalidad. Existen en la bibliografía varias alternativas para intentar mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas. En primer lugar, existen métodos que tratan de producir cierto grado de desnaturalización mediante tratamiento térmico o de alta presión (Chapleau y de Lamballerie-Anton, 2003, Demetriades y col., 1997; Speroni y col., 2005). El objetivo, en este caso, sería aumentar la hidrofobicidad superficial de las proteínas favoreciendo las interacciones hidrofóbicas que permitan el anclaje de la proteína a la interfase (Petursson y col., 2004). No obstante, en este caso, dado el tratamiento térmico sufrido durante el proceso de fabricación de la harina, esta vía no parece la más aconsejable. Otra alternativa consiste en someter a la proteína a cierto grado de hidrólisis para modificar sus características funcionales y mejorar su calidad (Kristinsson y Rasco, 2000, Vioque y col., 2000; Liseaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999). Una limitación de este método consiste en la necesidad de aislar la proteína previamente. En el presente trabajo se ha intentado una cuarta alternativa, distinta a las anteriores, que consiste en la utilización de un proceso indirecto para la preparación de la emulsión. Este proceso consiste en preparar la emulsión en las condiciones más favorables (alto valor de pH) con el objetivo de obtener una emulsión estable y, una vez estabilizada la interfase aceite-agua, modificar el pH a

través de una agitación suave para minimizar la coalescencia inducida por cizalla. Este proceso indirecto se divide en tres etapas:

1. Preparación de la emulsión a valores de pH extremos, en torno a pH 11,5, donde la aplicación alimentaria de la emulsión no sería posible. Con ello se pretende favorecer las interacciones electrostáticas entre las moléculas de proteínas a pH alejado del pI, presentando una importante densidad de carga superficial. En este punto se lleva a cabo la adsorción y estabilización de las moléculas de proteína en la interfase. Esta emulsión a pH 11,5 es la que se denominó emulsión de referencia o control.
2. La segunda etapa de este procedimiento consiste en una maduración después de la emulsificación, la cual contribuye al desarrollo de una microestructura tipo gel que depende de la temperatura de almacenamiento. Así, de acuerdo con los resultados obtenidos al estudiar la influencia del tiempo de almacenamiento a corto plazo, tras la preparación de la emulsión (apartado III 3.2.1. C), es necesario un tiempo mínimo de 400 minutos a 4°C para dar por concluida la evolución de la emulsión, al menos a corto plazo (figura 2.2.1.8). En consecuencia, como ya se comentó, todas las emulsiones se almacenaron a 4°C durante 24 horas para completar la etapa de maduración. Además, la elección del almacenamiento a baja temperatura contribuye a mejorar la estabilidad física y preservar la estabilidad microbiológica de estas emulsiones. De esta forma, aprovechando la formación de la emulsión a pH extremo las proteínas ya se han desplegado sobre la superficie de las gotas. A continuación habrá que evaluar si un cambio de pH produce un desplazamiento elevado o no de las proteínas de la interfase.
3. La última etapa consiste en la modificación del pH mediante la adición de HCl 2M con agitación manual moderada para minimizar el proceso de coalescencia por cizalla.

Este estudio se ha llevado a cabo utilizando la emulsión de referencia con 75% (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 11,5, procesada a 6000 r.p.m. a 20°C durante 7 minutos (6 minutos de adición de aceite más un minuto para

homogeneización). A esta emulsión de referencia se le han ido adicionando distintas cantidades de HCl 2M para ajustar el pH hasta el valor deseado.

A) Curvas de distribución de tamaño de gotas

En la figura 2.2.4.1 se presenta las curvas de distribución de tamaño de gotas para emulsiones a diferentes valores de pH preparadas a partir de la emulsión de referencia.

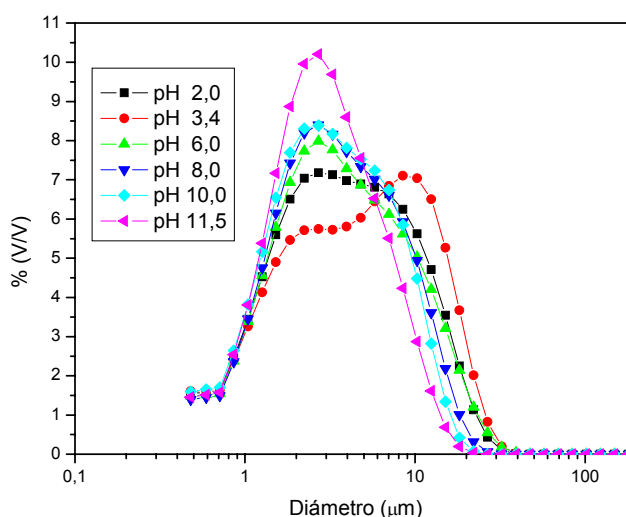


Figura 2.2.4.1. Evolución de curvas de distribución de tamaño de gotas para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

Se puede observar que a medida que disminuye el pH, se produce un desplazamiento hacia mayores tamaños con picos más anchos. También puede observarse el desarrollo de un segundo pico que resulta aún más claro en el punto isoeléctrico.

Los valores de los parámetros obtenidos a partir de la DTG reflejan la misma evolución con el pH, como puede apreciarse en la figura 2.2.4.2 con la aparición de valores superiores para los diámetro de Sauter y para la relación de uniformidad a valores cercanos al pI. Esta evolución puede atribuirse a un proceso de coalescencia favorecido por el hecho de que las repulsiones electrostáticas no son

suficientemente elevadas para prevenir la coalescencia de las gotas (Petursson y col., 2004).

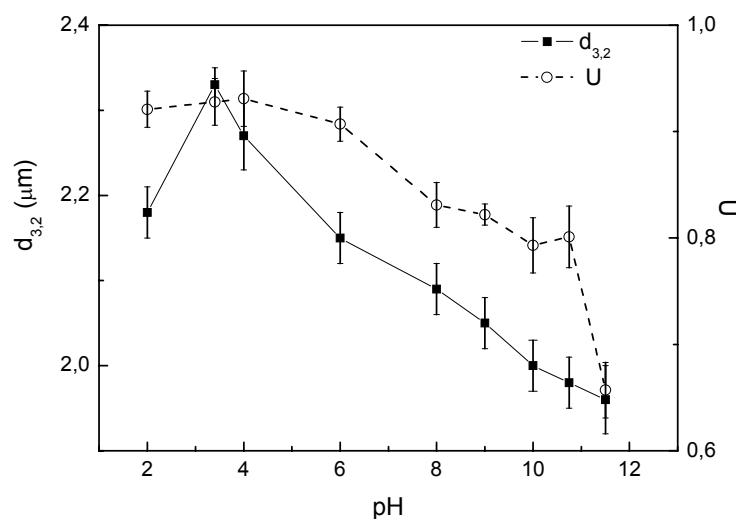


Figura 2.2.4.2. Evolución de los parámetros $d_{3,2}$ y U para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

Por tanto, al disminuir el pH de la emulsión parece inevitable que se produzca cierto grado de coalescencia durante la etapa de mezclado necesaria para obtener una buena homogeneización de la emulsión. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de utilizar agitación suave durante la etapa de modificación del pH, para limitar la coalescencia inducida por cizalla.

B) Propiedades viscoelásticas lineales

En la tabla 2.2.4.1 se recogen los valores de deformación crítica obtenidos en los barridos de deformación realizados a 1 Hz.

Tabla 2.2.4.1. Evolución de la deformación crítica para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de referencia.

pH	γ_c (%)
11,50	$10,27 \pm 0,34$
10,75	$8,67 \pm 0,23$
10,00	$8,51 \pm 0,16$
9,00	$7,84 \pm 0,19$
8,00	$6,88 \pm 0,12$
6,00	$4,78 \pm 0,16$
4,25	$4,30 \pm 0,30$
3,40	$4,24 \pm 0,23$
2,00	$4,85 \pm 0,10$

Las emulsiones estudiadas presentan un amplio intervalo viscoelástico lineal el cual depende de los valores de pH. La deformación crítica permanece casi constante a pH ácidos, apareciendo un incremento a medida que nos alejamos del punto isoeléctrico. Esto se explica por un mayor desarrollo del entramado estructural del sistema.

Las funciones viscoelásticas lineales obtenidas a distintos valores de pH se presentan en la figura 2.2.4.3 en función de la frecuencia.

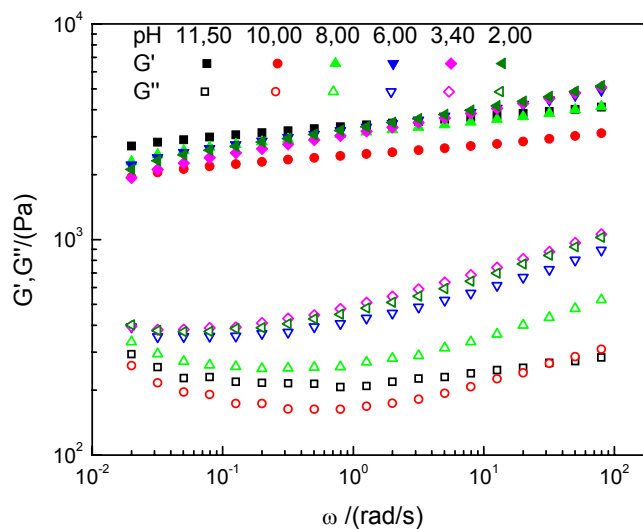


Figura 2.2.4.3. Evolución de los espectros mecánicos para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

La modificación del pH desde 11,5 produce en todos los casos un debilitamiento estructural que en algún caso se refleja como una disminución de los valores de los módulos viscoelásticos y en otros (a valores más bajos de pH) como una reducción de la zona plateau del espectro mecánico, con un desplazamiento del mínimo de G'' hacia frecuencias más bajas.

En la figura 2.2.4.4 se presentan los valores de los parámetros reológicos calculados a partir de los espectros mecánicos.

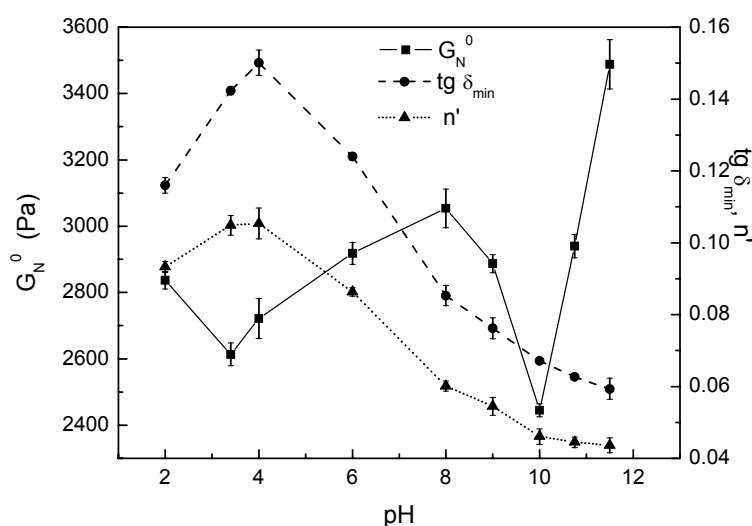


Figura 2.2.4.4. Evolución de los parámetros G_N^0 , γ_c , $\text{tg } \delta_{\min}$ y n' para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

En las proximidades del punto isoeléctrico se obtiene un mínimo del módulo plateau que coincide con el valor del mínimo de la deformación crítica, siendo la evolución de ambos parámetros similar en condiciones ácidas y hasta un valor de pH igual a 8. Del mismo modo se obtienen valores máximos en el pI para la tangente de pérdidas correspondiente al mínimo y para la pendiente n' de la función $G'(\omega)$. De hecho, los valores de tangente de pérdidas en el mínimo y de la pendiente son muy similares, mostrando un valor máximo en el punto isoeléctrico. Todos estos parámetros confirman la existencia de un debilitamiento del entramado estructural debido a la reducción de las interacciones electrostáticas al disminuir el

pH. Los resultados obtenidos entre pH 2 y 8 concuerdan además con la evolución de los parámetros de DTG.

En cambio, la evolución del módulo plateau a pH alcalino es muy diferente de lo que cabría esperar a partir de los perfiles de DTG. Así, el módulo plateau presenta un mínimo a pH 10, aún más claro que el obtenido en el pI a pesar de que la evolución de los parámetros de la DTG es moderada en la zona alcalina (una reducción del pH de 11,5 a 10 produce una disminución de los diámetros $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ de 3 y 10 % respectivamente). Este mínimo en el módulo plateau deberá considerarse desfavorable para la estabilidad de la emulsión y puede relacionarse con el segundo mínimo encontrado en la solubilidad en torno a pH 10 (Apartado III 1.2.2, figura 1.2.2.1). Estos resultados sugieren que los segmentos en forma de varilla de la miosina de las proteínas miofibrilares juegan un papel importante en la estabilización de emulsiones de harina de cangrejo. De hecho, según Xiong (1997), la miosina y la actomiosina son las proteínas musculares que presentan mejores propiedades emulsionantes. Por tanto, el punto isoeléctrico de los “rod segments” de las proteínas miofibrilares (aproximadamente a 10,5) no es adecuado para la obtención de emulsiones de proteínas de cangrejo, si se quieren conseguir óptimos valores de los parámetros viscoelásticos.

C) Estabilidad de las emulsiones

Se ha realizado un nuevo estudio de envejecimiento para estudiar la variación de los parámetros DTG y reológicos con el tiempo. En este caso, se ha mantenido constante la concentración de harina de cangrejo (5 %) evaluando la estabilidad de las emulsiones preparadas a diferentes valores de pH.

C.1 Distribución de tamaño de gotas

En la figura 2.2.4.5 se muestra la evolución de la DTG a lo largo del tiempo de almacenamiento para emulsiones preparadas a dos pH diferentes (pH 3,4 y 11,5). El primer valor seleccionado es el correspondiente al pI donde la solubilidad de la

proteína es mínima (pH 3,4), mientras que el segundo corresponde a la emulsión de control, preparada a pH 11,5, que presenta lo mayores valores de solubilidad.

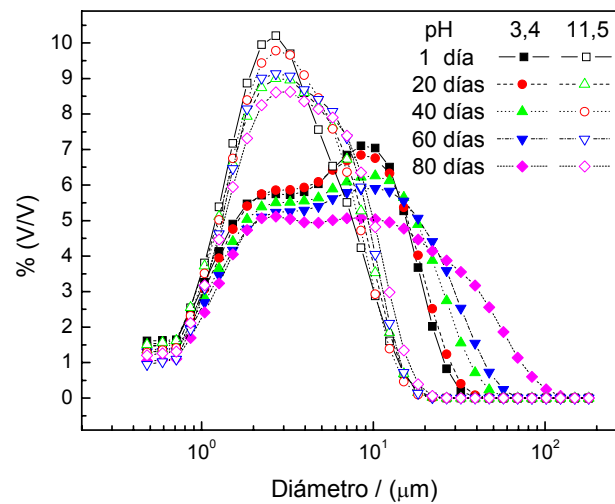


Figura 2.2.4.5. Evolución de las distribuciones de tamaño de gotas para emulsiones que contiene 75 % (p/p) y 5 % (p/p) de harina de cangrejo procesadas a 6000 rpm a diferentes valores de pH (3,4 y 11,5) en función del tiempo de almacenamiento.

En la figura 2.2.4.6 se pueden observar la variación de los parámetros $d_{3,2}$ y U a lo largo del tiempo.

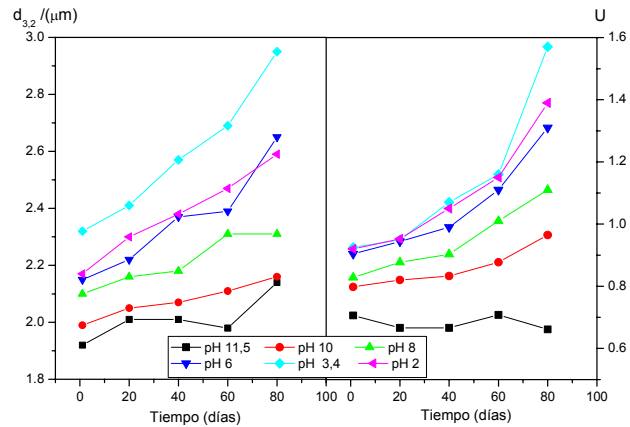


Figura 2.2.4.6. Evolución de $d_{3,2}$ y U a lo largo del tiempo para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

Puede observarse claramente como las emulsiones que poseen mayores valores de tamaño de gota y uniformidad a tiempos cortos son las que se encuentran a pH más próximo al punto isoeléctrico y son, a su vez, las que experimentan mayores subidas de ambos parámetros con el tiempo. En las cercanías del punto isoeléctrico las interacciones electrostáticas son más débiles, permitiéndose la floculación y posterior coalescencia de las gotas, proceso claramente favorecido con el tiempo debido al carácter cinético de la estabilidad de una emulsión.

Se ha utilizado un índice de coalescencia (CI) de acuerdo a la definición dada por Castellani y col. (2006), como una relación entre las áreas superficiales de la emulsión inicial, a_0 , y de la emulsión tras un tiempo t , $a(t)$. Esta ecuación también puede ser escrita en términos de diámetros medios de Sauter:

$$CI = \left[1 - \frac{a(t)}{a_0} \right] = \left[1 - \frac{d_{3,2}(0)}{d_{3,2}(t)} \right] \quad (2.2.4.1)$$

En esta ocasión el valor de referencia $d_{3,2}(0)$ elegido fue el $d_{3,2}$ obtenido 24 horas después de la emulsificación, donde las evoluciones a corto tiempo estaban completamente finalizadas.

En la tabla 2.2.4.2 se muestran los valores de los índices de coalescencia en función del tiempo. Todos los valores de los índices de coalescencia aumentan con el tiempo dependiendo de la proximidad al punto isoeléctrico. De esta forma, los mayores valores corresponden al punto isoeléctrico y a pH 6, 80 días después de la emulsificación, donde el efecto inicial del cremado fue observado. Este punto corresponde a valores del índice de coalescencia cercano a 0,20.

Tabla 2.2.4.2. Índices de coalescencia (CI) a diferentes valores de pH en función del tiempo (40 y 80 días) provenientes de la emulsión de referencia.

pH	2,0	3,4	6,0	8,0	10,0	11,5
CI 40 días	0,084	0,097	0,093	0,041	0,034	0,045
CI 80 días	0,142	0,200	0,173	0,114	0,074	0,081

Así, para obtener emulsiones más estables es conveniente mantener la emulsión a pH lo más alcalino posible, pero siempre teniendo en cuenta la aplicación alimentaria, que permite valores de pH situado entre pH 3 y 8, aproximadamente.

C.2 Propiedades viscoelásticas lineales

La evolución de los parámetros viscoelásticos lineales viene a refrendar los resultados obtenidos a partir de los ensayos de DTG.

Así, la emulsión preparada mediante el método indirecto descrito, a pH aproximadamente igual al punto isoeléctrico, presenta los menores valores de deformación crítica (figura 2.2.4.7).

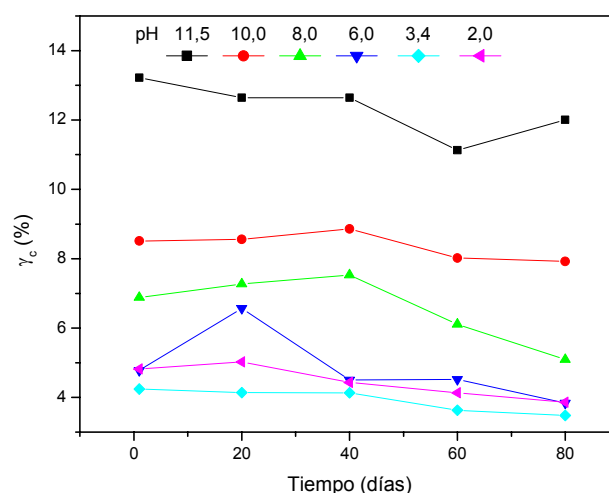


Figura 2.2.4.7. Evolución de γ_c en función del tiempo para emulsiones a diferente pH provenientes de la emulsión de control.

En todos los casos se produce una disminución de los valores de γ_c con el tiempo, si bien esta disminución no resulta significativa para las emulsiones con pH más elevados (11,5 y 10).

En la figura 2.2.4.8 se muestran los valores de las funciones viscoelásticas (módulos de almacenamiento y pérdidas) para las emulsiones a pH 3,4 y 11,5.

Como puede observarse existen importantes diferencias dependiendo del valor de pH. A los más altos valores de pH, no existe una significativa evolución en función del tiempo, ni en los valores de los módulos viscoelásticos ni en la forma de los espectros mecánicos. Por el contrario, en el punto isoeléctrico, la emulsión presenta un continuo descenso en G' y G'' , aunque sin cambios apreciables en su dependencia con la frecuencia. Como consecuencia, es posible efectuar una superposición con el objetivo de obtener un espectro mecánico maestro para cada pH, utilizando el módulo de plateau como parámetro de normalización (figura 2.2.4.9).

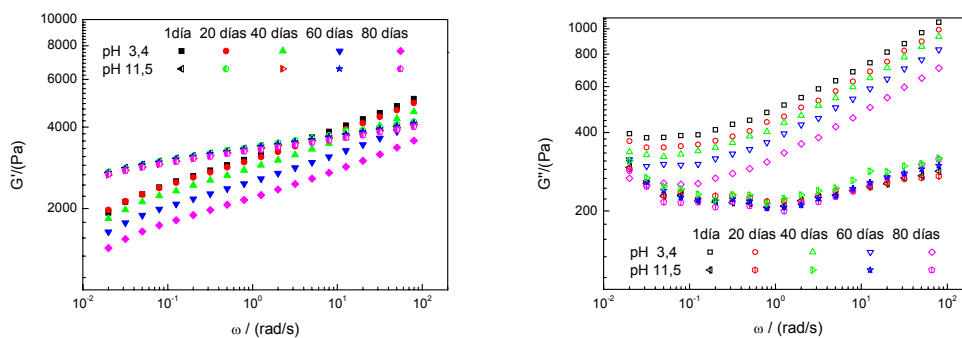


Figura 2.2.4.8. Propiedades viscoelásticas lineales para emulsiones provenientes de la emulsión de control a pH 3,4 y 11,5 en función del tiempo de almacenamiento.

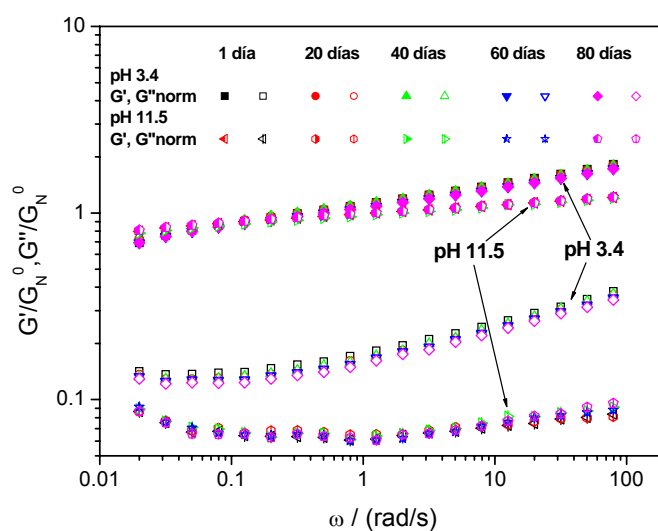


Figura 2.2.4.9. Normalización de las propiedades viscoelásticas lineales de emulsiones provenientes de la emulsión de control a pH 3,4 y 11,5 en función del tiempo de almacenamiento.

En la figura 2.2.4.10 se presenta la evolución de G_N^0 y $\text{tg } \delta_{\min}$ a lo largo del tiempo para emulsiones a diferentes pH.

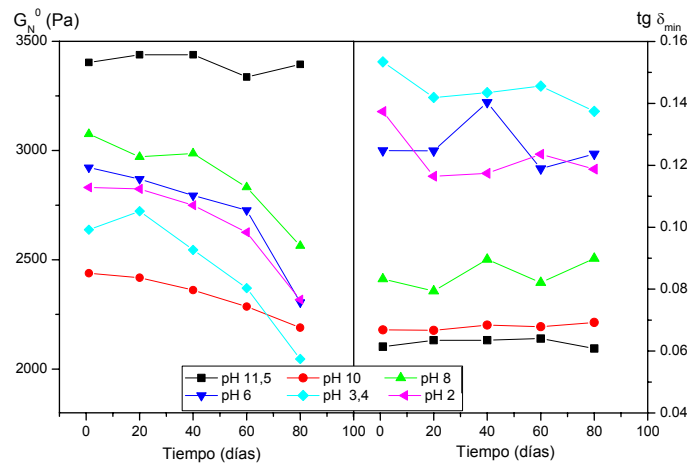


Figura 2.2.4.10. Evolución de G_N^0 y $\text{tg } \delta_{\min}$ a lo largo del tiempo para emulsiones a diferentes pH provenientes de la emulsión de control.

Como se puede observar los valores de la tangente de pérdidas en el mínimo no experimentan ninguna evolución importante a lo largo del tiempo, aunque se observa que las más cercanas al punto isoeléctrico son las que tienen valores de la tangente de pérdidas superiores, presentando de esta forma, un mayor carácter fluido. Además el hecho de la normalización, constatado anteriormente, denota que la evolución del entramado elástico puede ser explicada en términos de la modificación de la densidad de entrecruzamientos entre las gotas. Las variaciones a pH 11,5 y pH 10 con el tiempo son menos acusadas que las que se producen con el resto de emulsiones. Así, se puede observar un desplazamiento hacia menores valores cuando el pH se aproxima al punto isoeléctrico. Este comportamiento parece especialmente significativo por encima de 60 días donde se puede llegar a aparecer cremado.

Además de la desestabilización física encontrada en las emulsiones es muy importante reseñar la desestabilización microbiológica de las mismas cuando el pH es cercano al pH neutro. Este fenómeno se presenta especialmente para la emulsión de pH 6 que hace que los valores de los parámetros sean poco fiables a tiempos largos.

2.2.5 Tratamientos térmicos

En los apartados anteriores se han estudiado y caracterizado las emulsiones en diferentes condiciones de procesado y composición en base a parámetros reológicos y microestructurales. En el presente apartado se estudia la posibilidad de mejorar las propiedades de la emulsión una vez formada ésta. Existen diferentes estudios que revelan una relación entre reología, parámetros estructurales y estabilidad (Franco y col., 1995; Rahalkar, 1992). Uno de los factores que pueden modificar las propiedades de una emulsión, una vez formada, es la temperatura. Se han realizado diferentes estudios sobre la evolución de las propiedades reológicas de emulsiones sometidas a tratamientos térmicos mediante ensayos oscilatorios de baja deformación (Dickinson y Hong, 1995; Dickinson y Yamamoto, 1996 a,b; Dickinson y col., 1996; Chen y Dickinson, 1998; Dickinson y Cassanova, 1999; Moros y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de ellos se centran en emulsiones de muy baja viscosidad y con una fracción en volumen de fase oleosa relativamente baja, por lo que la aplicación de calor a la emulsión suele originar un cruce entre los módulos viscoelásticos G' y G'' , dando lugar a una transición desde un sistema con carácter predominantemente fluido hasta uno con un fuerte carácter elástico en el que se desarrolla un entramado tipo gel. En este estudio el tratamiento térmico se aplica a emulsiones de alto contenido en aceite, y va encaminado hacia el reforzamiento de un entramado estructural formado entre las moléculas de proteínas, lo cual debería traducirse en un aumento de estabilidad de la emulsión.

Los tratamientos térmicos se han realizado con emulsiones de aceite en agua con un 75% (p/p) de aceite y estabilizadas con un 5% (p/p) de harina de cangrejo (aprox. 3,25 % (p/p) de proteínas) a tres valores de pH diferentes: pH 11,5, que corresponde a la emulsión de referencia; 6, como valor intermedio en el que los resultados de estabilidad no son satisfactorios y, por último, a pH 3,4 que corresponde al punto isoeléctrico.

Se han realizado dos tipos de tratamientos térmicos: en el primero de ellos, se realizan rampas “in situ”, en el reómetro de deformación controlada. Este tipo de ensayos presenta la ventaja de que se puede efectuar un control tanto del programa

de calentamiento como de las propiedades reológicas durante el proceso. En el segundo de ellos se introduce la muestra en un reactor discontinuo sumergido en un baño termostático. La temperatura del baño es programable pero no se puede hacer un seguimiento de las propiedades reológicas durante el procesado.

A) Rampas “in situ”

A.1 Selección de condiciones

En primer lugar se han determinado las condiciones óptimas para el tratamiento térmico mediante una rampa “in situ” en un reómetro de deformación controlada. El grado de desnaturalización de las proteínas depende de la temperatura y del tiempo de calentamiento. Por tanto, la definición de la temperatura de calentamiento y la velocidad de calentamiento resultan decisivas en la ejecución de un adecuado procesado térmico. Para ello, se han realizado rampas de temperatura desde 20 a 90°C y a una frecuencia constante de 1 Hz, a diferentes velocidades de calentamiento para emulsiones a pH 6. Los resultados de estas rampas se comparan en la figura 2.2.5.1. Como la contribución de G' al módulo complejo, G^* , es mucho más importante que a G'' , el estudio del comportamiento termoreológico en este caso ha sido orientado al estudio de la evolución del módulo de almacenamiento.

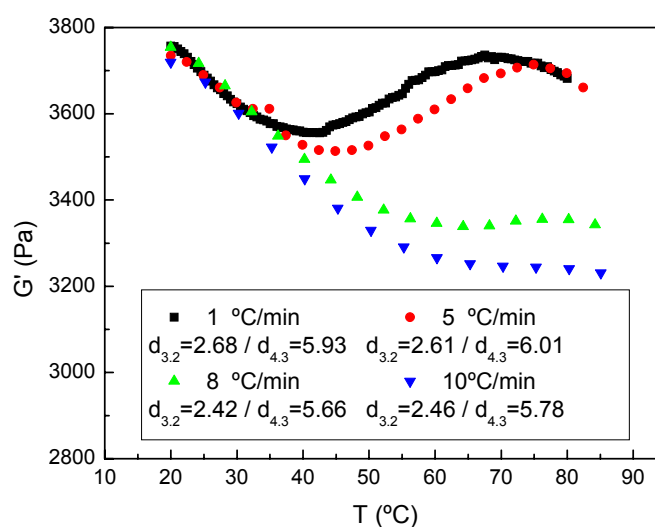


Figura 2.2.5.1. Evolución del módulo de almacenamiento (G') durante la aplicación de rampas de temperatura de 20 a 85° C a diferentes velocidades de calentamiento realizadas a emulsiones con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 6.

Durante la rampa de temperatura puede observarse que la evolución de los valores del módulo de almacenamiento puede dividirse en varias zonas:

1°. En un inicio, se produce un descenso acusado de G' independientemente de la velocidad de calentamiento. Este efecto es mucho más acusado para las mayores velocidades de calentamiento, prolongándose hasta las temperaturas más elevadas.

2°. En las curvas de calentamiento a velocidades moderadas, tras alcanzar un mínimo se observa un aumento de G' . Esta zona de subida de G' disminuye de forma drástica al aumentar la velocidad de calentamiento, llegando a desaparecer para el tratamiento a 10°C/min en el que el mínimo de G' se convierte en un plateau.

3°. Tras la zona de aumento de G' se alcanza un valor máximo a un valor de temperatura que depende de la velocidad de calentamiento empleada. Así, a medida que aumenta ésta se produce un desplazamiento del máximo hacia valores más altos de temperatura. Por consiguiente, para alcanzar dicho máximo es necesario sobrepasar una temperatura y un tiempo de procesado.

4°. Tras el máximo se produce una nueva zona de descenso de G' . Si esta zona se prolonga puede llegarse a la destrucción de la emulsión por coalescencia. Este efecto es especialmente patente en emulsiones procesadas a las velocidades de calentamiento más lentas, en las que los tamaños de las gotas después del tratamiento térmico son significativamente diferentes a los de la emulsión sin tratamiento ($d_{3,2} = 2,15$ y $d_{4,3} = 4,88$), como se puede observar en la figura 2.2.5.1. Por tanto, es conveniente impedir que se alcance esta zona durante el procesado térmico. Por otro lado, no se observan cambios significativos en el tamaño de las gotas en emulsiones procesadas a 8 y 10°C/min. Además, las emulsiones procesadas a las velocidades de calentamiento más lentas permanecen más tiempo a altas temperaturas, por lo que, el tiempo es un factor importante a considerar con el objetivo de evitar la rotura de la emulsión.

Estos resultados ponen de manifiesto que en los tratamientos térmicos es imposible separar los efectos de la temperatura y del tiempo, mostrando el módulo de almacenamiento siempre una fuerte dependencia tiempo-temperatura. Resultados similares a los obtenidos en este estudio se obtuvieron con emulsiones estabilizadas con yema de huevo (Moros y col. 2003) y para emulsiones con proteínas vegetales (Bengoechea 2006).

De acuerdo con estos resultados, conviene aprovechar al máximo el potencial de reforzamiento de la emulsión operando en condiciones próximas al máximo de G' pero sin sobrepasarlo. Para la rampa más lenta (1°C/min) el máximo se alcanza a 68 °C. Por ello se ha elegido la temperatura de 65 °C como temperatura máxima de procesado.

Presumiblemente, un procesado isotérmico posterior no debe producir destrucción estructural. Sin embargo, puesto que hay que seleccionar el resto de parámetros del tratamiento térmico (velocidad de calentamiento, tiempo de operación, etc.) se han realizado rampas de 20 a 65 °C a diferentes velocidades de calentamiento, seguidas de un proceso isotérmico a 65°C durante un tiempo prolongado.

Los resultados obtenidos se representan en la figura 2.2.5.2.

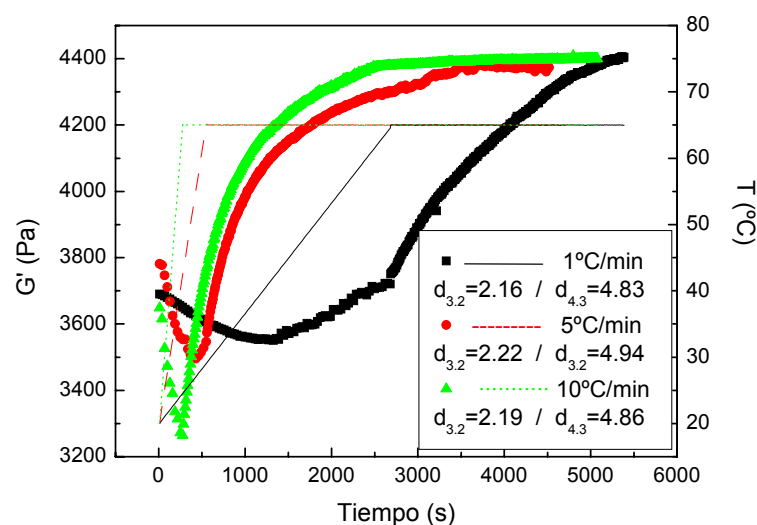


Figura 2.2.5.2. Evolución del módulo de almacenamiento (G') durante la aplicación de rampas de temperatura de 20 a 65 °C a diferentes velocidades de calentamiento realizadas a emulsiones con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 6.

A medida que aumenta la velocidad de calentamiento, se obtiene un mayor descenso inicial de G' , pero también se observa un aumento mucho más rápido de los módulos viscoelásticos. Por esta razón, parece más conveniente mantener una velocidad de subida rápida (10°C/min) seguido de un periodo isotérmico a 65 °C. Se ha seleccionado una duración de 50 minutos para este periodo isotérmico ya que no se observan variaciones importantes para un tiempo superior. Como puede observarse el resultado obtenido a tiempo infinito es prácticamente independiente de la historia térmica.

A la vista de estos resultados preliminares sobre tratamientos térmicos y con el objetivo de producir el mayor reforzamiento estructural que mejore la estabilidad de la emulsión se establecen las siguientes condiciones de operación:

1°) Rampas entre 20 y 65°C a una velocidad constante de 10°C/min a 1Hz de frecuencia

2°) Tramo isoterma a 65°C durante 50 minutos

3°) Bajada de temperatura desde 65 a 20°C a 10°C/min. Se ha seleccionado una velocidad de enfriamiento elevada ya que en estudios anteriores no se ha detectado una influencia significativa de este parámetro (Moros y col. 2003).

4º) Tramo isoterma a 20°C durante 10 minutos.

De esta forma se siguen los ciclos de calentamiento/enfriamiento similares a los encontrados en estudios previos (Chen y Dickinson, 1998; Dickinson y Hong, 1995; Kim y col., 2001; Moros y col., 2003; Bengoechea, 2006).

A.2 Resultados

Una vez establecidas las condiciones óptimas de operación para las rampas de temperatura “in situ”, se aplica el tratamiento a emulsiones preparadas a diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2.2.5.3.

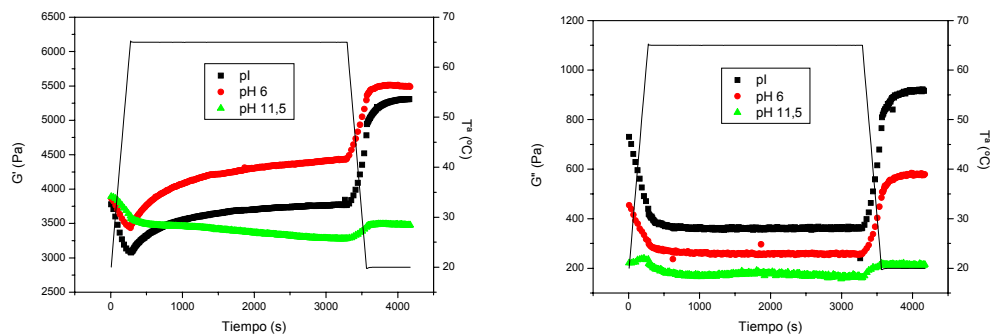


Figura 2.2.5.3. Evolución del módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdidas (G'') durante la aplicación de un ciclo térmico a emulsiones con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a diferentes pH.

Se pueden observar cuatro regiones claramente diferenciadas, que prácticamente corresponden a las cuatro zonas del ciclo térmico:

1. Una primera región, comprendida entre 20 y 65°C en la que se observa un descenso en G' y G'' que suele conducir hasta un mínimo.
2. La segunda etapa corresponde al tramo isoterma a 65°C donde hay un aumento progresivo del módulo elástico y un descenso de la tangente de pérdidas (no se producen cambios importantes en G''), hasta sendos valores asintóticos, tanto a pH 6 como a pH 3,4. Las emulsiones preparadas a pH 11,5 presentan un comportamiento diferente con un descenso continuo en G' .

3. La tercera etapa corresponde al enfriamiento el cual produce un aumento considerable de G' y G'' aunque de mayor magnitud en G' .
4. Corresponde al último tramo de equilibrado térmico a 20°C, en el que se alcanza una zona plateau para G' y G'' .

Las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre regiones polipeptídicas adyacentes son las principales propulsoras de las primeras etapas de gelificación a altas temperaturas. El crecimiento de los módulos viscoelásticos puede atribuirse a la presencia de entrecruzamientos entre grupos disulfuro que requieren ciertas condiciones térmicas y a la formación de puentes de hidrógeno favorecida en la etapa de enfriamiento (Dickinson y Hong, 1995).

Las proteínas sometidas a tratamientos térmicos experimentan importantes cambios conformacionales y cambios en la hidrofobicidad (Weegels y col., 1994). De esta forma se puede diferenciar:

Durante la etapa de calentamiento y zona isoterma a 65°C, las proteínas se abren y los grupos sulfhidrilos e hidrofóbicos pasan a estar expuestos a la fase continua formando agregados irreversibles entre moléculas. Resultados similares fueron encontrados por otros autores durante el calentamiento de emulsiones estabilizadas con β -lactoglobulina (Dickinson y col., 1992) o proteínas del suero de leche (Aguilera y col., 1993). Estos autores demostraron que se produce una fuerte interacción entre las moléculas de proteínas situadas en la interfase y las moléculas o agregados proteicos que se encuentran en el seno de la fase continua durante la primera etapa de gelificación. Yost y Kinsella, (1992) han observado mediante microscopía la existencia de tales interacciones entre las proteínas adsorbidas y las no adsorbidas en la interfase. En este tipo de emulsiones denominadas “gel emulsion” las interacciones entre proteínas adsorbidas y no adsorbidas suele ser fuerte y la capa viscoelástica de proteína que rodea a la gota de aceite juega un papel importante actuando como punto de anclaje que confiere estabilidad a la estructura.

Durante la etapa de enfriamiento se lleva a cabo la formación de enlaces de hidrógeno (Symons y Archer, 1988) e interacciones hidrofóbicas (Ben-Naim, 1990) a más bajas temperaturas. El pronunciado incremento en G' está en consonancia con los resultados de Beveridge y col. (1984), quien atribuyó el desarrollo de un gel durante la etapa de enfriamiento a la formación de enlaces de hidrógenos múltiples proteína-proteína y proteína-medio acuoso. Estas interacciones son reversibles, desapareciendo al aumentar la temperatura. En cambio, la formación de agregados entre moléculas de proteína que se produce durante la etapa anterior suele ser irreversible (Kersten y col. 2004).

Para comprobar la reversibilidad de los cambios producidos durante la etapa de enfriamiento se llevó a cabo un doble ciclo térmico para la emulsión a pH 6 cuyos resultados se presentan en la figura 2.2.5.4. Se observa que la segunda zona de calentamiento, desde 20 a 65°C, conlleva una disminución de G' hasta valores prácticamente iguales que los que se alcanzaba durante la primera etapa isoterma a 65°C. Con ello se comprueba dicha reversibilidad que debe atribuirse exclusivamente al desarrollo de enlaces de hidrógeno. Esta estructura vuelve a recuperarse tras la segunda etapa de enfriamiento.

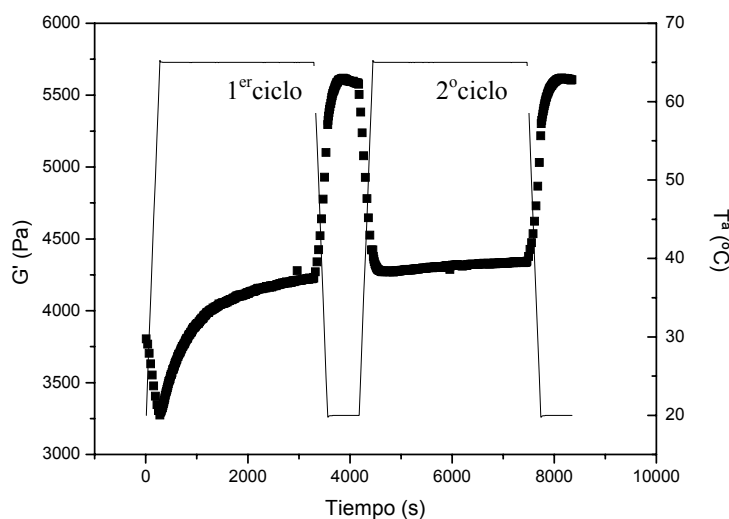


Figura 2.2.5.4. Evolución del módulo de almacenamiento (G') durante la aplicación de un ciclo realizado a una emulsión con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 6.

Puede observarse cierta inercia en las subidas y bajadas debida a la gran velocidad a la que se producen las rampas (10°C/min).

En la figura 2.2.5.5 se comparan los perfiles de DTG obtenidos antes y después del tratamiento con 1 o 2 ciclos térmicos. Los resultados de DTG no revelan la existencia de cambios significativos de tamaño tras el procesado térmico, de forma similar a lo observado por otros autores (Petursson y col., 2004; Bengoechea, 2006). Existe, sin embargo, una tendencia al aumento de tamaño de gota.

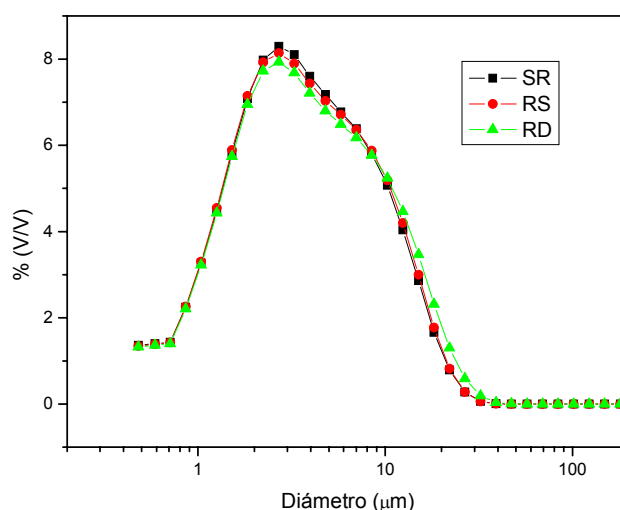


Figura 2.2.5.5. Curvas de distribución de tamaños de gotas para una emulsión realizada con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 6, antes y después de la aplicación de uno y dos ciclos a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. (SR: Sin rampa; RS: un ciclo; RD: dos ciclo).

En la figura 2.2.5.6 se comparan los resultados obtenidos en ensayos de barridos de frecuencia antes y después con uno y dos ciclos térmicos.

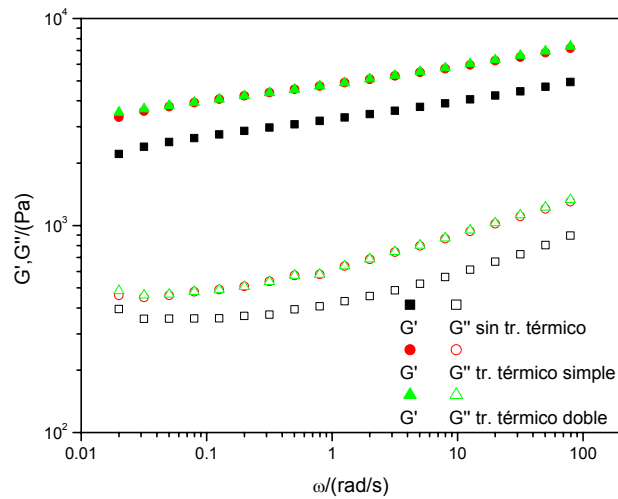


Figura 2.2.5.6. Espectros mecánicos para una emulsión realizada con 75 % (p/p) de aceite y 5% (p/p) de harina a pH 6, antes y después de la aplicación de uno y dos ciclos a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Ambos tratamientos térmicos producen un aumento significativo de las funciones viscoelásticas, G' y G'' . Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los resultados del tratamiento térmico simple y doble.

En definitiva, el tratamiento térmico produce un reforzamiento apreciable del entramado estructural de la emulsión sin cambios significativos en la DTG. Un segundo ciclo térmico no produce ninguna mejora significativa.

B) Tratamiento en baño

Una vez comprobados los efectos producidos en una emulsión mediante tratamientos térmicos “in situ”, se han intentado extrapolar estos resultados pero usando como elemento para el procesado térmico un baño termostático. El objetivo en este caso es comprobar si un reforzamiento de la estructura puede ir acompañado de una mejora de la estabilidad de la emulsión. Para que dicho reforzamiento estructural tenga lugar han de seleccionarse de forma cuidadosa las características del procesado térmico (máxima temperatura de calentamiento, velocidad de calentamiento, composición del ciclo térmico,...). Si dichos parámetros no se eligen correctamente, los ciclos térmicos posteriores no producen una mejora significativa

en la estructura de la emulsión. Este tratamiento presenta la ventaja de que permite extraer muestras a distinto tiempo de residencia para analizar la evolución de las propiedades viscoelásticas y la DTG a lo largo del proceso. Se han realizado únicamente a emulsiones de 75 % en peso de aceite, 5% en peso de harina y pH 6, por ser la que presenta mayores problemas de desestabilización microbiana.

Una vez que se han introducido los tubos de ensayo en el baño a 65 °C se registra la temperatura mediante una sonda situada en el seno de la emulsión, concretamente, en el eje central del tubo.

En la figura 2.2.5.7 se representa el perfil de temperatura tanto para la etapa de calentamiento como de enfriamiento. En este último caso se extrae el tubo de ensayo del baño a 65 °C y se introduce inmediatamente en otro baño que se encuentra a 20 °C.

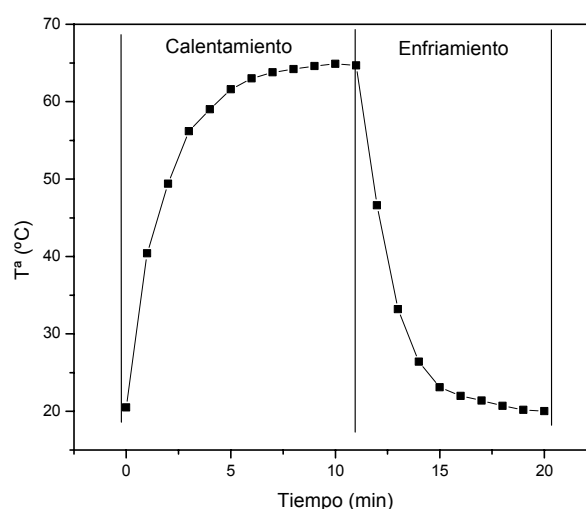


Figura 2.2.5.7. Evolución de la temperatura de la emulsión sometida a un tratamiento en baño.

Para analizar la evolución de las propiedades reológicas y de la DTG de la emulsión, se introdujeron en el baño a 65°C varios tubos de ensayos que fueron extraídos a diferentes tiempos de residencia e introduciéndolos, a continuación, en el baño a 20°C.

En la figura 2.2.5.8 se muestra la evolución del módulo de almacenamiento, a una frecuencia de 1 Hz para una emulsión sometida a diferentes tiempos de residencia en un baño a 65°C.

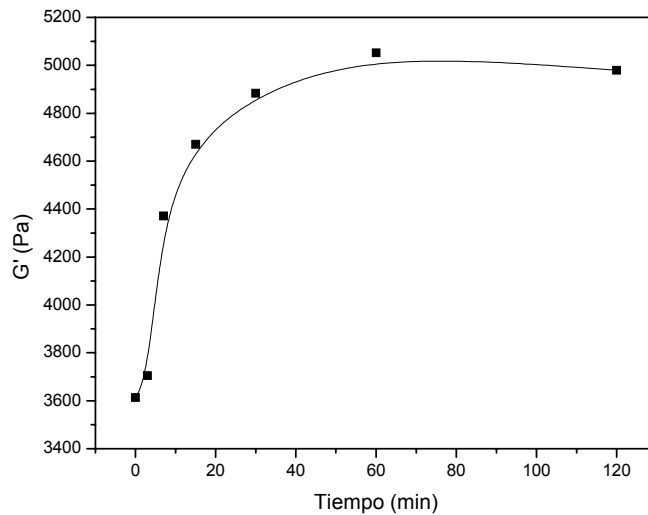


Figura 2.2.5.8. Evolución del módulo de almacenamiento, G' , a 1Hz para emulsiones de 75 % (p/p) de aceite, 5 % (p/p) de harina a pH 6 sometidas a diferentes tiempos de residencia en un baño a 65°C.

Como se puede observar hay un considerable aumento de G' con el tiempo de residencia en el baño y una tendencia a alcanzar un valor constante. Esta evolución es similar a la que se obtiene mediante rampas de calentamiento “in situ”. Conviene mencionar que los valores de G' presentados en la figura 2.2.5.8 corresponden a la estructuración que se produce tras el tratamiento térmico en baño y su posterior enfriamiento, siendo los valores de G' ligeramente inferiores a los que se obtuvieron mediante rampas de calentamiento “in situ”. Esto puede ser atribuido a que la geometría es diferente en ambos casos y, por tanto, el proceso de transferencia de calor también ocurre de manera diferente.

Finalmente, se han realizado seguimientos a lo largo del tiempo de las emulsiones sin tratamiento térmico, con 7 minutos de tratamiento térmico que coincide prácticamente con la zona de incremento de temperatura (figura 2.2.5.7) y con un tratamiento en baño de 60 minutos, tiempo muy próximo al de operación de las rampas “in situ”. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a 5°C. Se

realizaron ensayos viscoelásticos lineales (barridos de deformación) a frecuencia de 1Hz a distintos tiempos de almacenamiento (1, 30, 60 y 90 días).

Los resultados obtenidos para los distintos parámetros viscoelásticos y de DTG se presentan en la tabla 2.2.5.1.

Tabla 2.2.5.1. Parámetros viscoelásticos y de distribución de tamaño de gotas a lo largo del tiempo para emulsiones de 75 % (p/p) de aceite, 5 % (p/p) de harina a pH 6 sometido a diferentes tratamientos térmicos y tiempos de residencia.

Sin tratamiento térmico						
Tiempo	G' (1Hz)	γ_c	tg δ_{\min} (1Hz)	d_{3,2}	d_{4,3}	U
1 día	3693	4,78	0,1329	2,15	4,88	0,904
30 días	3471	5,08	0,1377	2,22	5,30	0,944
60 días	3216	4,52	0,1226	2,39	5,70	1,116
90 días	2321	3,84	0,1370	2,61	7,62	1,208
Tratamiento térmico 7 minutos						
Tiempo	G' (1Hz)	γ_c	tg δ_{\min} (1Hz)	d_{3,2}	d_{4,3}	U
1 día	4371	5,50	0,1043	2,16	4,49	0,877
30 días	4189	5,23	0,1124	2,24	5,38	0,980
60 días	3969	4,96	0,1120	2,31	5,69	1,053
90 días	-	-	-	2,53	7,31	1,170
Tratamiento térmico 60 minutos						
Tiempo	G' (1Hz)	γ_c	tg δ_{\min} (1Hz)	d_{3,2}	d_{4,3}	U
1 día	5052	6,30	0,0985	2,21	4,80	0,909
30 días	4857	6,19	0,1046	2,26	5,03	0,928
60 días	4683	6,06	0,1003	2,30	5,48	0,972
90 días	4182	5,52	0,1007	2,40	6,28	1,056

Las modificaciones de estos parámetros con el tiempo de almacenamiento son significativas para las emulsiones sin tratamiento térmico y con tratamiento. Sin embargo, carecen de significación estadística cuando son sometidas a un tratamiento térmico prolongado (sólo ocurre en algunos parámetros y a partir de 90 días). En cualquier caso se producen reducciones importantes en el efecto del tiempo de almacenamiento cuando se emplea un tratamiento térmico prolongado (60 minutos). Por ejemplo, tras 60 días de almacenamiento el valor de G' a 1Hz ha

disminuido un 12,9% sin tratamiento térmico, un 9,2% con un tratamiento de 7 minutos y un 7,3 % con el tratamiento prolongado. De igual forma, los crecimientos del diámetro $d_{3,2}$ tras los 60 días de almacenamiento fueron de 11,2 % sin tratamiento térmico y de 6,9 y 4,1 % con tratamiento a 7 y 60 minutos respectivamente. Las diferencias establecidas a los 90 días para emulsiones sin tratar y tratadas son más acusadas.

Se puede concluir que los tratamientos térmicos son muy adecuados para mejorar la estabilidad de la emulsión pero con condiciones controladas de velocidad de calentamiento y temperatura. Hay que destacar también que el tratamiento térmico reduce drásticamente la desestabilización microbiana, sin que se produzca la aparición de hongos en dichas muestras, en contraposición a lo que ocurre sin tratamiento térmico.

3. GELES

3.1 Gelificación térmica

3.1.1 Selección de las condiciones de gelificación

Se han preparado geles con una concentración variable de aislado de proteína de cangrejo en agua (desde 6 a 15% (p/p)) y de distinto pH, mediante un calentamiento hasta 90°C, de acuerdo a dos protocolos diferentes. Así, se han llevado a cabo tratamientos realizados “in situ” (en reómetros) y tratamientos en baño termostatzado.

Para el calentamiento “in situ” (en reómetro) se programó la subida de la temperatura de los geles hasta llegar a 90°C, para después descender a alta velocidad, mantener un tiempo de estabilización a 20°C y estudiar las propiedades finales del sistema obtenido. La ventaja primordial que tiene el estudio de la gelificación en el propio reómetro es la posibilidad de seguimiento del proceso de gelificación durante el calentamiento. El procedimiento en baño se realiza mediante un calentamiento a 90°C durante 30 minutos en un baño termostatzado, siguiendo el procedimiento establecido por Damodaran 1988, seguido por un enfriamiento a 15°C para detener la evolución de propiedades de los geles con el tiempo tras la etapa de calentamiento. Posteriormente los geles obtenidos se almacenan a 4°C durante un tiempo determinando para detener la evolución que se produce durante la etapa de calentamiento y favorecer el “setting” durante el enfriamiento. Se han realizado pruebas a diferentes condiciones de pH y concentración proteica observando una alta dependencia del tipo de gel, con dichas variables.

Se han realizado ensayos viscoelásticos dinámicos de geles durante las primeras horas tras la preparación de los geles, con objeto de estudiar la posible evolución de sus propiedades viscoelásticas lineales a lo largo del tiempo.

3.1.2 Influencia de la concentración

Antes de llevar a cabo el estudio de la gelificación se realizó una caracterización reológica de las dispersiones de aislado (apartado 1.2.4). Posteriormente se realizó el estudio del proceso de gelificación en reómetro mediante calentamiento de dispersiones desde 20 a 90°C. Es importante reseñar que en todo el intervalo de temperatura el sistema se encontraba dentro del intervalo viscoelástico lineal, ya que se programó la rampa con deformaciones adecuadas a partir de barridos de deformación. Las

dispersiones de aislado de proteína de cangrejo se prepararon a pH 6 y a diferentes concentraciones de proteínas. Se toma el pH 6 porque es un pH intermedio y es similar al utilizado en emulsiones para realizarle el tratamiento térmico. Merece la pena resaltar también el hecho de que no fue posible preparar geles a concentraciones de aislado de proteínas de cangrejo por debajo del 6 % (p/p). La figura 3.1.2.1 muestra el efecto de la temperatura sobre las propiedades viscoelásticas dinámicas, obtenidas a frecuencia constante, de las dispersiones proteicas de diferente concentración.

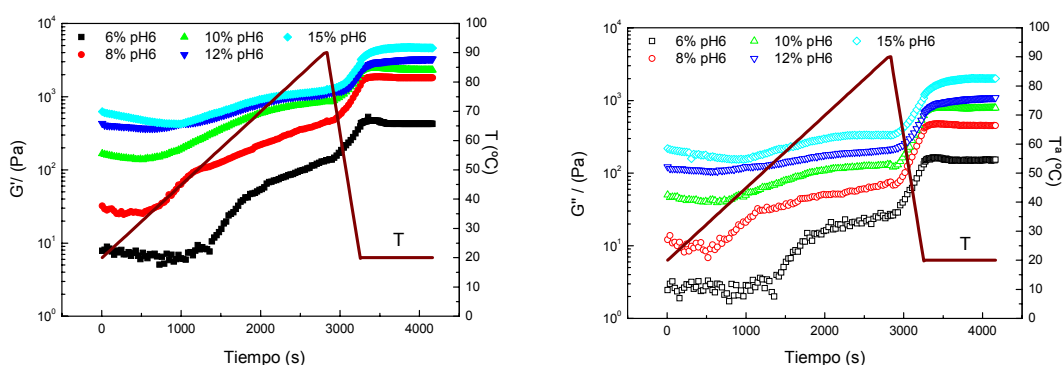


Figura 3.1.2.1. Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') durante rampas de temperatura a frecuencia constante, 1 Hz, para dispersiones a pH 6, en función de la concentración de aislado de proteína de cangrejo.

Como se puede observar, los resultados son parecidos para todas las concentraciones, mostrando tres regiones diferentes:

Región 1). Al principio del tratamiento térmico ($T < 45^\circ\text{C}$) se observa un ligero descenso en G' , G'' y la $\text{tg } \delta$. Esta etapa está relacionada con un incremento en la movilidad debido a la agitación térmica (el número de enlaces de hidrógenos se resultaría disminuido), pero la agregación de proteínas también es posible. Así, es un hecho conocido que durante el calentamiento, por debajo de 50°C , se produce la agregación de las regiones correspondientes a la cabeza globular de las proteínas miofibrilares. Esta agregación se produce como consecuencia de la oxidación de los grupos sulfhidrilos, predominantemente encontrados en la cabeza globular de este tipo de proteínas, dando lugar a un descenso de los módulos viscoelásticos en el intervalo de temperatura entre 30 y 50°C (Samejima y col., 1981; Ishioroshi y col., 1980; Acton y Dick, 1989; Sano y col., 1994). Algunos autores atribuyen este mínimo en G' a la desnaturalización de las moléculas de miosina, indicando que las porciones α -hélices en la porción de la cola se desdobl原因 en la región de temperatura entre 30 y 40°C (Kim y col., 2005; Yoon y col., 2004).

Región 2). Tras la primera región se produce un importante aumento en G' y G'' mostrando una tendencia asintótica al final de la rampa de calentamiento. Estos resultados son consistentes con los resultados publicados por Samejima y col. (1981) para la gelificación térmica de miosina. Aunque no se muestra, la tangente de pérdidas desciende en esta región, pero también tiende hasta un valor constante. Esta segunda región está asociada con cambios estructurales de los segmentos helicoidales de las moléculas de miosina que conducen a la formación de una red con entrecruzamientos entre estos segmentos (Acton y Dick, 1989). Además la zona terminal casi constante que se observa al final del tratamiento térmico se encontró para otros geles de proteínas basados en miosina (Samejima y col., 1981; Ishioroshi y col., 1981; Yoon y col., 2004).

Región 3). En la región de enfriamiento tiene lugar un mayor incremento en ambos módulos viscoelásticos, llegando a valores constantes de equilibrio una vez que se mantiene constante la temperatura de 20°C. Se puede observar como el incremento de la componente viscosa es más importante, produciendo un incremento en la tangente de pérdidas. Interacciones de tipo físico, principalmente puentes de hidrógeno, son los responsables de esta evolución. Los enlaces de hidrógeno entre aminoácidos y moléculas de agua, que tienen lugar principalmente durante la etapa de enfriamiento, pueden ser importantes en la estabilización y estructuración de los sistemas proteicos. Además, los enlaces de hidrógeno pueden contribuir a inmovilizar agua en la red proteica formada (Lanier y col., 2004).

Un incremento en la concentración de proteínas produce un desplazamiento de los resultados obtenidos en cada región hacia valores más altos. La temperatura en el mínimo de G' o G'' , la cual se corresponde con el final de la primera etapa, también tiende a incrementarse con la concentración de aislado en el gel, especialmente a mayores concentraciones mayores a 10 % (p/p).

La figura 3.1.2.2 muestra los valores de los incrementos en G' y G'' ($\Delta G'$ y $\Delta G''$) para cada etapa, calculado entre el primer y el último minutos de cada etapa.

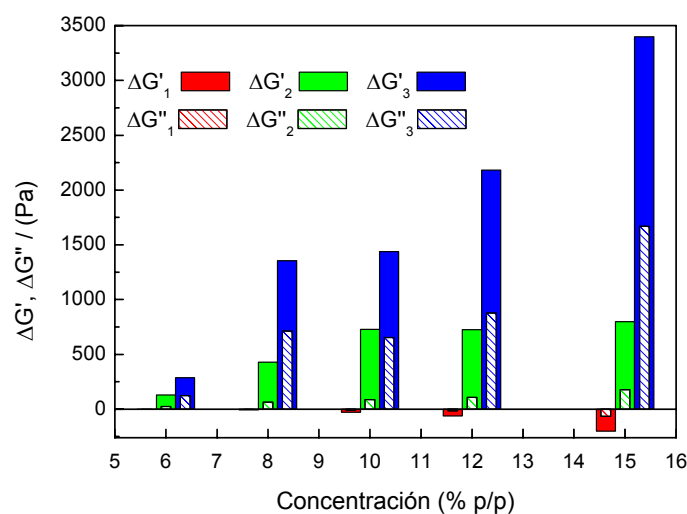


Figura 3.1.2.2. Evolución de las funciones viscoelásticas lineales para dispersiones de aislado de proteína de cangrejo a pH 6 en función de la concentración en rampas de temperatura durante las tres etapas.

Como se puede apreciar, $\Delta G'$ es siempre mayor que $\Delta G''$. La primera etapa siempre tiende hacia valores ligeramente negativos, siendo más importantes para las concentraciones más altas. En la segunda etapa, en la que se producen entrecruzamientos entre los segmentos en forma de varilla de la miosina, los valores de $\Delta G'$ son mucho más pronunciados que los de $\Delta G''$, sobre todo cuando se incrementa la concentración de aislado de proteína de cangrejo. Esta evolución sugiere un incremento en la densidad de los entrecruzamientos con el contenido de proteínas. En todo caso, durante la etapa de enfriamiento se obtienen los valores de $\Delta G'$ y $\Delta G''$ mayores, que también se hacen más importantes cuando la concentración es mayor.

3.1.3 Influencia del pH

La figura 3.1.3.1 muestra la evolución de los módulos viscoelásticos a lo largo del ciclo de temperatura en función del valor del pH, para dispersiones acuosas que contienen un 10 % (p/p) de aislado de proteínas de cangrejo.

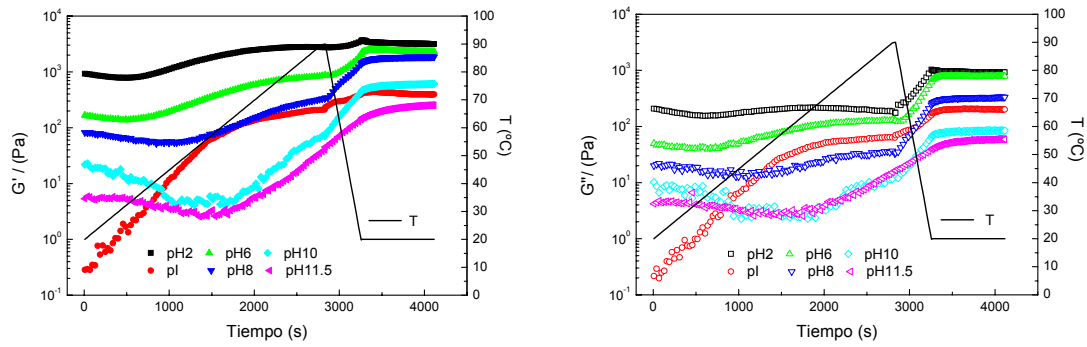


Figura 3.1.3.1. Evolución de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') durante rampas de temperatura a frecuencia constante, 1 Hz, para dispersiones 10 % (p/p) de aislado de proteína de cangrejo en función del pH.

Todos los sistemas estudiados muestran un comportamiento similar al descrito en el apartado anterior, excepto aquellos sistemas procesados en el punto isoeléctrico (pH 3,4), en los que G' y G'' muestran valores iniciales muy bajos y no se observa la primera región descrita anteriormente. Por tanto, la segunda etapa arranca desde el inicio del ensayo lo cual predice una cinética de gelificación más rápida. En la tabla 3.1.3.1 se incluyen los valores de la temperatura en el mínimo de G' (T_m), que corresponde al final de la primera etapa, y del punto de inflexión para la segunda etapa (T_i).

Tabla 3.1.3.1. Valores de T_m (temperatura en la cual hay un mínimo en el modulo de almacenamiento) y T_i (temperatura donde se observa un punto de inflexión) obtenidos en rampas (G' vs T) con dispersiones de harina de cangrejo a 10% (p/p) a diferentes valores de pH.

pH	2	3,4	6	8	10	11,5
T_m (°C)	32	20	32,8	38,8	56	58,3
T_i (°C)	57	60	65	78	85	90

Al aumentar el pH, se observa una extensión de la primera región, salvo en el pI, como se comentó anteriormente, así como un progresivo retraso en la temperatura de inflexión de la segunda etapa. Esta evolución nos indica que a mayores valores de pH hay una cinética de gelificación más lenta. Como consecuencia, para alcanzar un completo proceso de entrecruzamientos en condiciones alcalinas y a la velocidad de calentamiento experimental, se precisaría una segunda etapa más prolongada. Las

modificaciones producidas en G' y G'' en las tres etapas se observan en la figura 3.1.3.2, en función del pH.

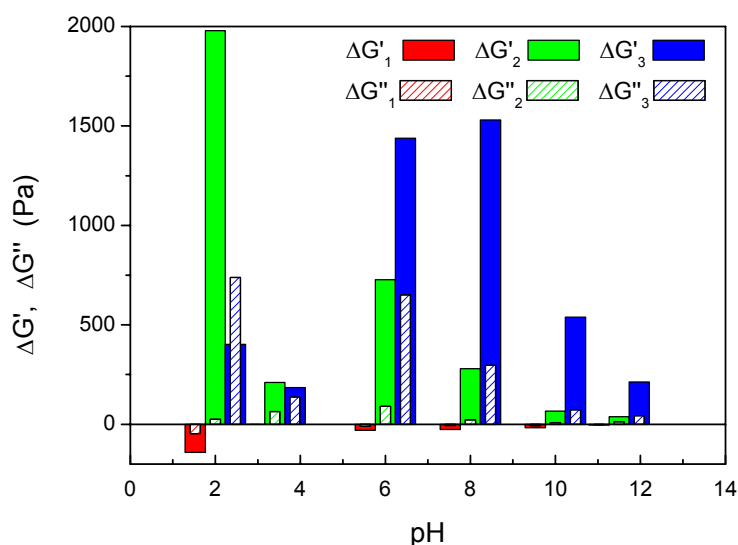


Figura 3.1.3.2. Evolución de las funciones viscoelásticas lineales para dispersiones de aislado de proteína de cangrejo a 10 % (p/p) en función del pH en rampas de temperatura durante las tres etapas.

Como se puede observar en esta figura, los valores de $\Delta G'$ son generalmente mayores que $\Delta G''$. Los resultados obtenidos en el punto isoeléctrico claramente difieren de la evolución general para el resto de sistemas. Las mayores modificaciones para el tratamiento térmico corresponden a $\Delta G'$ para pH 2 en la segunda etapa, en la cual se produce un cambio muy pequeño en G'' y un gran cambio en G' . Estos resultados sugieren que los entrecruzamientos entre los segmentos en forma de varilla de las proteínas miofibrilares están favorecidos por las condiciones ácidas que se dan por debajo del punto isoeléctrico. Estas condiciones corresponden a valores de pH muy alejados del punto isoeléctrico de dichos segmentos proteicos. Además, los cambios inducidos sobre G' durante la segunda etapa de procesamiento térmico conllevan una importante reducción con el aumento del pH y tienden a desaparecer a los valores más altos de pH. Por el contrario, el efecto de la segunda etapa de calentamiento sobre G'' es generalmente muy débil. La región de enfriamiento conduce a valores máximos en $\Delta G'$ a valores de pH neutros y un descenso en $\Delta G''$ al aumentar el pH (el punto isoeléctrico es de nuevo la excepción). Como consecuencia, se demuestra el importante efecto del enfriamiento en $\Delta G''$ que es incluso mayor que el que se produce sobre $\Delta G'$, a pH bajos (pH 2).

3.2 Caracterización de geles

3.2.1 Reología de geles

Después de realizar el tratamiento térmico descrito durante el procedimiento de gelificación se lleva a cabo una caracterización de los geles finales. En este apartado se compara la reología de geles preparados “in situ” con geles preparados en baño, tanto en función de la concentración como del pH, así como un estudio del tiempo de enfriamiento (“setting”).

A) Influencia de la concentración

La figura 3.2.1.1 muestra las propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia para geles preparados in situ (A) y en baño (B) para las diferentes concentraciones de aislado de proteína de cangrejo a partir de dispersiones preparadas a pH 6.

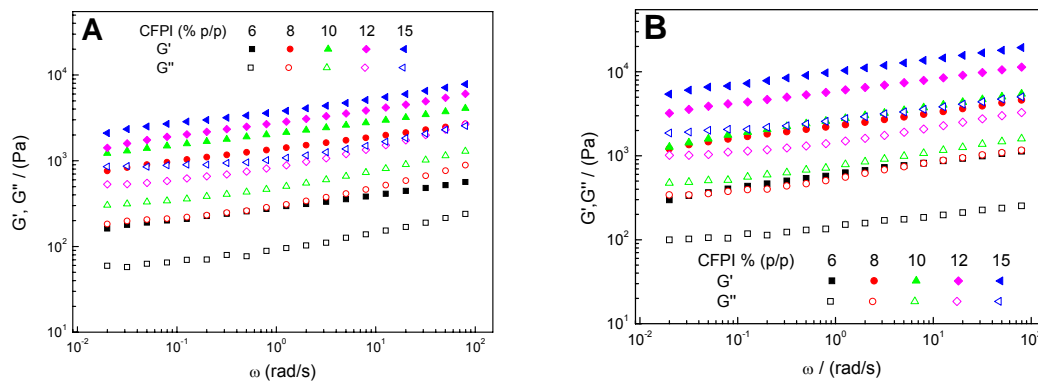


Figura 3.2.1.1. Evolución de las funciones viscoelásticas lineales de los geles de proteínas (CFPI) de cangrejo CFP a pH 6, procesados en el reómetro (A) y en baño (B) en función de la concentración y la frecuencia.

Como era de esperar, se ha encontrado un comportamiento tipo gel para todas las concentraciones estudiadas, en las que además se observa un importante reforzamiento del entramado tipo gel claramente inducido por el procesado térmico. Un efecto similar ha sido recientemente publicado por Binsi y col. (2007) para actomiosina procedente de mejillones verdes. De nuevo, un incremento en la concentración conduce a un importante desplazamiento hacia mayores valores de G' y G'' en el intervalo de frecuencias experimental. La figura 3.2.1.2 muestra la evolución de algunos parámetros

viscoelásticos dinámicos con la concentración, tanto para dispersiones de aislado de proteínas como para geles formados in situ y en baño.

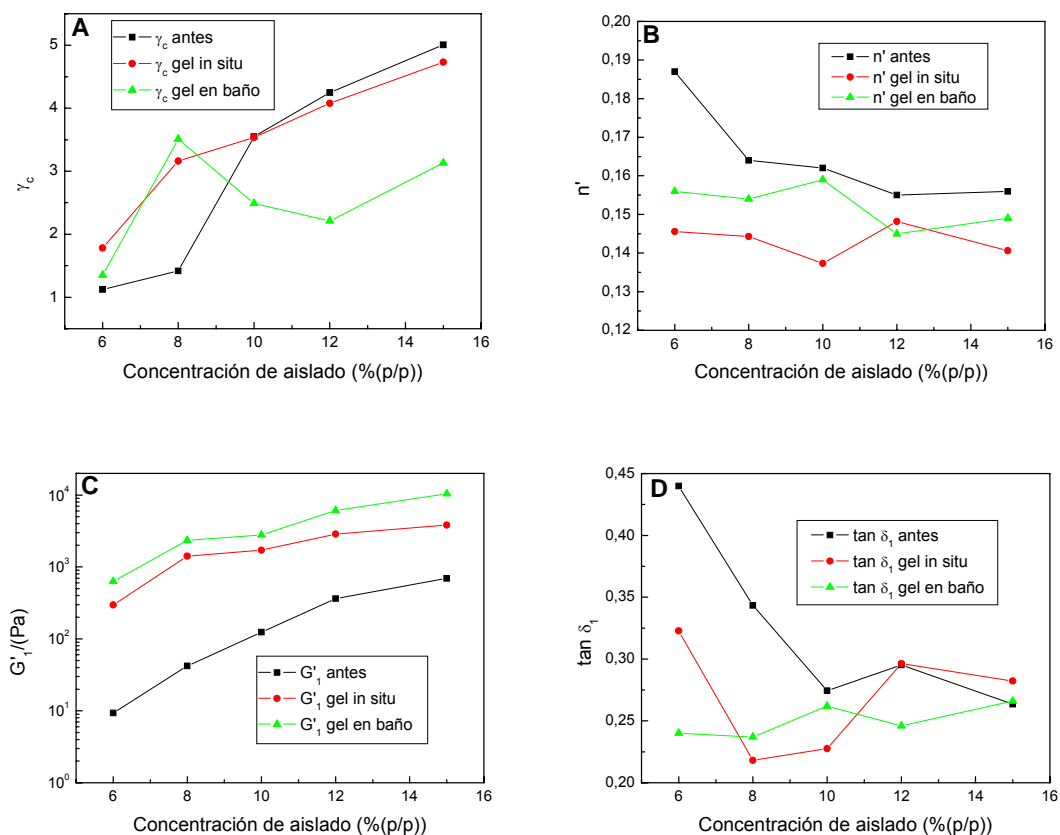


Figura 3.2.1.2. Evolución de los parámetros viscoelásticos lineales para dispersiones y geles de aislado de cangrejo a pH 6, en función de la concentración antes y después del procesado térmico en reómetro (in situ) o en baño (PT): A) Deformación crítica para el intervalo viscoelástico lineal; B) Pendiente del módulo de almacenamiento (n'); C) Módulo de almacenamiento a 1 rad/s; D) Tangente de pérdidas a 1 rad/s.

La deformación crítica (figura 3.2.1.2.A) para la viscoelasticidad lineal experimenta un continuo incremento con el contenido de aislado de proteínas de cangrejo independientemente de si hay o no tratamiento térmico y del tipo de éste. La figura 3.2.1.2.B muestra la evolución de la pendiente de G' con la frecuencia (n') en función de la concentración. No se observan variaciones significativas de n' con el contenido de aislado de proteína de cangrejo para los geles obtenidos después del tratamiento térmico, si bien estos valores son ligeramente mayores para los geles procesados in situ. Estos valores contrastan con los obtenidos antes de la aplicación del ciclo de temperatura, en el cual n' muestra un descenso con la concentración. En todo caso, los geles procesados térmicamente siempre muestran menores valores para n' que las dispersiones de aislado no procesadas, lo cual manifiesta un reforzamiento del

entramado estructural inducido por el procesado térmico. En cuanto al parámetro G'_1 (figura 3.2.1.2.C), experimenta en todos los casos (geles y dispersiones) un continuo incremento con la concentración de CFPI. Sin embargo, como puede apreciarse, el efecto de la concentración es más importante en el caso de las dispersiones no procesadas. En el caso de los geles, puede observarse una evolución muy similar para ambos tratamientos, si bien el tratamiento en baño siempre conduce a valores ligeramente superiores de G'_1 . Este comportamiento puede ser debido al efecto del “setting” que provoca un mayor reforzamiento del gel.

Por otro lado, las muestras procesadas térmicamente no presentan una variación claramente definida de $\text{tg } \delta_1$ (figura 3.2.1.2.D) con la concentración, en contraste con el claro descenso que puede apreciarse en las dispersiones. En cualquier caso, los valores obtenidos en cualquiera de los dos tratamientos térmicos son inferiores excepto para las concentraciones más altas, en las cuales no se aprecian diferencias significativas.

B) Influencia del pH

La figura 3.2.1.3 representa las propiedades viscoelásticas dinámicas frente a la frecuencia para diferentes valores de pH después del tratamiento térmico, tanto en el reómetro como en el baño.

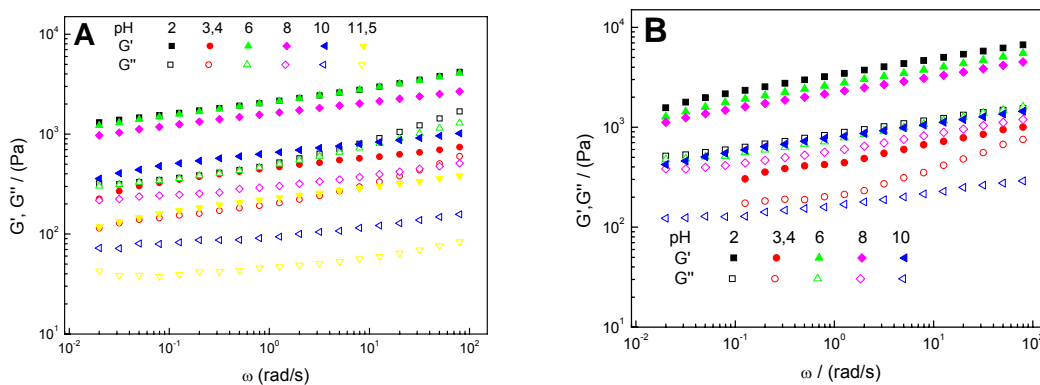


Figura 3.2.1.3. Evolución de las funciones viscoelásticas lineales de los geles de proteínas de cangrejo a 10 % (p/p), procesados en reómetro (A) y en baño (B) en función del pH y la frecuencia.

Todos los sistemas presentan un comportamiento tipo gel, mostrando siempre un importante incremento del entramado proteico con respecto a las dispersiones sin procesar (apartado IV, figura 1.2.4.4). En definitiva, todos los sistemas que contienen aislado de cangrejo siguen la misma evolución y comportamiento, independientemente

de que haya o no procesado térmico y de la geometría en la que éste se lleve a cabo. La evolución de las propiedades viscoelásticas de los geles de aislado de proteína con el incremento del pH es también similar a la obtenida con las dispersiones de aislado de proteínas antes del tratamiento térmico.

La figura 3.2.1.4 muestra la evolución de los parámetros reológicos seleccionados en función del pH tanto en dispersiones sin procesar como en geles procesados térmicamente.

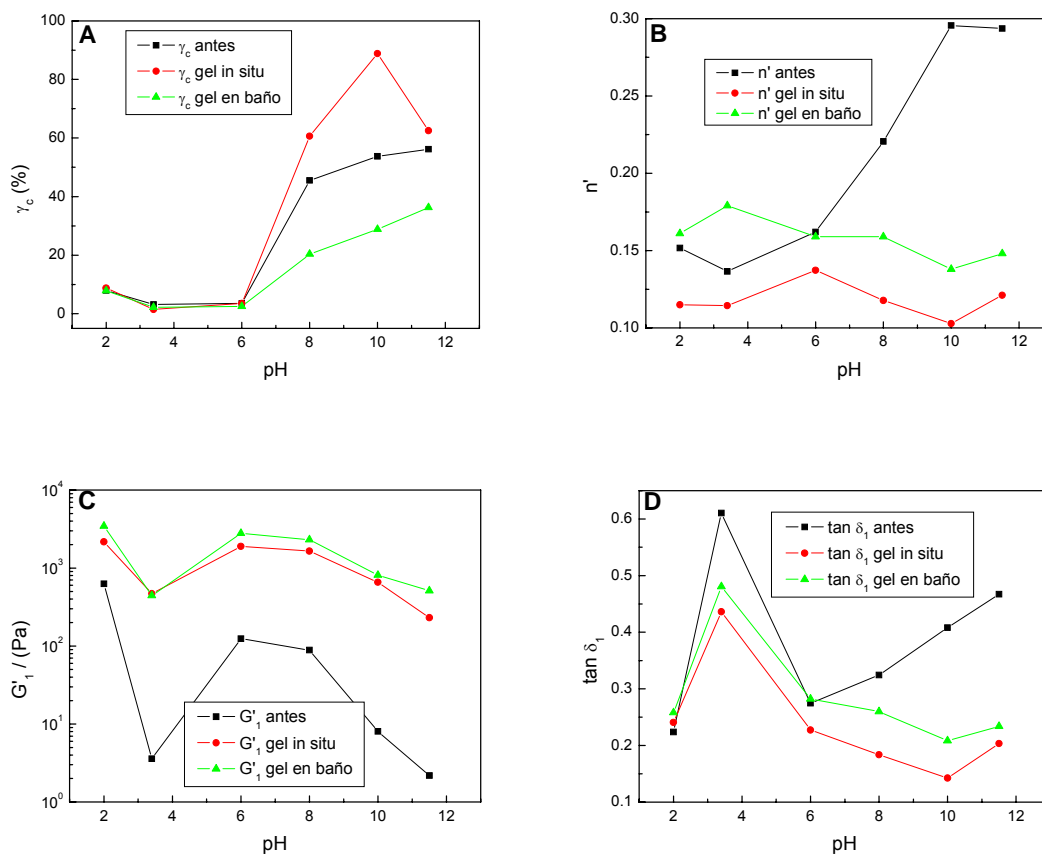


Figura 3.2.1.4. Evolución de los parámetros viscoelásticos lineales para dispersiones y geles de aislado de cangrejo a 10 % (p/p), en función del pH antes y después del procesado térmico en reómetro (in situ) o en baño (PT): A) Deformación crítica para el intervalo viscoelástico lineal; B) Pendiente del módulo de almacenamiento (n'); C) Módulo de almacenamiento a 1 rad/s; D) Tangente de pérdidas a 1 rad/s.

La figura 3.2.1.4.A muestra la evolución de la deformación crítica con el incremento de pH. En esta figura se pueden distinguir dos niveles de deformación crítica claramente diferenciados, tanto para dispersiones de aislado de proteínas como para geles de aislado de proteínas. En condiciones ácidas, no hay diferencias significativas entre las deformaciones críticas, γ_c , para los distintos valores de pH ni

para dispersiones ni para geles ($\gamma_c < 9\%$). Sin embargo, en condiciones alcalinas, la deformación crítica es muy superior.

En condiciones ácidas, no se aprecian variaciones significativas de los valores de la pendiente n' con el pH (figura 3.2.1.4.B), independientemente de que haya o no procesado térmico. Sin embargo, a altos valores de pH la pendiente de G' presenta un comportamiento muy diferente para sistemas sin procesar y procesados térmicamente. Así, contrariamente a lo que sucede con las dispersiones sin procesar en las que n' aumenta a altos valores de pH, cuando la solubilidad de la proteína alcanza un valor máximo, el procesado térmico conduce a la obtención de valores de n' prácticamente independientes del pH. Además los valores de n' son muy inferiores para los geles procesados térmicamente, especialmente para aquellos que han sido procesados in situ. Por tanto, el procesado térmico reduce la influencia de la frecuencia sobre la componente elástica, lo que se traduce en un aumento del carácter gel del sistema.

La evolución de G'_1 de la figura 3.2.1.4.C también refleja el efecto del debilitamiento de las dispersiones de CFPI con el aumento de pH. De hecho, se produce una reducción de más de dos órdenes de magnitud en G'_1 . Esta tendencia es similar a la encontrada para ambos tipos de geles aunque mucho menos acentuada. En ambos casos, el comportamiento en el punto isoeléctrico se desvía completamente de la tendencia general mostrando valores de G'_1 y G''_1 sensiblemente inferiores a los que les correspondería según la tendencia descrita.

En lo que se refiere a $\text{tg } \delta_1$ (figura 3.2.1.4.D) no existen diferencias entre los valores de $\text{tg } \delta_1$ para dispersiones y geles (in situ o en baño) excepto en el punto isoeléctrico en el que se produce un comportamiento anómalo. En condiciones alcalinas el comportamiento de las dispersiones es diferente al de los geles. En el primer caso se observa una tendencia a un aumento de $\text{tg } \delta_1$, en tanto que se mantiene prácticamente constante para los geles.

Los resultados anteriores pueden ser explicados por la importancia de las interacciones hidrofóbicas frente a las electrostáticas y a la cinética de gelificación más lenta que muestran las dispersiones de CFPI a mayores valores de pH, que por tanto requerirían mayor tiempo de procesado a altas temperaturas, como se mencionó anteriormente. Además, estos resultados son consistentes con los obtenidos por Samejima y col. (1981) e Ishioroshi y col. (1981) que encontraron un máximo de rigidez a pH 6 en los geles térmicos de miosina.

Como resumen de lo anterior se puede llegar a la conclusión de que ambos tratamientos térmicos conducen a resultados similares. Las pequeñas diferencias obtenidas son en cualquier caso atribuibles a diferencias en la historia térmica, como consecuencia de los diferentes ciclos de calentamiento como por ejemplo la presencia únicamente de setting en el caso de los geles procesados en baño, y sobre todo a la geometría del sistema de gelificación. Estos resultados tienen una gran importancia práctica, ya que abren la posibilidad de abordar el cambio a escalas superiores a partir de los datos de gelificación obtenidos tras un tratamiento térmico en un reómetro, en el que, como hemos comprobado anteriormente, es posible analizar la cinética del proceso.

C) Influencia del tiempo de enfriamiento (“setting”)

En este apartado se van a estudiar las variaciones que se producen en las propiedades viscoelásticas lineales de los geles procesados en baño tras ser sometidas a un periodo de enfriamiento a 5°C. Todas las medidas de los apartados anteriores se realizaron al menos 24 horas tras su preparación. Para ello, una vez preparado el gel, se almacena en frío a 5°C hasta su utilización. Se van tomando muestras de geles a diferentes tiempos, y se realizan medidas de viscoelasticidad lineal para determinar si hay algún tipo de variación significativa de los módulos viscoelásticos lineales y así confirmar que 24 horas de enfriamiento es tiempo suficiente para el desarrollo completo del gel.

Para realizar este estudio se han seleccionado geles al 10% (p/p) de aislado de proteína con dos sistemas (pH 2 y pH 6). Se realizaron barridos de frecuencia dentro del intervalo viscoelástico lineal con muestras tomadas a diferentes tiempos: 1, 4, 6, 10 y 24 horas. Cada una de las muestras se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de efectuar los ensayos viscoelásticos dinámicos.

En la figura 3.2.1.5 se observan los barridos de frecuencia para los geles de CFPI obtenidos mediante tratamiento en baño a pH 2 (A) y pH 6 (B) para diferentes tiempos de almacenamiento.

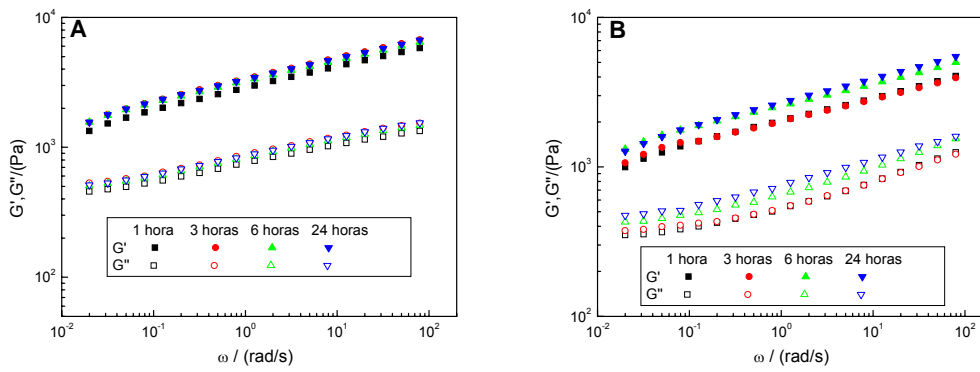


Figura 3.2.1.5. Comparación de la evolución a lo largo del tiempo (1, 3, 6 y 24 horas) de las funciones viscoelásticas lineales de geles de proteínas de cangrejo a 10 % (p/p) para (A) pH 2 y (B) pH 6 medidos a 20°C.

La forma del espectro mecánico no varía con el tiempo de enfriamiento, sin embargo, parece producirse en los geles un cierto aumento de los módulos viscoelásticos durante la primera etapa de enfriamiento (entre 3 y 6 horas). Para ilustrar más fácilmente esa evolución se representa en la figura 3.2.1.6 el módulo de almacenamiento a 1 rad/s, G'_1 , a lo largo del tiempo de almacenamiento.

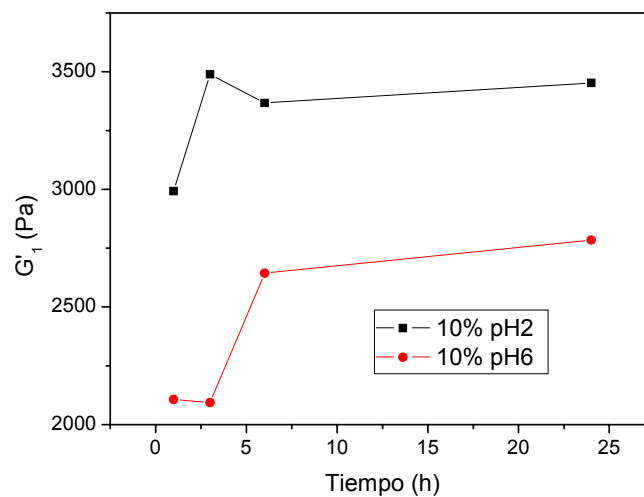


Figura 3.2.1.6. Evolución del parámetro G'_1 a lo largo del tiempo (1, 3, 6 y 24 horas) para los geles 10 % (p/p) pH 2 y pH 6, medidos a 20°C.

Hay un ligero aumento de los valores de G'_1 hasta un valor de equilibrio que se obtiene aproximadamente a partir de las 6 horas de enfriamiento. Este efecto es más claro en el caso del gel a pH 6. Estos resultados confirman la necesidad de mantener un

periodo de enfriamiento a baja temperatura antes de realizar cualquier ensayo para permitir el desarrollo completo de interacciones de tipo físico que contribuyen al reforzamiento del entramado proteico, fenómeno conocido como “setting” en la bibliografía especializada (Numakura y col., 1985; Kim, 1987) .

3.2.2 Capacidad de retención de agua

En la figura 3.2.2.1 se muestra la capacidad de retención de agua de los geles, preparados por calentamiento en baño a 90 °C durante 30 minutos y enfriados 24 horas a 4 °C, en función de la concentración proteica. La capacidad de retención se determina a partir del porcentaje de agua que queda retenido en el gel respecto a la cantidad inicial de agua del gel, calculado por diferencia de pesada a partir del procedimiento descrito en el desarrollo experimental (Apartado II, 2.2.5.A).

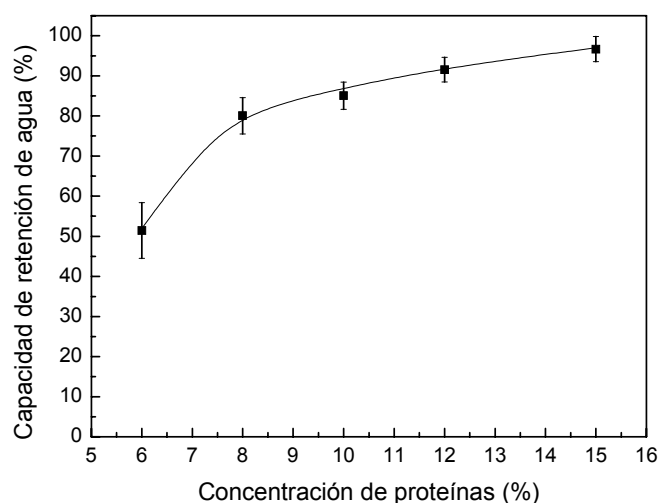


Figura 3.2.2.1. Capacidad de retención de agua de geles térmicos (90°C, 30 min.) a pH6 en función de la concentración de aislado de cangrejo

Como se puede ver se produce un incremento importante en la capacidad de retención de agua al aumentar la concentración de 6 a 8 % (p/p), que supera valores del 80% del agua retenida con un 8% de CFPI. A partir de esta concentración el aumento de la capacidad de retención de agua se suaviza considerablemente. Este efecto se puede relacionar con la debilidad del entramado proteico correspondiente al gel que contiene un 6 % (p/p) que hace que tenga una pobre capacidad de retención de agua. El gel al 6% (p/p) está en el límite de concentración necesaria para melificar, por lo que hay menor proporción de interacciones proteína-proteína capaces de formar una matriz que retenga

grandes cantidades de agua. A concentraciones mayores a 6 % (p/p), donde el entramado proteico está formado como se demostró a partir de los resultados de viscoelasticidad lineal, se mantiene y apenas se observa un ligero aumento de la retención de agua tras la centrifugación.

Como se ha comprobado anteriormente la consistencia del gel depende en gran medida del pH, por tanto parece interesante analizar la influencia de esta variable sobre la capacidad de retención de agua. Los resultados se muestran en la figura 3.2.2.2 para un gel a concentración de 10% (p/p) de CFPI en función del pH.

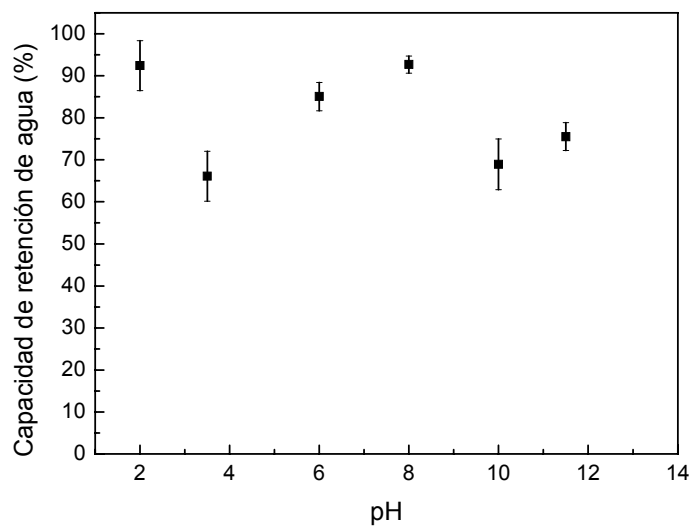


Figura 3.2.2.2. Capacidad de retención de agua de geles térmicos (90°C, 30 min.) al 10% (p/p) de aislado de cangrejo en función del pH

En general se observan valores relativamente altos de la capacidad de retención de agua (> 60 %) como puede corresponder a geles formados con otras proteínas (Puppo y col., 1995; 1998). Se puede diferenciar claramente un mínimo en la capacidad de retención de agua a pH 3,5 en el que se localiza el punto isoeléctrico del aislado. La formación de agregados proteicos favorecida por la escasa presencia de interacciones electrostáticas influye negativamente en la formación de la red e influye en el descenso en la capacidad de retención de agua. Los mayores valores de capacidad de retención de agua corresponden con los valores de pH donde los módulos de almacenamiento son más importantes. Se observan también un segundo mínimo, aunque menos acusado a pH 10, que se relaciona con la menor de solubilidad de la porción de α -hélice de las

moléculas de miosina. Conviene recordar que el punto isoeléctrico para los segmentos en forma de varilla de la miosina se encuentra en torno a pH 10,5.

3.2.3 Solubilidad

En la figura 3.2.3.1 se representan los valores de solubilidad de los geles preparados mediante tratamiento térmico en baño a pH 2, 6 y 10 para una concentración del 10% (p/p) de CFPI, en diferentes disoluciones amortiguadoras. La determinación de la solubilidad en muestras de geles sometidos a tratamiento térmico se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el apartado experimental (Apartado II, 2.2.5.B) utilizando diferentes disoluciones amortiguadoras como medios de extracción.

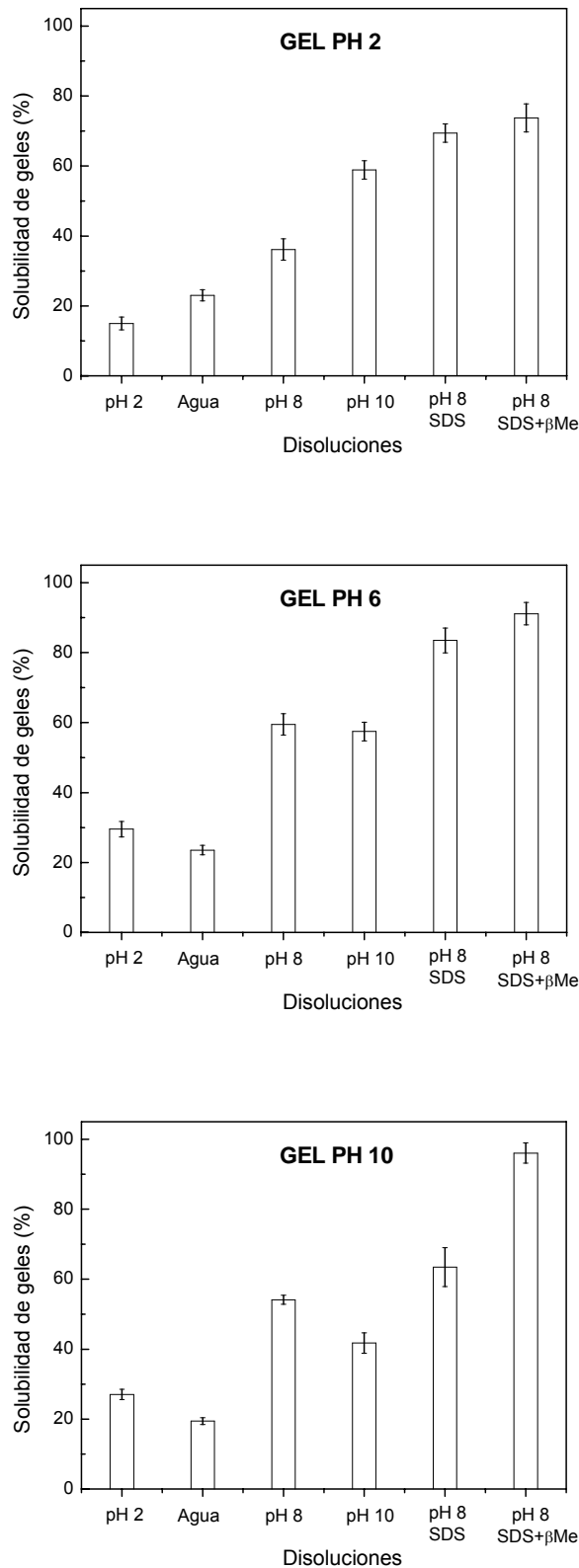


Figura 3.2.3.1. Solubilidad (%) en medios de extracción de diferente pH, de geles térmicos (90 °C, 30 min) al 10% (p/p) de aislado de cangrejo preparados a pH 2, 6 y 10: Disolución amortiguadora 0,03M fosfato (pH2); Agua; Disolución amortiguadora 0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA (pH8); Disolución amortiguadora 0,10M borato sódico (pH 10); Disolución amortiguadora pH 8 + 0,5% SDS; Disolución amortiguadora pH 8 + 0,5% SDS + 1,0% β-Mercaptoetanol (β-Me).

En ausencia de agentes desnaturalizantes (SDS) y disociantes (β -Mercaptoetanol) la solubilidad fue inferior al 60 % para todos los geles estudiados en todos los caso.

Para el caso del gel preparado a pH 2 se observa el menor valor de solubilidad en el caso de utilización de disolución amortiguadora a pH 2, hecho que concuerda con la baja solubilidad de la proteína a dicho pH (Fig. 1.2.2.1). La solubilidad aumenta con el pH, alcanzándose a pH 10 valores de $58,9 \pm 4,5$ % a pH 10. Al agregar SDS se produce un aumento de la solubilidad, alcanzando valores de un 70 % aproximadamente. Por otro lado, la incorporación de un agente capaz de romper puentes disulfuro no conlleva un aumento sustancialmente mayor de la solubilidad. Este resultado indica que el gel a pH 2 estaría estabilizado por uniones no covalentes del tipo electrostáticas, hidrofóbicas y puente hidrógeno, sin contribución apreciable de puentes disulfuro. De hecho, a pH ácido no está favorecido el intercambio SH/S-S; los sulfhidrilos ya se encuentran bajo la forma reducida (-SH). Los resultados sugieren que a pH 2 es probable que se forme un gel estabilizado por proteínas con un grado de entrecruzamiento elevado, de forma que no logren solubilizarse por encima del 70 %.

En el caso de los geles de pH 6, pH superior al pH de mínima solubilidad de la proteína (pH 4) se consigue una mayor solubilidad (\cong 60 %) en buffers de pH 8 y 10. A diferencia de los resultados obtenidos con el gel ácido, al agregar SDS y SDS+ β -Me se logró aumentar la solubilidad por encima del 80%. El gel de pH 10 presenta un comportamiento semejante al gel de pH 6 en los disolventes de distinto pH. La diferencia se observa en el caso del buffer con SDS que no aumenta sustancialmente la solubilidad con respecto al buffer de pH 8. Este efecto sugiere que la matriz del gel está estabilizada por uniones covalentes, del tipo disulfuro, como lo demuestra el alto valor de solubilidad (\cong 100%) en presencia de β -Me. A pH alcalino, se ve favorecido el intercambio SH/S-S, formándose una red más resistente a la solubilización.

3.2.4 Electroforesis

A continuación se presentan los resultados obtenidos con los ensayos de electroforesis de los extractos solubles de los geles, en diferentes disoluciones amortiguadores, utilizadas en el estudio del apartado anterior. Estos resultados se van a comparar con las electroforesis del aislado extraídos en las mismas disoluciones amortiguadoras.

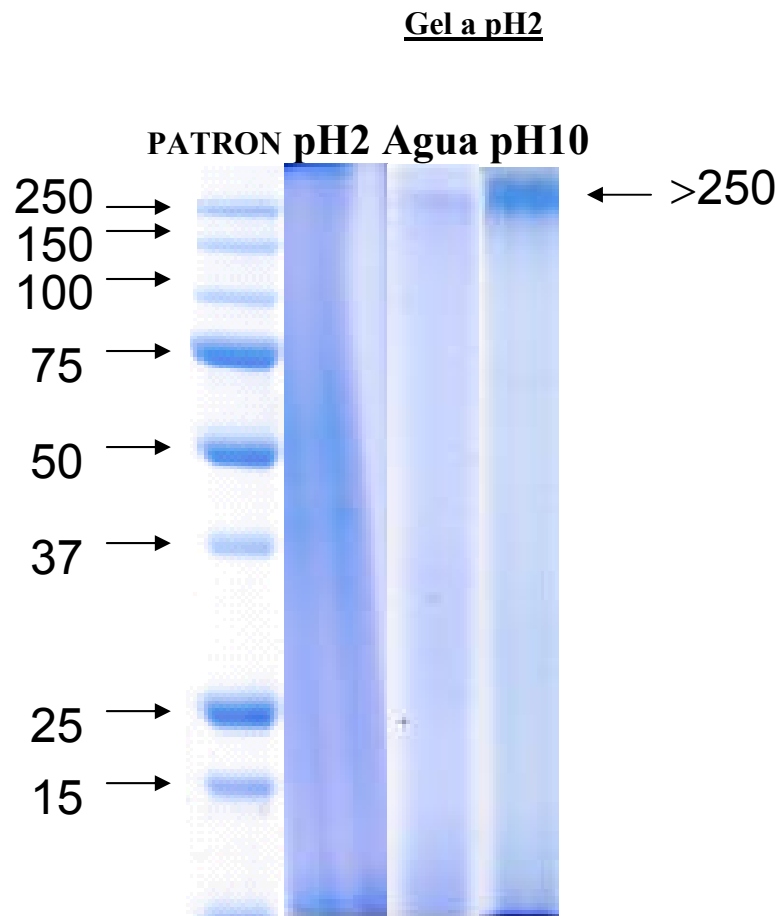


Figura 3.2.4.1. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 2 con disolución amortiguadora a pH2 de 0,03M de fosfato, agua y pH 10 de 0,1M de borato sódico.

En el caso de los extractos con las disoluciones indicadas procedentes del gel de pH 2 apenas se observa nada en el caso de extracción a pH 2 y con agua, si acaso una débil banda en el caso del agua correspondiente a agregados de alto peso molecular pero no mucho. Esto puede deberse a la baja solubilidad de este gel en ambos disolventes: Para el caso del extracto a pH 10, donde la solubilidad es mayor, sí se observa la extracción de agregados de alto peso molecular representado por una banda mucho intensa de masa molecular > 250 kD.

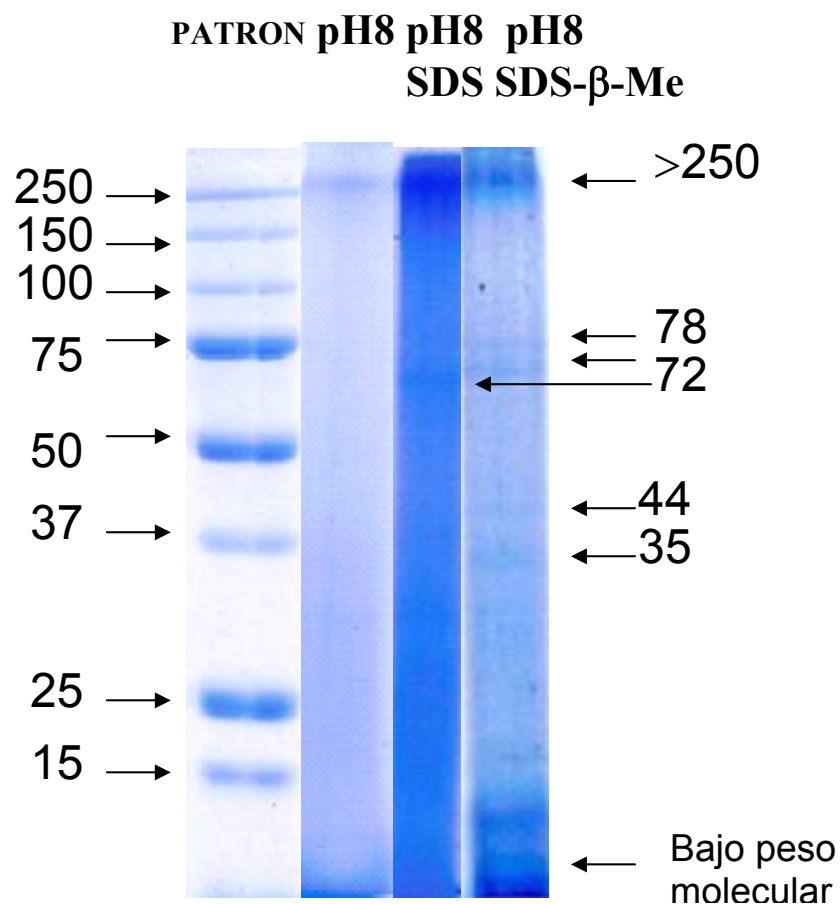


Figura 3.2.4.2. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 2 con disolución amortiguadora a pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA); pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS; pH8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS + 1,00% β-Me.

En esta ocasión se comparan los extractos de pH 8 con adición o no de SDS y de SDS y β-Me. En ellos se observa que la disolución amortiguadora a pH 8, en ausencia de agente desnaturizante y disociante, se llega a una sola banda correspondiente a los aglomerados de alto peso molecular, al igual que ocurría a pH 10, aunque algo menos intensa. Al adicionar SDS no se observa cambio significativo solo el aumento de intensidad de manera apreciable de la banda de alto peso molecular así como una tenue banda a 72kD. En el caso de SDS y β-Me aparece la misma banda de alto peso molecular junto con otras bandas a 78, 72, 44, 35 kD y otras correspondientes a monómeros de muy bajo peso molecular. Estos monómeros deben ser inducidos por el β-Me y aparecen como consecuencia del tratamiento térmico efectuado en la preparación del gel.

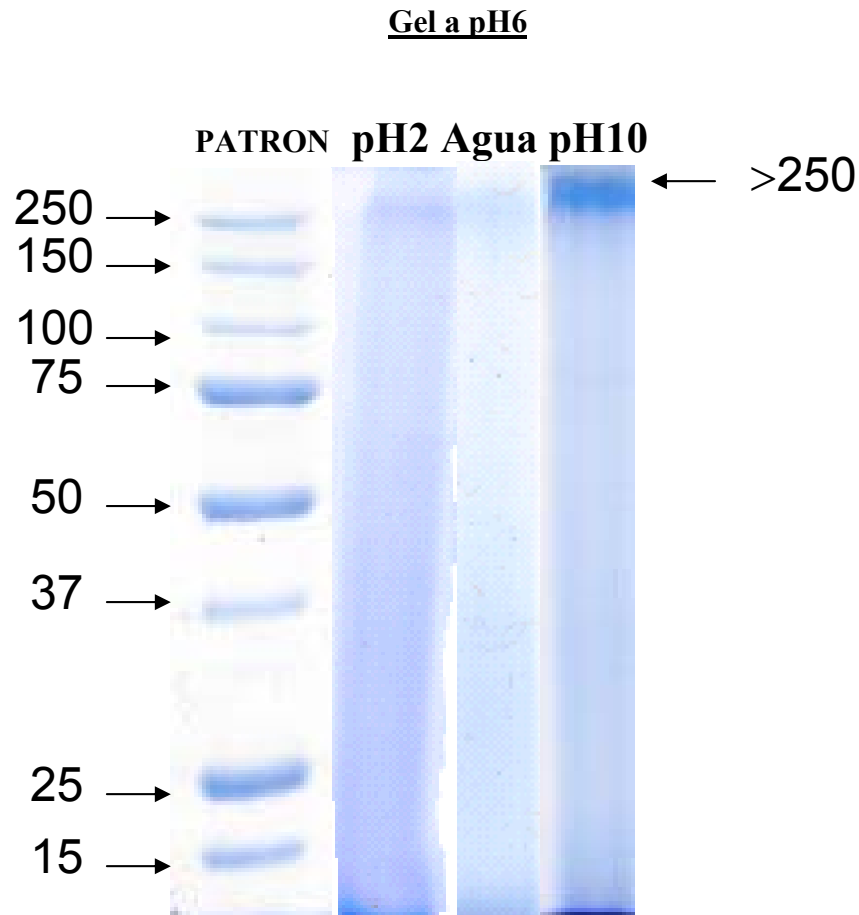


Figura 3.2.4.3. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 6 con disolución amortiguadora a pH 2 de 0,03M de fosfato, agua y pH 10 de 0,1M de borato sódico.

En los geles preparados a pH 6, tanto para el caso del extracto con disolución a pH 2 como con agua, se obtiene de nuevo una banda de alto peso molecular con escasa intensidad debido a la baja solubilidad del gel en esos disolventes. Sin embargo, en el caso del gel a pH 10 se observa una banda bien definida de alto peso molecular similar a la obtenida en el caso del aislado. La mayor intensidad del extracto a pH 10 se relaciona con el incremento de la solubilidad del gel a este pH.

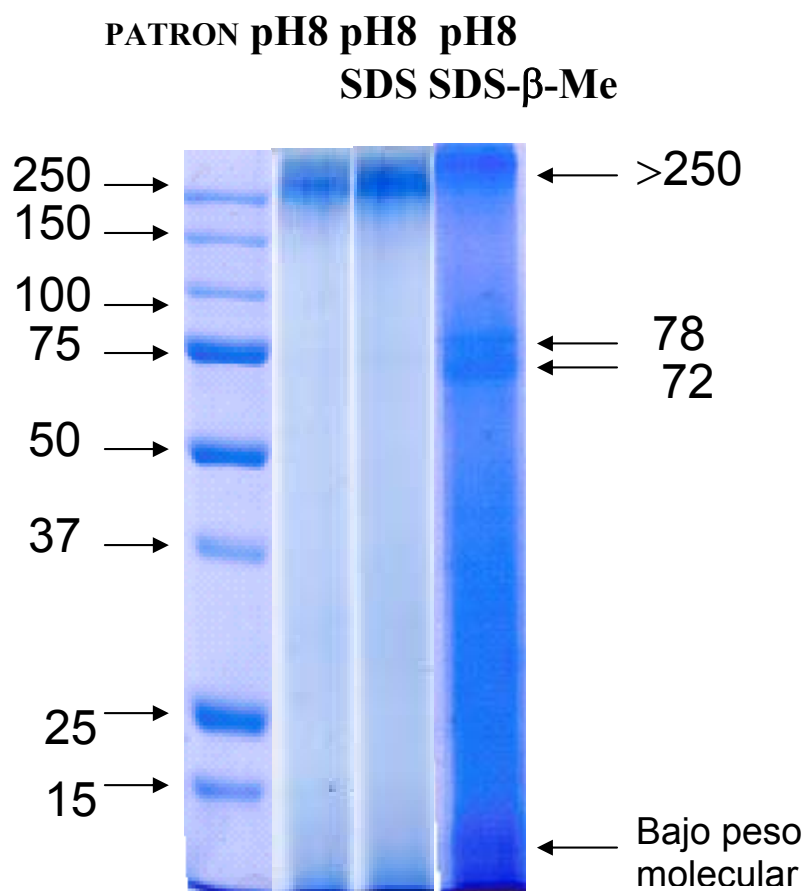


Figura 3.2.4.4. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 6 con disolución amortiguadora pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA); pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS; pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS + 1,00% β-Me.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con el gel a pH 6, en los distintos extractos de pH 8 no se observan grandes diferencias entre las calles correspondientes a pH 8 y pH 8 con SDS, salvo en la intensidad de la banda de alto peso molecular que es mayor en esta última. La situación es diferente en el caso del extracto con SDS y β-Me en el que se observan las bandas correspondientes a 78 y 72 kD. Además se observan bandas a muy bajo peso molecular correspondientes a monómeros que no se observaban en el caso del aislado y que aparecen en todos los extractos de geles donde se utiliza SDS y β-Me.

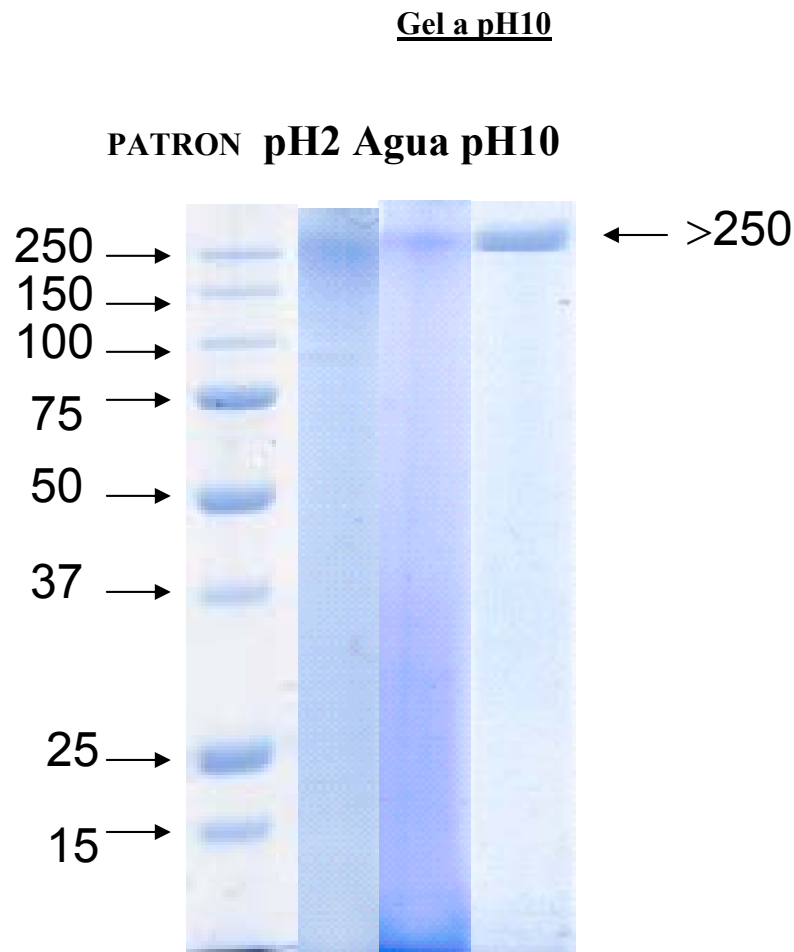


Figura 3.2.4.5. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 10 con disolución amortiguadora a pH 2 de 0,03M de fosfato, agua y pH 10 de 0,1M de borato sódico.

Para los geles preparados a pH 10 se obtienen resultados similares a los anteriores cuando se utilizan extractos a distinto pH sin agentes desnaturizante y disociante. Así, en estos extractos solo se observa la banda correspondiente a agregados de alto peso molecular. Estas se observan a diferente intensidad, dependiendo del pH, lo cual puede atribuirse de nuevo a la diferencia de solubilidad. Tampoco se llega a observar ninguna otra banda a peso molecular más bajo.

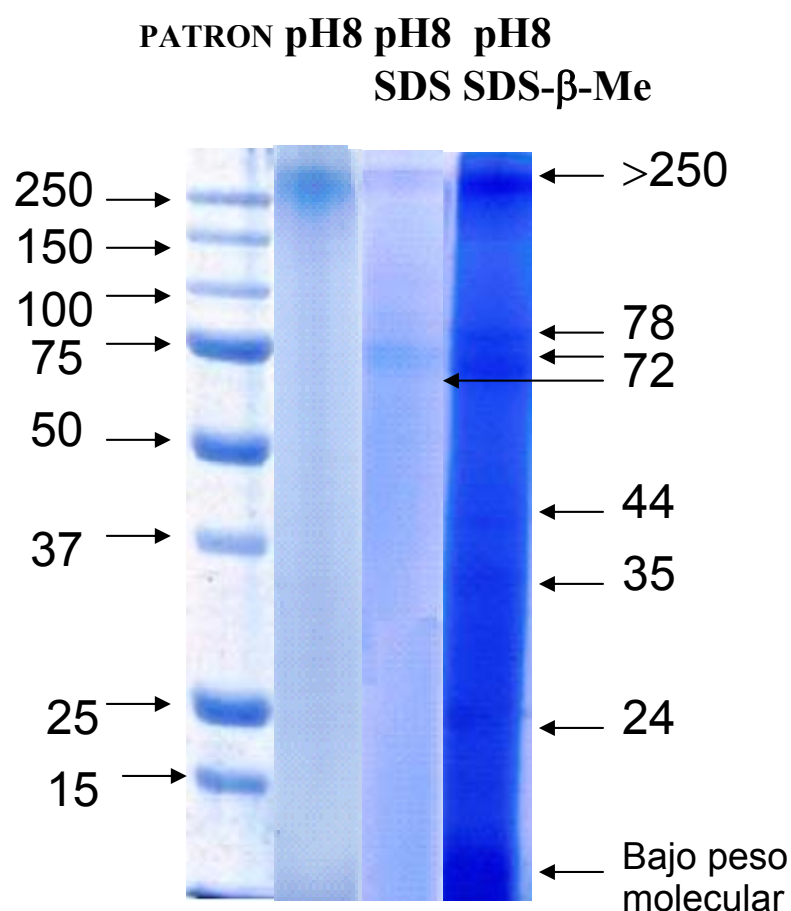


Figura 3.2.4.6. Electroforesis de los extractos solubles de gel de harina de cangrejo al 10% (p/p) y pH 10 con disolución amortiguadora pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA); pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS; pH 8 (0,086 M Tris-0,09 M glicina-4 mM Na₂EDTA) + 0,05% SDS + 1,00% β -Me.

En los extractos a pH 8 realizados sobre geles preparados a pH 10, como ocurría con los geles anteriores se produce la aparición de bandas de bajo peso molecular al añadir SDS y SDS más β -Me. Al adicionar solo SDS aparece muy marcada la banda de alto peso molecular y una banda en torno a 72 kD, mientras que en el caso de adición de SDS más β -Me aparecen nuevas más bandas, a 78, 72, 44, 37 y 24 kD así como otras a peso molecular muy bajo correspondientes a monómeros.

La aparición en todos los caso de bandas de alto peso molecular indica que el tratamiento térmico provoca la formación de agregados así como la aparición de monómeros de bajo peso molecular en el caso de los extractos con β -Me. Debe mencionarse que la banda a 44 kD y 22 kD que aparecían en el caso del aislado, ya no aparecen o aparecen con una intensidad muy baja.

3.2.5 Microscopía electrónica de barrido

En la figura 3.2.5.1 se observan por microscopía electrónica de barrido (SEM) los geles térmicos de aislado de proteína de cangrejo formados a diferentes pH.

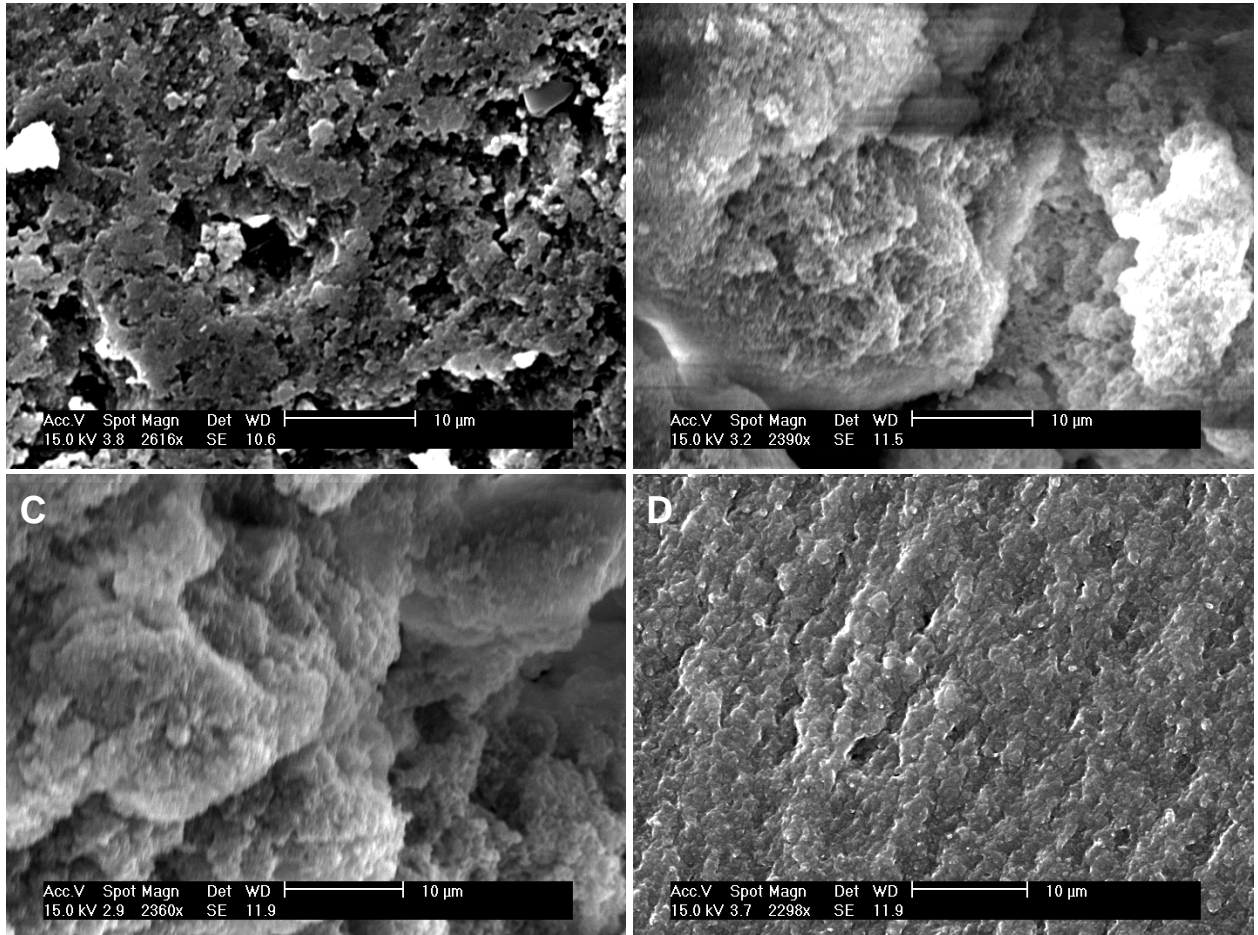


Figura 3.2.5.1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido para geles de aislado de proteína de cangrejo con 10 % (p/p) a diferentes valores de pH. A) pH=2; B) pH=3.5; C) pH=6; D) pH=10.

Como se puede observar, el incremento del pH produce una importante modificación de la microestructura. La microestructura encontrada a pH 2 corresponde a una red extendida en la que prevalecen los entrecruzamientos entre moléculas de proteína, de acuerdo con los resultados publicados por Acton y Dick, 1989. De hecho, como sugirieron Ishioroshi y col. (1981), las colas de α -hélice de las moléculas de miosina parecen jugar un papel fundamental en la gelificación térmica de los sistemas basados en miosina. Por otro lado, el resto de imágenes muestran una red tipo esponja con agregados similares a los encontrados por Samejima y col. (1981) e Ishioroshi y col. (1981) para geles de miosina y subfragmentos de miosina preparados mediante

tratamiento térmico. Estos agregados son mayores en el punto isoeléctrico, en ausencia de interacciones electrostáticas, en el que además el carácter de gel es más débil. A pH alcalino, en el cual las interacciones electrostáticas vuelven a ser importantes, los agregados de proteínas son mucho menores pero la microestructura aún permanece con apariencia esponjosa.

V. Conclusiones



Del análisis de los resultados experimentales obtenidos pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1. Tras finalizar el proceso de emulsificación se produce una evolución de las propiedades viscoelásticas con una extensión de la zona “plateau”, que puede atribuirse a un proceso de floculación extensiva. Este reforzamiento estructural está favorecido cuando la emulsión se almacena a baja temperatura y finaliza unas horas después de la emulsificación.

An evolution of the linear viscoelastic properties of fresh emulsions is found once the emulsification process is over, leading to an extension of the “plateau” region that may be attributed to an extensive flocculation process. This structural network strengthening is favoured by a low-temperature storage stage and finishes a few hours after emulsification.

2. Un incremento en la energía suministrada al sistema durante el procesado conduce a mayores valores de las funciones viscoelásticas y a menores valores de los tamaños de gota, lo cual se traduce en un reforzamiento del entramado estructural así como en un incremento de la estabilidad de la emulsión. Para concentración de emulsionante constante, se ha encontrado una relación potencial entre el tamaño de gota, $d_{3,2}$, y la densidad de energía, E_v , similar a la encontrada por otros autores.

An increase in the energy input supplied during the emulsification process yields higher values of linear viscoelasticity functions and lower droplet size, as has been generally found in the literature on emulsion rheology. This behaviour leads to an enhancement of the elastic network, as well as an increase in emulsion stability. A power-law equation, similar to that one used by other authors, fits the results of the mean droplet diameter, $d_{3,2}$, produced by the emulsification device and the energy density, E_v , supplied at constant emulsifier content.

3. Al aumentar la concentración de emulsionante se produce una reducción del tamaño de gota y una evolución desde emulsiones unimodales a bimodales. Paralelamente, se produce un incremento de las funciones viscoelásticas lineales con un cambio de comportamiento a una concentración en torno al 0,50 %, lo cual sugiere que a partir de ese valor, se excede la concentración de saturación de la interfase. El exceso de proteína se concentra en la fase continua como ha podido comprobarse mediante

microscopía confocal, formándose un entramado tipo gel entre las moléculas de proteínas presentes en la interfase y las de la fase continua.

An increase in the emulsifier concentration gives rise to a significant reduction in droplet size, as well as an evolution from unimodal to bimodal emulsions. Linear viscoelastic functions also undergo a significant increase with the emulsifier content, showing a remarkable change in behaviour for emulsions above 0.50 wt% CF, which suggests that a saturation of the oil–water interface takes place. Above this concentration, the amount of protein exceeding the concentration necessary to saturate the interface tends to be located at the aqueous continuous phase, as may be deduced from CLSM images. These results suggest that protein molecules (located either at the continuous phase or at the interface) participate in the formation of the above mentioned gel-like network.

4. Este entramado confiere alta estabilidad a las emulsiones preparadas a pH elevado, en las que las interacciones electrostáticas son más importantes y la solubilidad de las proteínas es mayor. Así, se consigue una estabilidad durante al menos 5 meses a partir de un 1,25 % de harina, condiciones en las que las emulsiones presentan valores de $G_N^0 > 1 \text{ kPa}$ y $d_{3,2} < 3 \mu\text{m}$.

This network yields long-term stability to emulsions prepared at high pH value, at which electrostatic interactions are relevant and protein solubility is favoured. Thus, from the long-term stability diagram it may be concluded that crayfish flour-based emulsions containing 1.25 wt% CF or higher, at which $G_N^0 > 1 \text{ kPa}$ and $d_{3,2} < 3 \mu\text{m}$, show long-term stability over 5 months at least.

5. El valor del pH de la fase continua resulta crítico para el proceso de emulsificación. La emulsificación directa no es posible a pH intermedio debido a la débil participación de las interacciones electrostáticas y a la baja solubilidad de las proteínas en esas condiciones. Para superar este inconveniente se ha desarrollado un procedimiento indirecto de preparación de emulsiones que consiste en tres etapas:

- i. Emulsificación a $\text{pH} > 10.5$, que corresponde al pI de los segmentos en forma de varilla de las proteínas miofibrilares
- ii. Maduración;
- iii. Adición de ácido para reducir el pH hasta el valor deseado.

Este método ha resultado válido para obtener emulsiones concentradas de harina de cangrejo que resultan estables en un amplio intervalo de valores de pH (incluyendo aquellos de aplicación alimentaria). No obstante, a medida que nos acercamos al pI, se produce una reducción de las interacciones electrostáticas con una tendencia hacia un debilitamiento del entramado de estas emulsiones y un mayor riesgo de aparición de desestabilización por coalescencia y cremado.

The pH of the continuous phase has been found to be critical for the emulsification process. Thus, crayfish flour could not lead to any stable emulsions in a range of pH values valid for food applications. As a consequence, it was necessary to develop an alternative emulsification process by means of an indirect procedure that consists of three stages:

- i. Emulsification at pH higher than 10.5 that corresponds to the pI for rod segments of myofibrillar proteins*
- ii. Maturation stage to allow complete development of the network formed at rest;*
- iii. Addition of HCl acid to reduce the pH 8 to the desired value.*

This procedure has shown to be valid to obtain highly concentrated crayfish flour-based stable emulsions, within a wide range of pH conditions (including the values for food applications), that otherwise could not be stabilized. However, close to CF isoelectric point, at which electrostatic forces tend to vanish, a weakening of the elastic network takes place and the risk of coalescence and creaming becomes higher.

6. Las propiedades interfaciales de las proteínas de cangrejo, tanto en el caso de aire-agua como aceite-agua, resultan más favorables a pH 8 que a pH 2. Estos resultados pueden explicar las mejores propiedades viscoelásticas, de distribución de tamaños y de estabilidad que presentan las emulsiones a pH 8 en comparación las de pH 2.

Interfacial properties of crayfish protein, either at the air-water or the oil-water interface, yields lower values at pH 8 than under acid conditions (pH 2). This fact may explain the best results obtained for linear viscoelastic properties, droplet size distribution and stability at pH 8, in comparison to those obtained at pH 2.

7. Es posible obtener un reforzamiento del entramado estructural de la emulsión sin alteraciones significativas de la DTG mediante tratamiento térmico, si bien este efecto depende del pH. El tratamiento térmico puede producir rotura de puentes de hidrógeno pero también puede favorecer la agregación irreversible de proteínas

mediante enlaces hidrofóbicos. A pH elevado, las interacciones electrostáticas prevalecen y la temperatura sólo produce el primer efecto. En el punto isoeléctrico o pH intermedio, el segundo efecto es más importante conduciendo al reforzamiento del entramado que da lugar a una mejora de la estabilidad de la emulsión.

Thermal treatment may produce an enhancement of the elastic network of CF-based emulsions without any significant modification in droplet size distribution. However, this effect depends on pH. Thermal treatment cause break up of hydrogen bonds, but also favours irreversible protein aggregation through hydrophobic interactions. At high pH values, electrostatic interactions prevail and thermal energy only produces the first effect. At pH close to the isoelectric point or at intermediate pH value, the second effect becomes more important leading to an enhancement in the elastic network and subsequently to an increase in emulsion stability.

8. La harina de cangrejo presenta un gran potencial como nuevo emulsionante, con capacidad para estabilizar emulsiones concentradas aceite en agua a pH alcalino, mostrando características típicas de sistemas altamente floculados. Sin embargo, su utilización como emulsionante alimentario (pH intermedio) requiere algún procedimiento de mejora de las propiedades funcionales. En este estudio se ha propuesto la preparación de la emulsión mediante un procedimiento indirecto. Sin embargo existen otras alternativas que deben contemplarse en un futuro entre las cuales puede citarse la mejora del proceso de fabricación de la harina para evitar una excesiva desnaturalización de las proteínas presentes, tratamientos mediante tecnología de alta presión u obtención de hidrolizados a partir del aislado proteico.

Crayfish flour possess a high potential as a new emulsifier in the stabilization of highly concentrated o/w emulsions, showing fairly good ability to produce long-term stability at high pH and showing a behaviour typical of extensive flocculated emulsions, provided that the flour content is above a critical value. However, CF cannot be directly used as a food emulsifier due to pH limitations and some method to improve its functional properties would be required. An indirect emulsification procedure has been proposed in this study, as well as a thermal treatment to enhance emulsion stability. However, other alternatives should be considered in future research, such as an optimization of processing conditions for the crayfish flour manufacture to minimize protein denaturation, use of Ultra High Pressure processing of crayfish protein systems, or preparation of crayfish protein hydrolysates.

9. El aislado de harina cangrejo puede ser utilizado para la fabricación de geles tipo surimi sometiendo a tratamiento térmico a las dispersiones de proteínas. Inicialmente las propiedades viscoelásticas lineales de las dispersiones de aislado de cangrejo presentan un comportamiento tipo gel débil, incluso antes de aplicar tratamientos térmicos. Este comportamiento podría estar relacionado con cambios conformacionales de las moléculas de proteína producidos durante la etapa de secado en tambor rotatorio del proceso de fabricación de la harina de cangrejo.

Linear dynamic viscoelastic properties of Crayfish Protein Isolate aqueous dispersions indicate occurrence of a gel-like behaviour. There is a tendency for CFPI dispersions to exhibit remarkable gelation properties even before the application of heat. This tendency could be connected with molecular changes brought about by the application of drum-drying to the CF protein concentrate used as the raw material for the protein isolate extraction, which must have caused heavy denaturation and aggregation to CF proteins.

10. Las medidas viscoelásticas lineales también ponen de manifiesto que el tratamiento térmico efectuado sobre el aislado favorece la capacidad para formar estructuras dando lugar a un reforzamiento del entramado del gel. Este reforzamiento es más importante a medida que aumenta la concentración o se reduce el pH, con la excepción del punto isoeléctrico. Tanto la concentración como el pH modifican el balance de fuerzas y, como consecuencia, tienen una gran importancia sobre la formación del gel.

Dynamic viscoelastic measurements also reveal the ability to form network structures under thermal processing that leads to a remarkable enhancement in gel strength. In addition, this gel network microstructure for CFPI systems is also reinforced (either before or after thermal processing) by increasing CFPI concentration or by reducing pH, excepting at the isoelectric point. Both variables may modify the balance of forces to a high extent (particularly between electrostatic and hydrophobic interactions).

11. Las repulsiones electrostáticas juegan un papel importante en la cinética de gelificación. Así la cinética de gelificación es más rápida en el punto isoeléctrico donde la carga superficial es cero, mientras que se vuelve más lenta a medida que nos alejamos del punto isoeléctrico.

Electrostatic repulsive interactions play an important role in gelation kinetics. Thus, gelation kinetics is faster at the isoelectric point, when the balance of surface charges is zero, whereas the slowest kinetics corresponds to the highest pH values, at which the charge density at the protein surface is higher.

12. Se obtienen resultados similares entre las propiedades viscoelásticas de los geles tratados térmicamente in situ y las correspondientes a los geles obtenidos en baño. Tan sólo aparecen pequeñas diferencias atribuibles a la distinta historia térmica, como consecuencia de pequeñas variaciones en los ciclos de calentamiento, y a las diferencias en la geometría del sistema de gelificación. Estos resultados tienen una gran importancia práctica, ya que abren la posibilidad de abordar el cambio a escalas superiores a partir de los resultados de gelificación obtenidos tras un tratamiento térmico en un reómetro.

Both thermal treatments carried out in situ or by using a thermal bath give rise to similar results of linear viscoelastic properties and consequently gel strength. Only minor differences take place that may be attributed to slight disparities in the thermal history (as the thermal cycles applied are similar but not coincident) and to differences in the geometry of the gelation system. This fact involves a remarkable practical consequence since opens the possibility to carry out scaling-up from the results obtained by thermal gelation in a rheometer.

VI. Bibliografía

-
- Acton, J.C., & Dick, R.L. (1989) Functional roles of heat protein gelation in processed meat, Kinsella J.E., Soucie W.G. (eds). American Oil Chemists Society, Champaign, IL, 195-209.
 - Aguilera, J. M.; Stanley, D. W. (1999) *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, 2nd Edition, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.
 - Aguilera, J.M.; Xiong, Y.L.; Kinsella, J.E. (1993) Viscoelastic properties of mixed dairy gels, *Food Res. Int.*, 1, 26, 11.
 - Ahuja, S.K. (1984) *Proceedings IX Int. Congress on Rheology*, México, 3, 515.
 - Alexander, A.E.; Johnson, P. (1949) *Colloid Science*, I, Oxford University Press, Londres.
 - A.O.A.C. (1995) Official methods of analysis, 13th Edition; *Association of Official Analytical Chemistry*, Washington, D.C.
 - Asada, T.; Onigi, S. (1983) *Polym. Eng. Reviews*, 3, 323.
 - Astarita, G. (1990) The Engineering reality of yield stress, *J. Rheol.*, 34, 275-277.
 - Bacon, J.R.; Noel, T.R.; Lambert, N. (1990) Preparation of transparent pea protein gels: a comparison of isolation procedures, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 25, 527-537.
 - Balny, C.; Masson P. (1993) Effects of high pressure on proteins, *Food Rev. Int.*, 9, 611-628.
 - Banks, W.; Muir, D.D. (1988) Stability of alcohol containing emulsions, *Advances in Food Emulsions and Foams*, Dickinson, E.; Stainsby, G. (eds.), Elsevier Applied Science, Londres.
 - Barnes, H.A. (1992) Theoretical and Applied Rheology, Moldenaers, P.; Keunings, R. (eds.), Elsevier, Amsterdam.
 - Barnes, H.A. (1998) *Progress and Trends in Rheology V*, Enri, I.; Cvelbar, R. (eds.), 201-202.
 - Barnes, H.A.; Hutton, J.F.; Walters, K. (1989) *An introduction to Rheology*, Elsevier, Londres.
 - Barnes, H.A.; Walters, K. (1985) The Yield Stress Myth?, *Rheol. Acta*, 24, 323-326.
 - Beneyto, F.J.; Lema, J.M.; Sola, C. (1980) *Afinidad*, 37, 306-312.
 - Bengoechea, C. (2006) *Estudio Reológico de Emulsiones alimentarias estabilizadas con Proteínas Vegetales*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España.
 - Bengoechea, C.; Cordobés, F.; Guerrero, A. (2006) Rheology and microstructure of gluten and soya-based o/w emulsions, *Rheol. Acta*, 46, 13-21.
 - Bengoechea, C.; Romero, A.; Villanueva, A.; Alaiz, M.; Millán, F.; Guerrero, A. (2008) Physicochemical and thermal characterization of carob (*Ceratonia siliqua*) proteins, *Food Chem.*, 107, 657-683.
 - Benjamins, J.; Cagna, A.; Lucassen-Reynders, E.H. (1996) Viscoelastic properties of tracylglycerol/water interfaces covered by proteins, *Coll. Surf.*, 114, 245-254.
 - Ben-Naim, A. (1990) *Hydrophobic interactions*, Plenum Press, New York.
 - Beveridge, T.; Jones, L.; Tung, M.A. (1984). Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soyben and albumen protein gels, *J. Agric. Food Chem.*, 32, 307-313.
 - Beverung, C.J.; Radke, C.J.; Lucassen-Reynders, E.H. (1999) Protein adsorption at the oil water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements, *Biophys. Chem.*, 81, 59-89.

-
- Bingham, E.C. (1929) *Fluidity and Plasticity*, Mc Graw-Hill, Nueva York.
- Binsi, P. K.; Shamasundar, B. A.; Dileep, A.O. (2007) Some physico-chemical, functional and rheological properties of actomyosin from green mussel (*Perna viridis*), *Food Res. Int.*, 39, 992-1001.
- Blanshard, J.M.V.; Mitchell, J.R. (1976) Rheological properties of pectate gels, *J. Text. Stud.*, 7, 341-351.
- Blanshard J.M.V.; Mitchell, J. R. (1988) *Food Structure – Its Creation and Evaluation*, Butterworths, Londres.
- Bokström, J.; Sjöberg, J.; Stenius, P.; Wärnheim, T. Y.; Fogler, H.S. (1986) *Tenside*, 25, 125.
- Booth, F. (1950) The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetric electrolyte, *Proc. R. Soc. London Ser. A*, 203, 533.
- Bourne, M.C. (1978) Texture profile analysis, *Food Technol.*, 72, 62-66.
- Bourne, M.C. (2002) *Food texture and viscosity: concept and measurement*, 2nd Edition, Academic Press, Londres.
- Bowland, E.L.; Foegeding, E.A. (1995) Effects of anions on thermally induced whey protein isolated gels. *Food Hydrocoll.*, 8, 47-56.
- Braginsky, L.M., Belevitskaya, M.A. (1996) Kinetics of droplets breakup in agitated vessels, *Liquid-Liquid Systems*, Kulov, N.N. (ed.), Nova Science, Commack, Nueva York, cap. 1.
- Braudo, E.E.; Plashchina, I.G.; Tolstoguzov, V.B. (1984) Structural Characterization of thermoreversible anionic polysaccharide gels by their elastoviscous properties, *Carbohydr. Polym.*, 4, 23-48.
- Brennan, J.G.; Butters, J.R.; Cowell, N.D.; Lilly, A.E. (1980) *Las operaciones de la Ingeniería de los Alimentos*, Acirbia, Zaragoza.
- Bressy, L., Hebraud, P., Schmitt, V., Bibette, J. (2003) Rheology of emulsions stabilized by solid interfaces, *Langmuir*, 19, 598-604.
- Cano, M.P.; de Ancos, B. (2005) Advances in Use of High Pressure to Processing and Preservation of Plant Foods, *Novel Food Processing Technologies*, Barbosa-Cánovas, G.V.; Tapia, M.S., Cano, M.P.; Martín-Belloso, O.; Martínez, A. (eds.), CRC Press, Boca Raton, 283-309.
- Cano, E.; Ocete, M.E. (2000) Average size reproductive ecology of *Procambarus clarkii* Girard (1852) (Decapoda, Cambaridae) in the Guadalquivir river marshes, *Zool. Baetica*, 11, 17,26.
- Cao, Y. H.; Dickinson, E.; Wedlock, D. J. (1990) Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide, *Food Hydrocoll.*, 4, 185-195.
- Castellani, O.; Belhomme, C., David-Briand, E., Guerin-Dubaird, C., & Anton, M. (2006) Oil-in-water emulsion properties and interfacial characteristics of hen egg yolk phosvitin, *Food Hydrocoll.*, 20, 35-43.
- Chan, J.K.; Gill, T.A.; Paulson, A.T. (1992) The dynamics of thermal denaturation of fish myosins, *Food Res. Int.*, 25, 117-123.
- Chappleau, N.; de Lamballerie-Anton, M. (2003) Improvement of emulsifying properties of lupin by high pressure induced aggregation, *Food Hydrocoll.*, 17, 273-280.
- Chen, J.; Dickinson, E. (1998) Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels, *J. Text. Stud.*, 29, 285-304.

-
- Cheng, D.C.H. (1986) Yield stress a time dependent property and how to measure it, *Rheol. Acta*, 25, 542-554.
- Cheng, D.C.H. (1987) Thixotropy, *Int. J. Cosm. Sci.*, 9, 151-191.
- Clark, A.H. (1987) The application of network theory to food systems, *Food Structure and Behaviour*, Blanshard, J.M.V.; Liillford, P.J. (eds.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 2.
- Clark, A.H. (1991) Structural and mechanical properties of biopolymer gels, *Food Polymers, Gels and Colloids*, Dickinson, E. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 322-338.
- Clark, A.H. (1996) Biopolymers gels, *Curr.Opinion Colloid Interf. Sci.*, 1, 712-717.
- Clark A.H. (1998) Gelation of globular proteins. *Functional properties of food macromolecules*, 2nd Edition, Hill, S.E.; Ledward, D.A.; Mitchell, J.R. (eds.), Gaithersburg, 77-142.
- Clark, A.H.; Kavanagh, G.M.; Ross-Murphy, S.B. (2001) Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocoll.*, 15, 383-400.
- Clark, A.H.; Richardson, R.K.; Robinson, G.; Ross-Murphy S.B.; Weaver, A.C. (1982) Structure and mechanical properties of agar/BSA co-gels, *Prog. Food Nutr. Sci.*, 6, 149-158.
- Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. (1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels, *Adv. Polym. Science*, 83, 57-192.
- Cremades, O. (2004) *Caracterización y Producción de carotenoproteínas de P. Clarkii*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Damodaran S. (1997) Food proteins:an overview, *Food proteins and their applications*, Damodaran, S.; Paraf, A. (eds.), New York, Marcel Dekker, Inc. Cap. 1, 1-24.
- Damodaran, S. (1988) Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 262-269.
- Darby, R. (1976) *Viscoelastic fluids; An Introduction to Their Properties and Behaviour*, Marcel Dekker, Nueva York.
- Darby, R. (1984) *Emulsions and Emulsion Technology, III*, Lissant, K.J. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 45.
- Davis, R.H.; Schonberg, J.A.; Rallison, J.M. (1989) The lubrication force between two viscous drops, *Physics of Fluids A*, 1, 77.
- De Kee, D.; Code, R.K.; Turcotte, G. (1983) Flow properties of time-dependent foodstuff, *J. Rheol.*, 27, 581-604.
- Dealy, J.M. (1982) *Rheometers for Molten Plastics*, (Eds) Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York.
- Demetriades, K., Coupland, J.N.; McClements, D.J. (1997) Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl, *J. Food Sci.*, 62, 342-347.
- Dickinson, E. (1988) *Food Structure: its Creation and Evaluation*, Blanshard, J.M.V.; Mitchell, J.R. (eds.), Butterworths, Londres.
- Dickinson, E. (1989) Food colloids – an overview, *Colloids Surf.*, 42, 191-204.
- Dickinson, E. (1992) *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford.

-
- Dickinson, E. (1996) *Les colloïdes alimentaires*, Courthaudon, J.L. ; Le Meste, M (eds.), Masson, Paris.
- Dickinson, E.; Casanova, H. (1999) A thermoreversible emulsion gel based on sodium caseinate, *Food Hydrocoll.*, 13, 285-289.
- Dickinson, E.; Flint, F.O.; Hunt, J.A. (1989) Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions, *Food Hydrocoll.*, 3, 389-397.
- Dickinson, E.; Hong, S.T. (1995) Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein stabilized emulsion gels, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2560-2566.
- Dickinson, E.; Hong, S.T.; Yamamoto, Y. (1996) Rheology of heat-set emulsion gels containing beta-lactoglobulin and small-molecule surfactants, *Neth. Milk Dairy J.*, 50, 2, 199.
- Dickinson, E.; Hunt, J.A.; Horne, D.S. (1992) Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed β -casein or phosvitin, *Food Hydrocoll.*, 6, 359-370.
- Dickinson, E., Stainsby, J. (1982) *Colloids in Foods*, Applied Science Publishers, Londres.
- Dickinson, E.; Yamamoto, Y. (1996a) Effect of lecithin on the viscoelastic properties of β -lactoglobulin-stabilized emulsion gels, *Food Hydrocoll.*, 10, 301-307.
- Dickinson, E.; Yamamoto, Y. (1996b) Viscoelastic properties of heat-set whey protein stabilized emulsion gels with added lecithin, *J. Food Sci.*, 61, 811-816.
- Dimitrova, T.D., Leal-Calderon, F. (2001) Bulk elasticity of concentrated protein-stabilized emulsions, *Langmuir*, 17, 3235-3244.
- Dimitrova, T.D., Leal-Calderon, F. (2004) Rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions, *Adv. Coll. Int. Sci.*, 108-109, 49-61.
- Djakovic, L.M.; Dokic, P. (1977) Effect of emulsifiers on the dynamics of oil emulsification in water, *Tenside Deter.*, 14, 126-134.
- Dumoulin, M.; Ozawa, S.; Hayashi, R. (1998) Textural Properties of Pressure-Induced Gels of Food Proteins Obtained under Different Temperatures including Subzero. *J. Food Sci.*, 63, 92-95.
- Edwards, S.F.; Lillford, P.J.; Blanshard, J.M.V. (1987). Gel and networks in practice and theory, *Food Structure and Behaviour*, Blanshard, J.M.V.; Lillford, P.J. (eds.), Academic Press, Londres. 1.
- Egelanddal, B.; Fretheim, K.; Harbitz, O. (1986) Dynamic Rheological Measurements on Heat-induced Myosin Gels: An Evaluation of the Method's Suitability for Filamentous Gels, *J. Sci. Food Agric.*, 37, 944-954.
- Elliot, J.H.; Ganz, A.J. (1977) Salad dressings. Preliminary rheological characterization, *J. Text. Stud.*, 8, 359-371.
- Etheridge, R.D.; Pesti, G.M.; Foster, E.H. (1998) A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 73, 21-28.
- Euston, S.R.; Finnigan, S.R.; Hirst, R.L. (2001) Heat-induced destabilization of oil-in-water emulsions formed from hydrolyzed whey protein, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5576.
- Farahnaky, A. (2003) *Food Storage: Changes to the Protein components*, Tesis doctoral, Division of Food Science, University of Nottingham.
- Farinato, R.S.; Rowell, R.L. (1983) Optical properties of emulsions, *Encyclopedia of Emulsions Technology*, Vol. 1. Basic Theory, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 8.
- Fellows, P. (1988) *Food Processing Technology: Principles and Practice*, VCH Publishers, Weinheim.

-
- Fennema, O.R. (1996) *Food Chemistry*, 3rd ed., Marcel Dekker, Nueva York.
- Ferguson, J.; Kembrowski, Z. (1991) *Applied Fluid Rheology*, Elsevier Science Publishing, Nueva York.
- Fernández-Martín F., Fernández P., Carballo J., Jiménez Colmenero F. (1997) Pressure/Heat combinations on Pork Meat Butters: Protein thermal behaviour and product rheological properties. *J. Agr. Food Chem.*, 45, 4440-4445.
- Ferry, J.D. (1980) *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley & Sons, (eds.), Nueva York.
- Finch, R. (1977) Whatever happened to fish protein concentrate. Prospects for success still not very bright, *Food Technol.* 31, 44, 46-47, 49, 52-53.
- Flores, J.; Bernell, S. (1984) Estructura y. propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 24, 1-5.
- Foegeding, E.A. (1993) The effect of cations on rheological properties of whey protein gels, *Food proteins: structure and functionality*, Schwenke K.D.; Mothes R. (eds.), Weinheim, p 341-343.
- Franco, J.M.; Guerrero, A.; Gallegos C. (1995) Rheology and processing of salad dressing emulsions, *Rheol. Acta*, 34, 513-524.
- Franco, J.M.; Partal, P.; Ruíz-Marquez, D.; Conde, B.; Gallegos, C. (2000) Influence of pH and protein thermal treatment on the rheology of pea protein-stabilized emulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 975-983.
- Franco, J.M.; Raymundo, A.; Sousa, I.; Gallegos, C. (1998) Influence of processing variables on the rheological and textural properties of lupin protein-stabilized emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3109-3115.
- Friberg, S.E.; Larsson, K. (1997) *Food Emulsions*, 4^a Ed., Marcel Dekker, Nueva York.
- Fuchigami, M.; Teramoto, A. (2003) Texture and structure of high-pressure-frozen gellan gum gel, *Food Hydrocoll.*, 17, 895-899.
- Galakza, V.B.; Ledward, D.A.; Sumner, I.G.; Dickinson. E. (1997) Influence of high pressure on bovine serum albumin and its complex with dextran sulphate, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 3465-3471.
- Gallegos, C. (1982) Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Gallegos, C.; Berjano, M.; Choplin, L. (1992) Linear viscoelastic behaviour of commercial and model mayonnaise, *J. Rheol.*, 36, 465-478.
- Gallegos, C.; Franco, J.M.; Madiedo, J.M.; Raymundo, A.; Sousa I. (2002) Nonlinear Viscoelasticity Modeling of Vegetable Protein-Stabilized Emulsions, *Engineering and food for the 21st century*, Weltichanes, J.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Aguilera, J.M. (eds.), CRC Press, cap. 25.
- Gallegos, C.; Sánchez, M.C.; Guerrero, A.; Franco, J.M. (1996) Effect of process parameters on the rheological properties of o/w emulsions, *Rheology and Fluid Mechanics of Nonlinear Materials D.A.*, Advani, S.G. (eds.), Siginer, ASME, Nueva York, 217.
- Garti, N. (1997) Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications, *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss.*, 30, 222.
- Gilleland, G.M.; Lanier, T.C.; Hamann, D.D. (1997) Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels, *J. Food Sci.*, 62(4), 713-716.
- Gopal, E.S.R. (1968) Principles of emulsion formation, *Emulsion Science*, Sherman, P., (ed.), Academic Press, Londres, cap. 1.

-
- Grace, H.P. (1982) Dispersion Phenomena in High Viscosity Immiscible Fluid Systems and Application of Static Mixers as Dispersion Devices in Such Systems, *Chem. Eng. Commun.*, 14, 225-277.
- Gross, M.; Jaenicke, R. (1994) Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and proteins complexes, *Eur. J. Biochem.*, 22, 617-630.
- Groves, M.J.; Ahmad, A.B. (1976) Some rheological properties of lyotropic liquid-crystals formed by phosphated polyoxyethylene, n-hexane and water, *Rheol. Acta*, 15, 501-507.
- Guerrero, A.; Ball, H. (1994) Effect of spray-dried or reduced-cholesterol yolk and temperature on the linear viscoelastic properties of mayonnaise, *J. Text. Stud.*, 25, 363-381.
- Hall, I.S.; Dawson, E. (1940) Effect of Air Film, *Emulsification Ind. Eng. Chem.*, 32, 415-420.
- Halling, P.J. (1981) Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 15, 155-203.
- Harmsen, G.J.; Van Schooten, J.; Overbeek, J.T.G. (1953) Viscosity and Electroviscous Effect of the AgI Sol. 1. Influence of the Velocity Gradient and of Aging of the Sol., *J. Colloid Sci.*, 8, 64-71.
- Hendrix, W.P.; Orr, C. (1972) Automatic sedimentation size analysis instrument, *Particle Size Analysis*, Groves, M.J.; Wyatt-Sargent, J.L. (eds.), Society for Analytical Chemistry, Londres.
- Henneck, M.; Rahalkar, R.R.; Richmond, P. (1984) Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions, *J. Food Sci.*, 49, 1271-1274.
- Hermansson, A.M. (1978) Physico-chemical aspects of soy protein structure formation, *J. Text. Stud.*, 9, 33-58.
- Hermansson, A.M.; Langton, M. (1993) Electron Microscopy, *Physical Techniques for the study of Food Biopolymers*, Ross-Murphy, S.B., (ed.), Elsevier, Londres, 277-338.
- Hiemenz, P.C.; Rajagopalan, R. (1997) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd Ed., Marcel Dekker, Nueva York.
- Higgs, P.G.; Ross-Murphy, S.B. (1990) Creep measurements of gelatin gels, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 223-240.
- Hjelmeland, L.M.; Chrambach, A. (1981) Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: a discussion of basic concepts, *Electrophoresis*, 2, 1-11.
- Hoffman, R.L. (1974) Discontinuous and dilatant viscosity behaviour in concentrated suspensions, *J. Coll. Int. Sci.*, 46, 491-506.
- Hudson, N.E.; Ferguson, J. (1994) *Progress and Trends in Rheology IV*. Gallegos, C.; Seinkopff, Darmstad, 432.
- Hunt, J.A.; Dalgleish, D.G. (1994) Effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate, *J. Food Sci.*, 59, 2131.
- Hunter, R.J. (1986) *Foundations of Colloid Science*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford.
- Hunter, R.J. (1989) *Foundations of Colloid Science*, vol. 2, Oxford University Press, Oxford.
- Hunter, R.J. (1993) *Introduction to Modern Colloid Science*, Oxford University Press, Oxford.
- Ishioroshi, M., Samejima, K., Aire, Y., & Yasui, T. (1980) Heat Induced Gelling Properties of Actomyosin: Effect of blocking the myosin-actin interaction in heat-induced gelation of myosin in the presence of actin, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2185.

-
- Israelachvili, J.N.; Wennerstrom, H. (1996) Role of hydration and water-structure in biological and colloidal interactions, *Nature*, 379, 219-225.
- Janssen, J.M.H.; Boon, A.; Agterof, W.G.M. (1994) Influence of dynamic interfacial properties on droplet breakup in simple shear flocs, *Fluid Mech. Trans. Phenom.*, 40, 1929-1939.
- Janssen, J.M.H.; Meijer, H.E.H. (1995) Dynamics of liquid-liquid mixing: A 2-Zone Model, *Polym. Eng. Sci.*, 35, 1766-1780.
- Jauregui, C.A.; Regenstein, J.M.; Baker, R.C. (1981) Expressible moisture, a simple centrifugal method for measuring water binding properties of muscle foods. *J. Food Sci.*, 46, 1271-1273.
- Juang, R.H.; Chang, Y.D.; Sung, H.Y.; Su, J.C. (1984) Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich, *Anal. Biochem.*, 141, 348-350.
- Kabalnov, A.S., Shchukin, E.D. (1992) Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 38, 69-97.
- Kalab, M.; Allan-Wojtas, P.; Miller, S.S. (1995) Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis, *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 177-186.
- Kandori, K. (1995) Applications of microporous glass membranes: membrane emulsification, *Food Processing: Recent Developments*, Gaonkar, A.G. (ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Karbstein, H.; Schubert, H. (1995a) Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions, *Chem. Eng. Process.*, 34, 205-211.
- Karbstein, H.; Schubert, H. (1995b) Basic criteria for the selection of emulsifying machines, *Food Ingredients Europe Conference Proceedings*, Frankfurt, 93.
- Kavanagh, G.M.; Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. (2002) Heat-induced gelation globular proteins: Part 4 Gelation kinetics of low β -lactoglobulin gels, *Langmuir*, 16, 9584-9594.
- Kavanagh, G.M.; Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. (2002) Heat-induced gelation globular proteins: Part 5 Creep behaviour of β -lactoglobulin gels, *Rheol. Acta*, 41, 274-284.
- Kerstens, S.; Murray, B.S.; Dickinson, E. (2004) Confocal microscopy of heat-induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in presence of non-ionic surfactant, *Food Hydrocoll.*, 19, 625-633.
- Kim, B.Y. (1987) Rheological investigation of gel structure formation by fish proteins during setting and heat processing, Ph. D. thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Kim, H. J.; Decker, E. A.; McClements, D. (2001) Role of postadsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH, *Langmuir*, 18, 7577-7583.
- Kinsella, J.E. (1976) Functional properties of food proteins: a review, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7, 219-280.
- Kirby, A.R.; Gunning, A.P.; Morris, V.J. (1995) Atomic force microscopy in food research: A new technique comes of age, *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 359-365.
- Kitabate, N.; Tani, Y.; Doi, E. (1989) Rheological properties of heat-induced ovoalbumin gels prepared by 2-step and one-step heating methods, *J. Food Sci.*, 54, 1632-1638.
- Kocher, P.M.; Foegeding, E.A. (1993) Microcentrifuge-base method for measuring water holding of protein gels, *J. Food Sci.*, 58, 1040-1046.
- Kristinsson, H. G.; Rasco B. A. (2000) Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40, 43-81.

-
- Kuehl, R. O. (2000) *Design of Experiments*, 2nd Ed., Thomson Learning, Duxbury, Massachusetts, 95-98.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Langton, M.; Jordansson, E.; Altskär, A.; Sorensen, C.; Hermansson, A.M. (1999) Microstructure and image analysis of mayonnaises, *Food Hydrocoll.*, 13, 113-125.
- Lanier, T.C.; Carvajal, P.; Yongsawatdigul, J. (2004) Surimi Gelation Chemistry, *Surimi and Surimi Seafood*, 2^a Ed., Park J. (ed.) Taylor and Francis, Boca Raton.
- Lapasin, R. (1980) Metodi per la caratterizzazione dei materiali tissotropici, *L'a industria della Vernice*, 34, 5, 16.
- Larson, R.G. (1988) *Constitutive Equations for Polymers Melts and Solutions*, Butterworths, Londres.
- Larson, R.G. (1999) *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, Oxford.
- Ledward, D.A.; Johnston, D.E.; Earnshaw, R.G.; Hasting, A.P.M. (1995) *High pressure processing of foods*, Nottingham Univ. Press, Nottingham.
- Lee, B.; Richards, F.M. (1971) The interpretation of protein structure: Estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.*, 55, 379-380.
- Lefebvre, J.; Renard, D.; Sánchez Gimeno, A.C. (1998) Structure and rheology of heat-set gels of globular proteins. I. Bovine serum albumin gels isoelectric conditions, *Rheol. Acta*, 37, 345-357.
- Li-Chan, E. C. (1996) Separation and purification, *Food proteins. Properties and characterization*, Nakai, S.; Modler, H. W. (ed.), Wiley-VCH, New York, 42-503.
- Li-Chan, E.C.Y.; Nakai, S. (1991a) Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1238-1245.
- Li-Chan, E.C.Y.; Nakai, S. (1991b) Importance of hydrophobicity of proteins in food emulsions, *Microemulsions and emulsions in foods*, Washington, ACS, 193-212.
- Lines, R.W. (1994) The electrical sensing zone method (the coulter principles), *Liquid and Surface Bourne Particle Measurement Handbook*, Knapp, J.Z., (ed.), Marcel Dekker, Nueva York.
- Liseaga-Gesualdo, A.M.; Li-Chan, E.C.Y. (1999) Functional properties of fish protein hidrolysate form herring (*Clupea harengus*), *J. Food Sci.*, 64, 1000-1004.
- Liu, S.; Masliyah, J.H. (1996) Rheology of suspensions, *Suspensions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Schramm, L.L. (ed.), American Chemical Society, Washington, DC, 3.
- Loncin, M.; Merson, R.L. (1979) *Food Engineering: Principles and Selected Applications*, Academic Press, Nueva York.
- Lopes de Silva, J.A.L.; Roa, M.A.; Fu, J.T. (1998) Rheology of structure developments and loss during gelation and melting, *Phase/State transitions in foods*, Roa, M.A.; Hartel, R.W. (eds.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, 11-115.
- Macosko, C.W. (1994) *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, VCH Publishers, Nueva York.
- Madiedo J.M.; Berjano, M.; Guerrero, A.; Muñoz, J.; Gallegos, C. (1994) Influence of surfactant concentration and temperature on the flow behaviour of sucrose oleate aqueous systems, *Coll. Surf.*, 82, 59-69.

-
- Mancini, F.; Moresi, M.; Rancini, R. (1999) Mechanical Properties of Alginate Gels: Empirical Characterisation. *J. Food Eng.*, 39, 369- 378.
- Marrucci, G. (1984) Remarks on the viscosity of polymeric liquid crystals, *Proceedings of the IX Int. Congress on Rheology*, México, 1, 441.
- Marshall, S.G.; Vaisey, M. (1972) Sweetness perception in relation to some textural characteristics of hydrocolloid gels, *J. Text. Stud.*, 3, 173-185.
- Martin, A.H.; Grolle, K.; Bos, M.A.; Cohen-Stuart, M.A.; Van Vliet, T. (2002) Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability, *J. Coll. Int. Sci.*, 254, 175-183.
- Mason, T.G., Lacasse, M.D., Levine, D., Grest, G.S., Bibette, J. Weiltz, D.A. (1997) Osmotic pressure and viscoelastic shear moduli of monodisperse emulsions. *Physical Review*, 56, 3150-3166.
- Maxwell, J.C. (1867) On the dynamical theory of glasses, *Phil. Trans. Royal Society*, Londres, A157, 49.
- Mazza, G. (1998) *Functional Foods, Biochemical and processing Aspects*. Technomic. Publi. Comp. Int., Lancaster.
- McClements, D.J. (2001) Emulsion Droplet Size Determination, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Vol. 1, Wrolstad, R.C. (ed.), John Wiley & Sons, Nueva York, Section D3.3.
- McClements, D.J. (2003) The rheology of emulsion-based food products, *Texture in Foods, Volume 1:1 Semi-Solid Foods*, McKenna, B.M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, 1.
- McClements, D.J. (2004) *Food Emulsions. Principles, Practices and Techniques*. CRC Press, Boca Raton.
- McClements, D.J.; Dekker, E.A. (2000) Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems, *Journal of Food Science*, 65, 1270.
- Meilgaard, M.; Civille, G. V.; Carr, B. T. (1999) *Sensory Evaluation Techniques*, 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Mengual, O.; Meunier, G.; Cayré, I.; Puech, K.; Snabre, P. (1999) TURBISCAN MA 2000: Multiple Light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis, *Talanta*, 50, 445-456.
- Mertens, B.; Knorr, D. (1992) Development of non-thermal processes for food preservation. *Food Technol.*, 46, 124-127.
- Messens, W.; Van Camp, J.; Huyghebaert, A. (1997) The use of high pressure to modify the functionality of food proteins, *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 107-112.
- Mewis, J.; Macosko, C.W. (1994) *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, Macosko, C.W. (ed.), VCH Publishers, Nueva York, cap. 10.
- Miki, W. (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure. Appl. Chem.*, 63(1), 141-146.
- Miroshinichenko, N.S.; Balanuk, I.V.; Nozdrenko, D.N. (2000) Packing of myosin molecules in muscle thick filaments. *Cell Biol. Int.*, 24(6), 327-333.
- Mohammed, Z.H.; Hill, S.E.; Mitchell, J.R. (2000) Covalent crosslinking in heated protein systems, *J. Food Sci.*, 65(2), 221-226.

-
- Montero, P.; Fernández-Díaz, M.D.; Gómez-Guillén, M.C. (2002) Characterization of gelatin gels induced by high pressure, *Food Hydrocoll.*, 16, 197-205.
- Moran, D.P.J. (1994) Fats in spreadable products, *Fats in Food products*, Blackie Academic & Professional, Londres.
- Moros, J.E.; Cordobés, F.; Franco, J.M.; Gallegos, C. (2003) Enhancement of gel strength by application of thermal treatments in highly flocculated emulsions, *Food Hydrocoll.*, 17, 199-206.
- Morris, E.R. (1989) Polysaccharide solution properties: origin, rheological characterization and implication for food systems, *Frontiers in carbohydrate research I: food applications*, Millane, R.P.; BeMiller, J.N.; Chandrasekaran, R.E. (eds.), Elsevier, Londres, 132.
- Morris, V.J.; Mackie, A.R.; Wilde, P.J.; Kirby, A.R.; Mills, E.C.N.; Gunning, A.P. (2001) Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers at the molecular level, *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.*, 34, 3.
- Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, *Anal. Biochem.*, 117, 307-310.
- Muñoz, J. (1992) "Aplicaciones Industriales de la Reología", cursos de la Univ. de Sevilla, 205.
- Muñoz, J.; Sherman, P. (1992) Dynamic viscoelastic properties of some commercial salad dressings, *J. Text. Stud.*, 21, 411-426.
- Normand, V.; Ravey, J.C. (1997) Dynamic study of gelatin gels by creep measurements, *Rheol. Acta*, 36, 610-617.
- Neiser, S.; Draget, K.I.; Smidsrod, O. (1998) Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-sodium alginate systems, *Food Hydrocoll.*, 12, 17-24.
- Numakura, T.; Seki, N.; Kimura, T.; Toyoda, K.; Fujita, T.; Takama, K.; Arai, K. (1985) Cross-linking reaction of myosin in fish paste Turing setting (suwari), *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 1559-1565.
- Orr, C. (1983) Determination of particle size, *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 3, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, cap. 3.
- Pal, R. (1992) Rheology of polymer thickened emulsions, *J. Rheol.*, 36, 1245.
- Pal, R. (1996) Rheology of emulsions containing polymeric liquids, *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 4, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 3.
- Palazolo, G.G.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. (2005) Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates, *Food Hydrocoll.*, 19, 595-604.
- Pan, L.G.; Tomas, M.C.; Añón, M.C. (2002) Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil- and oil-in-water emulsions, *J. Surf. Deter.*, 5, 135-143.
- Pandolfe, W.D. (1991) Homogenizers, *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Kirk Othmer (eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, 1413.
- Pandolfe, W.D. (1995) 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*, 16, 633-650.
- Parés, D.; Sagner, E.; Toldra, M.; Carretero, C. (2000) Effect of High Pressure Processing at Different Temperatures on Protein Functionality of Porcine Blood Plasma, *J. Food Sci.*, 65, 486-490.

-
- Paulson, M.; Dejimek, P.; van Vliet, T. (1990) Rheological properties of heat-induced β -lactoglobulin gels, *J. Dairy Sci.*, 73, 45-53.
- Peleg, M. (1979) Characterization of the Stress Relaxation Curves of Solid Foods, *J. Food Sci.*, 44, 277-281.
- Perrin, P. (2000) Droplet-droplet interactions in both direct and inverse emulsions stabilized by a balanced amphiphilic polyelectrolyte, *Langmuir*, 16, 881-884.
- Peterson, G.L. (1979) Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Anal. Biochem.*, 100, 201-220.
- Petursson, S.; Decker E.A.; McClements, D.J. (2004) Stabilization of Oil-in-Water Emulsions by Cod Protein Extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3996-4001.
- Phipps, L.W. (1985) *The High Pressure Dairy Homogenizer*, Technical Bulletin 6, National Institute of Research in Dairying Reading, Plesset, M.S.; Saffren, M.M. (eds.), Jet Propulsion Laboratory, Pasadena.
- Pons, R., Solans, C., Tadros, Th.F. (1995) Rheological behaviour of highly concentrated oil-in-water emulsions (o/w) emulsions. *Langmuir*, 11, 1966-1971.
- Princen, H.M.; Kiss, A.D. (1986) Rheology of foams and highly concentrated emulsions, *J. Coll. Int. Sci.*, 112, 427-347.
- Privalov, P.L.; Griko, Y.V.; Venyaminov, Y.S.; Kutysenko, V.P. (1986) Cold denaturation of myoglobin, *J. Mol. Biol.*, 190, 487.
- Puppo, M.C.; Añon, M.C. (1998) Structural properties of heat-induced soy proteins gels as affected by ionic strength and pH, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3583-3589.
- Puppo, M.C.; Añon, M.C. (1999a) Rheological properties of acidic soybean protein gels: Salt addition effects. *Food Hydrocoll.* 13, 167-176.
- Puppo, M.C.; Añon, M.C. (1999b) Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties, *J. Food Sci.*, 64, 50-56.
- Puppo, M.C.; Chapleau, N.; Speroni, F.; de Lamballerie-Anton, M.; Michel, F.; Añon, M.C.; Anton, M. (2004) Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean Protein Isolates, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1564-1571.
- Puppo, M.C.; Lupano, C.E.; Añón, M.C. (1995) Gelation of Soybean Protein Isolates in Acidic Conditions. Effect of pH and Protein Concentration, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2356-2361.
- Puppo, M.C.; Speroni, F.; Chapleau, N.; de Lamballeire-Anton, M.; Añón, M.C.; Anton, M. (2005) Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins, *Food Hydrocoll.*, 19, 289-296.
- Quéguiner, C.; Dumay, E.; Cavalier, C.; Cheftel, J.C. (1989) Reduction of *Streptococcus thermophilus* in a whey protein isolate by low moisture extrusion cooking without loss of functional properties, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24, 601-612.
- Quemada, D.; Flaud, P.; Jezequel, P.H. (1984) *Proceedings of the IX International Congress on Rheology*, México, 3, 441.
- Rahalkar, R.R. (1992) Viscoelastic properties of oil water emulsions, *Viscoelastic Properties of Foods*, Rao, M.A.; Steffe, J.F. (eds.), Elsevier Applied Science, Londres.
- Rampon, V.; Lethuaut, L.; Mouhous-Riou, N.; Genot, C. (2001) Interface characterization and aging of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions as revealed by front-surface fluorescence, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4046-4051.

-
- Rao, M.A. (1992) *Viscoelastic Properties of Foods*, Rao, M.A.; Steffe, J.F. (eds), Elsevier Applied Science, Londres.
 - Rao, M.A. (1995) Rheological properties of fluid foods, *Engineering Properties of Foods*, 2nd ed., Rao, M.A.; Rive, S.S.H. (eds.), Marcel Dekker, Nueva York, 1.
 - Rao, M.A. (1999) *Rheology of Fluids and Semisolid Foods*, Kluwer Academic Publishers, Nueva York.
 - Raymundo, A.; Franco, J.M.; Empis, J.; Sousa, I. (2002) Optimization of the composition of low-fat o/w emulsions stabilized by white lupin protein, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 783-790.
 - Rees, L.H. (1967) What to know about homogenizers colloid mills, when are they used and which is best for your operation. Here facts you should consider with examples of typical processes, *Food Eng.*, 39 (8), 69.
 - Regenstein, J. M.; Regenstein, C. E. (1984) *Food Protein Chemistry. An Introduction for Food Scientists*, Orlando, Academic Press.
 - Rehage, H. (1994) *Structure and Flow in Surfactants Solutions*, Herb, C.A.; Prud'Homme, R.K. (eds.), American Chemical Society, Washington, 229.
 - Reiner, M. (1960) *Deformation, Strain and Flow*, (eds.) Lewis, Londres.
 - Richardson, E.G. (1950) The formation and flow of emulsion, *J. Colloid Sci.*, 5, 404-413.
 - Richardson, R.K.; Ross-Murphy, S.B. (1981) Mechanical properties of globular protein gels. II. Concentration, pH concentration, pH and ionic strength dependence, *Brit. Polym. J.*, 13, 11-16.
 - Robb, I.D. (1982) *Microemulsions*, Plenum Press, Nueva York.
 - Roberts, I. (2003) In-line and on-line rheology measurements of food, *Texture in foods, Volume 1: Semi-solid Foods*, McKenna, B.M., Ed., CRC press, Boca Raton, 7.
 - Robinson, S.K. (1924) Practice in mayonnaise manufacture, *Am. Food J.*, 19, 185.
 - Romero, A.; Cordobés, F.; Puppo, M.C.; Villanueva, A.; Pedroche, J.; Guerrero, A. (2009) Linear viscoelasticity and microstructure of heat-induced crayfish protein isolate gels, doi:10.1016/j.fooohyd.2008.07.008.
 - Rosalina, I.; Bhattacharya, M. (2001) Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels, *Carbohydr. Polym.*, 48, 247-271.
 - Rosenthal A. J., (1999) *Food Texture, Measurement and Perception*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
 - Ross-Murphy, S.B. (1995) Rheology of biopolymer solutions and gels, New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems, Dickinson, E. (ed.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, 130-156.
 - Samal, B.B. (1987) Drying and storage of polyacrylamide slab gels: a simple procedure, *Anal. Biochem.*, 163, 42-44.
 - Samejima, K., Ishioroshi, M., & Yasui, T. (1981). Relative Roles of the Head and Tail Portions of the Molecule in Heat-Induced Gelation of Myosin, *J. Food Sci.*, 46, 1412-1418.
 - Sánchez, M.C.; Berjano, M.; Brito, E.; Guerrero, A.; Gallegos, C. (1998) Evolution of the microstructure and rheology of o/w emulsions during the emulsification process, *Can. J. Chem. Eng.*, 76, 479-485.

-
- Sánchez, M.C.; Berjano, M.; Guerrero, A.; Gallegos, C. (2000) Evolución de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua durante el proceso de emulsificación y almacenamiento, *Grasas y Aceites*, 51, 230-236.
 - Sanchez, C.; Burgos, J. (1997) Gelation of Sunflower Globulin Hydrolysates: Rheological and Calorimetric studies, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 2407-2412.
 - Sano, T.; Ohno, T.; Otsuka-Fuchino, H.; Matsumoto, J. J., Tsuchiya, T. (1994). Carp natural actomyosin: thermal denaturation mechanism, *J. Food Sci.*, 59, 1002–1008.
 - Schubert, H. (1997) Advances in the mechanical production of food emulsions, *Engineering and Food*, Jowitt, R. (ed.), Sheffield Academic Press, Sheffield, AA82.
 - Schubert, H.; Armbruster, H. (1992) Principles of formation and stability of emulsions, *Int. Chem. Eng.*, 32, 14-28.
 - Schubert, H.; Engel, R. (2004) Product and formulation engineering of emulsions. Trans IChemE, Part A, *Chem. Eng. Res. Des.*, 82, 1137-1143.
 - Schubert, H.; Karbstein, H. (1994) Mechanical emulsification, *Developments in Food Engineering. Part 1*, Yano, T.; Matsuno, R.; Nakamura, K. (eds.), Blackie Academic and Professional, Londres.
 - Sherman, P. (1960) *Proc. Fourth Int. Congr. Surf. Activity*, II, 596.
 - Sherman, P. (1968) *Emulsion Science*, Academic Press, London.
 - Sherman, P. (1970) *Industrial Rheology with Particular Reference to Foods, Pharmaceuticals and Cosmetics*, Academic Press, Londres, 4.
 - Sherman, P. (1979) *Food Texture and Rheology*, Academic Press, New York.
 - Silva, J.L.; Weber, G. (1993) Pressure stability of proteins, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 44, 89-113.
 - Smart, M.G.; Fulcher, R.G.; Pechak, D.G. (1995) Recent developments in the microstructural characterization of foods, *Characterization of Foods: Emerging Techniques*, Gaonkar, A.G. (ed.), Elsevier, Amsterdam, cap. 11.
 - Speroni, F.; Puppo, M.C.; Chaplaeu, N.; De Lamballerie, M.; Castellani, O. ; Añón, M.C. ; Anton, M. (2005) High-Pressure Induced Physicochemical and Functional Modifications of Low-Density Lipoproteins from Hen Egg Yolk, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5719-5725.
 - Spinelli, J.; Groninger, H.; Koury, B.; Miller, R. (1975) Functional Protein Isolates and Derivatives from Fish Muscle, *Process Biochem.*, 10, 31-35.
 - Stanley, L.; Fleger, J.W.; Heckman, W.; Klomparens, K.L. (1993) *Scanning and Transmission Electron Microscopy: An introduction*, Oxford University Press, Oxford.
 - Steffe, J.F. (1996) *Rheological Methods in Food Process Engineering*, 2nd Ed. Freeman Press, East Lansing, MI.
 - Suzuki, T. (1981) *Fish and Processing Technology*, Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.
 - Svarovsky, L. (2000) *Solid-Liquid Separation*, Svarovsky, L. (ed.) 4th ed., Butterworths, Londres.
 - Symons, M.C.R.; Archer, G.P. (1988) Solvation of thiols: an infrared and nuclear magnetic resonance study of ethanethiol. *J. Chem. Soc.*, Faraday Transactions 1, 84, 2499-209.
 - Szczesniak, R.A. (1975) Method and apparatus for angiotensin i determination. US Patent 3,899, 298.
 - Tabilo-Munizaga, G.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2004) Ultra High Pressure Technology and its Use in Surimi Manufacture: An Overview, *Food Sci. Technol. Int.*, 207-222.

-
- Tadros, T.F. (1994) Fundamental principles of emulsion rheology and their applications, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 91, 39-45.
- Taylor, P. (1995) Ostwald ripening in emulsions, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 99, 175-185.
- Tcholakova, S.; Denkov, N.C.; Sidzhakova, D.; Ivanov, I.B.; Campbell, B. (2003) Interrelacion between drop size and protein adsorption at various emulsification conditions, *Langmuir*, 19, 5640-5649.
- Tcholakova, S.; Denkov, N.D.; Ivanov, I.B.; Campbell, B. (2002) Coalescence in lactoglobulin-stabilized emulsions: Effect of protein adsorption and drop size, *Langmuir*, 18, 8960-8971.
- Thomson, J.J. (1888) *Applications of Dynamics to Physics and Chemistry*, MacMillan and Co., Londres.
- Tokita, M.; Niki, R.; Hikichi K. (1984) Percolation Theory and Elastic Modulus of Gel, *J. Phys. Soc.*, 53, 480-482.
- Toldra, M.; Elias, A.; Parés, D.; Saguier, E.; Carretero C. (2004) Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure, *Food Chem.*, 92, 227-233.
- Tschoegl, N.N. (1989) *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behaviour*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Tung, M.A.; Paulson, A.T. (1995) Rheological concepts for probing ingredient interactions in food systems, *Ingredient Interactions: Effects on Food Quality*, Gaonkar, A. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York.
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987), 5th ed., 9, 321-330.
- Van Boekel, M.A.J.S.; Walstra, P. (1981) Stability of oil-in-water emulsions with crystals in the disperse phase, *Coll. Surf.*, 3, 109-118.
- Van Camp, J.; Huyghebaert, A. (1995) A comparative rheological study between heat and high pressure-induced whey protein gels, *Food Chem.*, 54, 357-364.
- Van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J. (2001) Emulsions properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5005-5012.
- Van Wazer, J.R.; Lyons, J.W.; Kim, K.Y.; Corwell, R.E. (1963) *Viscosity and Flow Measurements*, John Wiley and Sons, Nueva York.
- Verheul, M.; Roefs, S.P. (1998) Structure of particulate whey protein gels: Effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4909-4916.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Millán, F. (2000) Partially hydrolyzed functional properties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 447-450.
- Voigt, W. (1892) *Ann. Phys.*, 47, 671.
- Walstra, P. (1983) *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 1 Basic Theory, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York.
- Walstra, P. (1996) Emulsion stability, *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 4, Becher, P. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York, cap. 1.
- Walstra, P. (2003) *Physical Chemistry of Foods*, Marcel Dekker, Nueva York.

-
- Walstra, P.; Oortwijn, H.; de Graaf, J. J. (1969) Studies on milk fat dispersion. I. Methods for determining globule-size distribution, *Neth. Milk Dairy J.*, 23, 12–36.
 - Walstra, P.; Smulder, P.E.A. (1997) *Food Colloids*, Dickinson, E.; Bergenstahl, B. (eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
 - Walstra, P.; Smulder, P.E.A. (1998) Emulsion formation, *Modern Aspects of Emulsion Science*, Binks, B.P. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, cap. 2.
 - Waniska, R.D.; Kinsella, J.E. (1985) Surface properties of beta(c) lactoglobulin: adsorption and rearrangement during film formation, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1143-1148.
 - Weegels, P.L.; de Groot, A.M.G.; Verhoek, J.A.; Hamer R.J. (1994) Effects on Gluten of Heating at Different Moisture Contents. II. Changes in Physico-Chemical Properties and Secondary Structure, *J. Cer. Sci.*, 19, 1-39.
 - Weijers, M.; Sagis, L.M.C.; Veerman, C.; Sperber, B.; van der Linden, E. (2002) Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength, *Food Hydrocoll.*, 16, 269-276.
 - Whorlow, R.W. (1992). *Rheological Techniques*, 2nd ed., Ellis Horwood, Nueva York.
 - Wiechert, W. (1951) *J. Appl. Mech.*, 18, 293.
 - Wiedman, W.; Blenke, H. (1976) *Chem. Analg. Verfahren*, 4, 82-92.
 - Williams, A.; Janssen, J.J.M.; Prins, A. (1997) Behaviour of droplets in simple shear flow in the presence of a protein emulsifier, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 125, 189-200.
 - Winter, H.H; Chambon, F. (1986) Analysis of a crosslinked polymer at the gel point, *J. Rheol.*, 30, 367-382.
 - Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V.P.; Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 118, 197-203.
 - Wu, S. (1989) Chain structure and entanglement, *J. Polym Sci.*, 27, 723.
 - Xiong, Y. L. (1997) Food proteins: an overview. *Food proteins and their applications*. Damodaran, S.; Paraf, A. (eds), New York, NY: Marcel Dekker, pp 341-392.
 - Xiong, Y.L. (2004) Muscle proteins, *Protein In Food Processing*, Yada, R.H. (ed.), CRC Press, Boca Raton, cap 5.
 - Xiong, Y.L.; Kinsella, J.E. (1990) Mechanism of urea-induced whey protein gelation, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1887-1891.
 - Yasui, T.; Ishioroshi, M.; Samejima, K. (1982) Effect of actomyosin on heat-induced gelation of myosin, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1049-1059.
 - Yoon, W.B.; Gunasekaran, S.; Park, J. W. (2004) Characterization of Thermorheological Behavior of Alaska Pollock and Pacific Whiting Surimi, *J. Food Sci.*, 69, E338.
 - Yoshimura, A.S.; Prud'Homme, R.K.; Prigen, H.M.; Kiss, A.D. (1987) A comparison of techniques for measuring yield stresses, *J. Rheol.*, 31, 669-710.
 - Yost, R.A.; Kinsella, J.E. (1992) Microstructure of whey-protein isolate gels containing emulsified butterfat droplets, *J. Food Sci.*, 57, 892-897.
 - Zhang, H.; Li, L.; Tatsumi, E.; Kotwal, S. (2003) Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, 4, 269–275.

- Ziegler, G.R.; Acton, J.C. (1984) Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue, Food Tech., 38, 77-82.

VII. ANEXO

