

R.9132

832003

X / 614-II

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Quiero presentar esta Tesis Doctoral
al año 78 número 15 del III
semestre de 1996
Sevilla, 28-11-96

El Jefe del Negociado de Tesis,

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

[Signature]

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

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

Memoria presentada por la licenciada
MARÍA DEL ROSARIO RODRÍGUEZ NIÑO
para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

[Signature]

VOLUMEN II

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en DPO, INGENIERÍA QUÍMICA
de la PDAD, QUÍMICA
de esta Universidad desde el día 2/12/96
hasta el día 23/12/96
Sevilla 26 de DICIEMBRE de 1996
El DIRECTOR DE

VOBO el Director

[Signature]

[Signature]

Prof. Juan M. Rodríguez Pabón

**7. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS
DE PELÍCULAS DE EMULSIONANTES
ALIMENTARIOS**

7. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE EMULSIONANTES.

La existencia de interacciones lípido-proteína en la interfase puede tener repercusiones sobre las propiedades reológicas de la película. Es decir, las características reológicas superficiales de la película son muy sensibles a la existencia de tales interacciones. Sin embargo, el conocimiento de las características reológicas superficiales de emulsionantes alimentarios poseen interés práctico por si mismo. Como se ha comentado en apartados previos, el comportamiento reológico de las interfases fluido-fluido juega una importante función en la estabilidad de los sistemas dispersos. Las interfases fluido-fluido que contienen especies tensioactivas exhiben a menudo propiedades reológicas diferentes de las del seno de la fase. La orientación de las moléculas adsorbidas o esparcidas, la interacción y el empaquetamiento de las moléculas, la formación de complejos interfaciales, o las transformaciones estructurales en la interfase pueden dar como resultado un comportamiento reológico determinado, que puede depender de la velocidad de cizalla, del tiempo y/o de la frecuencia de la oscilación.

La teoría de la reología superficial se basa en la traslación al plano bidimensional de la relación mensurable entre el esfuerzo y la deformación, en el plano de una interfase fluida, aunque, en realidad, lo que se investiga experimentalmente es una película delgada tridimensional con un espesor del orden de unos pocos nanómetros o menos. De una manera análoga al caso tridimensional, se definen un esfuerzo de cizalla superficial, τ_s (medido en unidades de $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$), y una deformación superficial de cizalla, γ_s . De esta misma analogía se deducen los dos comportamientos extremos del sistema en el plano superficial (Dickinson, 1992): el flujo superficial newtoniano ($\eta_s = \tau_s/\dot{\gamma}_s$) y la elasticidad hookeniana ($G_s = \tau_s/\gamma_s$). Donde $\dot{\gamma}_s$ es la velocidad de cizalla superficial, η_s es la

viscosidad de cizalla (con unidades de $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}$) y G_s es el módulo de elasticidad superficial (con unidades de $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$).

El conocimiento de las propiedades reológicas superficiales es esencial para describir el comportamiento dinámico de las interfases fluido-fluido. Para una interfase dada, las propiedades reológicas que determinan el movimiento interfacial son las viscosidades de cizalla y dilatacional y la tensión superficial. No obstante, cuando el peso molecular de las especies adsorbidas se incrementa, como es el caso de las proteínas, la interfase puede presentar un comportamiento viscoelástico.

Las características reológicas superficiales proporcionan una información muy valiosa para los procesos de inestabilidad de emulsiones y espumas alimentarias (Dickinson, 1992), así como en otros muchos procesos (supresión de la transferencia de materia a través de interfases fluido-fluido, supresión de la turbulencia interfacial, recuperación terciaria del petróleo, etc.). Por su parte, la relevancia de las propiedades dilatacionales en fenómenos tales como espumación y emulsificación ha sido explicada de acuerdo con la rápida expansión de la superficie durante la generación de las espumas o emulsiones. Muchos otros procesos tecnológicos y naturales (como los que ocurren en los alvéolos pulmonares durante la respiración, o en la interfase atmósfera-océano) están también afectados por estas propiedades mecánicas superficiales (Miller et al. 1991)

Como complemento de la determinación de la elasticidad de la película a partir de la isoterma π -A, obtenida en balanza de superficie (Fuente y Rodríguez Patino, 1994, 1995, 1995b, 1995c, 1996, Rodríguez Patino y Ruiz, 1996, Rodríguez Patino et al, 1992b, 1993), es el objetivo de este capítulo la determinación de las características reológicas de películas de lípidos (apartado 7.1), de proteínas (apartado 7.2) y de sus mezclas (apartado 7.3), en condiciones de dilatación-compresión. Estas constituyen una medida de la capacidad de la

película líquida para resistir una perturbación externa, tal como un incremento de área. La técnica experimental y los procedimientos experimentales utilizados han sido descritos en el apartado 4.2.2. Las experiencias realizadas, en función de las composiciones de la interfase y del medio acuoso, son las que se muestran en la tabla 4.4.

7.1. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE LÍPIDOS INSOLUBLES (MONOESTEARINA Y MONOOLEÍNA) ESPARCIDOS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.

Con el presente estudio se pretende aportar nueva información experimental sobre las consecuencias que las interacciones de monoglicéridos (puros o de sus mezclas) con ciertos solutos presentes en el medio acuoso, ejercen sobre las propiedades de películas de estos lípidos sobre la interfase aire-agua. Estos lípidos son los tensioactivos más utilizados en la industria alimentaria (Als y Krog, 1991), tanto en alimentos tradicionales (Krog et al, 1985), como en productos bajos en grasas y alimentos instantáneos (Dickinson y McClements, 1996). Un conocimiento de las características de la película interfacial es esencial para la producción y aplicaciones de coloides alimentarios formulados con estos emulsionantes (Larsson, 1994). En estudios previos se ha analizado las características estructurales y la estabilidad de películas de monoglicéridos y diglicéridos esparcidos sobre disoluciones acuosas conteniendo etanol y azúcares en función de la temperatura y de la composición de la interfase (Fuente y Rodríguez Patino, 1995a, 1995c, 1996). Se ha observado que las características de la película dependen de las interacciones entre las moléculas en la interfase y las de ésta con los solutos presentes en la subfase. Se ha comprobado también que la elasticidad de la película es un parámetro sensible a estas interacciones (Fuente y Rodríguez Patino, 1995b).

En este apartado se analizarán y discutirán los resultados obtenidos al esparcir moléculas de monoestearina y/o de monooleína sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0'5 M, a la temperatura de 20 °C. El estudio se centrará, en primer lugar, en caracterizar el comportamiento reológico de la película durante su esparcimiento y reordenación de las moléculas. Tras este periodo inicial de 30-60 minutos, dependiendo de la cantidad de lípido esparcido sobre la interfase, se estudiará el efecto de la frecuencia de la oscilación sobre las

características reológicas superficiales. La influencia de la concentración de lípido se centrará en el análisis de los valores de los parámetros reológicos de la película, una vez transcurridos 30 minutos desde su esparcimiento sobre la interfase. Un estudio similar se realizará con las mezclas monoestearina-monooleína esparcidas sobre agua. Sin embargo, en este caso, la composición de la mezcla de ambos lípidos será la variable de referencia. Con la incorporación de solutos en el medio acuoso se intenta aproximar el comportamiento de sistemas modelos simples a las formulaciones alimentarias reales, de composición más compleja.

7.1.1. Características reológicas de películas de monoestearina esparcidas sobre la interfase aire-medio acuoso.

Las variaciones con el tiempo de los parámetros reológicos (módulo dilatacional superficial, elasticidad dilatacional superficial, viscosidad dilatacional superficial y tangente del ángulo de pérdida) y de la tensión superficial, tras el esparcimiento de la monoestearina sobre agua, como un ejemplo, se muestran en la Figura 7.1. De estas gráficas se deduce que, una vez evaporado el disolvente utilizado para el esparcimiento del lípido, éste adquiere unos valores constantes de sus parámetros reológicos, a los 30 minutos tras el esparcimiento, para la menor concentración de lípido sobre la interfase ($1'64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$) y a los 60 minutos, para la mayor concentración interfacial ($8'21 \text{ moléculas.nm}^{-2}$).

Desde otro punto de vista, la velocidad con que se esparcen las moléculas de monoestearina sobre la interfase es superior a la observada según las experiencias realizadas en el tensiómetro Krüss (capítulo 6) con los mismos sistemas. Por lo tanto, se puede afirmar que la agitación a la que se someten las moléculas del lípido sobre la interfase, por la onda oscilatoria creada por el movimiento del anillo durante la realización de las experiencias reológicas, facilita el esparcimiento de las moléculas sobre la interfase, alcanzándose las condiciones

estacionarias en los valores de la tensión superficial y de los restante parámetros reológicos de la película en un menor tiempo.

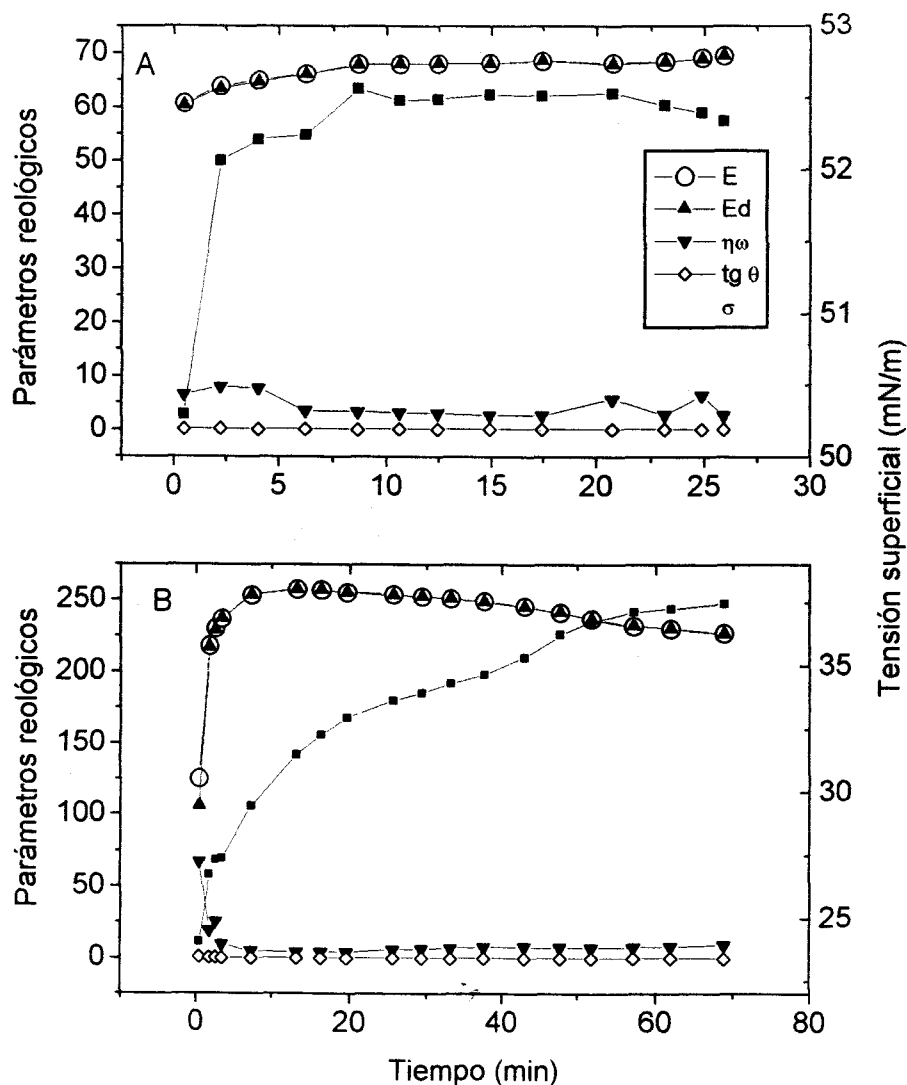


Figura 7.1. Variación con el tiempo de la tensión superficial y de los parámetros reológicos de películas de monoestearina esparcidas sobre agua (buffer, pH = 7.0, fuerza iónica 0.05 M), a 20 °C. Concentración de monoestearina esparcida sobre la interfase (moléculas.nm⁻²): A (1.64), B (8.21).

De los datos representados en las Figuras 7.1 se pueden deducir las siguientes consideraciones, desde un punto de vista reológico:

- A) Los valores del módulo de elasticidad (E) son prácticamente coincidentes con los de su componente elástica (E_d).
- B) La componente viscosa del módulo de elasticidad ($\eta_d \cdot \omega$) es prácticamente despreciable.
- C) Como consecuencia de los datos anteriores la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) es prácticamente cero.

Por lo tanto, se puede concluir que las películas de monoestearina esparcidas sobre los medios acuosos estudiados presentan un comportamiento reológico de carácter eminentemente elástico.

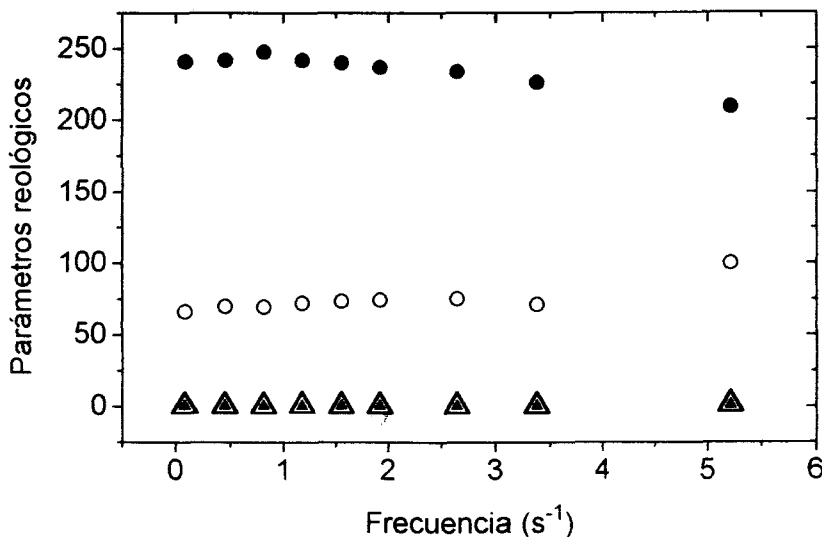


Figura 7.2. Variación de los parámetros reológicos con la frecuencia de la oscilación, correspondientes a dos concentraciones de monoestearina esparcida sobre agua ($\text{pH} = 7.0$, fuerza iónica = 0.05), a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (\bullet , \circ) Módulo dilatacional superficial, (\blacktriangle , \triangle) Tangente del ángulo de pérdida. Concentración de monoestearina esparcida sobre la interfase ($\text{moléculas}\cdot\text{nm}^{-2}$): 1.64 (símbolos sólidos), $8, 21$ (símbolos abiertos).

El hecho de que las características reológicas de las películas de monoestearina esparcidas sobre agua sean prácticamente elásticas, justifica el que los parámetros reológicos sean independientes de la frecuencia de la oscilación, según se comprueba en los datos presentados en la Figura 7.2. Se puede observar que, en el intervalo de frecuencias estudiado, los valores del módulo de elasticidad y de la tangente del ángulo de pérdida, permanecen prácticamente constantes.

La no influencia de la frecuencia de la oscilación sobre los parámetros reológicos superficiales es una indicación de que no existe reordenamiento de las moléculas esparcidas sobre la interfase, o de la ausencia de intercambio de las moléculas entre la interfase y el seno de la fase acuosa, durante el ciclo de expansión-compresión. Este comportamiento es característico de lípidos que son insolubles en el medio acuoso, como ha podido comprobarse en las experiencias de relajación realizadas con películas de monoestearina esparcidas sobre los mismos medios acuosos estudiados en esta Memoria (Fuente y Rodríguez Patino, 1994 y 1995b). En estos estudios, la inestabilidad de la película se ha asociado a los mecanismos de difusión y/o de colapso de la monocapa, en los cuales el tiempo característico de relajación (10-180 minutos) es muy superior al invertido durante el ciclo de expansión-compresión durante una oscilación del anillo.

7.1.1.1. Influencia de la concentración de monoestearina.

Los efectos de la concentración interfacial de monoestearina sobre los parámetros reológicos y sobre la tensión superficial se muestran en la Figura 7.3. De esta representación se pueden extraer las siguientes consideraciones:

A) Al aumentar la concentración de monoestearina esparcida sobre la interfase se produce un descenso brusco de la tensión superficial, hasta que se alcanza un valor característico de densidad superficial del lípido, a partir del cual el

valor de la tensión superficial permanece constante. Es decir, por analogía con los emulsionantes que forman micelas en el seno de medios acuosos, puede definirse una *concentración superficial crítica (CSC)*, a partir de la variación de la tensión superficial con la densidad superficial.

B) A concentraciones de monoestearina próximas a la concentración superficial crítica se observa un aumento brusco en el valor del módulo de elasticidad y, a continuación, el valor de este parámetro permanece constante a concentraciones superficiales superiores a la CSC.

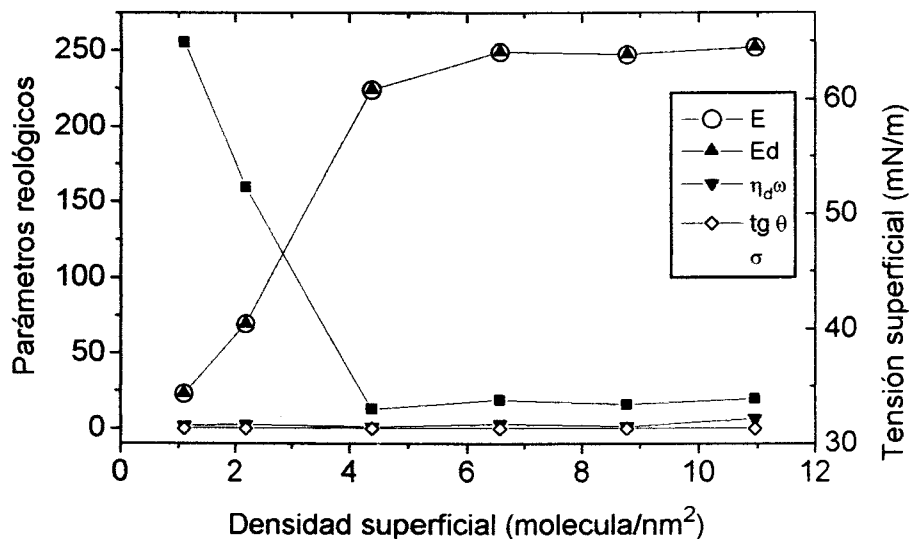


Figura 7.3. Variación de los parámetros reológicos con la densidad superficial de películas de monoestearina esparcidas sobre agua ($\text{pH} = 7.0$, fuerza iónica = 0.05), a los 30 minutos tras el esparcimiento. $T = 20^\circ\text{C}$.

Los valores máximos de E son del mismo orden de magnitud, aunque algo superiores, a los deducidos para los mismos sistemas a partir de las experiencias realizadas en balanza de superficie (Rodríguez Patino et al, 1992 y 1993). Por lo tanto, se confirma la opinión de que los valores de la elasticidad, deducidos a partir de las isothermas π -A obtenidas en balanza de superficie, proporcionan una medida

valiosa de las características reológicas de películas de emulsionantes, cuando la componente viscosa del módulo es despreciable, como ocurre con los lípidos estudiados en esta Memoria. Un comportamiento similar, sobre las propiedades reológicas superficiales en función de la concentración, con lípidos adsorbidos sobre la interfase aire-agua ha sido informado por Dukhin et al (1995).

El valor máximo de E , a concentraciones de monoestearina superiores a la CSC se explica si se admite que, a estas concentraciones, la estructura de la monocapa en el equilibrio es líquido-condensada, como se deduce de las isothermas π -A (Rodríguez Patino et al 1992 y 1993), y a la posible existencia de cristales de lípido sobre la interfase, formados por sobresaturación, a las mayores densidades superficiales (Rodríguez Patino y Martín, 1994). Sin embargo, estos cristales no contribuirían significativamente a los valores de E . En este estudio, el colapso se asocia con la transformación de una fase de una monocapa homogénea en una fase heterogénea constituida por una monocapa colapsada. Este fenómeno puede ocurrir por una fractura macroscópica de la película o por un proceso de nucleación y crecimiento de los cristales de lípido formados, cuando se sobrepasa una presión o una concentración superficial crítica del mismo (Gaines, 1966).

C) Las películas de monoestearina presentan un comportamiento reológico de carácter elástico, independientemente de la concentración de lípido esparcido sobre la interfase. En efecto, el valor de la componente viscosa del módulo dilatacional superficial es prácticamente despreciable, en comparación con el valor de su componente elástica, y, como consecuencia, el valor de la tangente del ángulo de pérdida es aproximadamente nulo.

7.1.2. Características reológicas de películas de monooleína esparcidas sobre la interfase aire-medio acuoso.

Las variaciones con el tiempo de la tensión superficial y de los parámetros reológicos de las películas de monooleína esparcidas sobre agua (Figura 7.4) son esencialmente similares a las observadas con películas de monoestearina esparcidas sobre los mismos medios acuosos (Figura 7.1). Es decir, tras la evaporación del disolvente usado como vehículo de esparcimiento de la monooleína sobre la interfase, la tensión superficial y los parámetros reológicos de la película adquieren valores constantes en el intervalo de tiempo de la experiencia. De igual forma, en comparación con lo observado en las experiencias realizadas en el tensiómetro Krüss, con los mismos sistemas (capítulo 6), el tiempo invertido para que el lípido se esparza homogéneamente sobre la interfase se reduce significativamente como consecuencia de la agitación de la interfase, ocasionada por el movimiento sinusoidal del anillo.

Una vez alcanzadas las condiciones estacionarias, el comportamiento interfacial de la monooleína presenta ciertas similitudes con la monoestearina e importantes diferencias. A partir de las representaciones de la Figura 7.4 se deduce que los valores del módulo de elasticidad (E) son prácticamente similares a los de su componente elástica (E_d). Además, la componente viscosa del módulo ($\eta_d \cdot \omega$) y la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) presentan valores próximos a cero. Finalmente, los valores de los parámetros reológicos son prácticamente independientes de la frecuencia de la oscilación (datos no mostrados). Estos resultados certifican que el comportamiento reológico superficial de las películas de monooleína esparcidas sobre los medios acuosos estudiados es eminentemente elástico. La principal diferencia entre las características reológicas de las películas de monoestearina y de monooleína es que el valor de E para la máxima concentración de monooleína (Figura 4B) es menor que el valor de E obtenido a la

menor concentración de monooleína (Figura 4A). Este comportamiento es opuesto al observado con las películas de monoestearina (Figura 7.1)

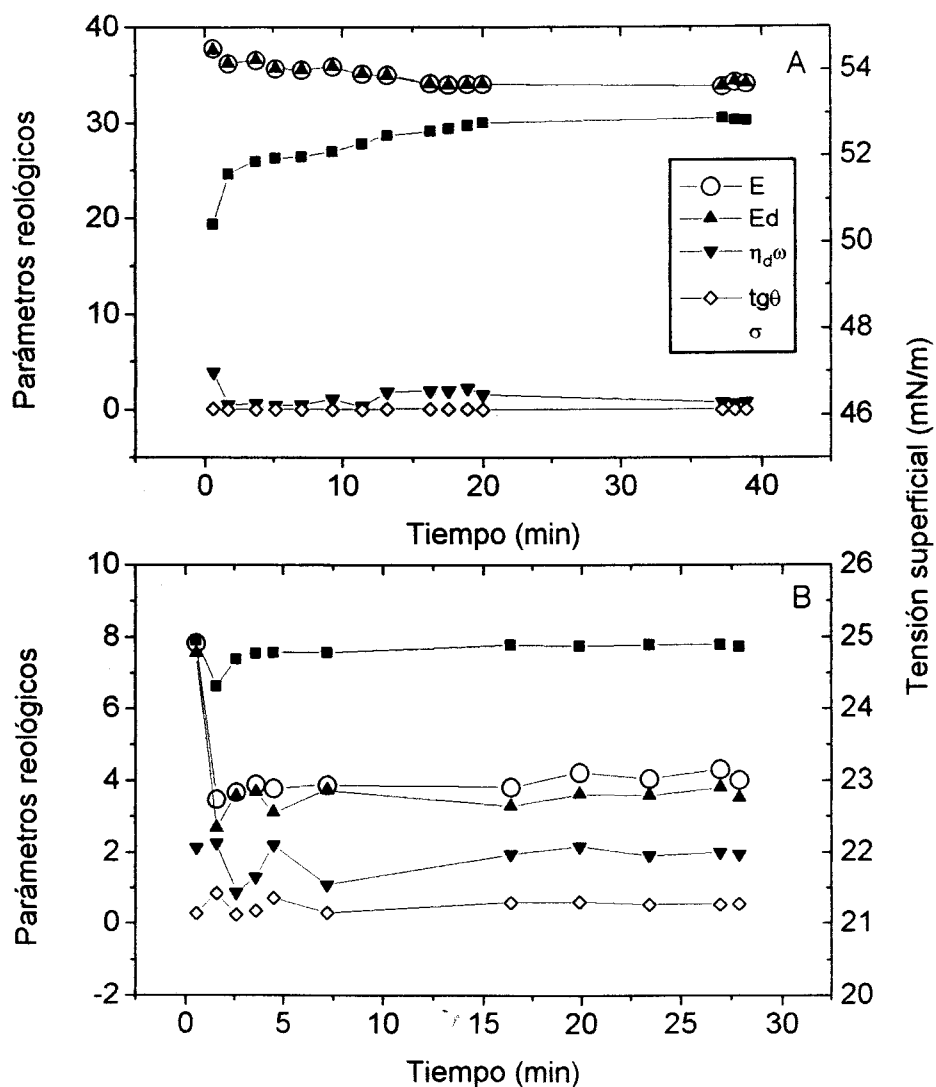


Figura 7.4. Variación con el tiempo de la tensión superficial y de los parámetros reológicos de películas de monooleína esparcidas sobre agua (pH = 7'0, fuerza iónica 0'05 M) a 20 °C. Concentración de monooleína esparcida sobre la interfase (moléculas.nm⁻²): A (1'64), B (8'21).

7.1.2.1. Efecto de la concentración de monooleína.

La influencia de la concentración de monooleína en películas esparcidas sobre agua, sobre la tensión superficial y sobre los parámetros reológicos superficiales, se representa en la Figura 7.5. A partir de la dependencia entre la tensión superficial y la densidad superficial es posible definir una *concentración superficial crítica (CSC)*. Sin embargo, el módulo de elasticidad y su componente elástica presentan valores máximos, precisamente a concentraciones próximas a las de la CSC, y disminuyen a concentraciones superficiales de monooleína superiores.

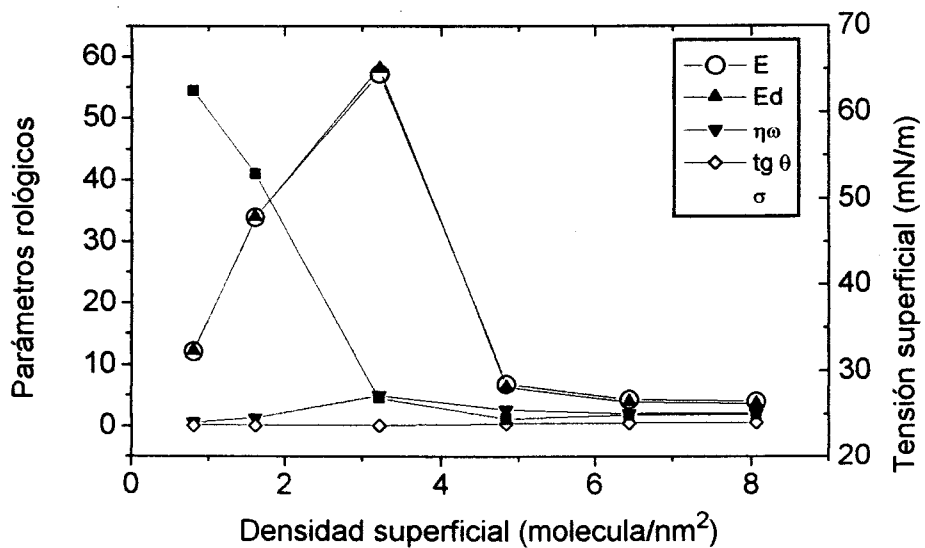


Figura 7.5. Variación de los parámetros reológicos con la densidad superficial de películas de monooleína esparcidas sobre agua ($pH=7.0$, fuerza iónica = 0.05), a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Una dependencia similar entre el módulo de elasticidad y la concentración fue observada por Kokelar (1994), al esparcir sobre agua los lípidos insolubles contenidos en el germen de trigo, y con películas adsorbidas de tensioactivos (Maru y Wasan, 1979; Kao et al, 1992). Como aquí, el módulo de elasticidad se incrementa con la concentración de tensioactivo en el seno de la fase, alcanza un

máximo a concentraciones próximas a la concentración micelar crítica y finalmente adquiere un valor prácticamente nulo a concentraciones de tensioactivo de un orden de magnitud por encima de la concentración micelar crítica. El descenso en el valor del módulo de elasticidad puede estar relacionado con procesos de transferencia de materia, tales como adsorción-desorción, difusión hacia el seno de la fase y difusión superficial. Sin embargo, la difusión superficial parece que tiene poca influencia si se compara con la convección en la interfase (Djabbarah y Wasan, 1982). Los cálculos realizados sobre estos procesos parecen indicar que la difusión molecular hacia el seno de la fase es el factor que más importancia ejerce sobre las propiedades viscoelásticas (Maru y Wasan, 1979).

La comparación entre los valores de la elasticidad superficial deducidos a partir de estas experiencias y los deducidos a partir de las isothermas π -A, únicamente es posible en el intervalo inicial de concentraciones de lípido sobre la interfase, hasta el valor de CSC. Es precisamente en las proximidades de esta concentración donde se produce el colapso de la monocapa (Rodríguez Patino y Ruíz, 1994; Ruíz, 1996). En la zona de existencia de la monocapa la variación de la elasticidad de la película con la densidad superficial es una función creciente. Sin embargo, los valores de este parámetro reológico deducidos a partir de la isoterma π -A son sensiblemente inferiores a los obtenidos a partir de las experiencias de oscilación, un fenómeno similar al discutido previamente con relación a las películas de monoestearina. En consecuencia, en el caso de tensioactivos insolubles, cuando las características reológicas superficiales son puramente elásticas, los valores de la elasticidad superficial calculados a partir de las isothermas π -A, son de gran utilidad para realizar estudios comparativos sobre las características reológicas superficiales de estos sistemas.

Desde un punto de vista práctico, conviene destacar que los valores de la elasticidad superficial de las películas de monooleína a las mayores densidades superficiales del lípido son muy bajos, como se muestra en los datos incluidos en la

Tabla 7.1. Este fenómeno es opuesto al observado con las películas de monoestearina.

Tabla 7.1. Valores del módulo dilatacional superficial ($mN.m^{-1}$) de películas de monoestearina y de monooleína esparcidas sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0'5 M, a la concentración superficial crítica (CSC) y a la máxima densidad superficial ($MDS = 8,21$ moléculas. nm^{-2}). $T = 20$ °C.

| | MONOESTEARINA | | MONOOLEINA | |
|----------------|---------------|-----|------------|-----|
| | CSC | MDS | CSC | MDS |
| AGUA | 224 | 250 | 57'2 | 4'0 |
| ETANOL 1 M | 208 | 230 | 41'2 | 2'8 |
| SACAROSA 0'5 M | 223 | 235 | 46'3 | 3'4 |

Las diferencias observadas entre las características superficiales de películas esparcidas de monoestearina (Figura 7.3) y de monooleína (Figura 7.5) -- especialmente a concentraciones superficiales superiores a CSC -- puede atribuirse a las distintas características de colapso (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993, Rodríguez Patino y Martín, 1994) y a la estructura en el equilibrio (Rodríguez Patino y Martín, 1994). En efecto, de las isothermas π -A, según las experiencias realizadas en balanza de superficie, se deduce que las películas de monooleína presentan únicamente una estructura líquido expandida en toda la zona de existencia de la monocapa. Por esta razón las monocapas de monooleína colapsan a la presión de esparcimiento en el equilibrio formando lentes sobre la interfase, a diferencia de las películas de monoestearina que, al presentar una estructura líquido condensada, colapsan formando multicapas o, incluso, cristales (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993), cuando se sobrepasa el valor de la concentración superficial crítica. La formación de lentes de moléculas de monooleína colapsadas sobre la interfase puede explicar la reducción significativa del valor de E, a estas concentraciones

superficiales, puesto que la existencia de lentes de monooleína sobre la interfase haría reducir las interacciones entre las moléculas.

Además, la presión de colapso es mayor en las películas de monoestearina que en las de monooleína (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993). Una relación entre la estructura de las cadenas hidrocarbonadas y la presión de colapso se ha discutido en trabajos previos con monocapas de ácidos grasos (Rodríguez Patino et al, 1992), fosfolípidos (Dietrich et al, 1991) y monoglicéridos (Rodríguez Patino et al, 1992b, 1993). De estos trabajos puede deducirse que la menor presión de colapso de las películas de monooleína podría atribuirse a una reducción de las interacciones entre las moléculas en la película, lo que podría explicar también las diferencias entre los valores de E de estos lípidos a las mayores densidades superficiales (tabla 7.1)

7.1.3. Efecto de la composición de la subfase sobre las características reológicas superficiales de monoestearina y de monooleína.

El estudio de la influencia que el etanol o la sacarosa disueltos en la subfase ejercen sobre las características reológicas superficiales de películas de lípidos, puede ser de utilidad para profundizar en el conocimiento sobre el comportamiento de estos emulsionantes cuando se usan en emulsiones y espumas alimentarias. Los principales alimentos que se presentan como emulsiones o espumas -- helados, postres, bebidas sin alcohol, licores crema, productos lácteos de imitación y alimentos basados en cereales, como el pan, pasteles y otros productos de bollería, por citar sólo a unos ejemplos (Krog et al, 1985, Leadbetter, 1990 -- pueden contener etanol y/o sacarosa en sus formulaciones. El efecto del etanol y de la sacarosa en la subfase sobre las características estructurales (Fuente y Rodríguez Patino, 1995a, 1995c y 1995d, Rodríguez Patino et al, 1992b y 1993) y sobre la estabilidad (Fuente y Rodríguez Patino, 1994 y 1995b) de monocapas de

monoglicéridos está bien estudiado. Sin embargo, el efecto de estos componentes en el medio acuoso sobre las características reológicas superficiales de estos lípidos no es bien conocido. Este estudio puede ser de utilidad para la formulación de productos acabados y para analizar las propiedades físico-químicas de la emulsión o espuma (efecto de la composición sobre la estabilidad, reología, color, sabor, etc.).

El efecto de los solutos en la subfase sobre las características reológicas de películas de monoestearina y monooleína se muestra en las figuras 7.6 y 7.8 para etanol 1M, y en las figuras 7.7 y 7.8 para sacarosa 0,5M. El efecto ejercido depende del tipo de soluto. Como se observa en los datos presentados en la tabla 7.1, la presencia de solutos en la subfase produce una reducción significativa en el módulo dilatacional superficial -- especialmente en presencia de etanol, a la concentración crítica superficial (CSC). El efecto de la composición de la subfase es también pronunciado a la máxima densidad superficial (MSD) estudiada, que es muy superior a la requerida para el colapso de la monocapa. Debe destacarse en estos datos, debido a las potenciales aplicaciones prácticas, el muy bajo valor del módulo dilatacional superficial de las películas de monooleína.

Los resultados con etanol en la subfase son similares a los obtenidos con suspensiones de lípidos procedentes de cereales (Kokelaar, 1994). En este estudio se postula que el etanol posiblemente perturba el retículo superficial debido a su adsorción, pero su efecto desaparece cuando, tras un cierto periodo de tiempo, se evapora. Este efecto temporal del etanol no es consistente con los datos obtenidos por Dickinson y Woskett (1988), quienes observaron una completa pérdida de la viscosidad de cizalla de la interfase formada entre hexano y una disolución acuosa de caseinato con un 1% de etanol. En sus experiencias, como en las realizadas en este estudio, es difícil que todo el etanol se evapore. Por lo tanto, la explicación más probable es que la presencia de pequeñas cantidades de etanol en el seno de la fase (y presumiblemente en una mayor cantidad en la interfase), es suficiente como

para interferir en las interacciones que conducen a la formación de una película viscoelástica. En otras palabras, que el etanol actúa como un tensioactivo que compite por la interfase, como se ha observado en sistemas modelo de espumas de cerveza, en las que el etanol compite por la interfase con las proteínas de la cerveza (Brierley et al, 1996).

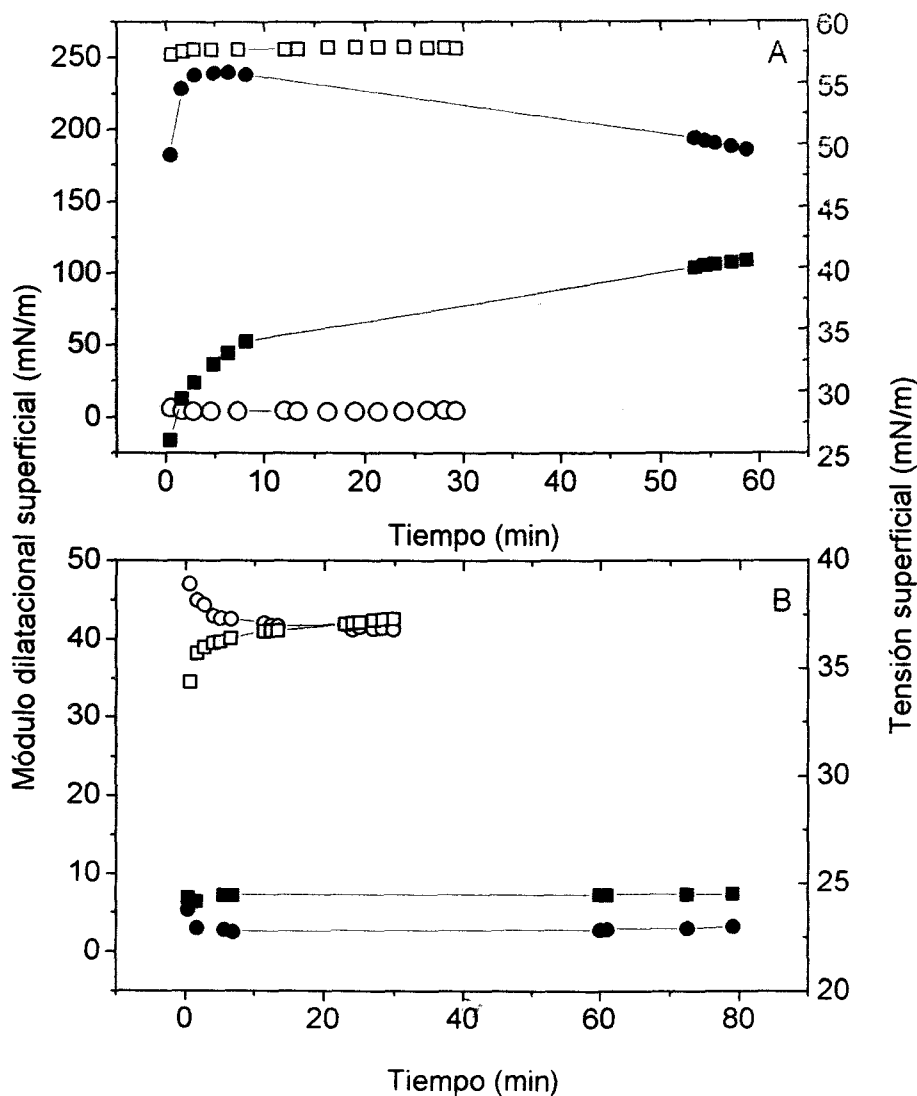


Figura 7.6. Variación con el tiempo de la tensión superficial (□, ■ : σ , mN/m) y del módulo dilatacional superficial (○, ●: E , mN/m) de películas de (A) monoestearina y (B) monooleína esparcidas sobre una disolución acuosa de etanol 1M, a 20 °C, y a diferentes concentraciones superficiales de lípido: 1,64 molécula/nm² (símbolos abiertos) y 8,21 molécula/nm² (símbolos cerrados). Frecuencia angular: 0,81 s⁻¹.

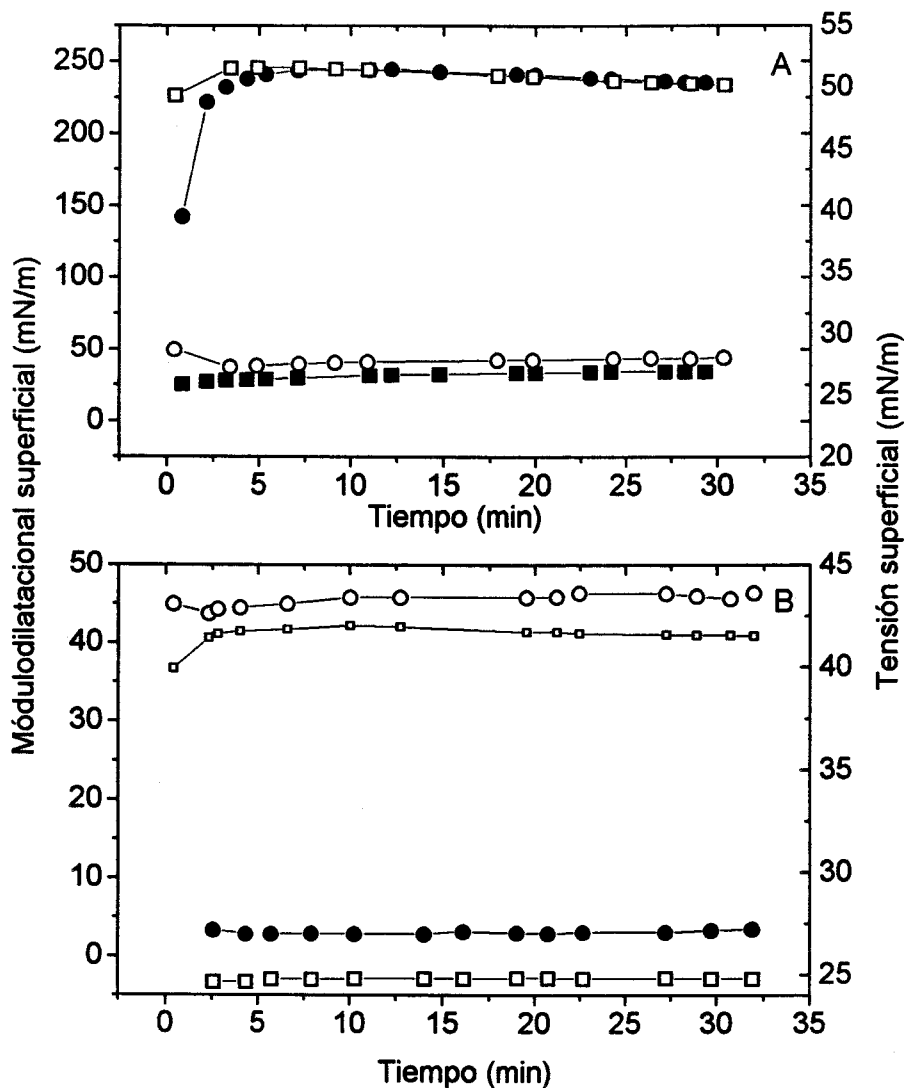


Figura 7.7. Variación con el tiempo de la tensión superficial (□, ■ : σ , mN/m) y del módulo dilatacional superficial (○, ● : E , mN/m) de películas de (A) monoestearina y (B) monooleína esparcidas sobre una disolución acuosa de sacarosa 0,5M, a 20 °C, y a diferentes concentraciones superficiales de lípido: 1,64 molécula/nm² (símbolos abiertos) y 8,21 molécula/nm² (símbolos cerrados). Frecuencia angular: 0,81 s⁻¹.

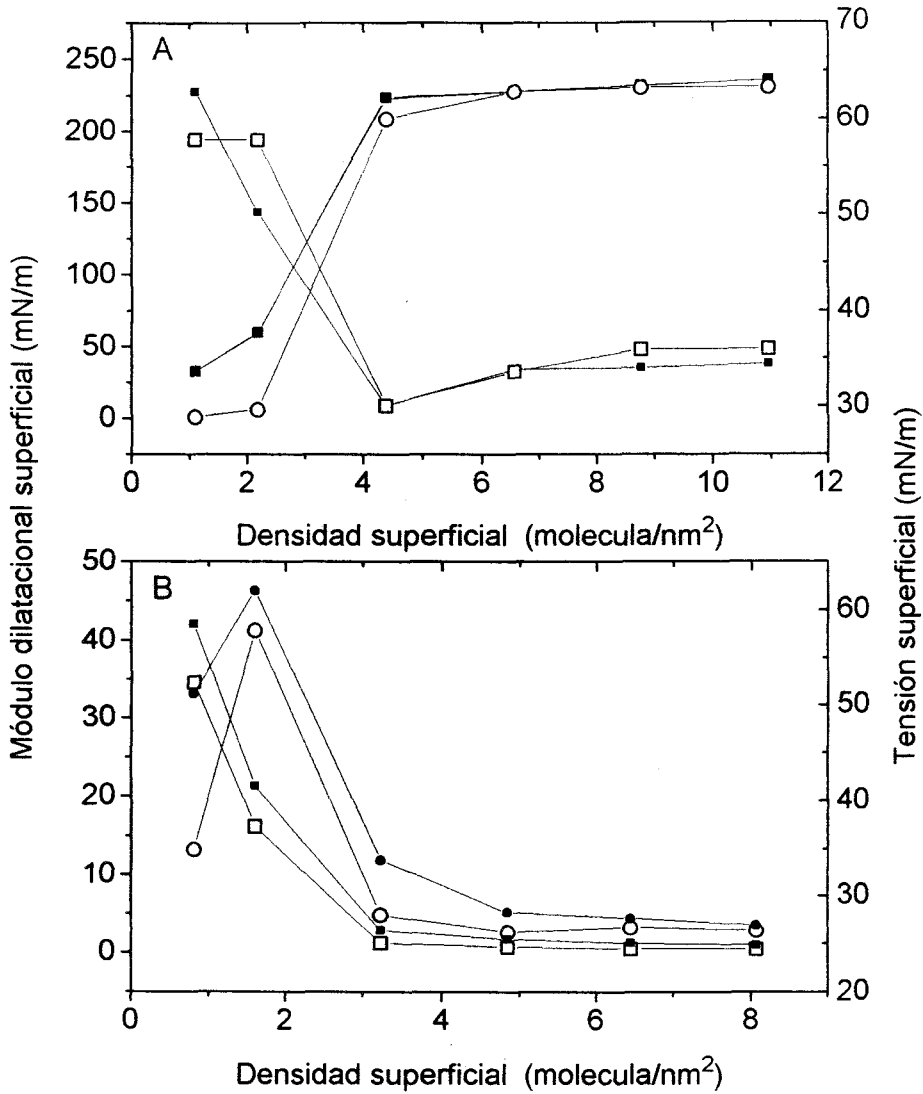


Figura 7.8. Variación con la densidad superficial de la tensión superficial (□, ■ : σ , mN/m) y del módulo dilatacional superficial (○, ●: E , mN/m) de películas de (A) monoestearina y (B) de monooleína, esparcidas sobre disoluciones acuosas de etanol 1M (símbolos abiertos) y sacarosa 0,5M (símbolos cerrados). Temperatura: 20 °C. Tiempo transcurrido tras el esparcimiento: 30 minutos. Frecuencia angular: 0,81 s⁻¹.

El efecto de la composición de la subfase sobre las características reológicas de películas de monoestearina y de monooleína puede atribuirse a las interacciones película-subfase. Sin embargo, estas interacciones deben ser diferentes para el etanol y la sacarosa, debido a sus diferentes características superficiales (Rodríguez Patino y Martín, 1994; Weast, 1986) y al efecto estructurante del agua en la interfase y en la subfase, como se ha discutido en trabajos previos (Rodríguez Patino et al, 1992b y 1993; Rodríguez Patino y Martín, 1993). Brevemente, las moléculas de etanol en la subfase pueden adsorberse sobre la interfase y ser capaces de tomar parte en las interacciones con los lípidos vía (a) interacciones de van der Waals con las cadenas hidrocarbonadas del lípido, (b) mediante enlaces de hidrógeno con los grupos de la cabeza polar del lípido, y (c) mediante la formación de retículos con los grupos polares del lípido. Estas interacciones dan lugar a una expansión de la estructura de la película (Rodríguez Patino et al, 1992b y 1993) o a una atracción de las moléculas del lípido hacia la subfase (Rodríguez Patino et al, 1992, Fuente y Rodríguez Patino, 1995a y 1995b), cuando el etanol está presente en la fase acuosa. Por el contrario, las moléculas de sacarosa no tienen una afinidad particular por la interfase aire-agua. Por lo tanto, sólo son factibles los mecanismos (b) y (c), antes citados. Estos mecanismos pueden conducir a una disminución de las fuerzas de adhesión entre las moléculas en la interfase, lo cual es consistente con la reducción observada en los valores de E en los datos experimentales obtenidos (tabla 7.1).

Un punto de interés en este trabajo es el bajo valor del módulo superficial dilatacional en las películas de monooleína esparcidas sobre etanol, a la mayor densidad superficial. Este fenómeno puede estar asociado, además, con la pérdida de moléculas desde la monocapa por colapso y disolución en el seno de la fase acuosa (Fuente y Rodríguez Patino, 1994).

7.1.4. Características reológicas de películas mixtas monoestearina-monooleína esparcidas sobre la interfase aire-agua.

El estudio de las características reológicas de las películas mixtas de lípidos puede ser de gran interés, como complemento de las experiencias realizadas con los mismos sistemas en balanza de superficie, en vía de disponer de una mayor información sobre la existencia de interacciones, estructura, estabilidad y miscibilidad de los componentes, etc. Este estudio tiene, además, interés en sí mismo ya que las sustancias tensioactivas utilizadas en aplicaciones comerciales son generalmente mezclas, debido a que estas se producen a un coste relativamente inferior a la de los componentes puros y, con frecuencia, las mezclas de diferentes emulsionantes exhiben mejores propiedades que las de cada uno de los componentes por separado. Es decir, en la práctica se suele usar una mezcla de emulsionantes con el fin de optimar la formulación. Esto es lo que ocurre en las formulaciones alimentarias presentadas como emulsiones o espumas. El estudio de este sistema puede tener un interés adicional debido a que, aunque ambas moléculas poseen la misma longitud de cadena hidrocarbonada, diferenciándose únicamente en la existencia de un doble enlace en la molécula de monooleína, su comportamiento reológico superficial (estudiado en los apartados previos), y la estructura de sus monocapas (Fuente y Rodríguez Patino, 1995a, 1995c y 1996; Carrera et al, 1996), presentan importantes diferencias. Hasta el presente son escasos los datos disponibles sobre propiedades reológicas de películas mixtas de tensioactivos (Djabbarah y Wasan, 1982a y 1982b; Dukhim et al, 1995).

En estas experiencias se ha estudiado diferentes mezclas de monoestearina y de monooleína, pero manteniendo constante la concentración total de emulsionantes en $3,33 \text{ moléculas/nm}^2$. De los resultados obtenidos sobre la variación con el tiempo de la tensión superficial y de los parámetros reológicos de las películas mixtas esparcidas sobre agua (datos no mostrados), se deduce que las películas mixtas, al igual que los componentes puros, presentan un comportamiento

reológico elástico. Este comportamiento es similar al observado con los componentes puros (Figuras 7.1 y 7.3 a 7.5). De estas representaciones se ha podido obtener los valores de E , correspondientes a un tiempo de 30 y de 60 minutos tras el esparcimiento del lípido (suficientes para que se alcancen condiciones estacionarias), en función de la composición interfacial de la película mixta (Figura 7.9). Se observa que en las películas mixtas de estos lípidos se produce una reducción significativa del módulo dilatacional superficial, en relación con la que existiría si la mezcla entre ambos lípidos fuese ideal. En este caso los valores de E seguiría la línea de puntos de la Figura 7.9.

La reducción de E en las películas mixtas, con relación a la que existiría con una mezcla ideal de monoestearina-monooleína sobre la interfase puede deberse a que estos lípidos sean insolubles entre sí. Las experiencias realizadas con los mismos lípidos en balanza de superficie confirman que esta hipótesis es verosímil. En efecto, del cumplimiento de la regla de aditividad de áreas y de la independencia de la presión de colapso con la composición de la mezcla (Niccolai et al, 1989, Fuente et al, 1996), por una parte, y de la variación de la presión de esparcimiento en el equilibrio, de los parámetros termodinámicos (energía libre, entalpía y entropía de mezcla) y de la estabilidad de las monocapas mixtas (Fuente et al, 1996, Carrera, 1996), por otra parte, se puede concluir que las moléculas de monoestearina y de monooleína son insolubles entre sí en la interfase. Es decir, las monocapas mezcladas de estos lípidos forman *islotes* constituidos por moléculas de monoestearina y de monooleína puras y estos *islotes* probablemente tienen una extensión variable y una distribución desordenada sobre la interfase (Niccolai et al, 1989). Una prueba adicional de la inmiscibilidad entre los componentes de la monocapa es que las mezclas presentan dos zonas de colapso, una a una presión superficial próxima a la presión de colapso de la monoestearina y la otra a una presión de colapso próxima a la de la monooleína (Niccolai et al, 1989, Carrera et al, 1996)

película (especialmente en los valores de E: Figura 7.9), con relación a una mezcla ideal de ambos lípidos sobre la interfase.

Se puede concluir, pues, que los resultados de las características reológicas de películas mixtas, deducidos en este estudio, están de acuerdo con las isothermas π -A obtenidas en balanza de superficie con relación a la mezcla bidimensional de compuestos no ionizables. Estos estudios indican que la orientación de las cadenas hidrocarbonadas es un factor determinante de la miscibilidad mutua de los componentes de la película mixta (Niccolai et al, 1989; de la Fuente et al, 1996). Es decir, la geometría y la distribución de los lípidos polares (en este estudio monoestearina y monooleína) sobre la interfase influyen decisivamente sobre las interacciones entre las moléculas presentes en la misma.

En resumen, los resultados obtenidos sobre las características reológicas de películas mixtas de monoestearina y de monooleína confirman y refuerzan la *regla empírica de miscibilidad* (Gabrielli et al, 1982 y 1986; Gabrielli y Maddii, 1978; Niccolai et al, 1989), según la cual, en el caso de tensioactivos no iónicos, se requiere una orientación (estructura) similar entre las cadenas hidrocarbonadas de los constituyentes de la película mixta para que exista miscibilidad entre ellos. Este requisito no se cumple en el caso de la película de solo monoestearina (Rodríguez Patino et al, 1992) y de solo monooleína (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993), lo que explicaría los resultados mostrados en la Figura 7.9.

7.2. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE UNA PROTEÍNA (BSA) ADSORBIDAS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.

La adsorción de proteínas sobre la interfase puede admitirse que ocurre a través de tres etapas (McRitchie, 1978; Graham y Phillips, 1979a, Tornberg, 1978): (i) difusión de las moléculas de proteína nativa hacia la interfase y su adsorción en forma globular, (ii) desnaturalización superficial, comprendiendo el esparcimiento y la desnaturalización de las moléculas previamente adsorbidas, y (iii) la reordenación molecular de las moléculas adsorbidas. En conexión con el estudio de las propiedades espumantes y emulsionantes de las proteínas, su comportamiento interfacial, como el que se refleja por el descenso de la tensión superficial o interfacial, estudiado en el apartado 5 de esta Memoria, es una propiedad muy importante. Parece razonable admitir que cualquier proceso responsable de la dependencia temporal de la reducción de σ por las moléculas de la proteína debe comprender un incremento en el número de segmentos adsorbidos por unidad de área con el tiempo (Damodaran, 1990; Xu y Damodaran, 1992, 1994). En el caso de las moléculas de proteínas adsorbidas sobre la interfase, Graham y Phillips (1979) han informado que la capa primaria de moléculas es la principal responsable de la reducción de σ .

Las proteínas, además de reducir la tensión superficial, pueden formar una película continua sobre la interfase a través de complejas interacciones intermoleculares, lo que imparte rigidez estructural a la interfase (Bos et al, 1996; Castle et al, 1987; Sarker, 1995). La orientación de las moléculas adsorbidas, el empaquetamiento y las interacciones moleculares, la formación de complejos, o las modificaciones estructurales en la interfase pueden dar como resultado un particular comportamiento reológico, que puede depender de la velocidad de cizalla o del tiempo (Malhotra y Wasan, 1988). Las interacciones moleculares pueden comprender los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La extensión de estas interacciones sobre la interfase dependen de la

conformación de las moléculas de proteína en el estado adsorbido. Un óptimo balance de estas interacciones, que puede conducir a la formación de una película viscosa, es un requisito para estabilizar una emulsión o una espuma. En adición a las propiedades físico-químicas de las proteínas, diversos factores, tales como la concentración de la proteína y la presencia de otros componentes del alimento (etanol, azúcares, lípidos, sales, etc.), pueden afectar a las propiedades de la película de proteína adsorbida y, como consecuencia, a sus propiedades espumantes y emulsionantes.

El objetivo de estas experiencias es el estudio sistemático de las características reológicas superficiales de una proteína (BSA) adsorbida desde disoluciones acuosas de etanol (apartado 7.2.1) o sacarosa (apartado 7.2.2). Se han determinado los parámetros viscoelásticos de la película en función del tiempo de adsorción y a un tiempo característico. En capítulos previos se ha observado (apartados 5 y 6) que la velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase y la tensión superficial en el equilibrio dependen de la composición del medio acuoso. Con etanol en la subfase se ha observado la existencia de un periodo de inducción que podría reflejar la existencia de interacciones BSA-etanol en la subfase y en la interfase. Sin embargo, la velocidad de adsorción se incrementa cuando la sacarosa está presente en la interfase. La influencia del etanol en la subfase ha sido estudiada también recientemente (Dussaud et al, 1994a-c).

7.2.1. Características reológicas de películas de BSA adsorbidas sobre disoluciones acuosas de etanol.

Las propiedades dinámicas superficiales -- tales como tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales (módulo dilatacional superficial, elasticidad dilatacional superficial, viscosidad dilatacional superficial y tangente del ángulo de

pérdida) -- para disoluciones acuosas de BSA a diversas concentraciones de etanol (0, 0,1, 0,5, 1,0 y 2 M) se representan en las figuras 7.10 a 7.14.

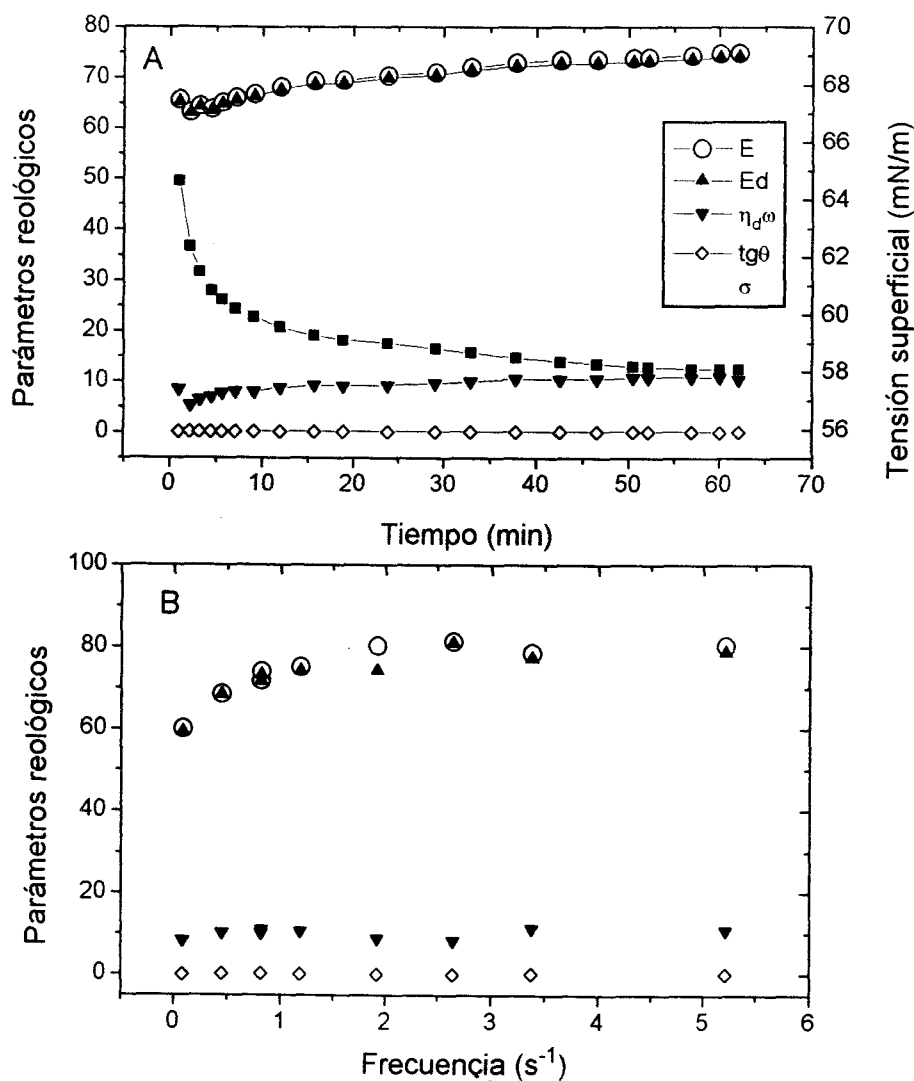


Figura 7.10. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E, mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed, mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg} \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre agua a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (B) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

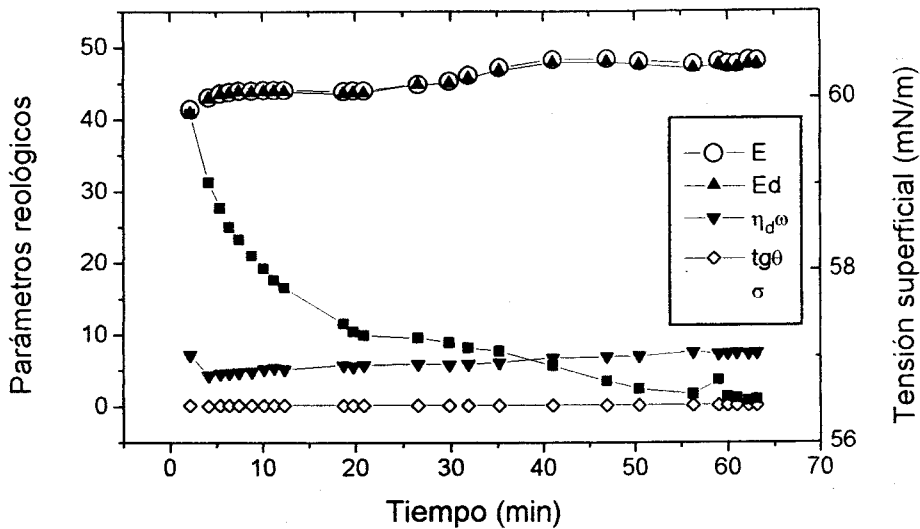


Figura 7.11. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de etanol 0,1 M a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

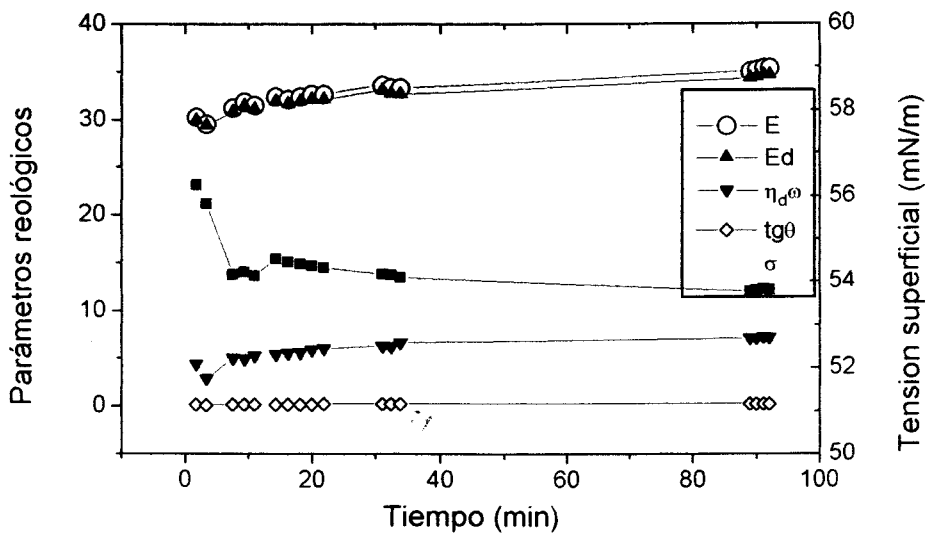


Figura 7.12. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de etanol 0,5 M a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

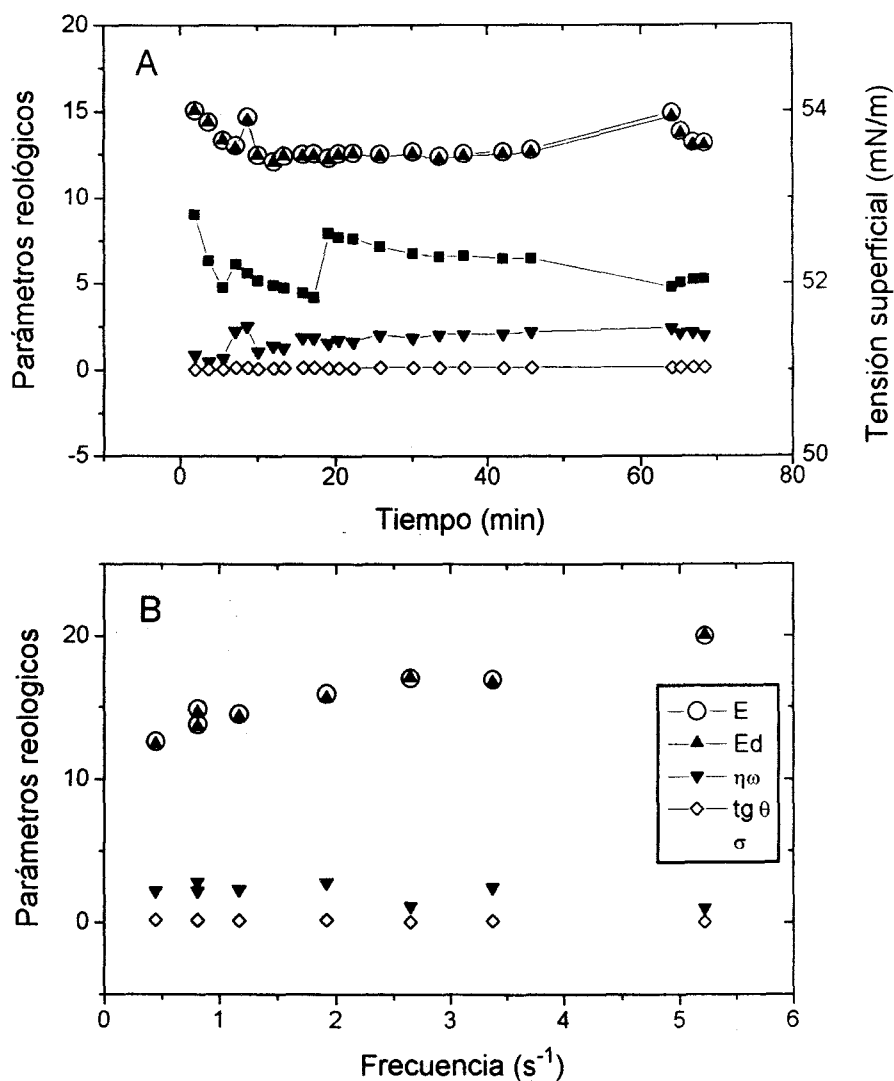


Figura 7.13. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($tg \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de etanol 1M a una frecuencia angular de $0,81 s^{-1}$. (B) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Temperatura: 20 °C.

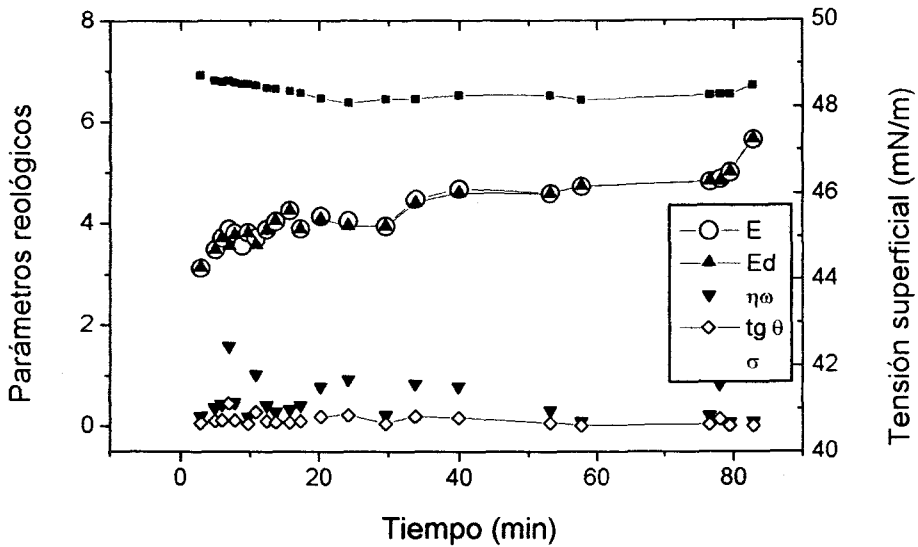


Figura 7.14. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de etanol 2,0 M a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los resultados muestran algunos comportamientos interesantes, desde un punto de vista reológico:

- (i) Los valores del módulo dilatacional superficial (E) son similares a los de la elasticidad superficial (E_d).
- (ii) Los valores de la viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \cdot \omega$) son bajos y se aproximan a cero cuando se incrementa la concentración de etanol.
- (iii) La tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) es prácticamente cero, especialmente a la mayor concentración de etanol. A concentraciones de etanol 2 M la tangente del ángulo de pérdida es menor que 0'1.

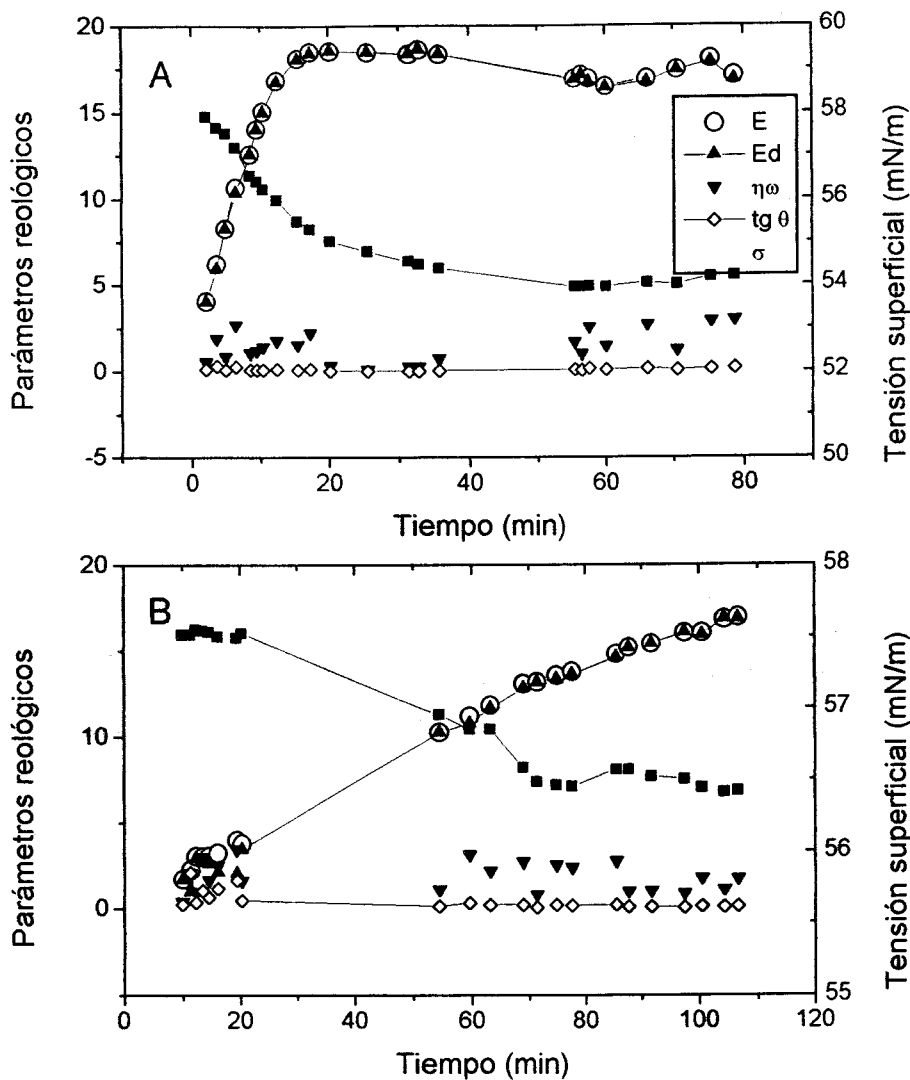


Figura 7.15. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA sobre una disolución acuosa de etanol 1,0 M a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Concentración de BSA en el seno de la fase (% en peso): (A) $2 \cdot 10^{-2}$, (B) $3 \cdot 10^{-3}$.

(iv) La dependencia de E y Ed con la frecuencia es una indicación de que las películas de BSA sobre agua y disoluciones acuosas de etanol muestran características reológicas de carácter viscoelástico, sobre el intervalo de frecuencias estudiado. En las figuras 7.10 y 7.13 se muestra esta

dependencia, para películas de BSA sobre agua y disolución acuosa de etanol 1M, respectivamente, como un ejemplo. Se observa que E y Ed varían desde 60,2 y 12,5 mN/m hasta valores constantes de 81,6 y 20 mN/m cuando la frecuencia se incrementa desde 0,45 hasta 5,2 s⁻¹, para disoluciones de BSA sobre agua y disolución acuosa de etanol 1 M, respectivamente.

Desde un punto de vista cinético, la dependencia con el tiempo de la tensión superficial y de las propiedades superficiales dilatacionales son función de la concentración de etanol. Sobre agua y disoluciones de etanol inferiores a 0,5 M, la tensión superficial decrece y el módulo dilatacional superficial se incrementa continuamente hasta que se alcanza un valor prácticamente constante (Figuras 7.10 y 7.12). A concentraciones de etanol superiores a 0,5 M, la dependencia con el tiempo de las propiedades dinámicas superficiales es más compleja (Figuras 7.12 a 7.14). Se puede observar que existe un periodo de inducción al comienzo de la adsorción de BSA. Este periodo de inducción se incrementa con la concentración de etanol.

La influencia de la concentración de BSA sobre las propiedades dinámicas superficiales se muestra en las figuras 7.13 y 7.15. En estas experiencias se han estudiado diferentes concentraciones de BSA (1.10⁻¹, 2.10⁻² y 3.10⁻³ %, en peso), sobre disoluciones de etanol 1M. Se observa que las propiedades reológicas superficiales son prácticamente independientes de la concentración de BSA. Es decir, la película muestra un comportamiento elástico -- se observa que los valores de E y Ed son similares y que la tangente del ángulo de pérdida es prácticamente cero (Figuras 7.13 y 7.15). La velocidad de adsorción de BSA sobre la interfase -- como se deduce del descenso de la tensión superficial o el incremento del módulo dilatacional superficial con el tiempo -- decrece cuando lo hace la concentración de BSA. A la menor concentración de BSA no se alcanza un estado de quasi-equilibrio una vez transcurridos 120 minutos de adsorción (Figura 7.15B).

7.2.1.1. Propiedades dinámicas superficiales transitorias.

La dependencia con el tiempo de la tensión superficial para disoluciones alcohólicas de etanol es típica, cuando se compara con los datos analizados en el capítulo 5 o en la bibliografía (Dussaud et al, 1994a). La principal diferencia con los datos obtenidos mediante tensiometría es que el tiempo que se requiere para alcanzar el estado de quasi-equilibrio se reduce en las experiencias dinámicas utilizadas en este apartado, como consecuencia de la convección interfacial y en el seno de la fase, originada por el movimiento ascendente-descendente del anillo (ver apartado 4.2.2).

Si la disminución de la tensión superficial o el incremento de las propiedades reológicas dilatacionales, especialmente el módulo dilatacional superficial y su componente elástica, con el tiempo se pueden asociar con la adsorción de BSA sobre la interfase (MacRitchie y Alexander, 1963; Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979b), las propiedades superficiales dinámicas transitorias de películas de BSA sobre disoluciones acuosas de etanol se pueden relacionar con la adsorción competitiva de BSA y de etanol sobre la interfase.

Un análisis detallado de la adsorción de BSA sobre agua (capítulo 5) ha mostrado que tras una rápida difusión de la proteína hacia la interfase, de acuerdo con la ecuación de Ward y Torday (1946), la velocidad de adsorción de BSA está controlada por el esparcimiento y desnaturalización de las moléculas adsorbidas y su posterior reordenación interfacial. La existencia de un período de inducción se puede asociar con la adsorción competitiva de BSA y etanol sobre la interfase. La concentración en exceso de etanol sobre la interfase se ha calculado mediante la clásica ecuación de Gibbs (ecuación 6.2, figura 6.16). A partir de estos cálculos (datos no mostrados) se puede concluir que el recubrimiento superficial por el etanol en el equilibrio está próximo a la saturación para una concentración superior a 1,3M. Sin embargo, la proteína puede competir con el etanol debido a su mayor

afinidad por la interfase que aquel, como una consecuencia de su mayor hidrofobicidad.

Finalmente, la dependencia con la frecuencia del módulo dilatacional superficial es una indicación de que puede existir una reordenación de las moléculas sobre la interfase o una difusión de las moléculas entre la interfase y la subfase, durante el ciclo de compresión-expansión.

7.2.1.2. Efecto de la concentración de etanol.

El efecto de la concentración de etanol sobre las propiedades dinámicas superficiales a 30 y 60 minutos de adsorción se muestra en la figura 7.16. Se puede observar que la tensión superficial y los parámetros reológicos superficiales, especialmente el módulo dilatacional superficial y su componente elástica, decrecen cuando se incrementa la concentración de etanol. Estos resultados son de importancia práctica debido al hecho de que la viscoelasticidad desciende hasta un valor bajo a la mayor concentración de etanol estudiada (2 M). Unos resultados similares han sido obtenidos por Dussaud et al (1994b) para disoluciones alcohólicas de BSA sobre la interfase aire-agua. Estos datos están de acuerdo también con los obtenidos por Dickinson y Woskett (1988) sobre la viscosidad superficial de cizalla sobre la interfase aceite-agua..

La explicación para los resultados obtenidos debe asociarse con las interacciones proteína-etanol, tanto sobre la interfase como en el seno de la fase acuosa. Las interacciones BSA-etanol sobre la interfase podría reducir la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase (Dussaud et al, 1994a) o interferir en las interacciones proteína-proteína, pudiéndose llegar a la formación de películas adsorbidas mixtas de BSA y etanol. Además, el efecto desnaturalizante del etanol (Tanford, 1962) podría hacer disminuir los enlaces hidrofóbicos, o hacer decrecer

la solubilidad de la proteína (Aoki et al, 1981). Es posible también que el etanol desestabilice a la proteína nativa por la acción de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, como se ha informado a partir de datos de dicroísmo circular (Clark y Smith, 1989). Como consecuencia de estas interacciones BSA-etanol pueden formarse complejos entre ambas sustancias, lo que debilitaría la estructura interfacial, un fenómeno que está de acuerdo con los datos presentados en la figura 7.16.

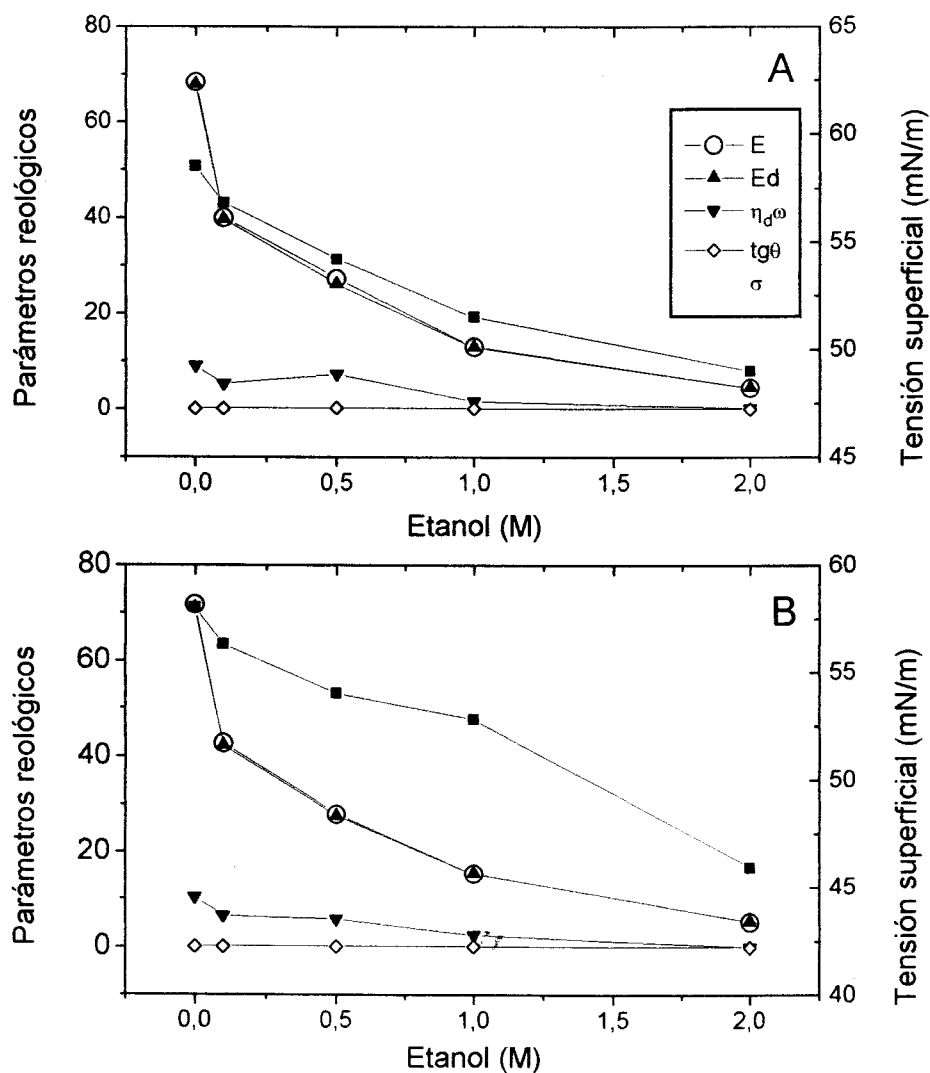


Figura 7.16. Efecto de la concentración de etanol sobre la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($tg \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre disoluciones acuosas de etanol a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (A) 30 minutos, (B) 60 minutos.

7.2.1.3. Efecto de la concentración de BSA.

El efecto de la concentración de BSA en una disolución acuosa de etanol 1M sobre las propiedades dinámicas a 30 y 60 minutos de adsorción se muestra en la figura 7.17. Se puede observar que el módulo dilatacional superficial y su componente elástica se incrementan con la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa, hasta que se alcanza un valor constante. Este fenómeno puede asociarse con la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase. Es decir, cuanto mayor es la concentración de proteína en el medio acuoso tanto mayor es la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase, lo que está de acuerdo con los datos de la literatura (Phillips, 1980; Tornberg, 1978) y con los aportados sobre el mismo sistema en los capítulos 5 y 6 de esta Memoria. El máximo valor de las propiedades reológicas se observa a concentraciones de proteína a las que el valor de σ se hace mínimo. El aumento de las propiedades dilatacionales superficiales puede asociarse con un mayor empaquetamiento de las moléculas de proteína adsorbidas, conduciendo a una mayor densidad superficial y a una película más gruesa. A densidades superficiales superiores a la correspondiente a la saturación de la monocapa, las moléculas de proteína pueden formar multicapas, situadas por debajo de la primera monocapa adsorbida, pero que no contribuyen significativamente al valor de σ (Graham y Phillips, 1978) ni a los de las propiedades dilatacionales superficiales (Figura 7.17).

Las diferencias observadas en las figuras 17A y 17B, como una consecuencia del tiempo de adsorción, puede asociarse con el efecto del etanol sobre la velocidad de adsorción de BSA, previamente analizada. En efecto, a la menor

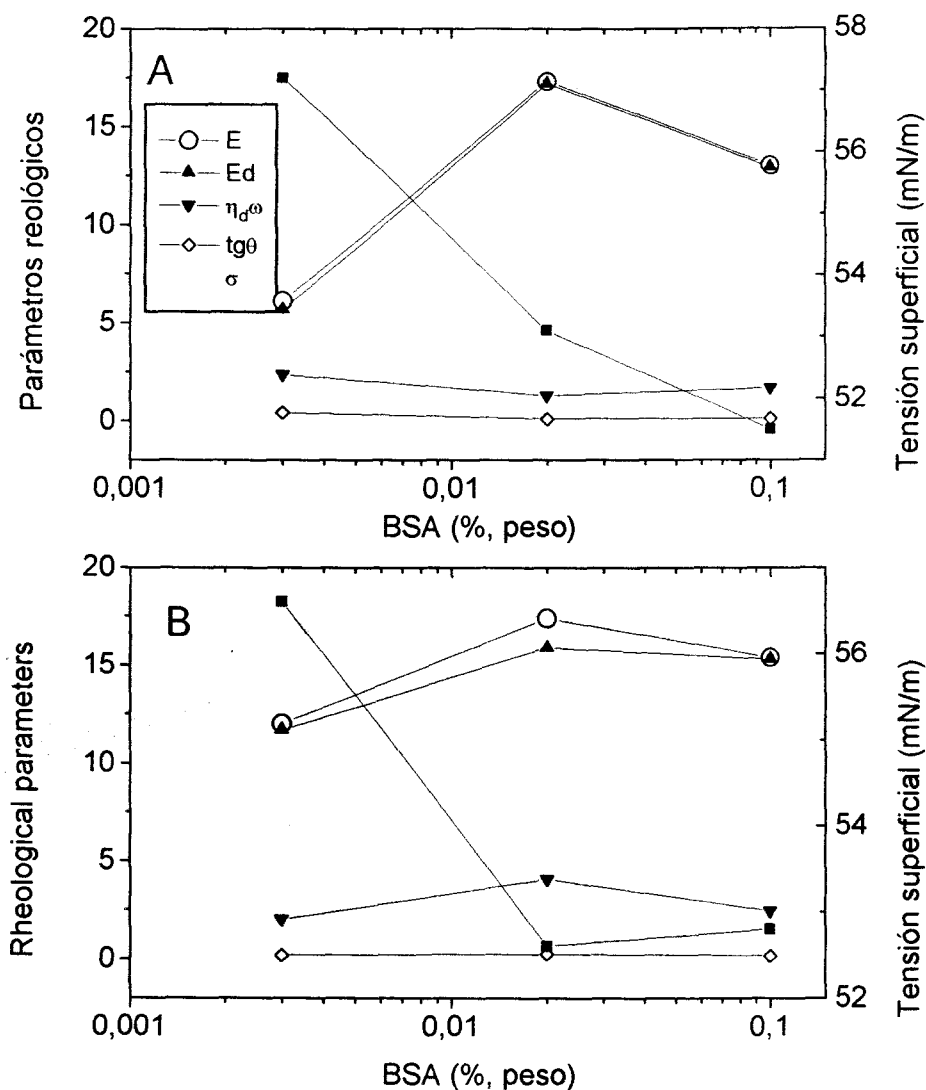


Figura 7.17. Efecto de la concentración de BSA sobre la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{a,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg}\theta$) de películas adsorbidas de BSA sobre disoluciones acuosas de etanol (1 M), a una frecuencia angular de $0,81\text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20\text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (A) 30 minutos, (B) 60 minutos.

concentración de BSA ($3 \cdot 10^{-3}\%$) las propiedades dinámicas superficiales son dependientes del tiempo, en el intervalo considerado. Se puede observar que la tensión superficial es prácticamente igual y que los parámetros reológicos

superficiales (especialmente E y E_d) son menores a 30 minutos que a 60 minutos de adsorción. Por lo tanto, se puede concluir que el efecto del etanol sobre las propiedades dinámicas de las películas de BSA depende de la relación BSA-etanol. A la mayor concentración de etanol o al menor contenido de BSA en el medio acuoso, disminuyen la velocidad de adsorción de BSA -- recuérdese (apartados 5.1.3 y 5.2.2) que en estos sistemas se incrementa el periodo de inducción -- y las propiedades reológicas superficiales. Es decir, a la menor concentración de etanol el efecto de la concentración de BSA sobre la interfase es predominante, pero lo contrario es cierto a las más altas concentraciones de etanol en el medio acuoso.

7.2.2. Características reológicas de películas de BSA adsorbidas sobre disoluciones acuosas de sacarosa.

En este apartado se presentan las propiedades dinámicas superficiales (tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales) de películas de BSA adsorbidas desde disoluciones de sacarosa, en función del tiempo de adsorción y de la concentración de sacarosa (0, 0'25, 0'5 y 1 M). Se incluye además en este apartado el comportamiento interfacial de una película de BSA adsorbida desde una mezcla de etanol 1 M y de sacarosa 0'5 M. La temperatura se mantiene constante en todas las experiencias, en un valor de 20 °C.

7.2.2.1. Propiedades dinámicas superficiales en función del tiempo.

El efecto de la adición de sacarosa sobre las propiedades dinámicas superficiales -- tales como tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales (módulo dilatacional superficial, componentes elástica y viscosa y tangente del ángulo de pérdida) -- de películas de BSA se muestra en las figuras 7.18 a 7.20. Se observa que la tensión superficial disminuye cuando se incrementa

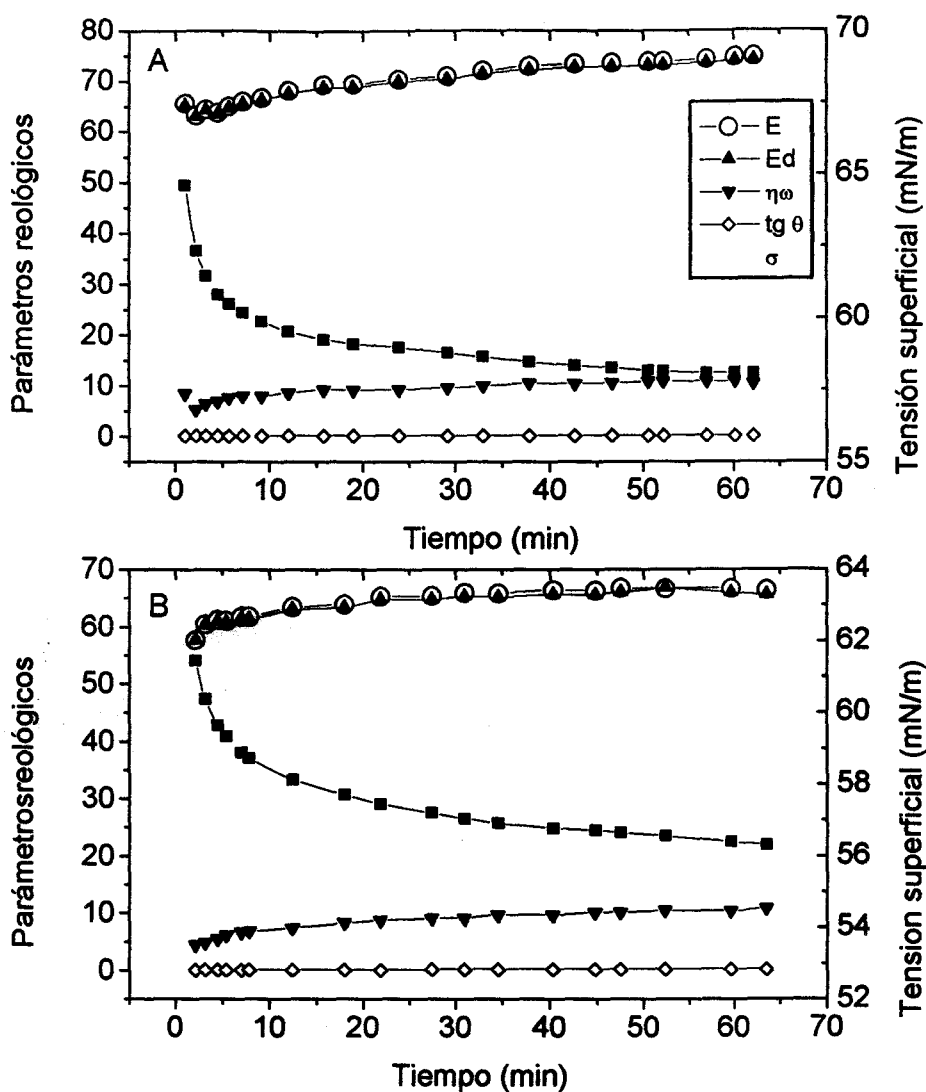


Figura 7.18. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre agua (A) y una disolución acuosa de sacarosa 0'25 M (B), a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

el tiempo de adsorción de la proteína. Sin embargo, la dependencia con el tiempo de las propiedades dilatacionales superficiales, especialmente del módulo dilatacional superficial y de su componente elástica, es más compleja. A la menor

concentración de sacarosa en el seno de la fase (0'25 M), los valores de E y de E_d aumentan con el tiempo, hasta que alcanzan un valor constante. Este comportamiento es similar al discutido en el apartado anterior, con referencia a la adsorción de BSA sobre agua. Sin embargo, a concentraciones de sacarosa superiores a 0'5 M, E y E_d presentan un máximo y posteriormente decrecen cuando se incrementa el tiempo de adsorción. El valor de la viscosidad superficial dilatacional es bajo, independientemente de la concentración de sacarosa en la fase acuosa. Sin embargo, el valor de la tangente del ángulo de pérdida es prácticamente cero, durante todo el tiempo de la experiencia.

El efecto de la adición de sacarosa sobre la velocidad de adsorción de BSA es algo diferente al observado con etanol (apartado 7.2.1). En efecto, la velocidad de adsorción de BSA sobre disoluciones acuosas de sacarosa es superior a la observada sobre agua o disoluciones acuosas de etanol. Además, a diferencia de lo observado con disoluciones acuosas de etanol, no existe un periodo de inducción

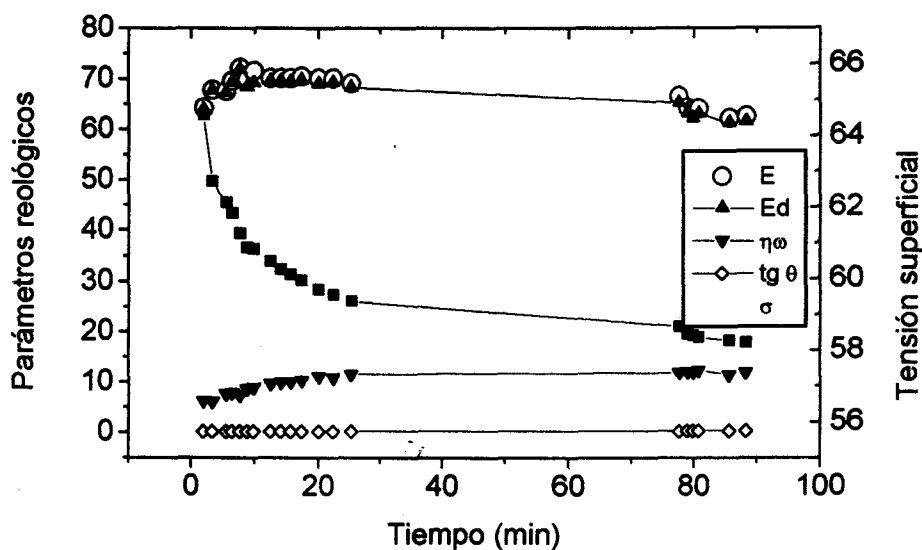


Figura 7.19. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de sacarosa 0,5 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

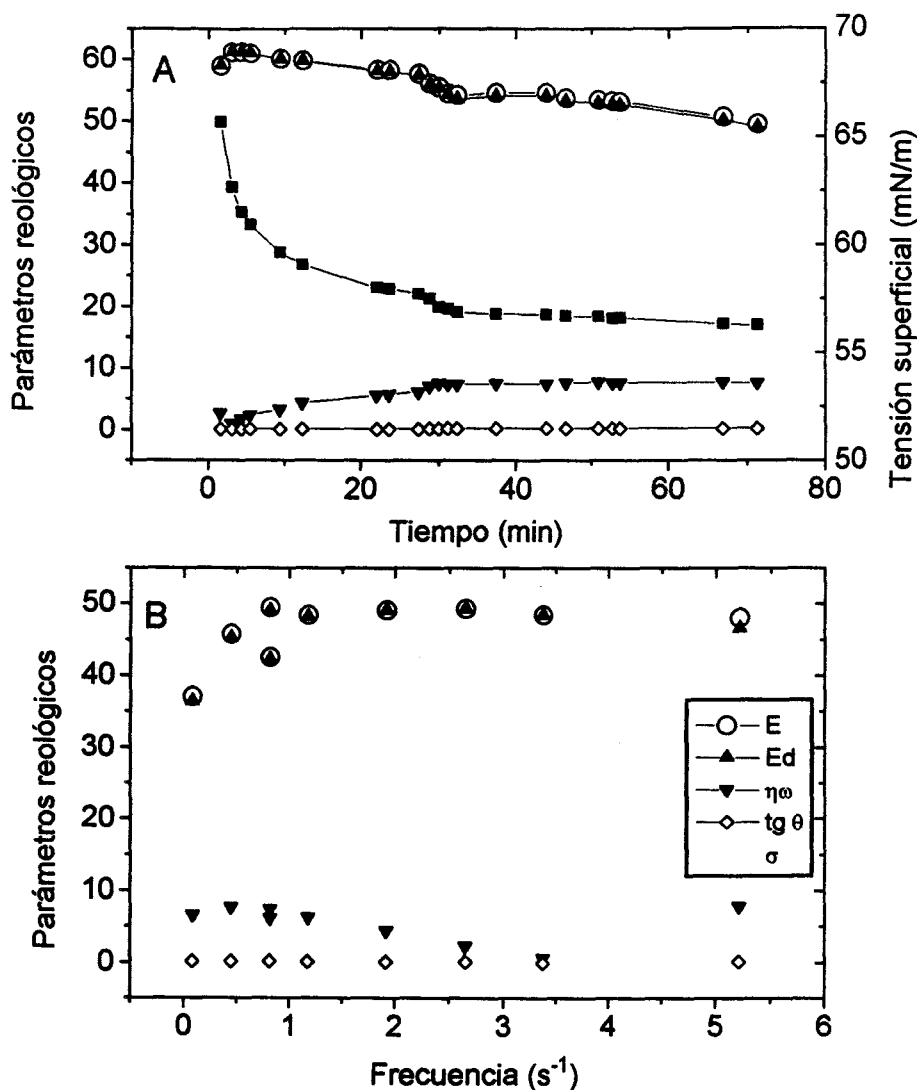


Figura 7.20. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una disolución acuosa de sacarosa 1M a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (B) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

durante la adsorción de BSA desde una disolución acuosa de sacarosa. Este comportamiento es similar al analizado en un apartado previo (apartado 5), según las experiencias de tensiometría. Por lo tanto, las mismas explicaciones se

aplicarían aquí. Es decir, el fenómeno observado podría estar relacionado con el hecho de que las moléculas de proteína están preferencialmente hidratadas en presencia de sacarosa (Crowe et al, 1987; Lee y Timasheff, 1981). Por lo tanto, se puede admitir que la sacarosa incrementa la barrera de energía entre los estados nativo y desnaturalizado de la proteína (Crowe et al, 1987) y es excluida de los dominios inmediatos de la proteína en disolución. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este apartado confirman y refuerzan la hipótesis de que la sacarosa limita la desnaturalización de la proteína y las interacciones proteína-proteína, evitando su agregación y facilitando una mayor participación de la proteína nativa en la formación de la película.

La disminución de los valores del módulo dilatacional superficial y de su componente elástica, a los mayores tiempos de adsorción (Figuras 7.19 y 7.20), podría estar relacionada con un descenso de las interacciones proteína-proteína y/o con el efecto de la sacarosa sobre la estructura molecular de la proteína sobre la interfase -- por interacción directa con la macromolécula, por una acción indirecta a través de su efecto sobre la estructura y propiedades del disolvente, o por una combinación de ambos efectos (Timasheff et al, 1976). Es decir, cualquier cambio de la conformación de la proteína tras su adsorción podría afectar a los valores de las propiedades reológicas superficiales y a su variación con el tiempo.

7.2.2.2. Propiedades dilatacionales superficiales.

El efecto de la adición de sacarosa sobre las propiedades reológicas de películas de BSA muestra algunos comportamientos característicos (Figuras 7.18 a 7.20):

- (i) Los valores del módulo dilatacional superficial son muy similares a los de su componente elástica.

(ii) Los valores de la viscosidad dilatacional superficial y de la tangente del ángulo de pérdida son bajos, y prácticamente cero.

(iii) Los valores de los parámetros reológicos superficiales -- especialmente del módulo dilatacional superficial y de su componente elástica -- aumentan con la frecuencia hasta que se alcanza un valor constante.

Como una consecuencia de este comportamiento, se puede concluir que las características viscoelásticas superficiales de las películas adsorbidas de BSA sobre estos medios acuosos son esencialmente elásticas. Este comportamiento, que es característico de lípidos insolubles, apoyan de nuevo la hipótesis acerca del efecto de la sacarosa sobre la estructura de la proteína sobre la interfase. En efecto, si la sacarosa favorece la adsorción de la proteína sobre la interfase y reduce las interacciones proteína-proteína, ambos fenómenos conferirían un carácter prácticamente elástico a las propiedades viscoelásticas de la película.

La reducción de las interacciones proteína-proteína sobre la interfase podría explicar también la reducción del módulo dilatacional superficial cuando se incrementa la concentración de sacarosa en el seno de la fase, especialmente a la mayor concentración de sacarosa estudiada (Figura 7.21). Es decir, la BSA puede adsorberse sobre la interfase con una configuración predominantemente nativa, estabilizada por la presencia de sacarosa.

La dependencia con la frecuencia de las propiedades superficiales dilatacionales (a las más bajas frecuencias) puede ser la consecuencia de una reordenación de las moléculas de proteína sobre la interfase o de la existencia de una difusión de las mismas entre la interfase y la sub-subfase, durante el ciclo de compresión-expansión. Sin embargo, la constancia de los valores de las propiedades superficiales dilatacionales a las más altas frecuencias podría indicar

que el tiempo de relajación de procesos diferentes al desplazamiento parcial de la proteína de la interfase y/o a la reordenación de las moléculas de proteína adsorbidas, si existen, poseen una escala de tiempo superior a la correspondiente al ciclo de compresión-expansión (Graham y Phillips, 1980).

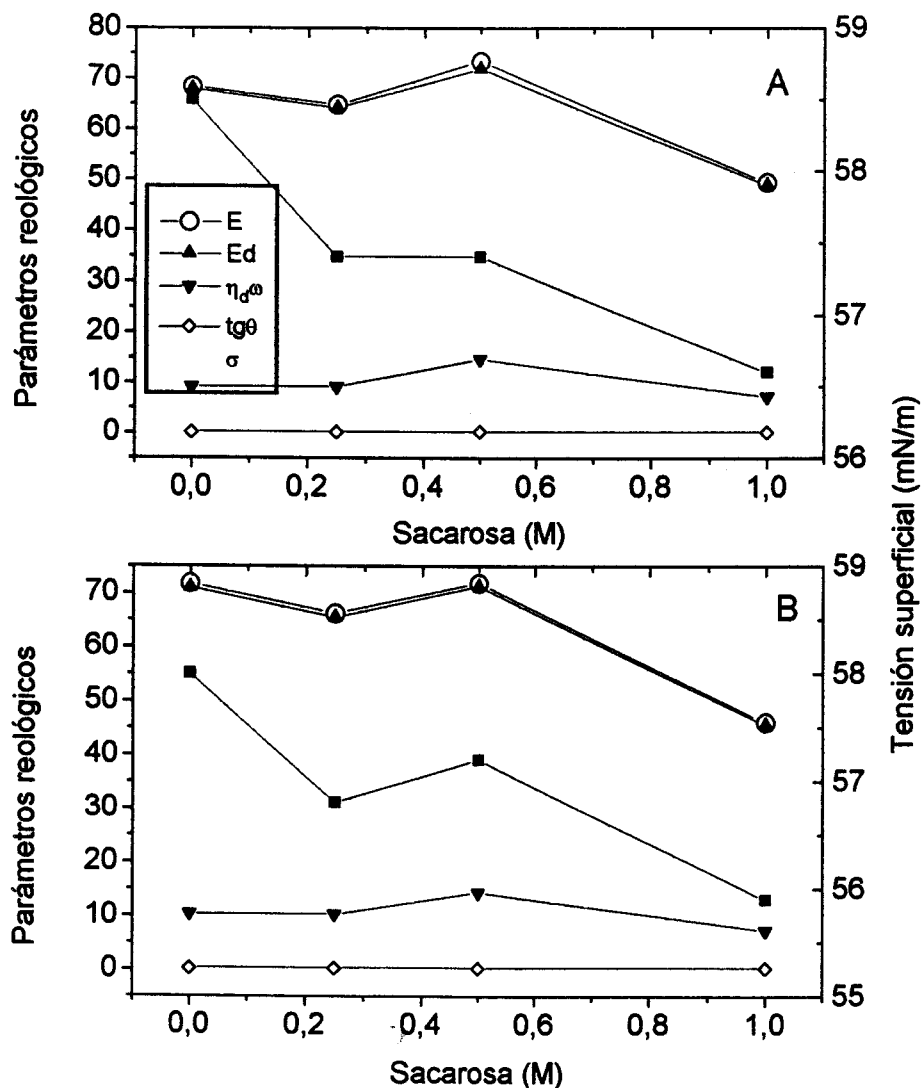


Figura 7.21. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{a,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre disoluciones acuosas de sacarosa, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (A) 30 minutos, (B) 60 minutos.

7.2.3. Adsorción de BSA desde una disolución acuosa de etanol 1 M y de sacarosa 0'5 M.

El efecto de la presencia de la mezcla de etanol (1 M) y de sacarosa (0'5 M) en el medio acuoso sobre las propiedades dinámicas transitorias de películas adsorbidas de BSA, se muestra en la figura 7.22. Como ocurría con disoluciones acuosas de etanol 1M (Figura 7.13, apartado 7.2.1) y de sacarosa 0'5 M (Figura 7.19), las películas de BSA, adsorbidas desde una mezcla de ambos solutos, presentan un comportamiento reológico superficial que es esencialmente elástico. Se puede observar (Figura 7.22) que los valores de las propiedades reológicas superficiales son debidos fundamentalmente a la presencia de etanol en la fase acuosa. Véase que el valor del módulo dilatacional superficial es similar al observado sobre disolución acuosa de etanol 1 M (Figura 7.13) y menor al observado sobre disolución acuosa de sacarosa 0'5 M (Figura 7.19)

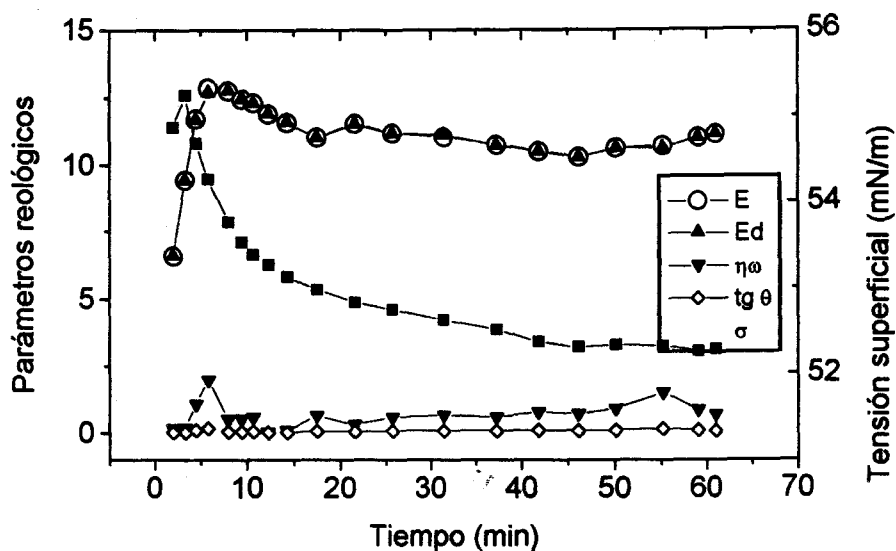


Figura 7.22. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) de películas adsorbidas de BSA (0,1% en peso) sobre una mezcla acuosa de etanol 1'0 M y de sacarosa 0,5 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sin embargo, la presencia de sacarosa en el seno de la fase acuosa afecta principalmente a la cinética de adsorción de la BSA. Como se ha discutido previamente, la sacarosa incrementa la velocidad de adsorción de la BSA. Además, la variación del módulo dilatacional superficial con el tiempo presenta un máximo y posteriormente decrece cuando se incrementa el tiempo, un fenómeno que se ha asociado al efecto estructurante de la sacarosa sobre la molécula de la proteína.

7.3. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE PELÍCULAS MIXTAS LÍPIDO- PROTEÍNA SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO.

Como se sabe, los coloides alimentarios (emulsiones y espumas) se estabilizan fundamentalmente mediante lípidos (emulsionantes de bajo peso molecular) y proteínas (macromoléculas), o por una mezcla de ambos emulsionantes (Charalambous y Doxastakis, 1989; Dickinson, 1992; Larsson y Friberg, 1990; Leadbetter, 1990). Debido a su naturaleza anfifílica, con grupos polares y no polares, estos emulsionantes tienden a orientarse sobre la interfase aire-agua o aceite-agua, disminuyendo la tensión superficial o interfacial y confiriendo estabilidad a las burbujas o gotitas, formando una capa adsorbida sobre su superficie, que las proteja frente a los mecanismos causantes de su rotura.

La mayoría de los coloides alimentarios se estabilizan, en primer lugar, mediante una capa adsorbida de proteínas (procedentes normalmente de la leche o del huevo), formando una barrera protectora estérica alrededor de la fase dispersa, por la acción de complejas interacciones intermoleculares, que imparte rigidez estructural a la interfase (Halling, 1981; Dickinson, 1982). El desarrollo de películas con la misma rigidez no es posible en el caso de los lípidos, debido a que las interacciones entre ellos son más débiles (Halling, 1981; Dickinson, 1992). Por lo tanto el conocimiento de las características reológicas de películas mixtas de emulsionantes adsorbidos o esparcidos sobre las interfases fluido-fluido es de particular importancia, debido a su relación directa con la estabilidad global y con las propiedades del producto final (Dickinson, 1989). Además, la existencia de interacciones proteína-lípido pueden ejercer una influencia importante sobre el comportamiento interfacial de ambos tipos de sustancias (Bos et al, 1996).

La formación y propiedades de la capa interfacial están fuertemente afectadas, no solo por la composición interfacial (proteínas, lípidos, o sus mezclas),

sino también por las propiedades y composición del medio acuoso, como se ha discutido en apartados previos de esta Memoria. Para profundizar en este estudio, y una vez analizadas las características dinámicas superficiales de películas de lípidos (apartado 7.1) y de una proteína (apartado 7.2), el objetivo de este apartado se ha centrado en el estudio de las películas mixtas de ambos tipos de emulsionantes. Se analizarán, pues, el comportamiento interfacial de películas de BSA-monoestearina (apartado 7.3.1), BSA-monooleína (apartado 7.3.2.) y BSA-Tween 20 (apartado 7.3.3.), sobre medios acuosos que contienen etanol o sacarosa. Por lo que se conoce, el análisis sistemático de las características reológicas de películas mixtas lípido-proteína sobre medios acuosos que contienen solutos presentes en formulaciones alimentarias típicas, no ha sido realizado hasta la fecha. Por lo tanto, en este apartado se intenta profundizar en este tema.

7.3.1. Características reológicas de películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-medio acuoso.

7.3.1.1. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-agua.

Las propiedades dinámicas transitorias de la película -- tales como tensión superficial y propiedades dinámicas dilatacionales (módulo dilatacional superficial y sus componentes elástica y viscosa, así como la tangente del ángulo de pérdida) -- tras el esparcimiento de monoestearina sobre una película de BSA adsorbida sobre agua se muestran en la figura 7.23. Como se observa, el esparcimiento de monoestearina, a una densidad superficial de $1'64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$ (Figura 7.23A) produce una caída instantánea seguida de un rápido aumento de la tensión superficial y del módulo dilatacional superficial. Tras este periodo inicial de tiempo, que puede durar entre 5 y 10 minutos -- el tiempo requerido para la evaporación del disolvente utilizado para esparcir al lípido -- tanto la tensión superficial como el

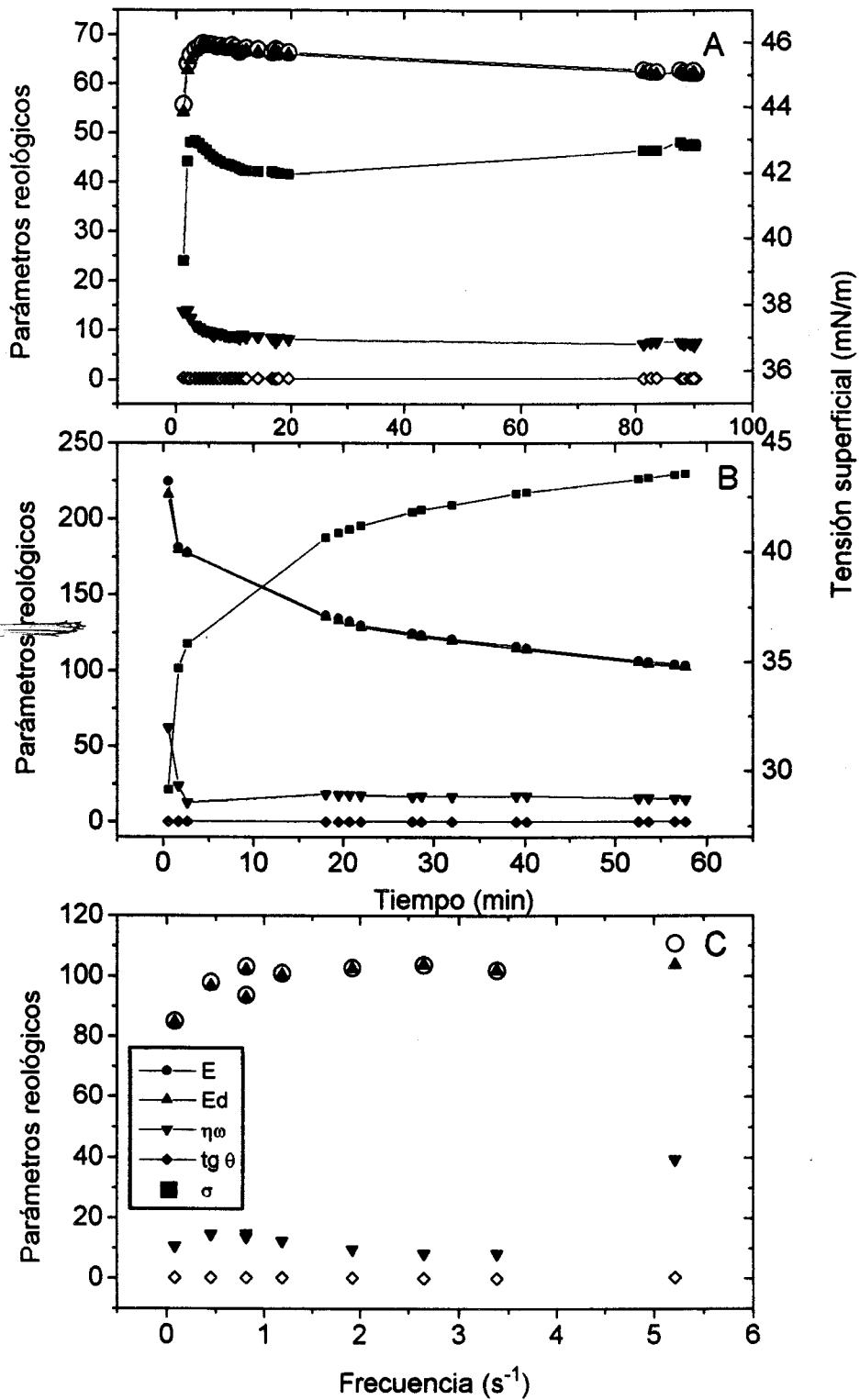


Figura 7.23. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta\omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina ($1,64 \text{ moléculas} \cdot \text{nm}^{-2}$) sobre una película adsorbida de BSA (0,1% en peso) sobre la interfase aire-agua a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (B) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Densidad superficial de monoestearina ($\text{moléculas} \cdot \text{nm}^{-2}$): (A) $1,64$; (B) y (C) $3,29$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

módulo dilatacional superficial varían con el tiempo, tendiendo a un valor constante a los mayores tiempos de la experiencia.

Las propiedades dinámicas transitorias son algo diferentes cuando la cantidad de lípido que se esparce sobre la interfase se incrementa hasta 3,29 moléculas.nm² (Figura 7.23B). Como lo observado a la menor concentración de lípido, tras el esparcimiento del mismo, se produce una caída instantánea de σ e inmediatamente su valor se incrementa con el tiempo. Sin embargo, el módulo dilatacional superficial se comporta de forma diferente. Este parámetro decrece continuamente con el tiempo hasta que se tiende a un valor constante. El módulo dilatacional superficial varía desde 225 hasta 100 mN/m cuando el tiempo se incrementa desde 0 hasta 60 minutos. Estos resultados sugieren que la proteína y el lípido compiten por la interfase (según lo discutido en el capítulo 6) y/o que el fenómeno de relajación puede deberse a la inestabilidad de la película de monoestearina sobre la interfase (Fuente y Rodríguez Patino, 1994).

Los valores de las propiedades dinámicas transitorias de películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.23) son diferentes a los observados con los emulsionantes puros sobre la interfase, sean estos BSA (Figura 7.10, apartado 7.2) o monoestearina (Figura 7.1, apartado 7.1). Estos efectos sinergistas parecen indicar que la película interfacial está afectada, no sólo por la monoestearina esparcida, sino también por la proteína adsorbida desde el medio acuoso. Esta hipótesis se soporta por una amplia bibliografía (Bos et al, 1996), que establece que la estructura de la película y su capacidad de formación dependen de los mecanismos de formación de complejos lípido-proteína sobre la interfase (Sovij et al, 1993) y de los cambios conformacionales de las moléculas de proteína causados por la formación de estos complejos (Wüstneck et al, 1988).

Las diferencias observadas, en función de la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase, pueden estar asociadas con la estructura de la

monocapa de monoestearina y con la saturación de la interfase por el lípido. Puesto que el valor de la máxima cantidad de lípido esparcida está próximo al correspondiente a la concentración superficial crítica (apartado 7.1), la interfase debe estar saturada por la monoestearina. A esta concentración de monoestearina el valor del módulo dilatacional es máximo (Figura 7.3) y la estructura de la monocapa en el equilibrio es líquido-condensada (Rodríguez Patino y Martín, 1994). El valor máximo de E para una película de monoestearina pura es doble al de una película mixta BSA-monoestearina (Figura 7.23B), lo que refuerza la hipótesis de que ambas moléculas interactúan sobre la interfase. Sin embargo, a la menor concentración de monoestearina ($1.64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$, Figura 7.23A), la monocapa no está saturada por el lípido y la estructura de este se corresponde con la transición entre líquido expandida y líquido condensada (Rodríguez Patino et al, 1992). Por lo tanto, se puede concluir que la composición interfacial de la película depende de la relación BSA-monoestearina sobre la interfase, del grado de saturación de la monocapa por el lípido y de su estructura. Se puede especular, pues, que a bajos contenidos de monoestearina, con una estructura más expandida de la monocapa, es más probable la existencia de una película mixta proteína-lípido. Sin embargo, a las más altas concentraciones superficiales de monoestearina, con una estructura más condensada de la monocapa y, con ello, con su saturación por el lípido, se favorece la existencia de una película de monoestearina con un bajo contenido de complejos BSA-monoestearina.

La disminución del módulo dilatacional superficial, especialmente a la mayor concentración de monoestearina (Figura 7.23) podría relacionarse también con la inestabilidad de la monocapa. En efecto, a partir de experiencias de relajación, a tiempos superiores que los característicos de una experiencia de dilatación, se ha observado que la estabilidad de las monocapas de monoestearina depende de la presión superficial y de la composición de la subfase (Fuente y Rodríguez Patino, 1994). En estas experiencias, las principales causas de inestabilidad de la monocapa fueron la desorción en la subfase compitiendo con el

colapso por formación y crecimiento de núcleos cristalinos. La presión superficial correspondiente a la menor concentración de monoestearina ($1,64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$) es menor que la presión de colapso de la monocapa, pero lo contrario es cierto a la mayor concentración de monoestearina ($3,29 \text{ moléculas.nm}^{-2}$). Por lo tanto, este mecanismo podría controlar la pérdida molecular a las mayores concentraciones de monoestearina, lo que explicaría las diferencias observadas en el módulo dilatacional superficial en las figuras 7.23A y 7.23B.

Desde un punto de vista reológico, los resultados muestran algunas características interesantes:

- (i) Los valores del módulo dilatacional son similares a los de su componente elástica.
- (ii) Los valores de la viscosidad dilatacional superficial son bajos.
- (iii) El valor de la tangente del ángulo de pérdida es prácticamente cero.
- (iv) La dependencia con la frecuencia de la oscilación del módulo dilatacional superficial es característico de un comportamiento viscoelástico de la película, sobre el intervalo de frecuencias estudiado. Esta dependencia con la frecuencia se ha observado con películas de BSA pura (Figura 7.10, apartado 7.2), pero no con películas esparcidas de monoestearina (Figura 7.1, apartado 7.1).

Se ha informado (Graham y Phillips, 1980, Lucassen-Reynders y Lucassen, 1969) que, en el caso de monocapas insolubles, que no están sometidas a intercambios difusionales ni a procesos de relajación superficial en la escala de tiempo característico de la frecuencia de compresión-expansión -- tal como ocurre con las películas de monoestearina (Figura 7.1, apartado 7.1) --, el módulo

dilatacional superficial es similar al que se mide a partir de la isoterma π -A obtenida en una típica experiencia en la balanza de superficie (Rodríguez Patino et al, 1992). Sin embargo, el comportamiento viscoelástico observado con películas de BSA y de las mezclas BSA-monoestearina podría estar asociado con el parcial desplazamiento de la BSA desde la interfase y/o con la reordenación de la película mixta, como una consecuencia de las interacciones BSA-monoestearina, durante el ciclo de compresión-expansión. Estos datos podrían indicar también que cualquier proceso de relajación en la película -- tal como la pérdida de moléculas de la monocapa -- ha de tener una escala de tiempo más pequeña o mayor que la escala de tiempo del ciclo de compresión-expansión (Graham y Phillips, 1980). Estos fenómenos estarían de acuerdo con las propiedades dilatacionales transitorias de la película (Figura 7.23), como anteriormente se ha discutido.

7.3.1.2. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol.

Propiedades dinámicas transitorias de la película.

El efecto del etanol en la fase acuosa a 0,1 M sobre las propiedades dinámicas superficiales (tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales) se muestra en la figura 7.24, como un ejemplo. Los mayores contenidos de etanol (0'5, 1'0 y 2'0 M, datos no mostrados) producen efectos similares. Como con agua (Figura 7.23), tras el esparcimiento de la monoestearina sobre una película de BSA adsorbida sobre la interfase, la tensión superficial se incrementa con el tiempo desde un valor bajo (que es prácticamente cero, al comienzo de la experiencia) hasta un valor constante. Sin embargo, el módulo dilatacional superficial se incrementa con el tiempo tras el esparcimiento del lípido, y alcanza un valor máximo a los 10-15 minutos, y posteriormente decrece a tiempos más prolongados. La dependencia con el tiempo es más significativa

cuanto mayor es la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase, cualquiera que sea la concentración de etanol en el seno de la fase (Figuras 7.24 y 7.25).

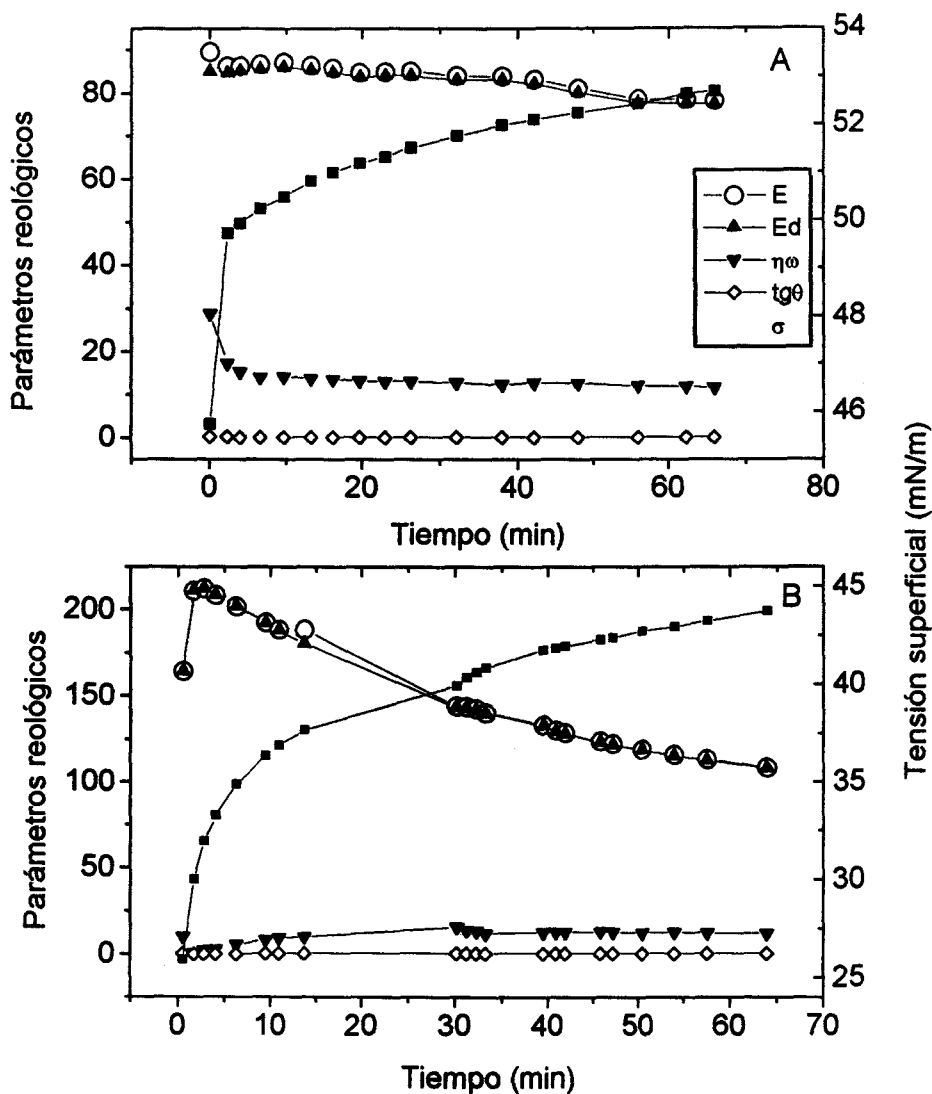


Figura 7.24. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina sobre una película de BSA (0,1%, en peso) adsorbida sobre una disolución acuosa de etanol 0,1 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Densidad superficial de monoestearina (moléculas. nm^{-2}): (A) 1,64, (B) 3,29. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

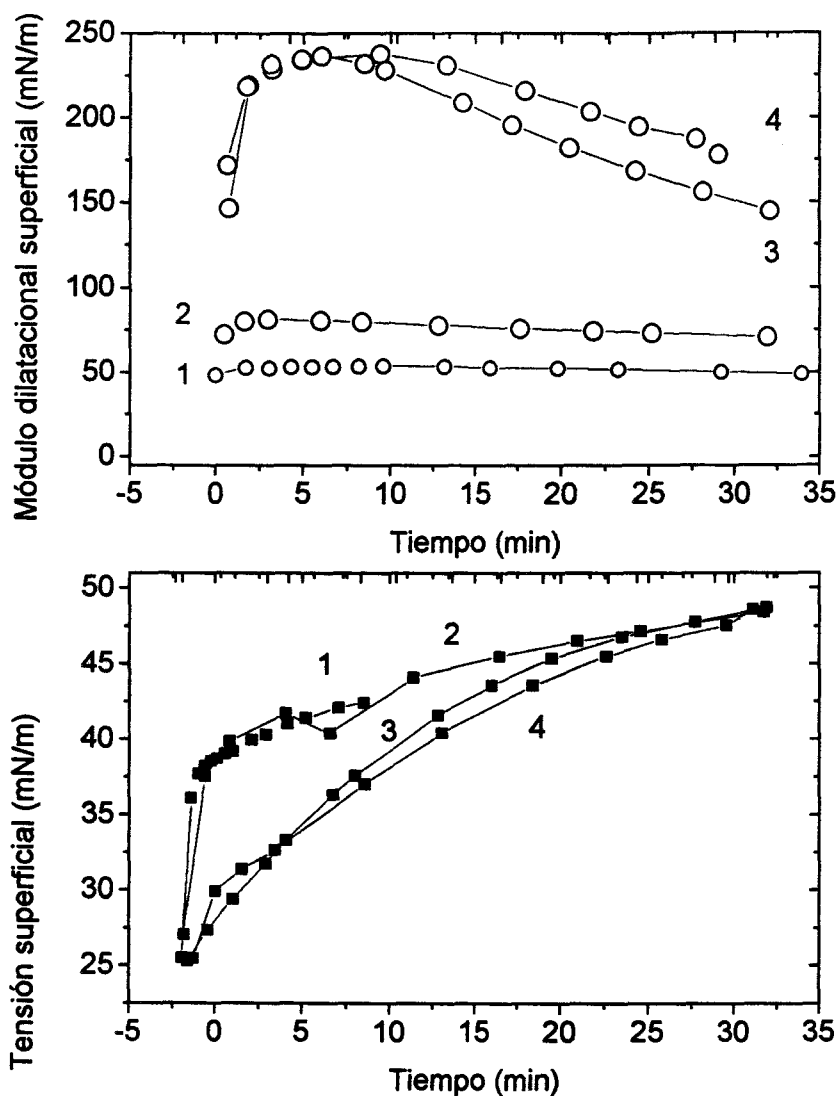


Figura 7.25. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m) y del módulo dilatacional superficial (E , mN/m) tras el esparcimiento de monoestearina sobre una película de BSA (0,1%, en peso) adsorbida sobre una disolución acuosa de etanol 1 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Densidad superficial de monoestearina ($\text{moléculas}\cdot\text{nm}^{-2}$): (1) 1,64, (2) 3,29, (3) 4,94 y (4) 6,58. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los mismos razonamientos usados previamente para analizar los datos obtenidos con las películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-agua, se aplicarían aquí. Tanto el incremento de la tensión superficial como el descenso

del módulo dilatacional superficial tras el esparcimiento de la monoestearina pueden ser debidos (a) a la readsorción de las moléculas de BSA tras un desplazamiento inicial de las mismas por la monoestearina, (b) a la existencia de complejos lípido-proteína sobre la interfase, y/o (c) a fenómenos de relajación asociados con la pérdida molecular de la monocapa. La existencia de complejos lípido-proteína sobre la interfase podría facilitarse en presencia de etanol, debido a que el etanol puede romper la estructura globular de la proteína nativa y favorecer a aquéllas con una mayor área superficial (Tanford, 1962; Pohl, 1968). Además, la inestabilidad de las monocapas de monoestearina por desorción y/o colapso se incrementa en presencia de etanol, especialmente a la mayor concentración de este soluto en la fase acuosa (Fuente y Rodríguez Patino, 1994).

Efecto de la concentración de etanol.

El efecto de la concentración de etanol en la fase acuosa sobre la tensión superficial y las propiedades dilatacionales superficiales (módulo dilatacional superficial y tangente del ángulo de pérdida) para películas mixtas BSA-monoestearina, a 30 y 60 minutos tras el esparcimiento del lípido, se muestra en la figura 7.26. Se puede observar que la tensión superficial se reduce cuando se incrementa ambos la concentración de etanol en la subfase y la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase. Sin embargo, la dependencia de las concentraciones de etanol y de monoestearina sobre el módulo dilatacional superficial es algo diferente. El módulo dilatacional superficial decrece cuando aumenta la concentración de etanol, pero se incrementa con la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase. Por otra parte, la tangente del ángulo de pérdida se incrementa con la concentración de etanol, especialmente a los menores contenidos de monoestearina en la película mixta. Esto significa que las películas mixtas BSA-monoestearina exhiben un comportamiento reológico superficial de carácter viscoelástico, lo cual está de acuerdo con la dependencia

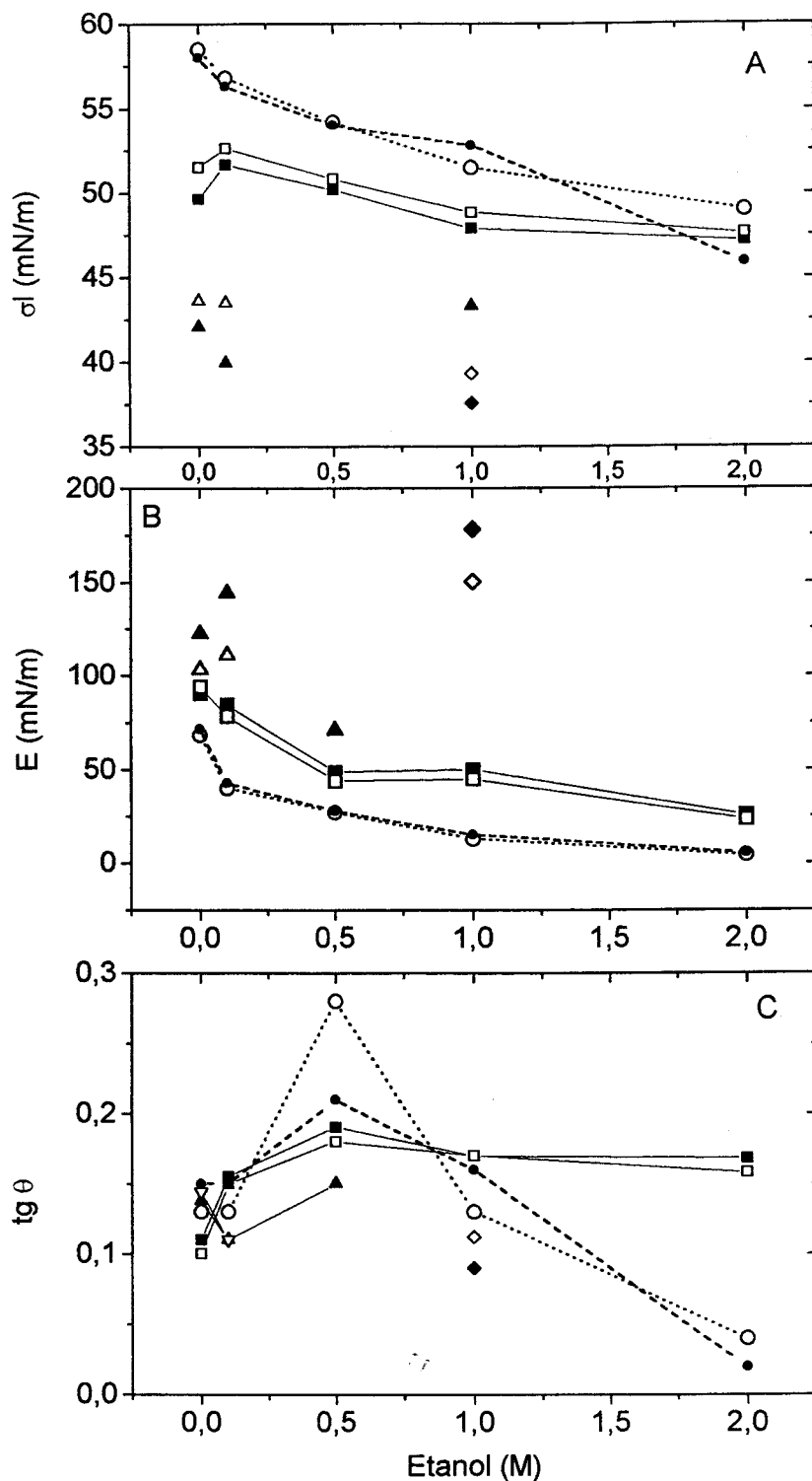


Figura 7.26. Variación con la concentración de etanol (M) en el seno de la fase acuosa de la tensión superficial (A), del módulo dilatacional superficial (B) y de la tangente del ángulo de pérdida (C), de monoestearina esparcida sobre una película de BSA adsorbida sobre la interfase aire-medio acuoso.

| TIEMPO DE ADSORCIÓN TRAS ESPARCIMIENTO (min) | DENSIDAD SUPERFICIAL DE MONOESTEARINA (moléculas.nm ⁻²) | | | | BSA (0'1% EN PESO) |
|--|---|------|------|------|--------------------|
| | 1'64 | 3'29 | 4'94 | 6'68 | |
| 30 | ■ | ▲ | ◆ | ◇ | ○ |
| 60 | □ | △ | | | ● |

con la frecuencia del módulo dilatacional superficial (datos no mostrados). Sin embargo, a los mayores contenidos de monoestearina en la película mixta, la tangente del ángulo de pérdida se hace prácticamente cero y la película se comporta como puramente elástica, un fenómeno similar al observado con el lípido puro (Figura 7.1, apartado 7.1).

El efecto del etanol sobre el módulo dilatacional superficial de películas mixtas BSA-monoestearina debe ser destacado, por su importancia práctica. Como se ha informado previamente, el etanol produce una pérdida completa de la viscosidad de cizalla interfacial en películas de proteínas sobre la interfase aceite-agua (Dickinson y Woskett, 1988), y, como se analizó en esta memoria, en sus propiedades dilatacionales superficiales sobre la interfase aire-agua (apartado 7.2). Este descenso pronunciado de las propiedades reológicas superficiales no favorece la estabilidad de emulsiones y de espumas (Dickinson y Stainsby, 1987; MacRitchie, 1986; Djabbarah y Wasan, 1985). Por lo tanto, la adición de monoestearina a una película de BSA adsorbida sobre disoluciones acuosas de etanol produce una mejora significativa de sus características reológicas superficiales. El efecto producido por la monoestearina es más pronunciado a las mayores concentraciones de etanol en la subfase, pero este efecto pasa por un máximo y luego se hace constante a las mayores concentraciones de monoestearina sobre la interfase. Por lo tanto, estos datos sugieren que existe un valor óptimo de monoestearina sobre el cual sucesivas adiciones no producen posteriores mejoras. Esta concentración óptima de monoestearina coincide con la concentración superficial crítica definida en el apartado 7.1. A esta concentración de monoestearina sobre la interfase la película podría estar saturada por el lípido, con una estructura líquido-condensada de la monocapa (Rodríguez Patino y Martín, 1994).

Comparando los datos obtenidos con películas de monoestearina pura (Figura 7.8, apartado 7.1) con los de BSA (Figura 7.16, apartado 7.2) y los de las

películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.26), en función de la concentración de etanol, se puede concluir que existen fenómenos sinérgicos en el comportamiento interfacial de las películas mixtas, que podrían estar asociados con la formación de complejos BSA-monoestearina sobre la interfase. La existencia de estos complejos sería más factible a bajas concentraciones de lípido. A las más elevadas concentraciones de lípido, el valor de E se aproxima al del lípido puro, aunque no se puede descartar la acción ejercida por la presencia de una cierta cantidad de BSA sobre la interfase. Estos resultados están de acuerdo con los analizados en el apartado 6, con relación a las medidas de tensiometría realizadas con los mismos sistemas (apartado 6.2.2).

Efecto de la relación BSA-monoestearina.

El efecto de la concentración de BSA sobre la tensión superficial y parámetros reológicos superficiales, a una concentración constante de monoestearina esparcida sobre la interfase de $1,64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$, se muestra en la figura 7.27. Se puede observar que la tensión superficial disminuye significativamente cuando se incrementa la concentración de BSA en el seno de la fase, hasta que la concentración de proteína se aproxima a un valor crítico, a partir del cual σ adopta un valor constante, cuando aumenta la concentración de BSA. El punto de ruptura en la curva σ en función de la concentración de proteína sugiere que existe una concentración crítica a partir de la cual las moléculas de proteína proporcionan una actividad superficial constante a la interfase. Por comparación de los datos de tensión superficial de monoestearina (Figura 7.8, apartado 7.1), de BSA (Figura 7.17, apartado 7.2) y de las mezclas BSA-monoestearina (Figura 7.27), se refuerza la idea de que es posible la existencia de complejos lípido-proteína sobre la interfase. Véase que las tensiones superficiales son 34, 52'5 y 47'5 mN/m para películas de monoestearina esparcida, para películas de BSA adsorbidas y para las películas mixtas de BSA-monoestearina, respectivamente.

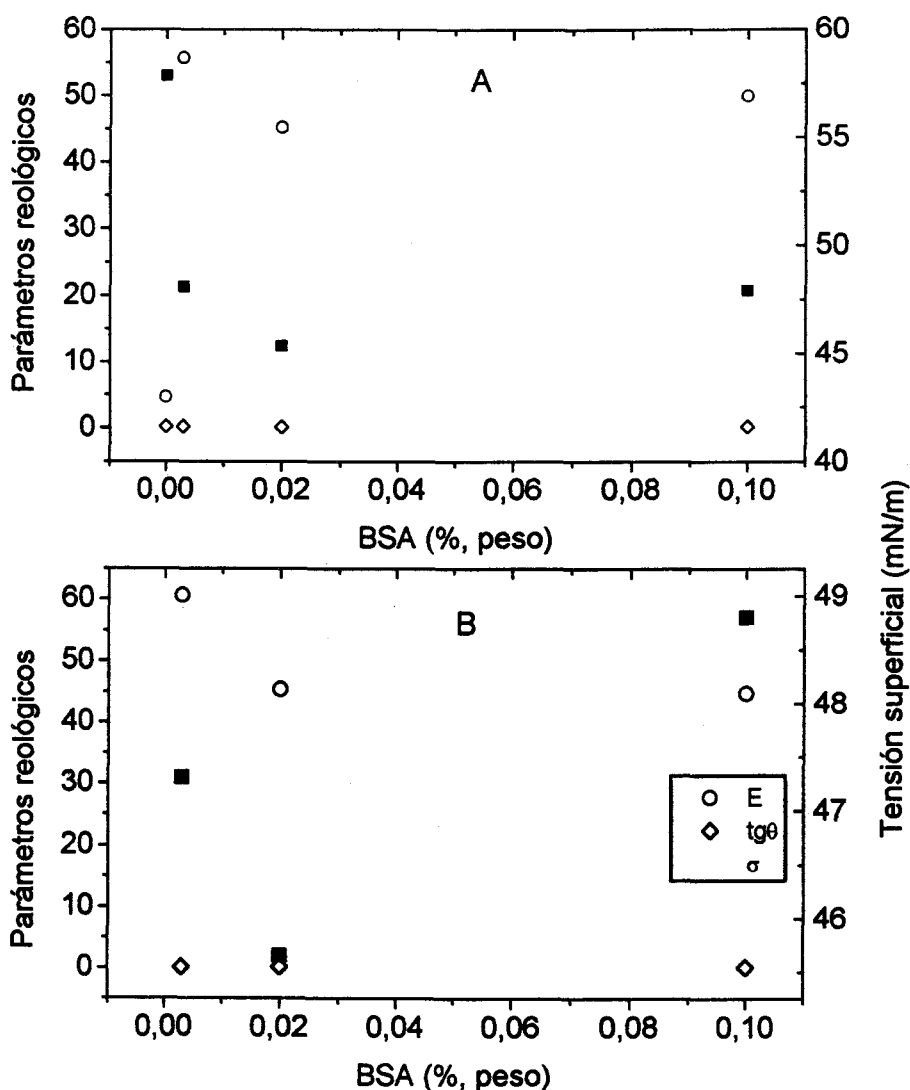


Figura 7.27. Variación con la concentración de BSA en el seno de la fase acuosa (% en peso) de la tensión superficial (σ), del módulo dilatacional superficial (E) y de la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina ($1,64 \text{ moléculas.nm}^{-2}$) sobre una película de BSA adsorbida sobre una disolución acuosa de etanol $1M$, a 20°C y a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Tiempo transcurrido tras el esparcimiento de la monoestearina (min): (A) 30, (B) 60.

Es decir, la actividad superficial de la película mixta está comprendida entre las de las películas de cualquier emulsionante puro. Por otra parte, la similitud entre las curvas σ versus concentración de BSA -- tanto para películas de

proteína pura (Figura 7.12, apartado 7.2), como para las películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.27) -- proporciona una evidencia adicional para relacionar los valores de la tensión superficial con la presencia de proteína sobre la interfase (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979).

La dependencia con la concentración de BSA del módulo dilatacional superficial refuerza la hipótesis de que a concentraciones de BSA próximas a las de saturación de la monocapa -- es decir, para concentraciones de entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-3}$ %, en peso -- existen películas mixtas de BSA-monoestearina sobre la interfase. En efecto, a concentraciones de BSA, en las películas mixtas, próximas a $1 \cdot 10^{-2}$ %, el módulo dilatacional superficial se incrementa significativamente y a continuación alcanza un valor constante, a mayores concentraciones de proteína en el seno de la fase (Figura 7.27). El máximo valor de E para la película mixta (Figura 7.27) es mayor que los de las películas puras de monoestearina (Figura 7.8) o de BSA (Figura 7.17). Por lo tanto, se puede concluir que la existencia de los complejos BSA-monoestearina sobre la interfase tienen un efecto sinergista positivo sobre las propiedades dilatacionales superficiales, especialmente sobre el módulo dilatacional superficial y su componente elástica. Se puede observar, finalmente, que la tangente del ángulo de pérdida es prácticamente cero y no depende de la concentración de BSA (Figura 7.27).

7.3.1.3. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa.

Las propiedades dinámicas superficiales en función del tiempo (tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales), de películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa, se muestran en las figuras 7.28 y 7.29. Estos resultados son esencialmente similares a los de las películas mixtas de ambos emulsionantes sobre agua (Figura 7.23) o disoluciones

acuosa de etanol (Figuras 7.24 y 7.25), analizados previamente desde los puntos de vista cinético y reológico.

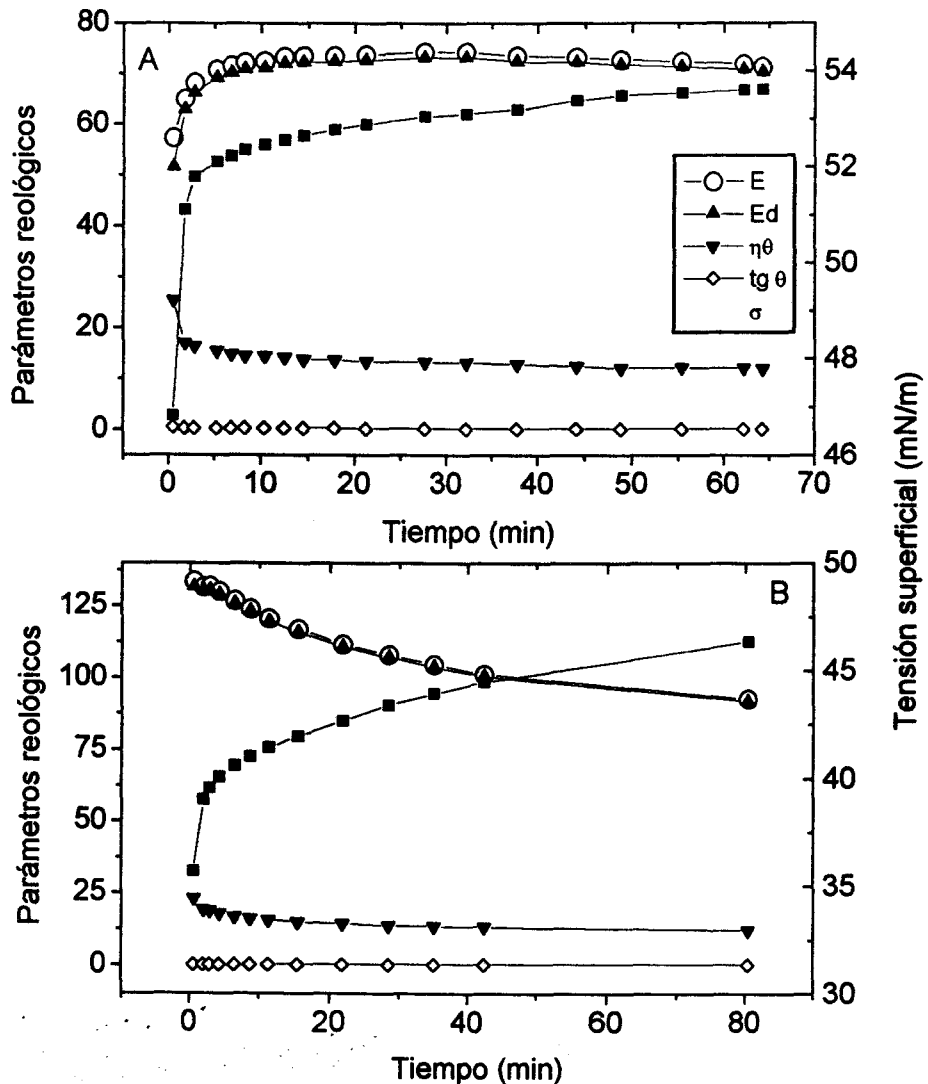


Figura 7.28. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina sobre una película de BSA (0,1%, en peso) adsorbida sobre una disolución acuosa de sacarosa 0,25 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Densidad superficial de monoestearina (moléculas. nm^{-2}): (A) 1,64, (B) 3,29. Temperatura: 20 °C.

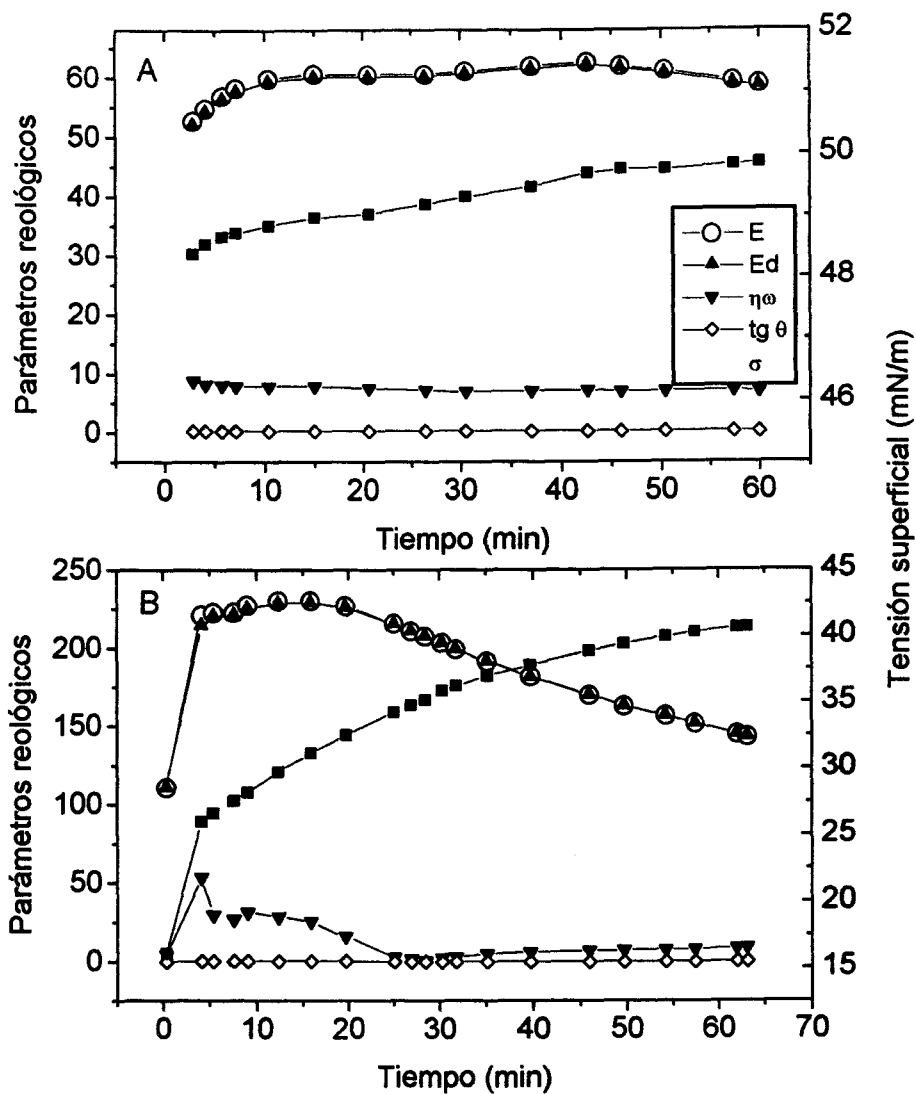


Figura 7.29. Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_d \cdot \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina sobre una película de BSA (0,1%, en peso) adsorbida sobre una disolución acuosa de sacarosa 1 M, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Densidad superficial de monoestearina ($\text{moléculas} \cdot \text{nm}^{-2}$): (A) 1,64, (B) 3,29. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se puede observar (Figuras 7.28 y 7.29) que la tensión superficial se incrementa y que el módulo dilatacional superficial decrece con el tiempo, una vez

evaporado el disolvente de esparcimiento del lípido. Los procesos de relajación asociados al módulo dilatacional superficial son más significativos a las mayores cantidades de monoestearina esparcida sobre la interfase. El valor del módulo dilatacional superficial es muy similar al de su componente elástica, y es dependiente de la frecuencia (datos no mostrados). Estos resultados son característicos de una película viscoelástica, con una contribución predominante de carácter elástico.

La figura 7.30 resume el efecto de la concentración de sacarosa sobre las propiedades superficiales dinámicas, a los 30 y 60 minutos tras el esparcimiento de la monoestearina sobre una película previamente adsorbida de BSA. Se observa que la tensión superficial decrece y que el módulo dilatacional superficial se incrementa con la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase y con la concentración de sacarosa en el seno de la fase. Sin embargo, la tangente del ángulo de pérdida no es muy dependiente de la cantidad de monoestearina esparcida sobre la interfase, ni de la concentración de sacarosa en el seno de la fase. Por lo tanto, la adición de monoestearina sobre una película adsorbida de BSA desde disoluciones acuosas de sacarosa incrementa el valor del módulo dilatacional superficial (Figura 7.30), pero en una mayor extensión que sobre disoluciones acuosas de etanol (Figura 7.26).

Puesto que la estructura de la monocapa de monoestearina sobre una disolución acuosa de sacarosa es diferente, y más expandida (Rodríguez Patino et al, 1993), que sobre una disolución acuosa de etanol (Rodríguez Patino et al, 1992), se podría asociar a este fenómeno las diferencias observadas en el módulo dilatacional superficial (Figuras 7.26 y 7.30). Es decir, si la sacarosa potencia la existencia de la proteína sobre la interfase y una estructura líquido-expandida para la monocapa de monoestearina, la formación de los complejos BSA-monoestearina se favorecerían en presencia de la sacarosa. Este fenómeno podría compensar el efecto de la reducción de las interacciones proteína-proteína en la interfase sobre la

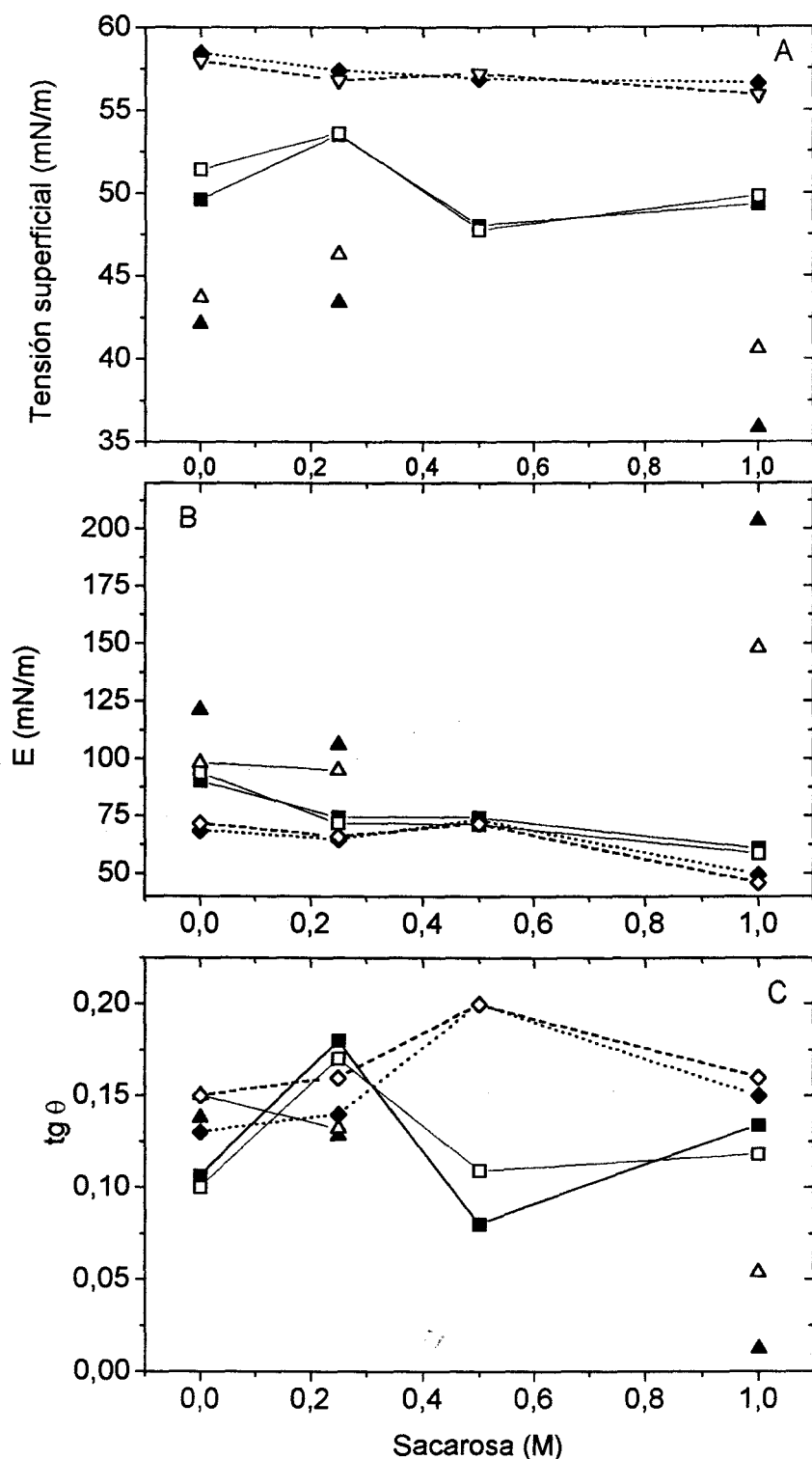


Figura 7.30. Variación con la concentración de sacarosa (M) en el seno de la fase acuosa de la tensión superficial (A), del módulo dilatacional superficial (B) y de la tangente del ángulo de pérdida (C), de monoestearina esparcida sobre una película de BSA adsorbida sobre la interfase aire-medio acuoso.

| TIEMPO DE ADSORCIÓN TRAS ESPARCIMIENTO (min) | DENSIDAD SUPERFICIAL DE MONOESTEARINA (moléculas.nm ⁻²) | | BSA (0'1% EN PESO) |
|--|---|------|--------------------|
| | 1'64 | 3'29 | |
| 30 | ■ | ▲ | ◆ |
| 60 | □ | △ | ◇ |

tensión superficial y sobre el módulo dilatacional superficial. Por otra parte, si la superficie de la fracción hidrofóbica de la proteína es su principal zona de enlace con el lípido, la porción hidrofóbica del etanol es capaz de ocupar la zona hidrofóbica de la proteína y la cabeza polar hidrofílica del etanol conferir solubilidad en agua del complejo resultante, lo que estaría de acuerdo con el menor valor del módulo dilatacional superficial en presencia de etanol en la subfase, especialmente a los mayores tiempos (Figuras 7.26 y 7.30). Por lo tanto, se puede pensar que los solutos en la subfase pueden interferir las interacciones lípido-proteína, y además competir con el lípido por las zonas de enlace con la proteína (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1995).

7.3.1.4. Películas mixtas BSA-monoestearina sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1 M y sacarosa 0'5 M

El efecto de la adición de la mezcla etanol 1M y sacarosa 0'5 M sobre las propiedades superficiales dinámicas transitorias, de películas mixtas de BSA-monoestearina, se muestra en la figura 7.31. Como ocurría con etanol 1M (Figura 7.25) y sacarosa 0'5 M (datos no mostrados), el esparcimiento de monoestearina sobre una película adsorbida de BSA causa una caída rápida seguida de un posterior incremento del valor de la tensión superficial. Sin embargo, el módulo dilatacional superficial muestra una dependencia más compleja con el tiempo. El valor de E presenta un máximo a un tiempo algo inferior al necesario para que se evapore el disolvente de esparcimiento y a partir de aquí disminuye, cuando aumenta el tiempo. Por lo tanto, los mismos razonamientos utilizados previamente se aplicarían al estudio de las películas mixtas BSA-monoestearina sobre una disolución acuosa de etanol y de sacarosa.

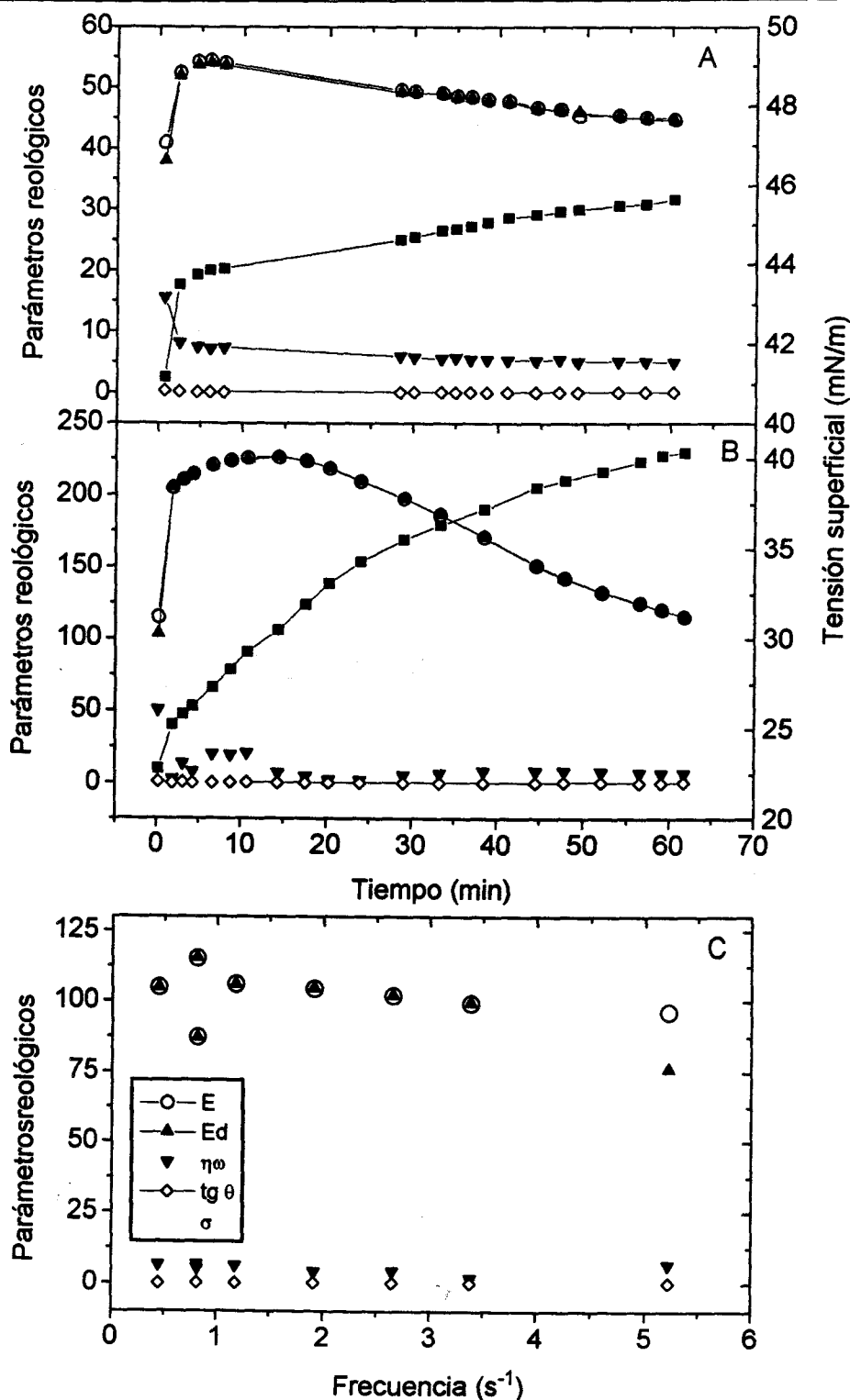


Figura 7.31. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E, mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed, mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta\omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monoestearina (1,64 moléculas.nm⁻²) sobre una película adsorbida de BSA (0,1% en peso) sobre la interfase entre el aire y una disolución acuosa de una mezcla de etanol 1M y de sacarosa 0,5 M, a una frecuencia angular de 0,81 s⁻¹. (C) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Densidad superficial de monoestearina (moléculas.nm⁻²): (A) 1,64; (B) y (C) 3,29. Temperatura: 20 °C.

Por otra parte, como con las películas de monoestearina pura (Figuras 7.6 y 7.7, apartado 7.1) y de BSA pura (Figura 7.22, apartado 7.2) sobre disoluciones acuosas de etanol 1M, de sacarosa 0'5 M y sobre la mezcla de ambos componentes en el medio acuoso, las películas mixtas BSA-monoestearina presentan un comportamiento reológico superficial de carácter eminentemente elástico (Figura 7.31). Se puede comprobar que el valor de módulo dilatacional superficial es similar al de su componente elástica (Figuras 7.31A y 7.31B), y que los parámetros reológicos son prácticamente independientes de la frecuencia (Figura 7.31C), a las mayores valores de la variable. La existencia de ambos solutos en disolución tienen un efecto sinergista positivo sobre el módulo dilatacional superficial. El valor de este parámetro para disoluciones acuosas de etanol 1M (Figura 7.25) o de sacarosa 0'5 M (Figura 7.30) es menor que el observado para la misma película mixta sobre la mezcla de ambos solutos en la subfase (Figura 7.31). Sin embargo, el valor de las propiedades reológicas superficiales de las películas mixtas BSA-monoestearina son prácticamente debidas a la presencia de monoestearina en la interfase. Se puede comprobar que el valor del módulo dilatacional superficial es menor pero muy próximo al de una película de monoestearina pura sobre la misma subfase.

7.3.2. Características reológicas de películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-medio acuoso.

7.3.2.1. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-agua.

Propiedades dinámicas transitorias de la película.

La tensión superficial y las propiedades superficiales dilatacionales -- tales como el módulo dilatacional superficial, sus componentes elástica y viscosa y la tangente del ángulo de pérdida -- tras el esparcimiento de monooleína sobre una

película previamente adsorbida de BSA sobre agua, se muestra en la figura 7.32. Se puede observar que el esparcimiento de la monooleína causa un instantáneo descenso del valor de la tensión superficial seguido de un rápido aumento del mismo con el tiempo. Tras este período inicial, que puede durar entre 5 y 15 minutos que, como se ha citado previamente, es el tiempo requerido para que se evapore el disolvente de esparcimiento del lípido, el valor de σ aumenta con el tiempo hasta que se alcanza un valor constante en estado estacionario.

Sin embargo, la variación de E con el tiempo presenta un valor mínimo alrededor de los 15 minutos, tras el esparcimiento de la monooleína, y a continuación aumenta tendiendo a un valor constante en estado estacionario. La velocidad de aumento de las propiedades dinámicas superficiales, σ y E , depende de la cantidad de monooleína esparcida sobre la interfase, especialmente en lo referente al módulo dilatacional superficial. Se puede observar que la tensión superficial adquiere un valor estacionario en unos 60 minutos; sin embargo, se requiere un tiempo más prolongado para que el módulo dilatacional superficial alcance un valor constante, especialmente a las mayores cantidades de monooleína esparcida sobre la interfase.

Se debe destacar que la dependencia con el tiempo de σ y de E no son esencialmente similares, especialmente durante la primera etapa, relacionada con el período de evaporación del disolvente de esparcimiento. Es decir, el valor de E describe un mínimo y posteriormente aumenta hasta que se alcanza un valor máximo en estado estacionario, mientras que el valor de σ se incrementa continuamente hasta que se alcanza un valor máximo en estado estacionario. La dependencia con el tiempo de las propiedades dinámicas superficiales son esencialmente similares a las analizadas previamente con relación a las películas mixtas BSA-monoestearina (apartado 7.3.1.2).

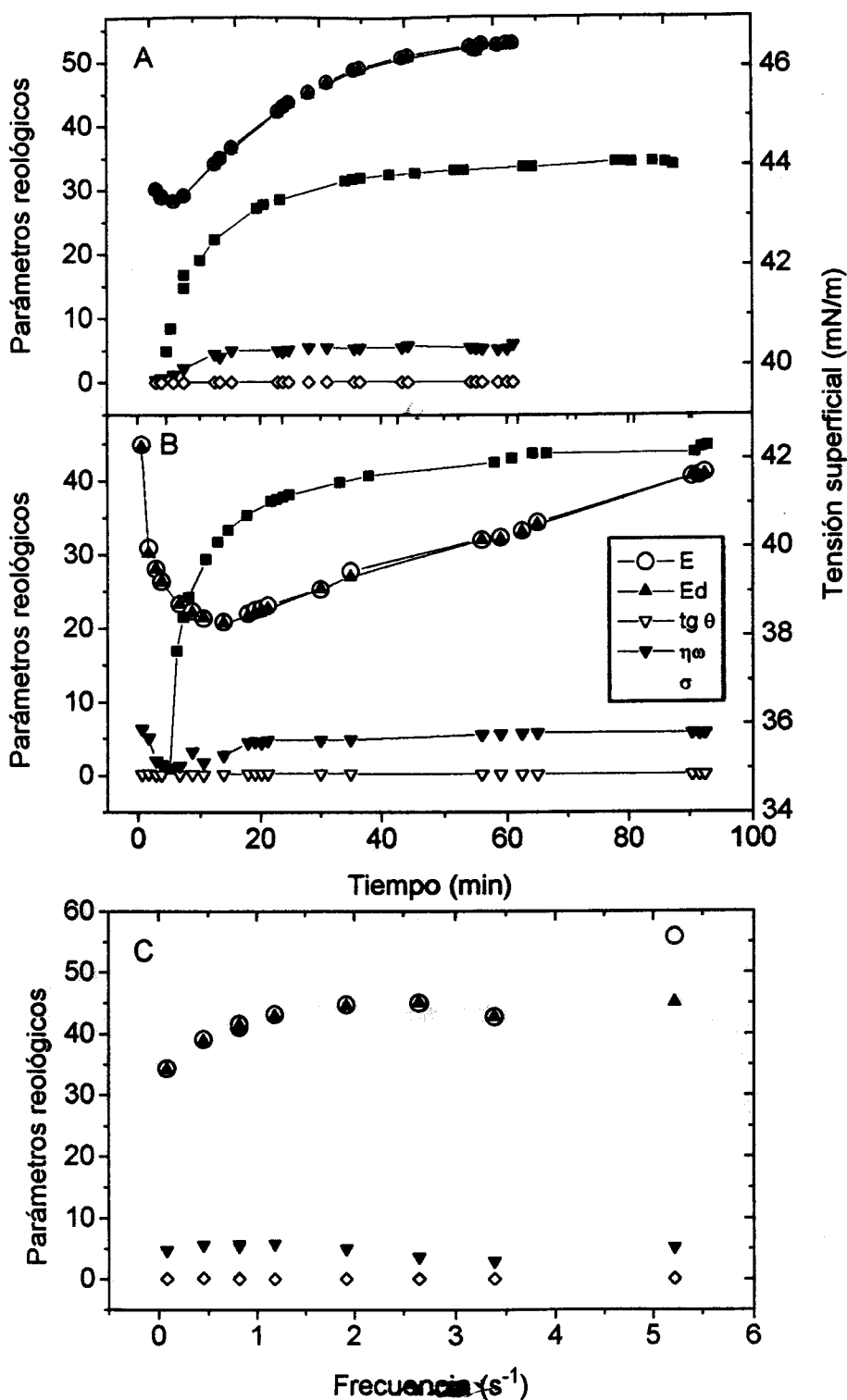


Figura 7.32. (A) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\tan \theta$) tras el esparcimiento de monooleína ($1,21 \text{ moléculas} \cdot \text{nm}^{-2}$) sobre una película adsorbida de BSA (0,1% en peso) sobre la interfase aire-agua, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (B) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Densidad superficial de monooleína ($\text{moléculas} \cdot \text{nm}^{-2}$): (A) y (C) 1,21; (B) 2,42. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los resultados obtenidos (Figura 7.32) sugieren que la BSA y la monooleína compiten por la interfase. Como se se ha comentado en apartados anteriores, existe una extensa bibliografía sobre las interacciones lípido-proteína (Bos et al, 1996), que establece que la capacidad de formación de una película mixta y su estructura dependen de las interacciones lípido-proteína sobre la interfase (Sovilj et al, 1993), así como de los cambios conformacionales en las moléculas de proteína causados por la formación de estos complejos (Wüstneck et al, 1988). Pero estas interacciones deber ser diferentes para las moléculas de monoestearina y de monooleína, y también dependen de la cantidad de monooleína esparcida sobre la interfase (Figura 7.32). Estos dos fenómenos deben estar relacionados con las diferentes estructuras de las películas de monoestearina (Rodríguez Patino et al, 1992) y de monooleína (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993) sobre la interfase aire-agua, en función de la densidad superficial del lípido. Las diferencias observadas en función de la cantidad de monooleína esparcida sobre la interfase puede asociarse, pues, con la saturación de la interfase por la monooleína.

A la menor concentración de monooleína sobre la interfase (Figura 7.32A) la película del lípido puro tiene una estructura líquido-expandida (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993) y la interfase no está saturada por el lípido (Rodríguez Patino y Martín, 1994). Ambos fenómenos favorecen la existencia de interacciones BSA-monooleína sobre la interfase y, como consecuencia, la velocidad de alcanzar el estado estacionario en los valores de las propiedades dinámicas superficiales se incrementa.

Sin embargo, a la mayor concentración de monooleína sobre la interfase (Figura 7.32B) la película mantiene su estructura líquido-expandida, pero la interfase se encuentra saturada por el lípido (Rodríguez Patino y Martín, 1994). Por lo tanto, en estas condiciones experimentales la monooleína está presente como una monocapa colapsada formando lentes de moléculas de lípido sobre la interfase. Estas lentes de monooleína se deberían romper para que las moléculas

individuales del lípido interaccionen con la proteína, lo que estaría de acuerdo con la menor velocidad de incremento de E (Figura 7.32B), en estas condiciones experimentales.

Características reológicas superficiales

Desde un punto de vista reológico se puede observar (Figura 7.32) que los valores del módulo dilatacional superficial son similares a los de su componente elástica. El valor de la viscosidad dilatacional superficial es bajo y el de la tangente del ángulo de pérdida es prácticamente cero. Los valores de los parámetros reológicos son dependientes de la frecuencia de la oscilación, a las menores frecuencias, y tienden a valores constantes, a las más altas frecuencias. Estos datos sugieren que las películas mixtas BSA-monooleína presentan un comportamiento viscoelástico, que podría estar relacionado con el parcial desplazamiento de la BSA y/o con la reordenación de la estructura de la película mixta BSA-monooleína, como consecuencia de las interacciones entre ambos emulsionantes en la escala de tiempo de las frecuencias estudiadas. Otros fenómenos de relajación posibles -- tales como la pérdida molecular de monooleína desde la interfase por colapso y/o disolución en el seno de la fase acuosa -- tienen lugar a mayores tiempos que los típicos del ciclo de dilatación-compresión en las experiencias dilatacionales (Fuente y Rodríguez Patino, 1994).

Efecto de la concentración de monooleína.

La dependencia de la concentración de monooleína sobre el módulo dilatacional superficial debe ser destacada, debido a su importancia práctica. Se observa que este parámetro reológico decrece cuando la concentración de monooleína esparcida sobre la interfase se incrementa (Figuras 7.32A y 7.32B).

Estos resultados son diferentes de los analizados previamente con relación a las películas mixtas BSA-monoestearina (apartado 7.3.1). Estas diferencias se pueden asociar también con las diferentes estructuras de estos lípidos y, como consecuencia, con la estructura de la fase colapsada, una vez que la interfase está saturada por el lípido. En efecto, la existencia de lentes de monooleína sobre la interfase, a densidades superficiales del lípido por encima de la de saturación de la interfase, podría reducir las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína, lo cual estaría de acuerdo con la disminución del valor del módulo dilatacional superficial a la más alta concentración de lípido sobre la interfase (Figura 7.32B).

Como se recuerda, unas diferencias similares fueron observadas con películas de monoestearina y de monooleína puras sobre la interfase aire-agua (apartados 7.1.1 y 7.1.2). Una reducción en las interacciones entre las moléculas de monooleína -- como se deduce a partir de las estructuras de la película sobre la interfase (Rodríguez Patino y Ruíz, 1993), y de la fase colapsada (Rodríguez Patino y Martín, 1994) -- podría ser la causa de reducción del valor del módulo dilatacional superficial a la mayor concentración de monooleína. Por el contrario, las películas de monoestearina poseen una estructura líquido-condensada en el equilibrio (Rodríguez Patino y Ruíz, 1994) y la monocapa colapsa formando cristales de lípido sobre la interfase. La existencia de ambos fenómenos podrían incrementar las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína, lo que estaría de acuerdo con los mayores valores del módulo dilatacional superficial y con el incremento de los mismos con la densidad superficial del lípido, tanto en el caso de las películas de monoestearina pura (Figura 7.3), como de las películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.23), en comparación con lo observado con las películas de monooleína (Figura 7.5) o las de sus mezclas con BSA (Figura 7.32).

7.3.2.2. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol.

Propiedades dinámicas transitorias de la película.

El efecto de la presencia de etanol en la subfase sobre las propiedades dinámicas transitorias se muestra en la figura 7.33, en función de la concentración de etanol. Como sobre agua (Figura 7.32), tras el esparcimiento de la monooleína sobre una película de BSA absorbida sobre disoluciones acuosas de etanol, los valores de la tensión superficial se incrementan con el tiempo hasta que se alcanza un valor constante. La velocidad de incremento de σ es mayor sobre disoluciones acuosas de etanol (Figura 7.33) que sobre agua (Figura 7.32). Sin embargo, el valor del módulo dilatacional superficial decrece con el tiempo, pasa por un valor mínimo a los 10-30 minutos y posteriormente se incrementa con el tiempo, hasta que se alcanza un valor constante.

Se pueden sugerir diferentes hipótesis para explicar estos resultados: (i) la posibilidad de readsorción de las moléculas de BSA o fragmentos de las mismas, tras un inicial desplazamiento por el lípido, (ii) la formación de complejos lípido-proteína sobre la interfase, y/o (iii) la existencia de fenómenos de relajación asociados con la pérdida de moléculas desde la monocapa. El cumplimiento de las hipótesis (i) y (ii) podría ser más factible en el caso de películas mixtas lípido-proteína sobre disoluciones acuosas de etanol que sobre la interfase aire-agua, debido a la capacidad del etanol de romper la estructura de la proteína y favorecer aquellas con una mayor área superficial (Tanford, 1962; Pohl, 1968). Además, la existencia de complejos BSA-monooleína estaría de acuerdo con el observado efecto sinergista positivo sobre el módulo dilatacional superficial (Figura 7.33). Se puede apreciar que los valores de E son mayores en el caso de las películas mixtas BSA-monooleína (Figura 7.33), que con las películas de cualquiera de los dos

emulsionantes puros, sean estos BSA (Figura 7.16) o monooleína (Figura 7.6). Desde otro punto de vista, la existencia de inestabilidad en la monocapa de monooleína por desorción y/o colapso, en presencia de etanol en el seno de la fase acuosa, es un fenómeno bien estudiado en la bibliografía (Fuente y Rodríguez Patino, 1994). En efecto, a partir de experiencias de relajación se ha observado que la pérdida molecular de monooleína desde la monocapa puede ser instantánea a concentraciones de etanol 5 M.

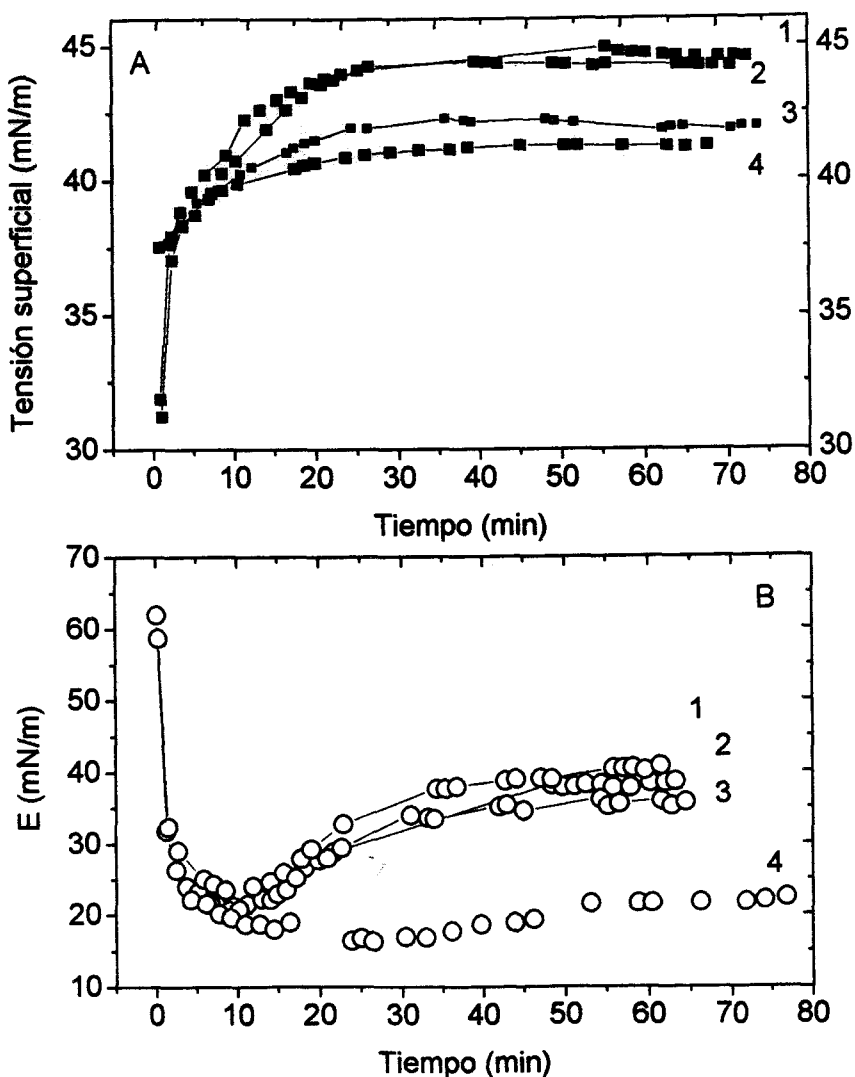


Figura 7.33. Dependencia con el tiempo de la (A) tensión superficial (σ , mN/m) y (B) del módulo dilatacional superficial (E , mN/m) para películas de monooleína esparcidas sobre una película de BSA (0,1% en peso) adsorbida sobre disoluciones acuosas de etanol: (1) 0'1 M; (2) 0'5 M; (3) 1 M; (4) 2 M. Frecuencia angular: $0'81 \text{ s}^{-1}$. $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Características reológicas superficiales

Como sobre agua, las características reológicas de las películas mixtas BSA-monooleína sobre disoluciones acuosas de etanol son de carácter prácticamente elástico. Se ha observado (datos no mostrados) que los valores de E son muy similares a los de E_d . Los valores de la viscosidad superficial dilatacional son bajos y se incrementan con el tiempo, cuando previsiblemente están presentes los complejos BSA-monooleína sobre la interfase. Sin embargo, la tangente del ángulo de pérdida es cero. La dependencia con la frecuencia de la oscilación del módulo dilatacional superficial (datos no mostrados) es típica de un comportamiento viscoelástico de la película, independientemente de la concentración de etanol en el seno de la fase acuosa.

Efecto de la concentración de etanol.

El efecto de la concentración de etanol en el seno de la fase acuosa sobre los valores de la tensión superficial, del módulo dilatacional superficial y de la tangente del ángulo de pérdida de películas mixtas BSA-monooleína, a los 30 y 60 minutos tras el esparcimiento del lípido, se muestra en la figura 7.34. Se puede observar que los valores de σ y de E disminuyen cuando la concentración de etanol en la fase acuosa o de monooleína esparcida sobre la interfase se incrementa.

Un efecto similar de la concentración de etanol sobre los valores de σ y de E se observó para películas adsorbidas de BSA (Figura 7.16, Dussaud et al 1994a y b) sobre la interfase aire-agua y en el caso de la viscosidad de cizalla de películas de proteína sobre la interfase aceite-agua (Dickinson y Woskett, 1988). La explicación de los fenómenos observados pueden estar relacionados con diferentes causas.

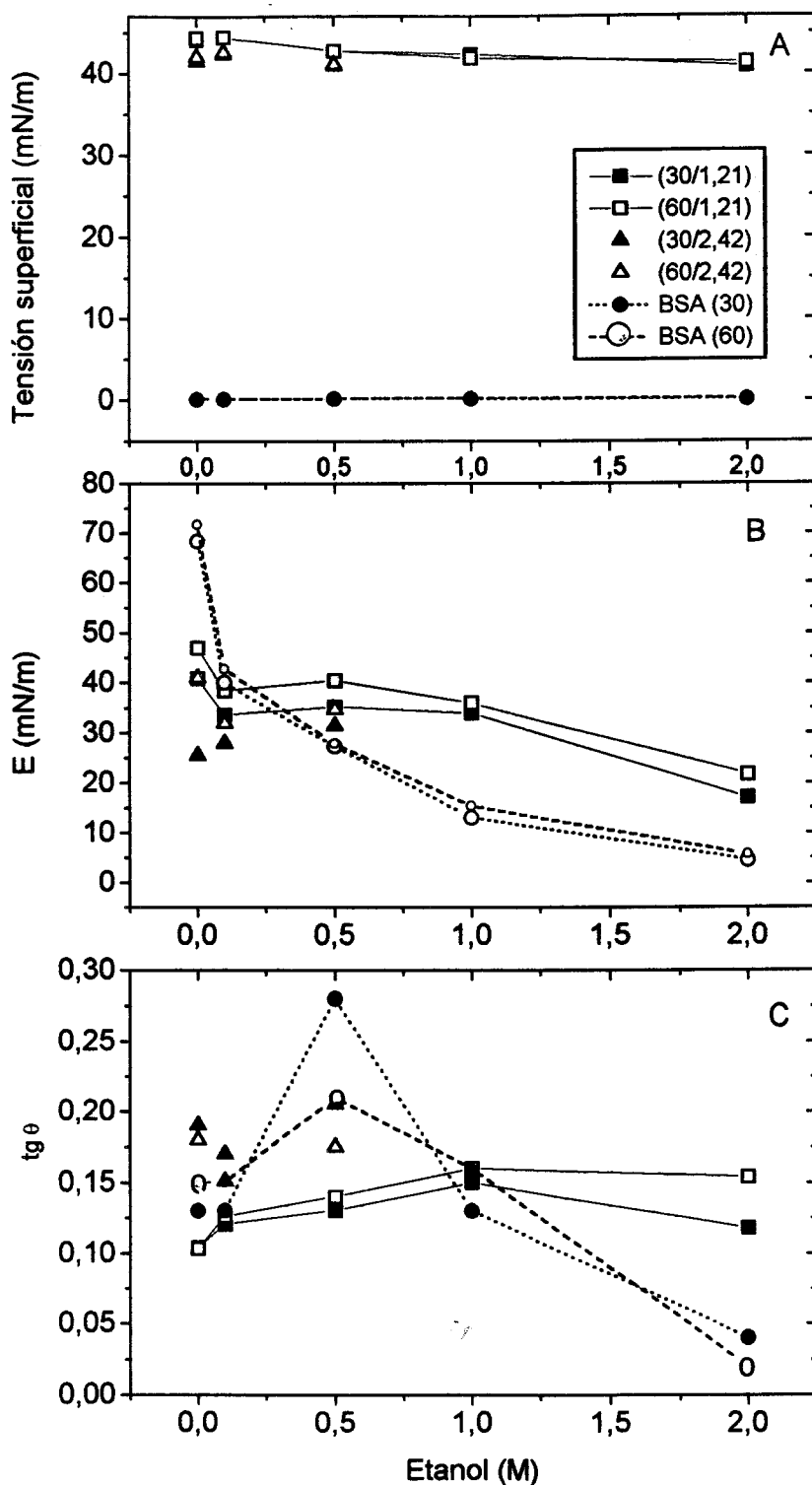


Figura 7.34. Variación con la concentración de etanol (M) en el seno de la fase acuosa, de la tensión superficial (A), del módulo dilatacional superficial (B) y de la tangente del ángulo de pérdida (C), de monooleína esparcida sobre una película de BSA adsorbida sobre la interfase aire-medio acuoso. Densidad superficial de monooleína (moléculas.nm⁻²): (■, □) 1'21; (▲, △) 2'42. (●, ○) Película de BSA pura (0,1% peso). Tiempo de adsorción tras el esparcimiento (min): 30 (símbolos oscuros), 60 (símbolos claros).

Primero, la adsorción competitiva de etanol, BSA y monooleína sobre la interfase podría perturbar las interacciones proteína-proteína, lo que podría hacer reducir los valores de las propiedades reológicas superficiales de las películas mixtas. Por lo tanto, la existencia de una adsorción competitiva de etanol, BSA y monooleína sobre la interfase estaría de acuerdo con la dependencia de E con la concentración de etanol (Figura 7.34B). La reducción de la velocidad de formación de una película de proteína o de una película mixta lípido-proteína es un fenómeno estudiado en la bibliografía (Dussaud et al, 1994c, Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1995a y b).

Segundo, debido al efecto desnaturalizador del etanol (Tanford, 1962) los enlaces hidrofóbicos lípido-proteína podrían ser más débiles y la solubilidad y agregación de la proteína podrían decrecer (Aoki et al, 1981). Estos fenómenos también podrían producir una reducción de E, como se observa en la figura 7.34B. Tercero, el etanol podría causar una desestabilización de la película de monooleína asociada a la pérdida de moléculas desde la monocapa por desorción o colapso (Fuente y Rodríguez Patino, 1994). La disminución del valor de E de películas de monooleína pura esparcidas sobre disoluciones acuosas de etanol, se ha explicado previamente (apartado 7.1.3) como una consecuencia de este fenómeno.

El efecto de la concentración de monooleína en las películas mixtas BSA-monooleína (Figura 7.34) es diferente al observado con las películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.26). Se puede observar (Figura 7.34) que E decrece cuando la cantidad de monooleína esparcida sobre la interfase se incrementa. Una dependencia similar de E con la densidad superficial se observó previamente con las películas de monooleína pura (Figura 7.8) y con las películas mixtas BSA-monooleína sobre agua (Figura 7.32). Por lo tanto, los mismos razonamientos usados previamente se aplicarían aquí.

Desde otro punto de vista, la reducción del módulo dilatacional superficial, a los mayores contenidos de etanol en la subfase o de monooleína sobre la interfase (Figura 7.34), debe ser destacado debido a razones prácticas. Como se sabe, la reducción de las propiedades dilatacionales superficiales es perjudicial para la estabilidad de emulsiones y de espumas (Dickinson y Stainsby, 1987; MacRitchie, 1986; Djabbarah y Wasan, 1985). Por lo tanto, se ha de tener presente en el caso de formulaciones alimentarias que la adición de monooleína a disoluciones alcohólicas de proteínas reduce los valores de las propiedades reológicas superficiales, especialmente cuando la cantidad de lípido esparcido es superior a la concentración superficial crítica (ver apartado 7.1), un efecto opuesto al observado con la adición de monoestearina (apartado 7.3.1.2). Estos hechos deben ser tomados en consideración para la selección del lípido a añadir a una formulación alimentaria alcohólica, con el fin de conseguir una estabilidad óptima.

Finalmente, la tangente del ángulo de pérdida se incrementa con la concentración de etanol y con la densidad superficial de monooleína (Figura 7.34C). Esto puede significar que las películas mixtas BSA-monooleína poseen un comportamiento viscoelástico. Además, los mayores valores de la tangente del ángulo de pérdida a las mayores densidades superficiales de monooleína sugieren que las características viscoelásticas de la proteína presente en la película son predominantes cuando el lípido forma lentes de moléculas que no interaccionan sobre la interfase, una vez que se alcanza el colapso de la monocapa. Este fenómeno también es diferente al observado con las películas mixtas BSA-monoestearina (Figura 7.26).

Efecto de la relación BSA-monooleína

El efecto de la concentración de BSA sobre los valores de la tensión superficial, módulo dilatacional superficial y tangente del ángulo de pérdida, a una

concentración constante de monooleína esparcida sobre la interfase de $1,21 \text{ moléculas.nm}^{-2}$, se muestra en la figura 7.35. Se puede observar que el valor de σ se incrementa con la concentración de BSA en el seno de la fase, hasta que la concentración de proteína se aproxima a un valor crítico y a partir de aquí el valor de la tensión superficial se hace constante. Sin embargo, la dependencia de E con la concentración de BSA presenta un mínimo a concentraciones de proteína de entre $2 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-1}$ % en peso. Estos datos refuerzan la hipótesis de que a concentraciones de BSA superiores a las requeridas para la saturación de la monocapa (véase el apartado 6.2) pueden formarse sobre la interfase películas mixtas BSA-monooleína, pero predominan las propiedades superficiales de la proteína. Sin embargo, a menores concentraciones de BSA las características superficiales de la película son principalmente debidas a la presencia de la monooleína (véase apartado 7.1). Por lo tanto, se puede concluir que existe una relación BSA-monooleína (Figura 7.35) a la cual los complejos BSA-monooleína sobre la interfase tienen un efecto sinergista negativo sobre las propiedades reológicas superficiales.

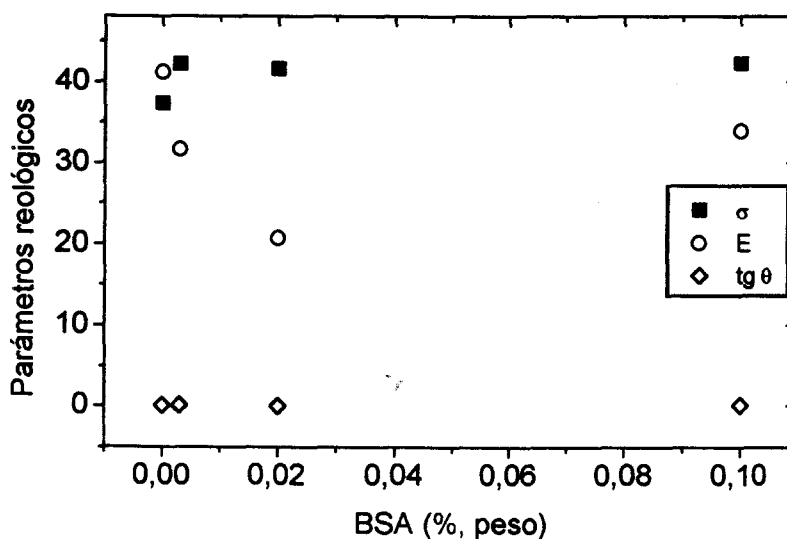


Figura 7.35. Variación con la concentración de BSA en el seno de la fase acuosa (% en peso) de la tensión superficial (σ), del módulo dilatacional superficial (E) y de la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monooleína ($1,21 \text{ moléculas.nm}^{-2}$) sobre una película de BSA adsorbida, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Tiempo transcurrido tras el esparcimiento de la monooleína: 30 minutos.

7.3.2.3. Películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa.

La tensión superficial y las propiedades dilatacionales superficiales de películas mixtas BSA-monooleína sobre la interfase aire-disoluciones acuosas de sacarosa, en función de la densidad superficial de monooleína y de la concentración de sacarosa en el seno de la fase, se muestra en las figuras 7.36 y 7.37.

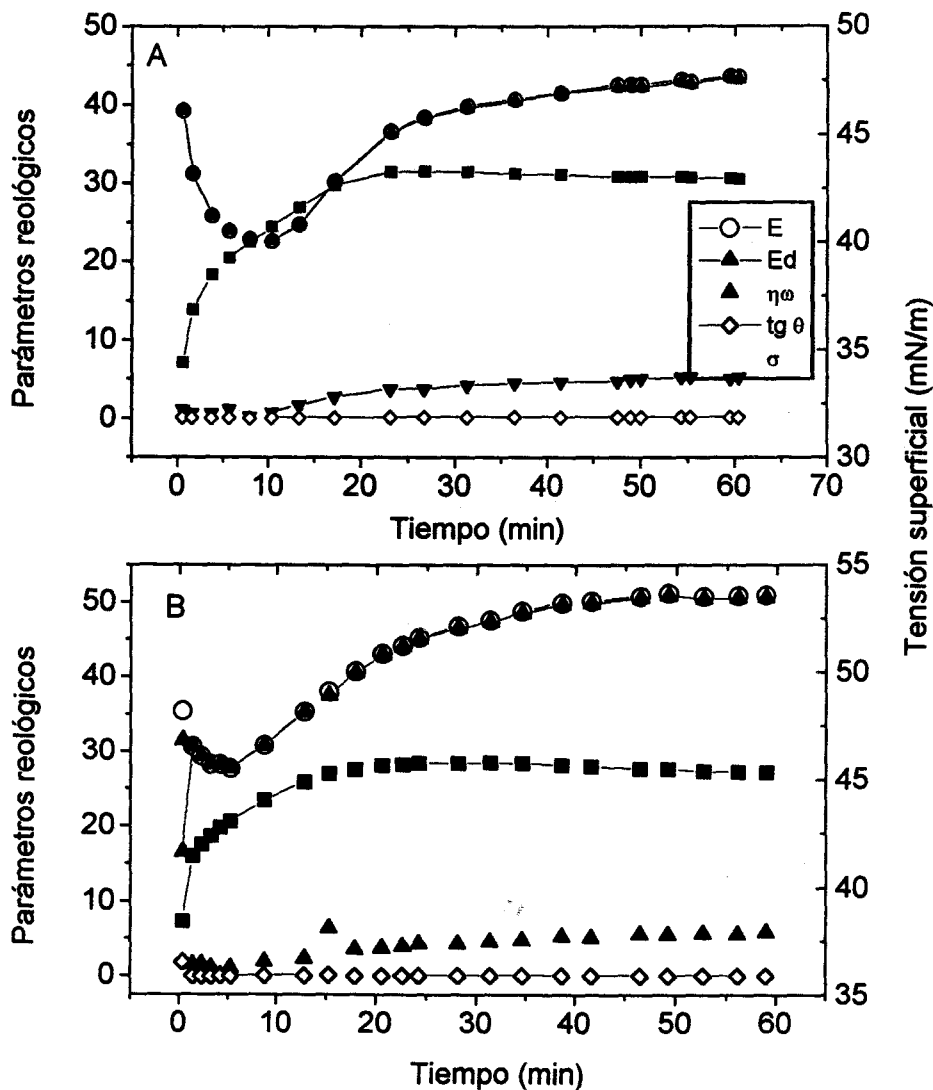


Figura 7.36. Dependencia con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), del módulo dilatacional superficial (E , mN/m), de la elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), de la viscosidad dilatacional superficial ($\eta\omega$, mN/m) y de la tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas de monooleína ($1.21 \text{ moléculas.nm}^{-2}$) esparcidas sobre una película de BSA adsorbida (0.1% en peso) sobre disoluciones acuosas de sacarosa. Frecuencia angular: 0.81 s^{-1} . $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Concentración de sacarosa (M): (A) 0.25 M; (B) 0.5 M.

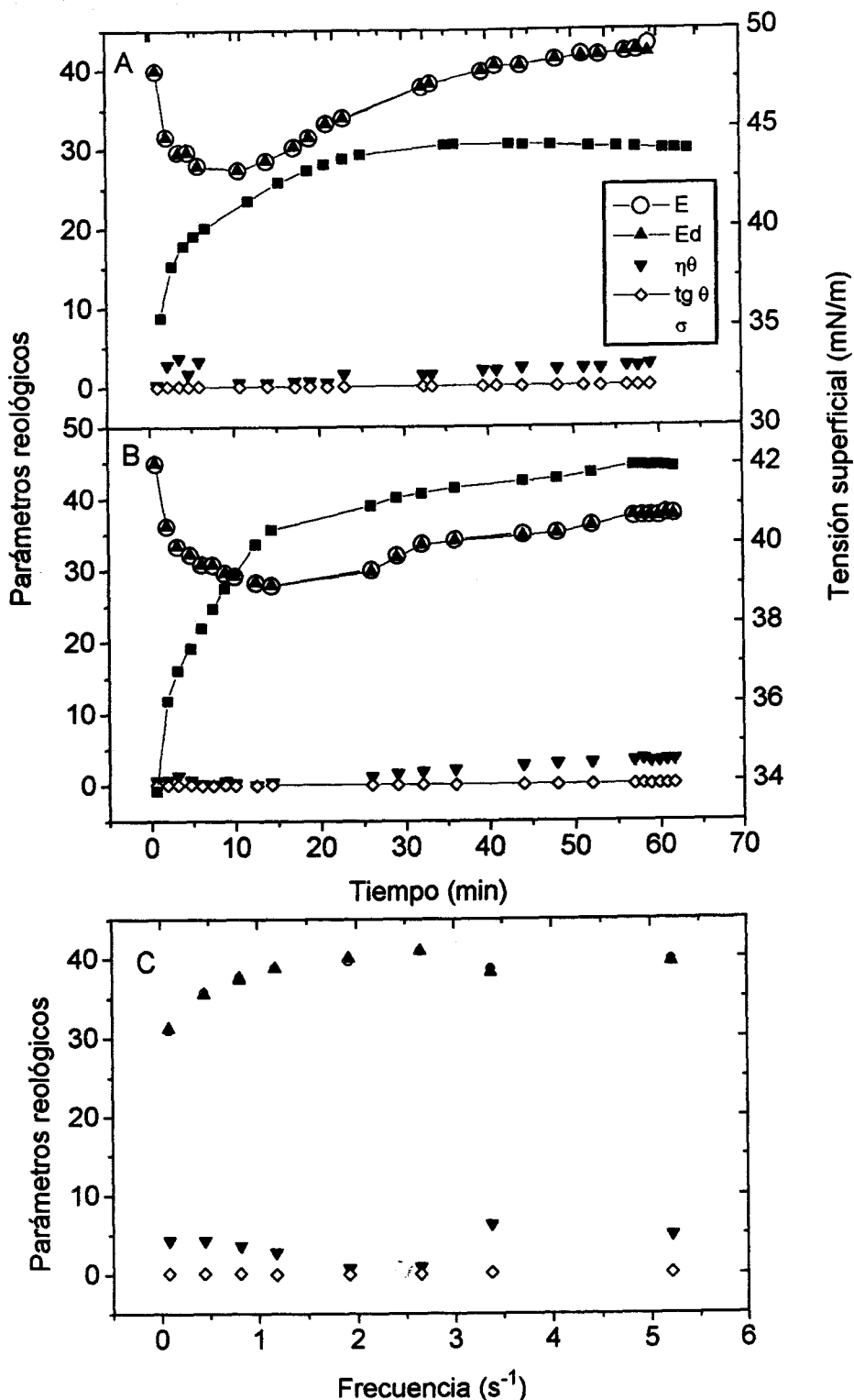


Figura 7.37. (A) y (B) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) tras el esparcimiento de monooleína sobre una película adsorbida de BSA (0,1%, en peso) sobre una disolución acuosa de sacarosa 0'5 M, a una frecuencia angular de 0,81 s⁻¹. (C) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. Densidad superficial de monooleína (moléculas.nm⁻²): (A) y (C) 1,21; (B) 2,42. Temperatura: 20 °C.

Se observa que, tras el esparcimiento de la monooleína sobre una película adsorbida de BSA sobre disoluciones acuosas de sacarosa, la tensión superficial se incrementa con el tiempo hasta que se alcanza un valor estacionario. La velocidad de aumento de la tensión superficial no depende de la concentración de sacarosa, pero decrece cuando la cantidad de monooleína esparcida sobre la interfase se incrementa. Sin embargo, el módulo dilatacional superficial decrece tras el esparcimiento de la monooleína, pasa por un valor mínimo y a partir de este se incrementa con el tiempo hasta alcanzar un valor constante en estado estacionario. La velocidad de aumento de E es menor cuando se incrementa la concentración de sacarosa en el seno de la fase acuosa o la densidad superficial de monooleína. La velocidad de aumento con el tiempo de los valores de σ y de E es superior sobre disoluciones acuosas de sacarosa (Figuras 7.36 y 7.37), que sobre agua (Figura) o disoluciones acuosas de etanol (Figura 7.33).

Desde un punto de vista reológico, los datos de las figuras 7.36 y 7.37 sugieren que las películas mixtas de BSA-monooleína, sobre la interfase aire-disoluciones acuosas de sacarosa, se comportan como viscoelásticas, con un carácter prácticamente elástico.

La figura 7.38 resume el efecto de la concentración de sacarosa sobre las propiedades dinámicas superficiales a los 30 y 60 minutos tras el esparcimiento de la monooleína sobre una película de BSA. Se observa que, a la menor concentración de monooleína, la tensión superficial se incrementa con la concentración de sacarosa hasta que se alcanza un valor constante. A las mayores densidades superficiales de monooleína el valor de σ no depende de la densidad superficial del lípido. El módulo dilatacional superficial se incrementa con la concentración de sacarosa, pasa por un máximo y a continuación decrece a las mayores concentraciones de sacarosa. El valor de E también decrece cuando se incrementa la densidad superficial de monooleína. La tangente del ángulo de pérdida es prácticamente independiente de la concentración de sacarosa, a las

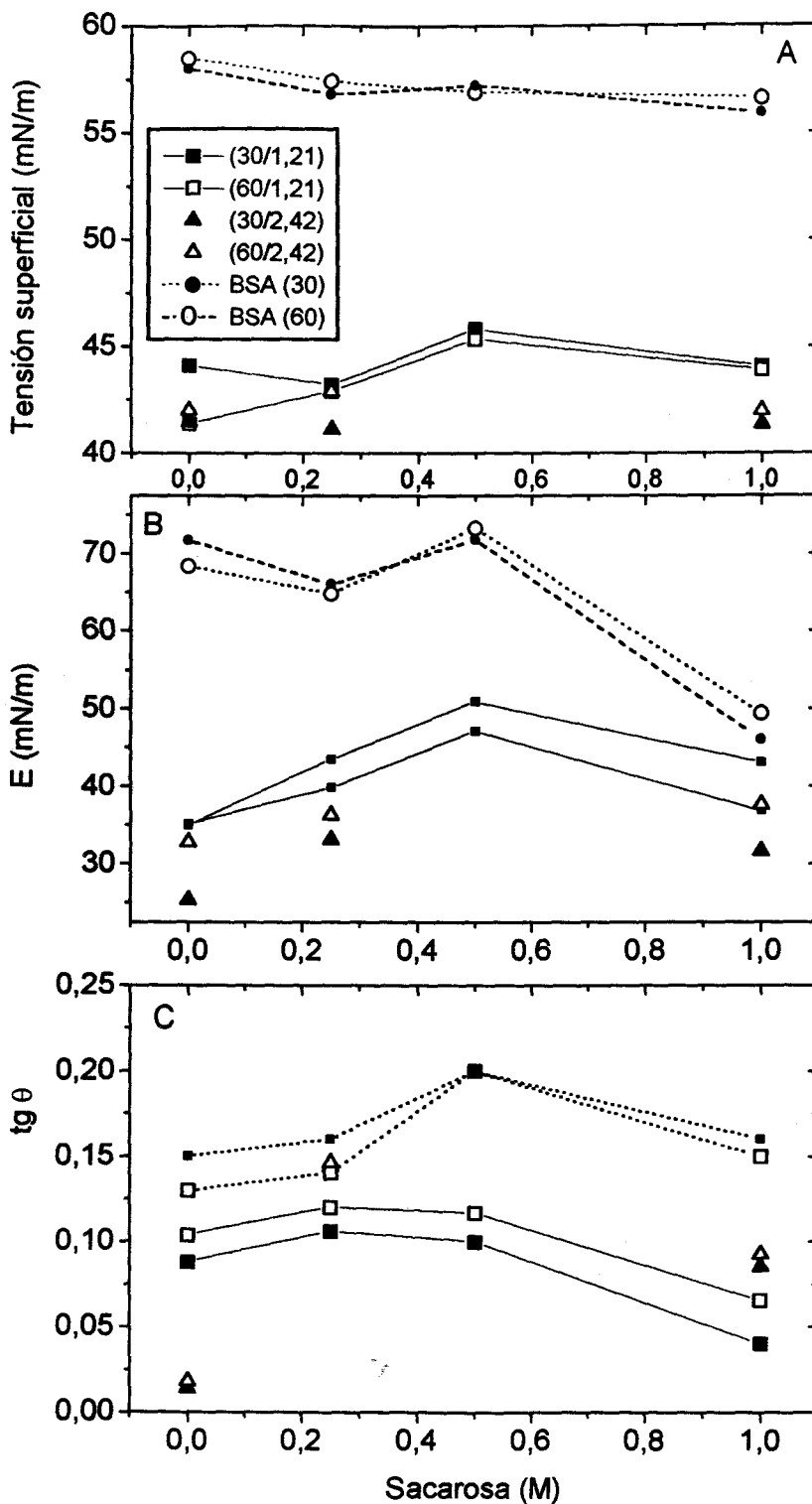


Figura 7.38. Variación con la concentración de sacarosa (M) en el seno de la fase acuosa, de la tensión superficial (A), del módulo dilatacional superficial (B) y de la tangente del ángulo de pérdida (C), de monooleína esparcida sobre una película de BSA adsorbida sobre la interfase aire-medio acuoso. Densidad superficial de monooleína (moléculas.nm⁻²): (■, □) 1'21; (▲, Δ) 2'42. (●, ○) Película de BSA pura (0,1% peso). Tiempo de adsorción tras el esparcimiento (min): 30 (símbolos oscuros), 60 (símbolos claros).

menores concentraciones de monoleína, pero se incrementa con la concentración de sacarosa a las más elevadas densidades superficiales del lípido.

7.3.3. Características reológicas de películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas sobre la interfase aire-medio acuoso.

Una vez analizadas las características reológicas de películas de lípidos insolubles (apartado 7.1), de proteínas (7.2) y de sus mezclas (apartados 7.3.1 y 7.3.2) sobre la interfase aire-medio acuoso, el objetivo del estudio realizado en este apartado se ha centrado en el análisis de las características reológicas de las películas formadas por la misma proteína (BSA), un lípido soluble en el medio acuoso (Tween 20) y de sus mezclas (BSA-Tween 20), sobre los mismos medios acuosos (agua y una disolución acuosa de etanol 1M o de sacarosa 0,5 M).

7.3.3.1. Propiedades dinámicas superficiales transitorias

Las propiedades dinámicas superficiales en función del tiempo -- tales como tensión superficial y propiedades dilatacionales superficiales -- de películas de BSA (0,1%, en peso) y de las películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, se muestran en las figuras 7.40 a 7.42, respectivamente, para una determinada relación lípido-proteína. Los datos obtenidos con diferentes relaciones BSA-Tween 20 son esencialmente similares (datos no mostrados). Se puede observar la típica dependencia con el tiempo de la tensión superficial para películas adsorbidas de BSA o de sus mezclas con Tween 20 (Figuras 7.40A, 7.41A y 7.42A). El valor de σ decrece y los valores de las propiedades dilatacionales superficiales -- especialmente del módulo dilatacional superficial y de su componente elástica -- se incrementan con el tiempo y tiende a un valor constante en estado estacionario. Sin embargo, la velocidad de

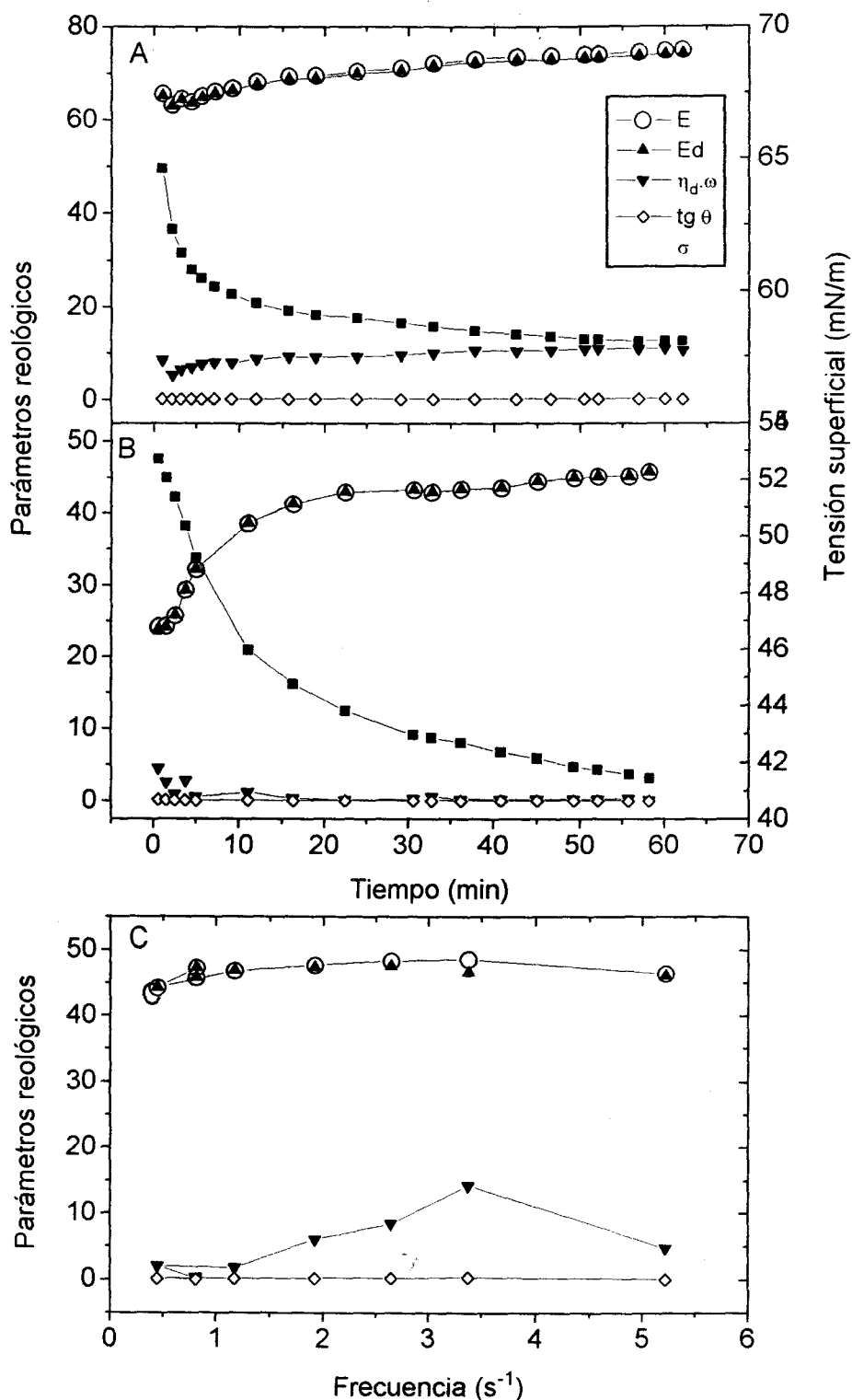


Figura 7.40. (A) y (B) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{d,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas de emulsionantes adsorbidas sobre agua, una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (C) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. (A) BSA 0.1% en peso, (B) y (C) disolución de BSA 0.1% en peso y Tween 20 a $20 \mu\text{M}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

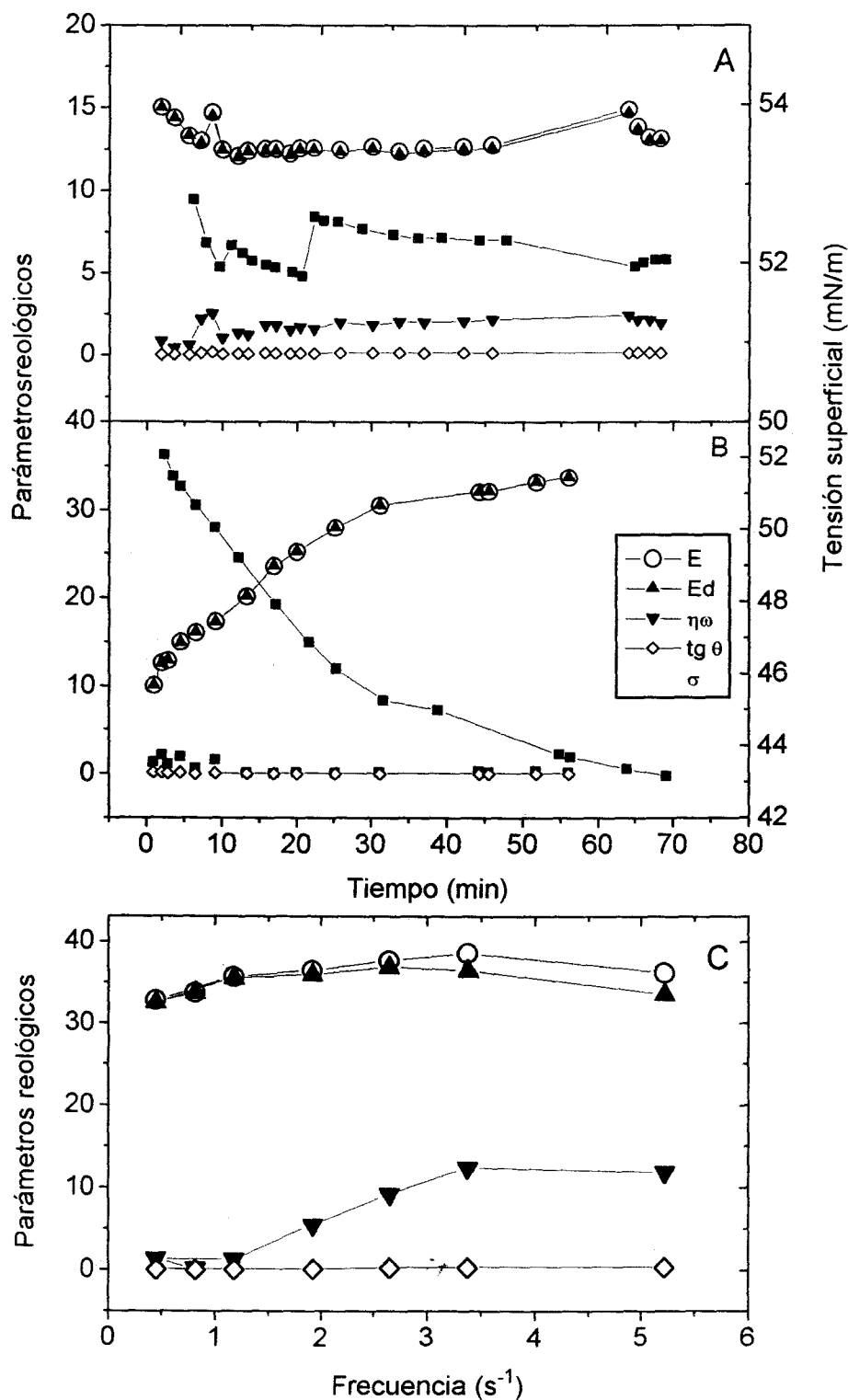


Figura 7.41. (A) y (B) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (Ed , mN/m), viscosidad dilatacional superficial (η_{ω} , mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($tg \theta$) para películas de emulsionantes adsorbidas sobre disolución acuosa de etanol 1 M, una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. (C) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. (A) BSA 0.1% en peso, (B) y (C) disolución de BSA 0.1% en peso y Tween 20 a $7.5 \mu\text{M}$. Temperatura: $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

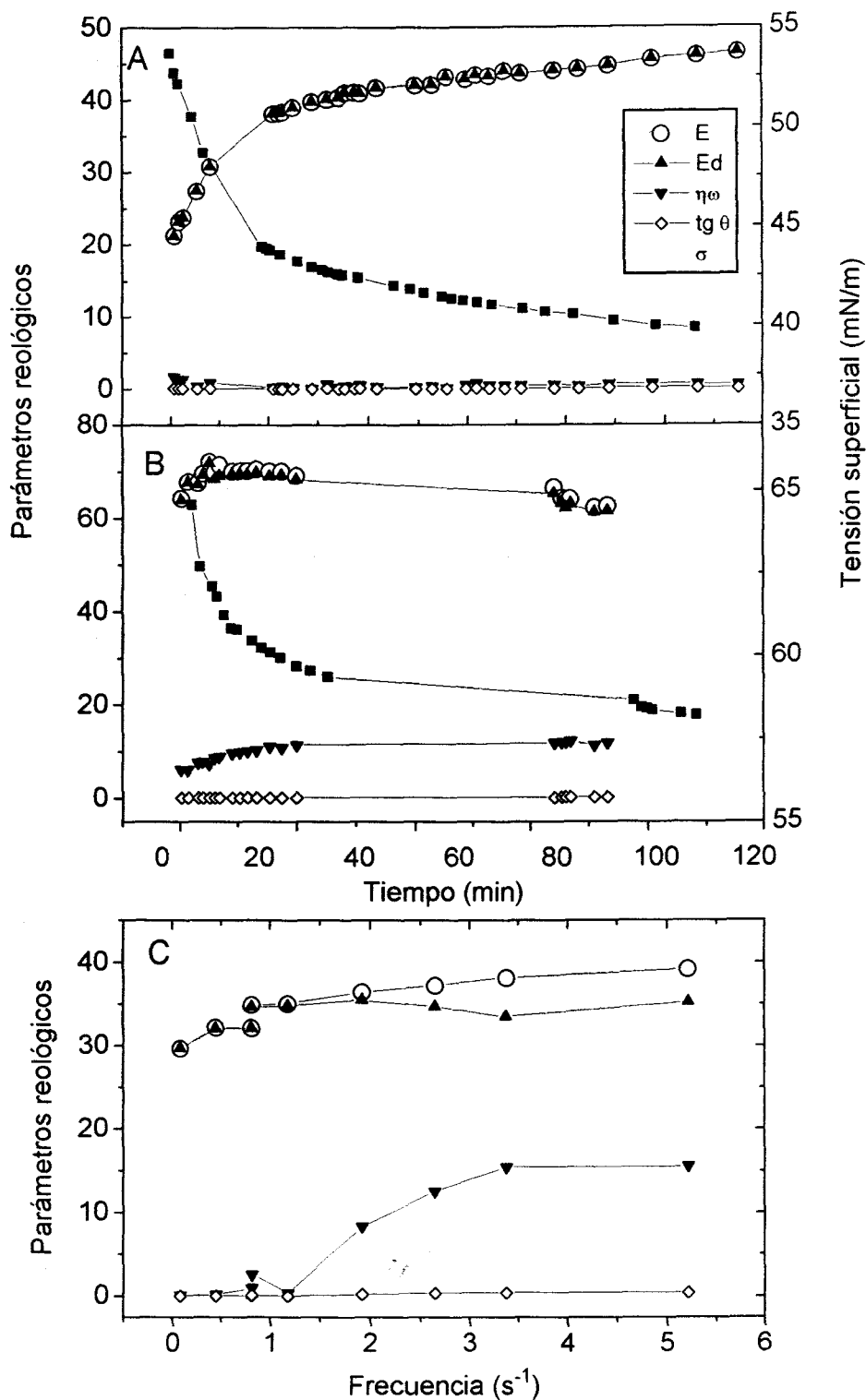


Figura 7.42. (A) y (B) Variación con el tiempo de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_a \omega$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas de emulsionantes adsorbidas sobre disolución acuosa de sacarosa 0.5 M, una frecuencia angular de 0,81 s⁻¹. (C) Efecto de la frecuencia sobre los parámetros reológicos. (A) BSA 0.1% en peso, (B) y (C) disolución de BSA 0.1% en peso y Tween 20 a 7.5 μM . Temperatura: 20 °C.

disminución de σ o la de aumento de E depende de la composición de la fase acuosa.

Películas de BSA-Tween 20 adsorbidas desde agua.

Sobre agua (Figura 7.40), la velocidad de disminución de la tensión superficial es menor para películas mixtas BSA-Tween 20 que para una película de BSA pura. Los valores de las propiedades dilatacionales superficiales, especialmente de E y de E_d , se incrementan con el tiempo hasta que se alcanza un valor constante en estado estacionario (Figura 7.41B). Al igual que ocurre con σ , la velocidad de incremento de las propiedades dilatacionales superficiales es menor para las películas mixtas de BSA-Tween 20 (Figura 7.40B) que para una película de BSA pura (Figura 7.40A). Sin embargo, la dependencia de la concentración de Tween 20 sobre los valores de ambos parámetros, σ y E , depende de la composición de la fase acuosa, como se analizará posteriormente.

Películas de BSA-Tween 20 adsorbidas desde una disolución acuosa de etanol 1 M.

Como sobre agua, en las películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas desde una disolución acuosa de etanol 1 M (Figura 7.41), los valores de la tensión superficial disminuyen y el del módulo dilatacional superficial se incrementa con el tiempo, hasta que se alcanzan valores constantes de los mismos en estado estacionario. Sin embargo, el periodo de inducción que se observaba al comienzo de la adsorción de BSA pura (Figura 7.41A), no se aprecia en el caso de las películas mixtas BSA-Tween 20 (Figura 7.41B). Es decir, en presencia de Tween 20, los efectos sobre las propiedades superficiales de la adsorción competitiva de

BSA y etanol, que ha sido asociada con la existencia de un periodo de inducción (ver apartado 7.2.1), desaparecen.

Películas de BSA-Tween 20 adsorbidas desde una disolución acuosa de sacarosa 0,5 M.

La dependencia con el tiempo de σ y de E de películas mixtas de BSA-Tween 20 sobre disolución acuosa de sacarosa 0,5 M (Figura 7.42), es similar a la que se observa con las mismas películas sobre agua. Sin embargo, existen diferencias con relación a los cambios de σ y de E con el tiempo, en función de la composición de la fase acuosa. Se observa que sobre una disolución acuosa de sacarosa la velocidad de disminución de σ , o de aumento de E, es superior en el caso de películas mixtas BSA-Tween 20 (Figura 7.42B), en comparación con las películas de BSA pura (Figura 7.42A). Es decir, en presencia de sacarosa la existencia de Tween 20 tiene un efecto sinergista positivo sobre la velocidad de adsorción de BSA, un fenómeno que es opuesto al observado con las mismas mezclas de emulsionantes sobre agua.

Discusión de los resultados

Si las propiedades superficiales transitorias están asociadas con la adsorción de BSA y/o de las mezclas BSA-Tween 20 sobre la interfase aire-agua (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979b), los datos reocinéticos mostrados en las figuras 7.40 a 7.42, podrían estar relacionados con la adsorción competitiva de BSA y Tween 20 sobre la interfase, en función de la composición del medio acuoso. El hecho de que la dependencia con el tiempo de E y de la presión superficial sigan la misma tendencia, podría indicar que E depende de la adsorción sobre la interfase de ambos emulsionantes, que es esperable se

incremento con el tiempo (MacRitchie y Alexander, 1963; MacRitchie, 1989, Joos et al, 1992; Damodaran y Song, 1988). Debido a esta similitud se puede establecer una analogía, definiendo una ecuación cinética (7.1), semejante formalmente a la utilizada por Tornberg (1978) y Graham y Phillips (1979), y que ha sido usada con éxito para el análisis de la cinética de adsorción de BSA, en relación con las experiencias de tensiometría (ver apartado 5.1), según los mecanismos de adsorción y desnaturalización interfacial, seguido de la reordenación de las moléculas de proteína previamente adsorbidas. Como ocurría con las experiencias de tensiometría a tiempos prolongados, la etapa de difusión es lo suficientemente rápida (ver apartados 5.1 y 5.2) como para que pueda ser detectada mediante las experiencias reológicas transitorias realizadas.

$$\ln \frac{\pi_{60} - \pi_{\theta}}{\pi_{60}} = -k_i \cdot \theta \quad (7.1)$$

donde π_{60} y π_{θ} son la presión superficial a los 60 minutos de adsorción y a cualquier tiempo, respectivamente, y k_i es la constante cinética de primer orden.

Como ocurría con los resultados obtenidos por aplicación de la ecuación (7.1) a la adsorción de la BSA pura en presencia de convección (apartado 5.3), sobre los mismos medios acuosos estudiados en este apartado, con las mezclas BSA-Tween 20 se obtienen dos o tres regiones lineales, de cuyas pendientes se han deducido los valores de las constantes cinéticas que se incluyen en la tabla 7.2.

A partir de los resultados obtenidos (tabla 7.2), y como un comportamiento general, se puede deducir que las moléculas de BSA y Tween 20 se adsorben sobre la interfase con una velocidad superior a la de la BSA pura. En efecto, puede comprobarse que los valores de las constantes cinéticas de primer orden k_1 y k_2 son superiores en las películas mixtas BSA-Tween 20, independientemente de la composición del medio acuoso. Además, se reduce significativamente el tiempo

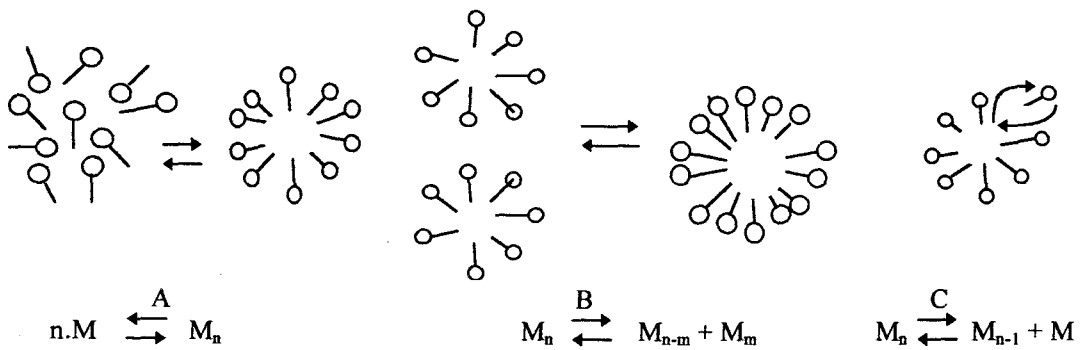
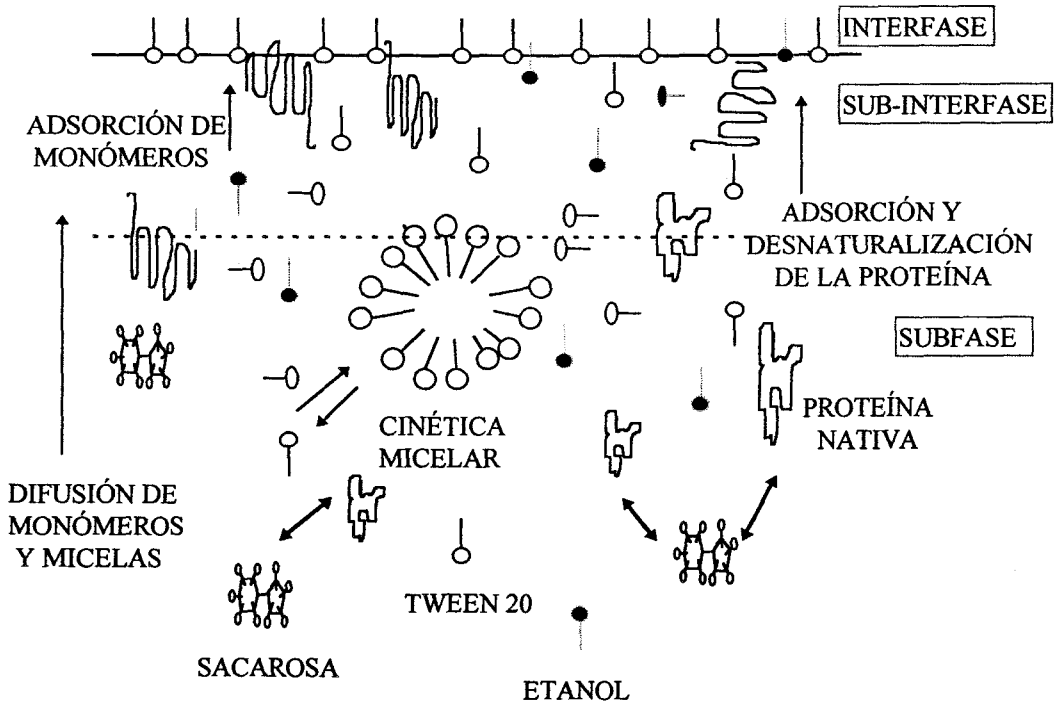
característico (θ^*) al cual se produce un cambio de mecanismo. El comportamiento de las películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas sobre disolución acuosa de sacarosa es más complejo, observándose la existencia de tres mecanismos cinéticos de primer orden, asociados a las constantes cinéticas k_1 , k_2 y k_3 .

Tabla 7.2. *Parámetros característicos de la velocidad de adsorción de la Mezcla BSA-Tween 20 sobre la interfase aire-medio acuoso, a 20 °C. Se incluye los parámetros característicos de la velocidad de adsorción de BSA, sobre los mismos medios acuosos para su comparación.*

| | $k_1 \cdot 10^3$ (min^{-1}) (LR) | θ_1^* (min) | $k_2 \cdot 10^3$ (min^{-1}) (LR) | θ_1^* (min) | $k_3 \cdot 10^3$ (min) (LR) | $\theta_{\text{máx}}$ (min) |
|--|---|-----------------------|---|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| BSA(agua) | 56,7 (0'989) | 50 | | | | 62 |
| BSA (etanol 1M) | 29'3 (0'973) | 63 | | | | 70 |
| BSA (sacarosa 0'5 M) | 33'6 (0'973) | 80 | | | | 92 |
| BSA-Tween 20 ^a (agua) | 61'0 (0'995) | 49'8 | 256 (0'951) | | | 60 |
| BSA-Tween 20 ^b (etanol 1 M) | 56'3 (0997) | 44'3 | 139 (0'987) | | | 60 |
| BSA-Tween 20 ^c (sacarosa 0'5 M) | 66'4 (0'973) | 31'3 | 15'8 (0'972) | 74'2 | 139 (0'942) | 82 |

Concentración de Tween 20 en la mezcla BSA-Tween 20 (μM): (a) 20, (b) y (c) 7'5. θ_i : tiempo característico del cambio de mecanismo. $\theta_{\text{máx}}$: tiempo de la experiencia.

El problema que se presenta a la hora de analizar los resultados obtenidos con las películas mixtas BSA-Tween 20 se debe al hecho de que tanto la BSA como el Tween 20 pueden adsorberse sobre la interfase, como moléculas



Mecanismos de la cinética micelar: (A) Formación-disolución. (B) Reordenación. (C) Agregación-desintegración por pasos.

Figura 7.43. Modelo de la adsorción competitiva de BSA y Tween 20 desde agua o disoluciones acuosas de etanol o sacarosa, en presencia de micelas de Tween 20 en el medio acuoso.

individuales o como un complejo de BSA-Tween 20 previamente formado en el seno de la fase acuosa. Además, el Tween 20 puede formar agregados micelares una vez alcanzada una cierta concentración del lípido en el seno de la fase acuosa, su concentración micelar crítica (CMC). Estas situaciones se representan en el modelo de la figura 7.43.

Hasta el presente, todos los modelos teóricos sobre cinética de adsorción se han basado en disoluciones de tensioactivos con una distribución de moléculas de los mismos como monómeros. La presencia de micelas en el seno de la fase puede ejercer una influencia significativa sobre la cinética de adsorción y sobre las interacciones BSA-Tween 20. Para cuantificar el efecto de la presencia de micelas en disolución, se han publicado diversos trabajos con el fin de determinar el número de agregación micelar y las constantes de velocidad de la cinética de formación de micelas de tensioactivos (Dukhin et al, 1995). Si se adopta una cinética de primer orden para la formación-desintegración de las micelas, de acuerdo con Zana (1974), las constantes cinéticas de primer orden (k_i) que correlacionan los datos experimentales, según la ecuación (7.1), deberían ser dependientes del proceso de adsorción de la mezcla BSA-Tween 20, en función de la existencia de monómeros o entidades micelares de Tween 20. No obstante, una discusión más detallada de estos sistemas, debido a su complejidad, requiere un mayor aporte experimental que, aunque no está contemplado en los objetivos de la Memoria, puede constituir un desarrollo lógico de la misma.

7.3.3.2. Propiedades reológicas dilatacionales superficiales

Desde un punto de vista reológico se debe destacar que los valores del módulo dilatacional superficial son similares a los de su componente elástica, tanto para las películas mixtas BSA-Tween 20 sobre agua (Figura 7.40B), como para disoluciones acuosas de etanol 1 M (Figura 7.41B) o sacarosa 0,5 M (Figura 7.42B). Para los mismos sistemas, los valores de la viscosidad dilatacional superficial y de la tangente del ángulo de pérdida son muy bajos, y prácticamente tienden a cero. La dependencia de los parámetros reológicos superficiales con la frecuencia de la oscilación (Figuras 7.40C, 7.41C y 7.42C) es característica de películas viscoelásticas, pero con un carácter eminentemente elástico.

Las propiedades dilatacionales superficiales también dependen de la composición de la fase acuosa. Sobre agua y disolución acuosa de sacarosa 0,5 M, los valores de las propiedades dilatacionales superficiales -- especialmente del módulo dilatacional superficial y de su componente elástica -- de películas mixtas BSA-Tween 20 son menores que los de las películas de BSA pura. Sin embargo, sobre disolución acuosa de etanol 1 M el módulo dilatacional superficial de películas mixtas BSA-Tween 20 es mayor que para las películas puras de BSA. Estos fenómenos son opuestos a los observados con películas de BSA puras adsorbidas sobre agua, en cuyo caso la presencia de solutos en el medio acuoso (etanol o sacarosa) produce una disminución significativa en los valores del módulo dilatacional superficial que, como se ha comentado, puede ser muy importante en el caso de disoluciones acuosas de etanol (ver apartado 7.2.1). Por lo tanto, el efecto sinergista positivo, sobre las propiedades reológicas superficiales de las películas mixtas BSA-Tween 20, debido a la presencia de Tween 20 en la interfase, debe ser destacado debido a razones prácticas, especialmente en el caso de las películas adsorbidas sobre la disolución acuosa de etanol. Los valores del módulo dilatacional superficial de las películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas

sobre disolución acuosa de sacarosa son mayores que las de las mismas películas mixtas adsorbidas sobre agua o disolución acuosa de etanol, en este orden.

7.3.3.3. Efecto de la concentración de Tween 20

El efecto de la concentración de Tween 20 sobre los valores de σ y de E de películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, a los 30 y 60 minutos de adsorción, se muestra en las figuras 7.44 a 7.46, respectivamente. La tensión superficial decrece significativamente cuando se incrementa la concentración de Tween 20 en el seno de la fase, pero tiende a un valor constante a las mayores concentraciones ensayadas.

La influencia de la concentración de Tween 20 sobre el módulo dilatacional superficial es más compleja. Puede comprobarse que el efecto de la concentración de Tween 20 sobre E depende del tipo de soluto presente en el seno de la fase acuosa. Sobre agua (Figura 7.44), se produce una disminución del valor de E a las más bajas concentraciones de Tween 20, se alcanza un mínimo a una concentración del lípido de alrededor de 5 μM , y a continuación se incrementa hasta que se llega a un valor constante de E, cuando la concentración de Tween 20 es superior a 20 μM . Sobre disolución acuosa de etanol (Figura 7.45). El valor de E se incrementa con la concentración de Tween 20 y tiende a un valor constante a valores de la concentración del lípido superiores a 10 μM . Sobre disolución acuosa de sacarosa (Figura 7.46) el efecto de la concentración de Tween 20 sobre E es similar al que se ha observado sobre agua. Es decir, el valor de E disminuye con la concentración del lípido hasta que se alcanza un mínimo a concentraciones de Tween 20 próximas a 5 μM , y a partir de aquí se incrementa hasta que se llega a un valor constante de E a concentraciones del lípido superiores a 10 μM . El valor de E a las máximas concentraciones de Tween 20 en las mezclas BSA-Tween 20 es mayor para las

películas mixtas adsorbidas sobre agua, y disminuye para las mismas películas adsorbidas sobre disoluciones acuosas de sacarosa 0,5 M y de etanol 1 M, en este orden.

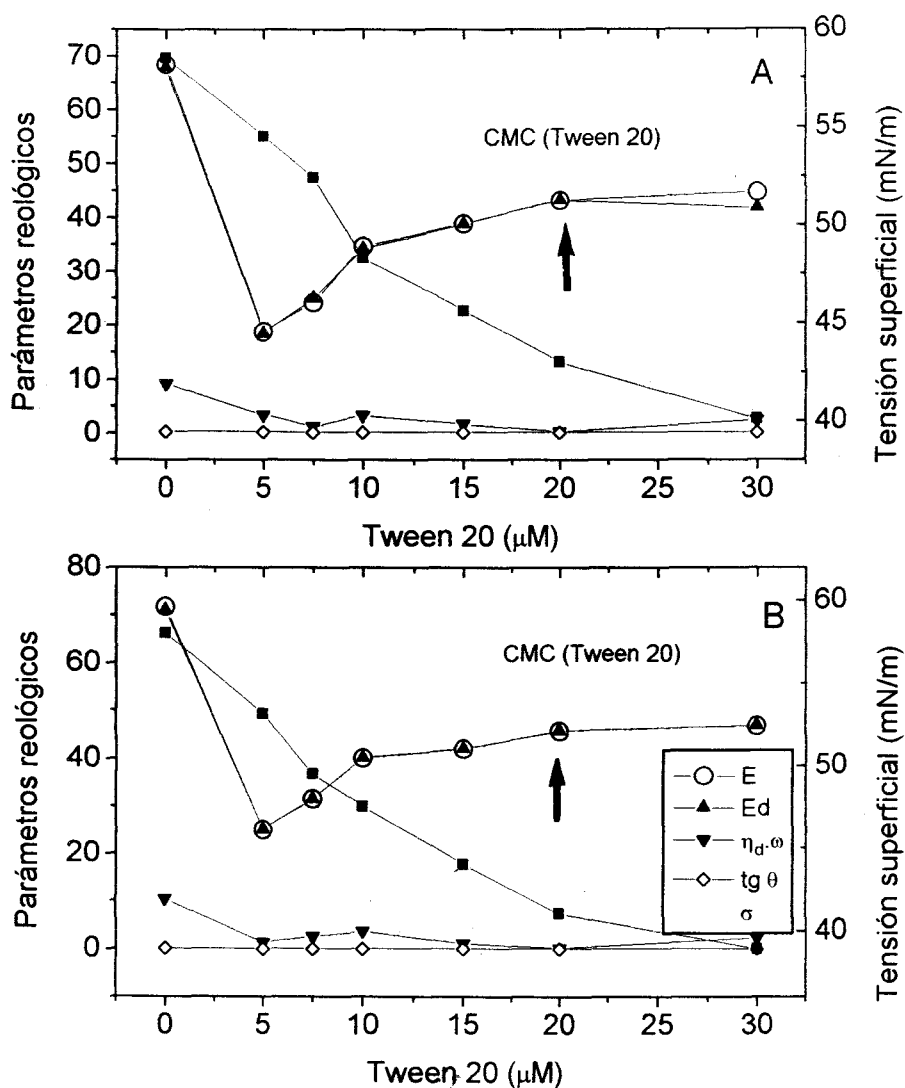


Figura 7.44. Variación con la concentración de Tween 20 (μM) de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{d,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas mixtas de BSA (0,1% en peso)-Tween 20 adsorbidas sobre agua, a una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (min): (A) 30; (B) 60.

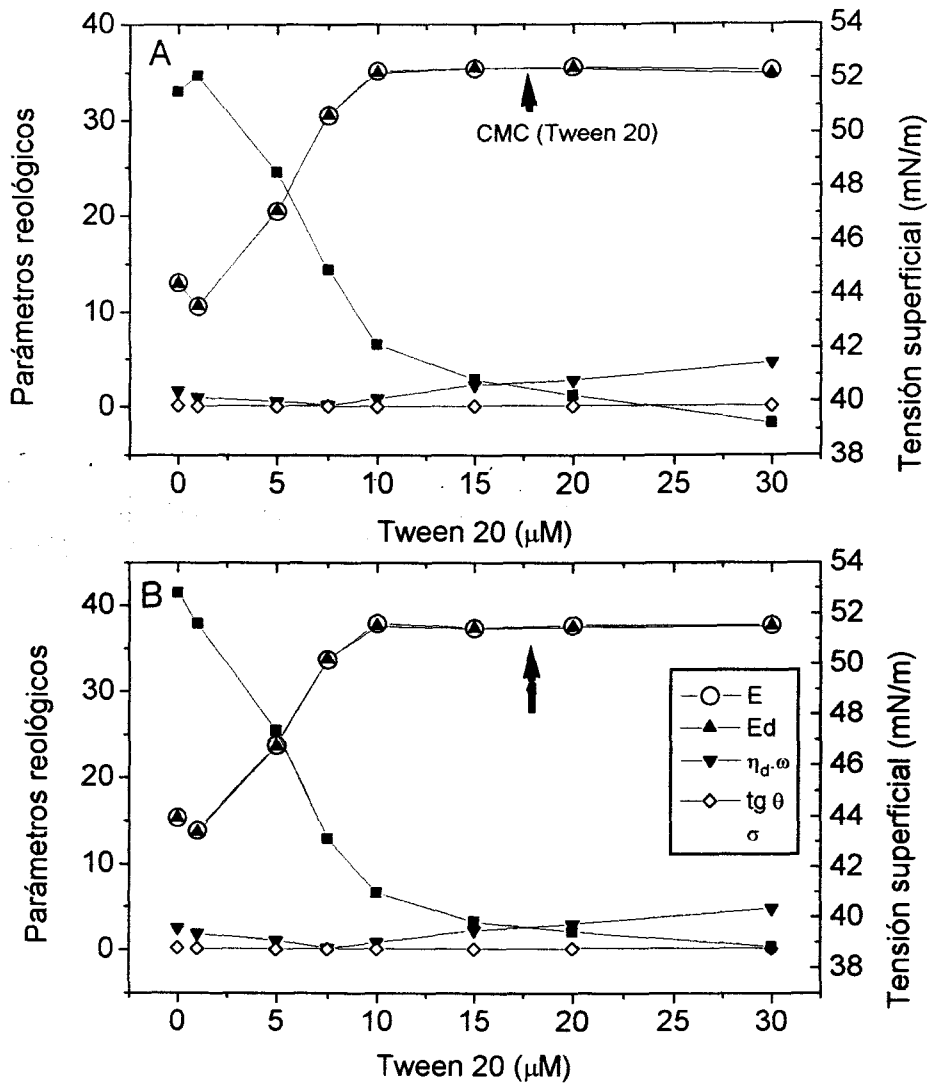


Figura 7.45. Variación con la concentración de Tween 20 (μM) de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{d,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas mixtas de BSA (0,1% en peso)-Tween 20 adsorbidas sobre disolución acuosa de etanol 1 M, una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (min): (A) 30; (B) 60.

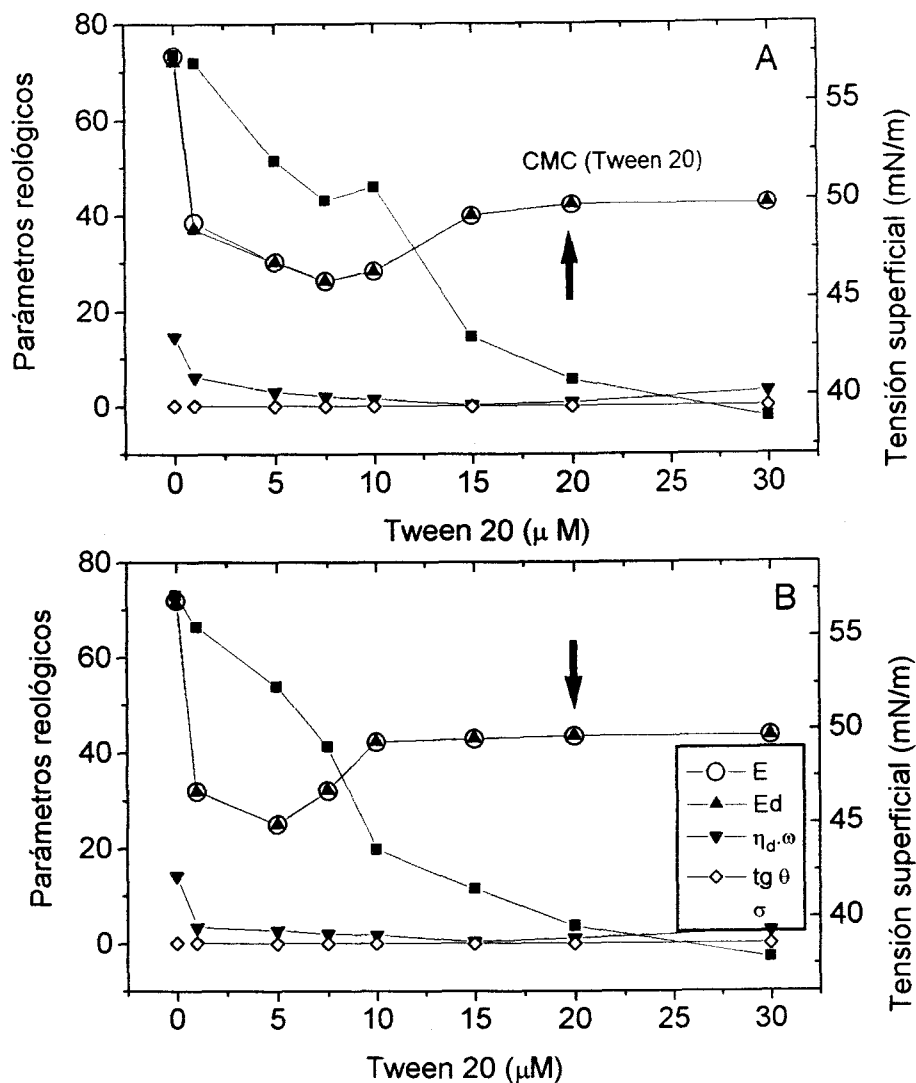


Figura 7.46. Variación con la concentración de Tween 20 (μM) de la tensión superficial (σ , mN/m), módulo dilatacional superficial (E , mN/m), elasticidad dilatacional superficial (E_d , mN/m), viscosidad dilatacional superficial ($\eta_{d,\omega}$, mN/m) y tangente del ángulo de pérdida ($\text{tg } \theta$) para películas mixtas de BSA (0,1% en peso)-Tween 20 adsorbidas sobre disolución acuosa de sacarosa 0,5 M, una frecuencia angular de $0,81 \text{ s}^{-1}$. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Tiempo de adsorción (min): (A) 30; (B) 60.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman y refuerzan la hipótesis de que el comportamiento superficial de las mezclas de emulsionantes depende de la relación de concentraciones de ambos emulsionantes en la mezcla y de la composición de la fase acuosa. En efecto, sobre agua y disoluciones acuosas de sacarosa los valores de las propiedades reológicas superficiales son máximos para películas de BSA pura, en comparación con los de las películas mixtas BSA-Tween 20 (Figuras 7.44 y 7.46). El valor mínimo de E , que se observa a concentraciones de Tween 20 de entre 5 y 7,5 μM , podría estar asociado con una transición en la estructura de la película adsorbida, debido a las interacciones lípido-proteína. La existencia de estas interacciones, tanto en la interfase como en el seno de la fase, está bien estudiada en la bibliografía (Cornell y Carrell, 1985; Erickson y Hegg, 1985; Bos et al, 1996; Wüstneck et al, 1988). En general, los lípidos y las proteínas pueden interactuar en la interfase mediante los mecanismos asociados a la formación de complejos o a la existencia de una adsorción competitiva, dependiendo de las interacciones del lípido sobre la interfase y de los enlaces lípido-proteína. Además, la proteína puede interactuar con el lípido en disolución, como moléculas individuales o como micelas, a concentraciones del lípido superiores al valor de la concentración micelar crítica (CMC).

Por lo tanto, se puede concluir que a la mayor concentración de proteína en la película mixta las interacciones proteína-proteína son predominantes, lo que estaría de acuerdo con los mayores valores de E de las películas mixtas BSA-Tween 20, a las mayores relaciones proteína-lípido (Figuras 7.44 a 7.46). Sin embargo, a las mayores concentraciones de lípido, las interacciones lípido-lípido serían predominantes, pero estas interacciones son más débiles que las que se establecen entre moléculas de proteínas, lo cual estaría de acuerdo con el menor valor de E de las películas mixtas BSA-Tween 20, a las mayores relaciones lípido-proteína (Figuras 7.44 a 7.46). El máximo valor de E se produce a partir de una concentración de Tween 20 próxima al valor de su CMC en el medio.

Se puede admitir, pues, que a esta concentración de Tween 20, la BSA y el Tween 20, como moléculas individuales¹, compiten por la interfase. Esta relación lípido-proteína es una composición singular de la película mixta, que delimita comportamientos diferentes -- tales como estructura de la película adsorbida (Clark et al, 1993, Kragel et al, 1995; Courthaudon et al, 1991), el drenaje y la difusión superficial en películas delgadas (Clark et al, 1990a y b; Bos et al, 1996; Sarker et al, 1995), etc. --, que al final puede tener una repercusión decisiva sobre la estabilidad de una emulsión o espuma (Chen y Dickinson, 1995a-c; Sarker et al, 1995).

El hecho de que el valor de la concentración de Tween 20 en la película mixta, al que se produce el mínimo de E, se desplace hacia mayores concentraciones del lípido en presencia de sacarosa en la subfase -- en relación con lo observado con las mismas películas adsorbidas sobre agua o disolución acuosa de etanol --, podría estar relacionado con el efecto repetidamente citado en esta Memoria de que la sacarosa favorece la presencia de la BSA sobre la interfase. Por lo tanto, se requiere una mayor concentración de Tween 20 para que desplace a la proteína de la interfase, o para que predomine su efecto sobre el comportamiento interfacial en la película mixta. Estos fenómenos están de acuerdo con los datos de drenaje y de difusión superficial de los mismos sistemas, como se analizará en el siguiente apartado de esta Memoria.

Las diferencias que se observan en el comportamiento reológico superficial de las películas mixtas BSA-Tween 20 adsorbidas sobre disolución acuosa de etanol (Figura 7.45) pueden estar relacionadas con la existencia de una adsorción competitiva de etanol, BSA y Tween 20 sobre la interfase, y con la existencia de interacciones del etanol con los emulsionantes, especialmente con la proteína, sobre la interfase y en el seno de la fase (Tanford, 1962; Brands y Hunt, 1967).

¹ Las micelas que se formen en el seno del medio continuo a concentraciones de Tween 20 superiores a la CMC, debido a su carácter hidrofílico (véase el esquema molecular de la figura 7.43), no tienen tendencia a adsorberse sobre la interfase.

Como una consecuencia de la existencia de estas interacciones con el etanol disminuirían las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína, lo cual estaría de acuerdo con el menor valor de E (Figura 7.45), en relación con lo observado con las mismas películas adsorbidas sobre agua (Figura 7.44) o disolución acuosa de sacarosa (Figura 7.46). La existencia de interacciones lípido-proteína en presencia de etanol puede estar relacionado también con el efecto sinergista positivo del Tween 20 sobre el valor de E , en las películas mixtas BSA-Tween 20. Es decir, el debilitamiento de las interacciones proteína-proteína, como una consecuencia del efecto desnaturizante del etanol, podría facilitar la existencia de interacciones lípido-proteína sobre la interfase, lo que podría, en fin, incrementar el valor de E , cuando lo hace la concentración de Tween 20 en la mezcla con BSA (Figura 7.45).

**8. DRENAJE Y DIFUSIÓN SUPERFICIAL
DE PELÍCULAS DELGADAS DE BSA Y
DE TWEEN 20 SOBRE LA INTERFASE
AIRE-MEDIO ACUOSO**

8. DRENAJE Y DIFUSIÓN SUPERFICIAL DE PELÍCULAS DELGADAS DE BSA Y DE TWEEN 20 SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

El estudio de películas delgadas de líquidos goza de un gran interés científico, del que se han deducido importantes aplicaciones industriales. Las películas de un líquido libre pueden considerarse como modelos para espumas, mientras que películas formadas entre dos líquidos inmiscibles pueden servir como modelos útiles para las emulsiones. El drenaje de películas delgadas ha resultado ser un fenómeno importante por su relación con procesos de espumación y emulsificación (Bos et al, 1996; Clark, 1995; Kruglyakov, 1988, Rao et al, 1982). La extensión y la velocidad de drenaje de un líquido desde la laminilla hasta los bordes de Plateau son dos factores importantes, determinantes de la estabilidad de una espuma. Existe un extenso número de estudios sobre películas delgadas estabilizadas por tensioactivos (Khristov et al, 1984; Kaschiev y Exerowa, 1980; Exerowa et al, 1983; de Feijter y Vrij, 1974; Exerowa et al, 1979), por proteínas (Lalchev et al, 1979; Platikanov et al, 1980; Musselwhite y Kitchener, 1967), o por la mezcla de lípidos y de proteínas (Clark et al, 1990, Sarker et al, 1995). La mayoría de estos trabajos se han centrado, con algunas excepciones, en el estudio del comportamiento de las películas delgadas sobre la interfase aire-agua, en las que se ha incluido glicerina en el medio acuoso para el estudio del efecto de la viscosidad del medio sobre el comportamiento de drenaje.

El objetivo del estudio realizado en este apartado se ha centrado en el análisis del efecto que determinados solutos presentes en el medio acuoso (tales como etanol y sacarosa) pueden ejercer sobre el comportamiento de drenaje de películas mixtas BSA-Tween 20 (apartado 8.1), en función de la composición interfacial (relación BSA-Tween 20). Es decir, se intenta complementar los datos

de los estudios realizados previamente en esta Memoria, o procedentes de experiencias realizadas o en ejecución, sobre características de películas de emulsionantes alimentarios, y su relación con la estabilidad de sistemas dispersos (emulsiones y espumas). El estudio se completará con la determinación de la movilidad superficial de ambos emulsionantes sobre la interfase aire-medio acuoso (apartado 8.2), mediante la técnica de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP), descrita en el apartado 4 de esta Memoria. Claramente, nuestro conocimiento sobre la estabilización de películas delgadas de emulsionantes sobre la interfase aire-medio acuoso puede mejorar, si se dispone de una medida cuantitativa de la movilidad de las especies que se adsorben sobre la interfase, expresada por el coeficiente de difusión superficial. La discusión global de los resultados obtenidos sobre drenaje y movilidad de las especies presentes en la interfase se realizará en el apartado 8.3.

8.1 DRENAJE DE PELÍCULAS DE BSA Y TWEEN 20.

Según lo indicado en el apartado experimental (apartado 4.2.3), el proceso de drenaje de una película delgada se visualiza directamente, a través del objetivo del microscopio o de una pantalla de TV, pero al mismo tiempo se graba en cinta magnética para un análisis posterior más detallado. A partir de aquí se puede disponer de fotografías, obtenidas de la cinta magnética, donde se recogen los aspectos más característicos del proceso. Los sistemas estudiados son los indicados en la tabla 4.5.

A título de ejemplo, en la figura 8.1 se recoge una secuencia de drenaje típica de una película delgada estabilizada por un lípido (Tween 20), una proteína (BSA), o una mezcla de ambos emulsionantes. Estas secuencias se tomaron durante el drenaje de las películas en disolución acuosa, con un $\text{pH} = 7$ y una fuerza iónica de 0,05M.

Una secuencia típica de drenaje de una proteína se muestra en las fotografías a-c. Las películas estabilizadas por proteínas se caracterizan por una serie de anillos concéntricos blancos, negros y de colores luminosos, denominados *anillos de Newton* (Figura 8.1-a). Estos anillos se corresponden con las interferencias aditivas o destructivas de la luz reflejada desde las interfases superior e inferior de la película delgada, y con regiones interconectadas de la película con similares espesores. Inicialmente, los anillos de Newton están muy poco espaciados, lo cual es una indicación del mayor grosor de la película tras su formación. Además, se observa una gradación de espesores en la película, asociada a los distintos colores de los anillos, siendo más delgada en la zona central. Cuando el drenaje prosigue, los anillos se separan entre sí, apareciendo un oscurecimiento en la periferia de la película (Figura 8.1-b). La formación de un anillo negro continuo en la periferia de la película puede bloquear el drenaje del líquido contenido en la región central de la misma. Sin embargo, el drenaje continua,

al estrangulamiento de la película, que tiene como resultado una reducción de las dimensiones de la región central iluminada (Figura 8.1-c). Finalmente, la película se vuelve negra completamente, si bien la llegada a esta situación puede durar horas.

EVOLUCIÓN DEL DRENAJE CON EL TIEMPO

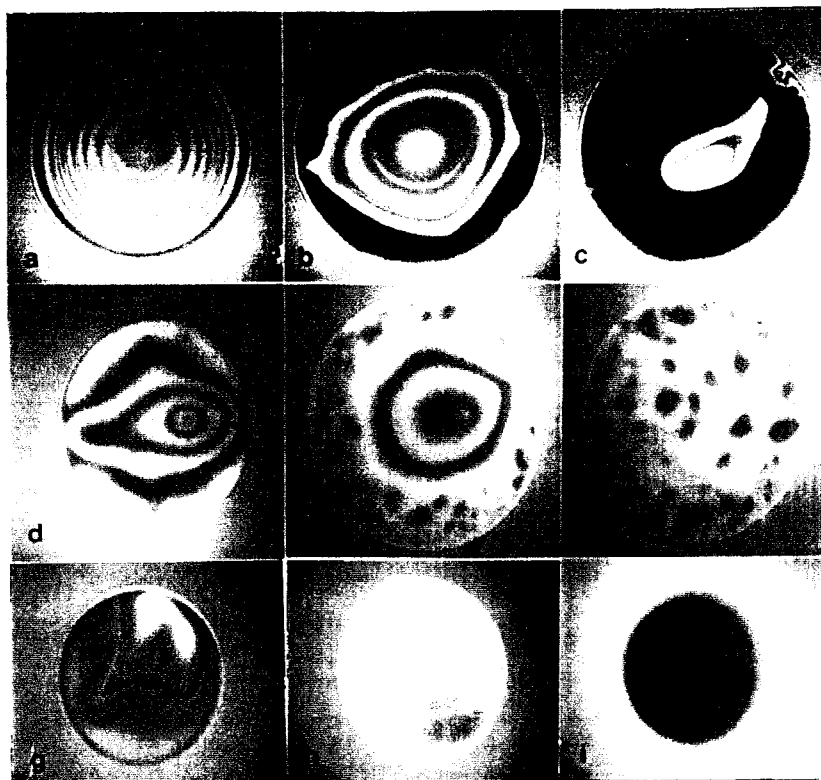


Figura 8.1. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por BSA al 0,1 % en peso (a-c), por Tween 20 con una concentración $10 \mu\text{M}$ (g-i), y por la mezcla de ambos (d-f). Temperatura 20°C , $\text{pH} = 7$, fuerza iónica $0,05 \text{ M}$.

La velocidad de drenaje de la película puede depender de la historia de la interfase, como se analizará posteriormente. En las interfases con más edad -- se entiende por edad de la interfase el tiempo que transcurre desde que se introduce el sistema en el capilar y su posterior succión y formación de la película --, el drenaje suele ser más lento, lo cual puede ser debido a que se ha propiciado la adsorción de la BSA sobre la interfase (capítulo 5), con lo cual se incrementan sus propiedades viscoelásticas (capítulo 7).

Las películas delgadas estabilizadas por Tween 20 presentan unas características de drenaje muy diferentes a las de la BSA. El drenaje de estas películas es más caótica, en comparación con las películas estabilizadas por proteínas, y sigue siempre la misma secuencia (Figura 8.1 g-i). La película drena desde unos colores no uniformes tras su formación (Figura 8.1-g), en muy poco tiempo. Las diferencias coloreadas indican regiones con distintos espesores. Gradualmente la película se oscurece, haciéndose más grisácea cuando el drenaje y su adelgazamiento continúan (Figura 8.1-h). Durante este período, empiezan a aparecer manchas negras en las regiones más oscuras de la película. Estas manchas se mueven al azar, en el interior de la película, y lentamente se incrementa su tamaño. Cuando dos manchas negras colisionan entre sí, se unen para formar una única mancha de mayor tamaño (Figura 8.1-h). Puede ocurrir que, en la etapa final del drenaje, la película adquiera una tonalidad oscura y uniforme. En esta situación, y a partir de medidas de interferometría se ha podido medir el espesor de la película en el equilibrio (Clark et al, 1989 y 1990; Exerowa et al, 1987). La mayor parte de los tensioactivos de bajo peso molecular se comporta de esta forma. Se incluyen entre estos a los polisorbatos (Coke et al, 1990), ésteres de sacarosa (Clark et al, 1992), lecitinas (Wilde et al, 1993; Sarker et al, 1995), etc., con pocas diferencias entre ellos.

En el caso de las películas mixtas BSA-Tween 20, su comportamiento frente al drenaje puede ser similar al analizado para el caso de la BSA pura (Figura

8.1 a-c), del Tween 20 (Figura 8.1 g-i), o uno intermedio (Figura 8.1 d-f), dependiendo de la relación lípido-proteína en el medio acuoso. En este último caso, los anillos de Newton, que se forman en la etapa inicial del drenaje, aparecen distorsionados y más separados entre sí. Además, la fluidez de la película se incrementa y el drenaje se hace más rápido, como en el caso de los lípidos puros. Finalmente, para una relación BSA-Tween 20 característica -- a la cual se produce la transición entre ambos tipos de comportamientos frente al drenaje (similar al de una proteína o de un lípido) --, la película suele ser inestable y romperse antes de llegar a su espesor de equilibrio.

Las características de drenaje de las películas delgadas de BSA, Tween 20, o de sus mezclas, formadas sobre agua, son muy diferentes según sea la concentración del emulsionante sobre la interfase, la composición de la interfase y la composición del medio acuoso, según se resume en la información contenida en las tablas 8.1 a 8.3, deducida directamente de análisis de las imágenes grabadas. En las figuras 8.2 y 8.3 se muestran, a título de ejemplo, las fotografías de drenaje obtenidas con películas estabilizadas por BSA (0,1 %, en peso), sobre disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, respectivamente. En las figura 8.4, 8.5 y 8.6 se muestran, a título de ejemplo, las fotografías de la secuencia del drenaje obtenidas con películas estabilizadas por la mezcla de BSA y Tween 20 sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, respectivamente.

Las observaciones del comportamiento de drenaje de una película de BSA, Tween 20, o una mezcla de ambos, analizadas anteriormente, es una consecuencia de sus características interfaciales -- relacionadas con su formación, estructura, estabilidad, propiedades reológicas, etc. Mediante esta técnica es fácil distinguir entre películas estabilizadas por una proteína o por un lípido, o por una mezcla de ambos. Estudios específicos del espesor de una película de una solución de proteína que contiene adiciones crecientes de un lípido revelan que se produce una

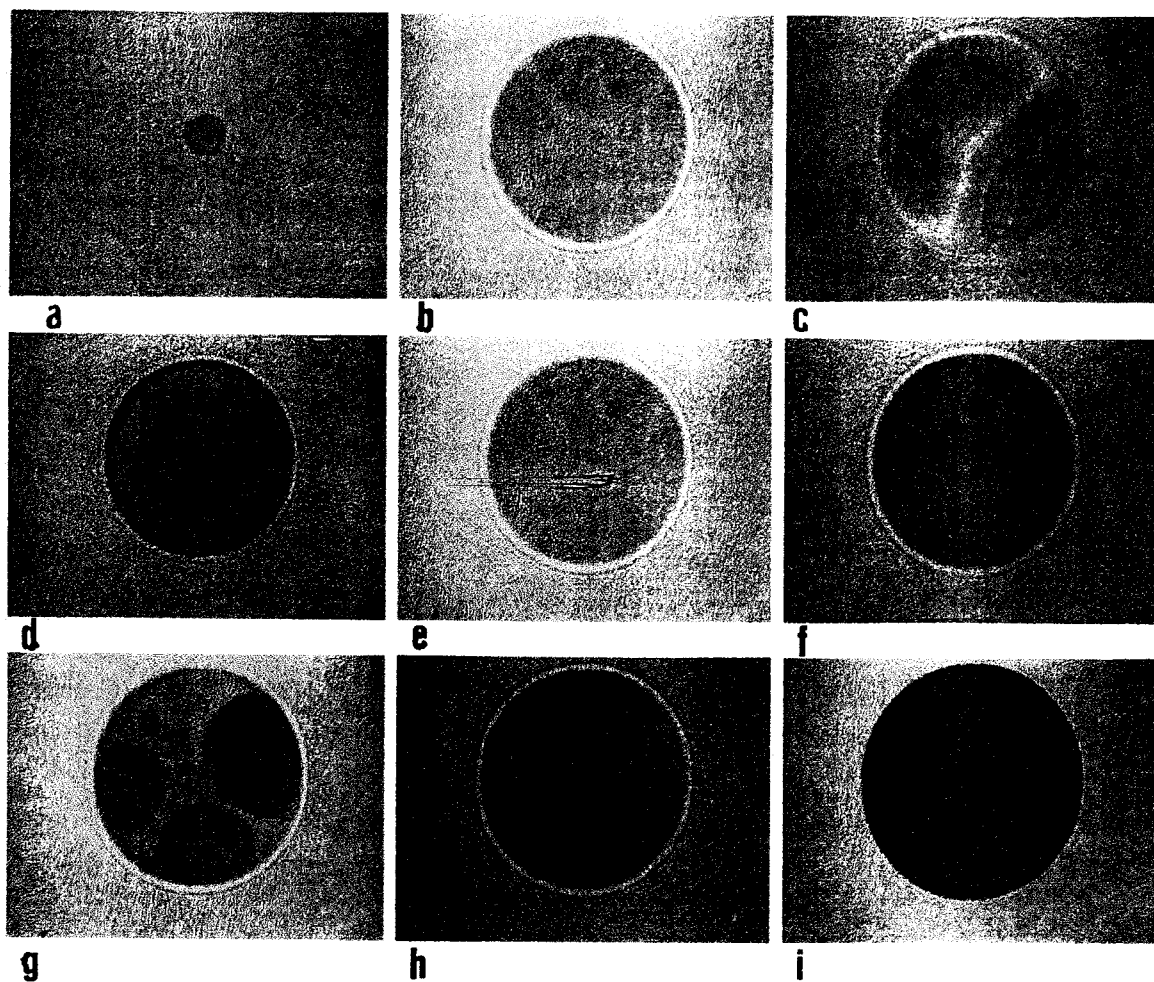


Figura 8.2. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por Tween 20 ($50 \mu\text{M}$) sobre la interfase aire- disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, fuerza iónica $0,05 \text{ M}$. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| θ (min) | 0,1 | 0,11 | 0,15 | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 2,0 | 2,5 |

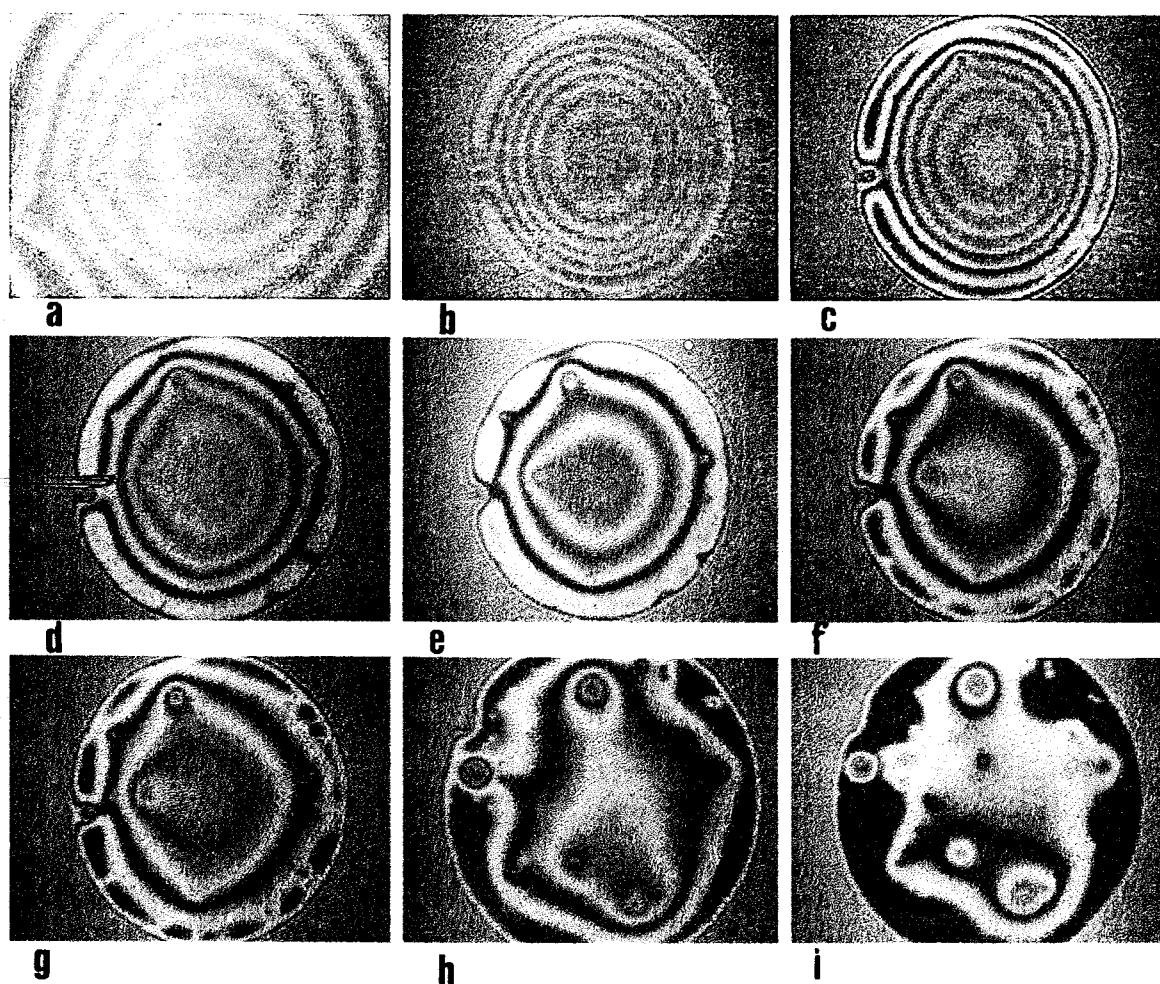


Figura 8.3.1. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) sobre la interfase aire- disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura 20 °C, pH = 7, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|-----|---|---|-----|----|----|----|
| θ (min) | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | 3 | 7,5 | 15 | 18 | 23 |

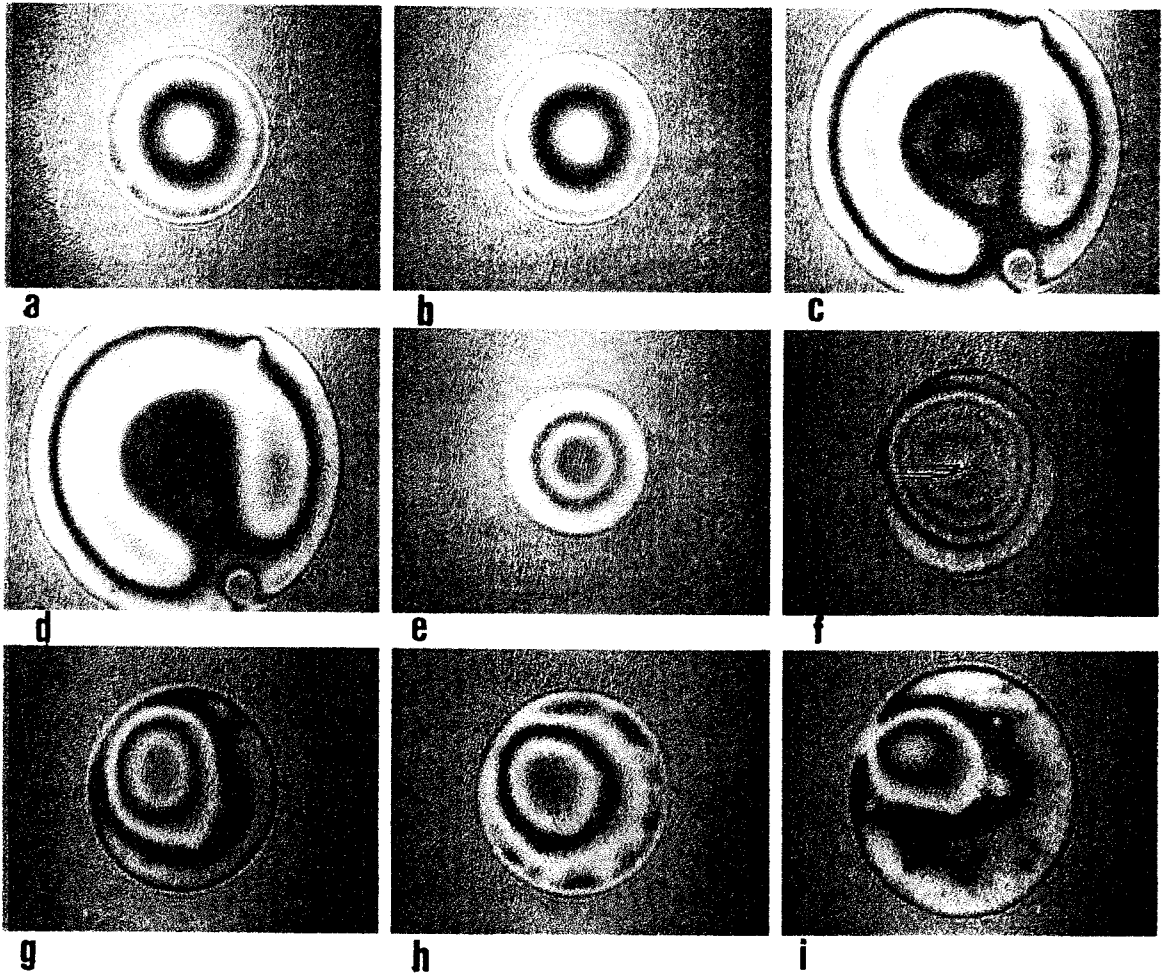


Figura 8.3.2. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (10^{-2} % en peso) sobre la interfase aire- disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura 20 °C, pH = 7, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|------|-----|------|---|------|-----|-----|---|
| θ (min) | 0,1 | 0,15 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,25 | 1,5 | 2,5 | 4 |

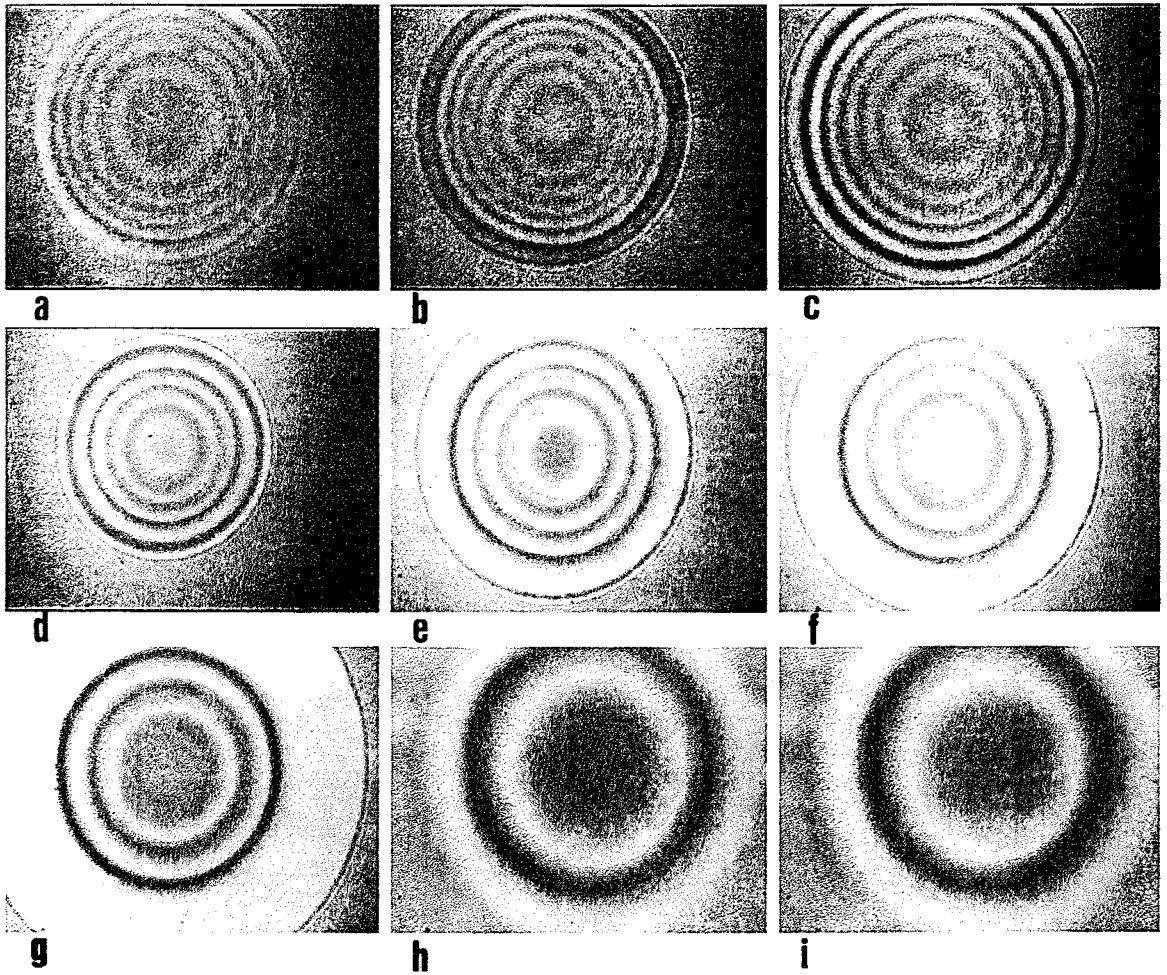


Figura 8.4.1. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) sobre la interfase aire- disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura 20 °C, pH = 7, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|------|------|---|---|-----|----|----|
| θ (min) | 0,1 | 1,2 | 2,25 | 2,75 | 4 | 7 | 9,5 | 12 | 15 |

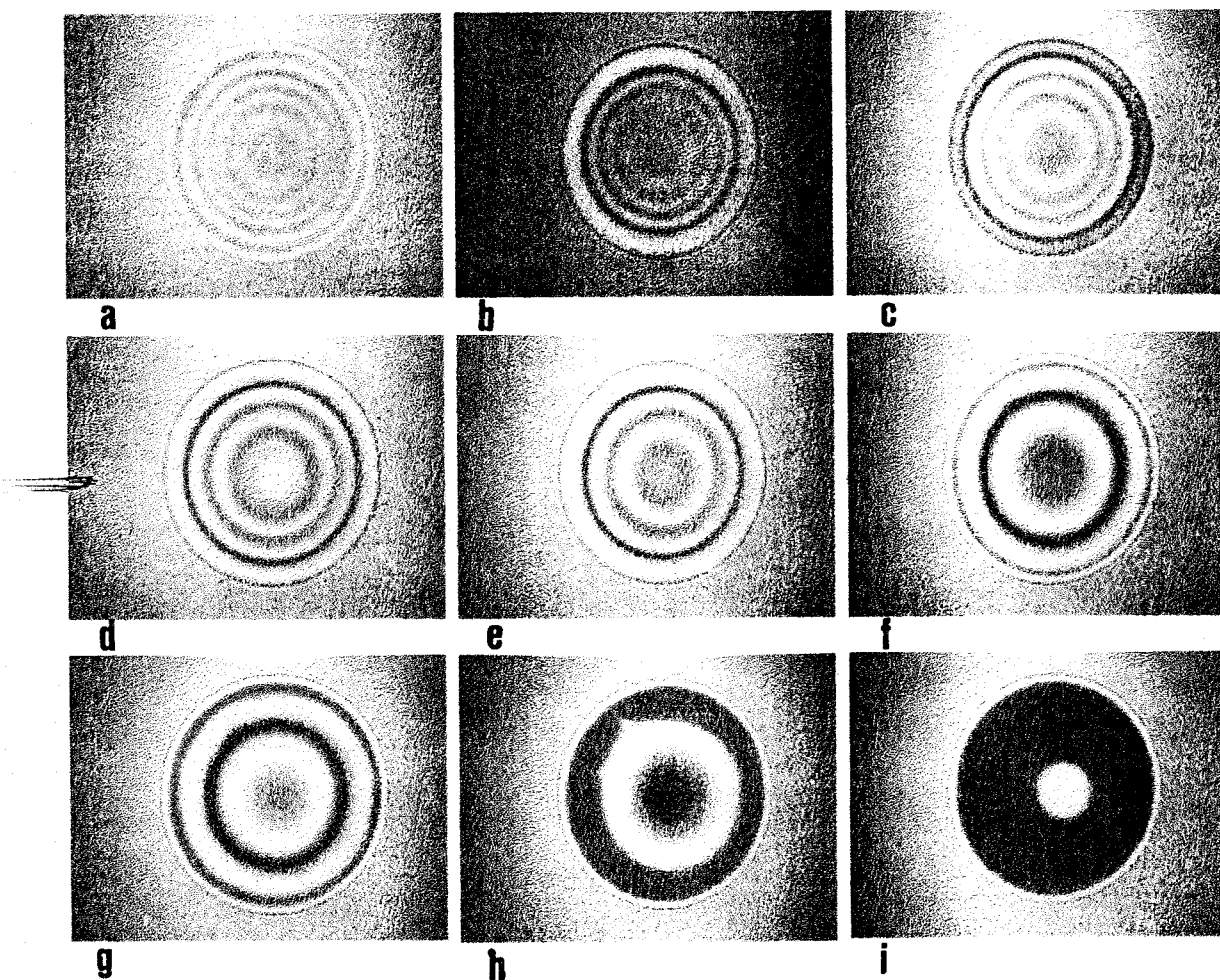


Figura 8.4.2. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (10^{-2} % en peso) sobre la interfase aire- disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura 20 °C, pH = 7, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|------|------|-----|-----|-----|---|-----|----|
| θ (min) | 0,1 | 0,15 | 0,25 | 0,5 | 1,3 | 1,7 | 2 | 8,5 | 15 |

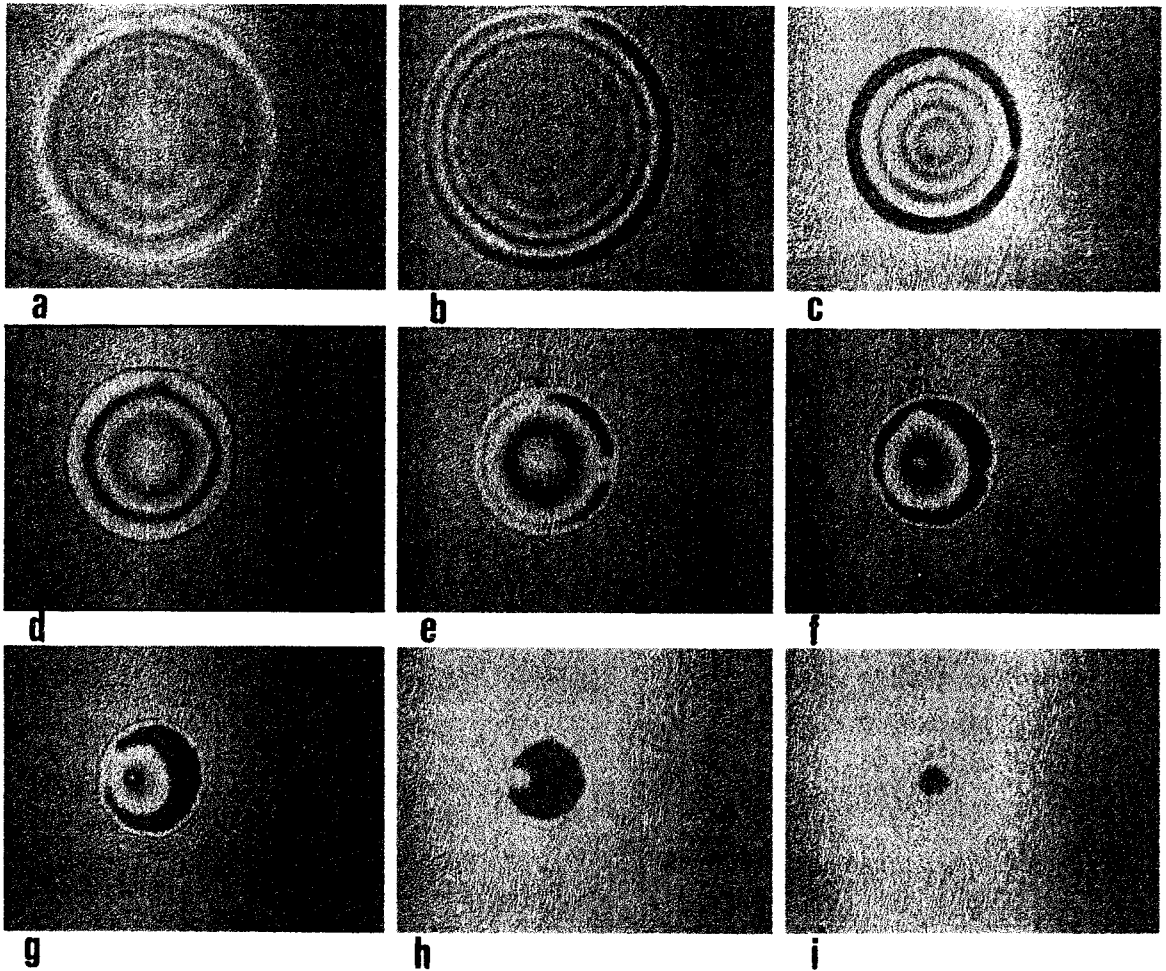


Figura 8.5.1. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) y Tween 20 ($1 \mu\text{M}$) sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|------|-----|------|---|-----|----|----|----|
| θ (min) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 3,25 | 7 | 8,5 | 12 | 15 | 22 |

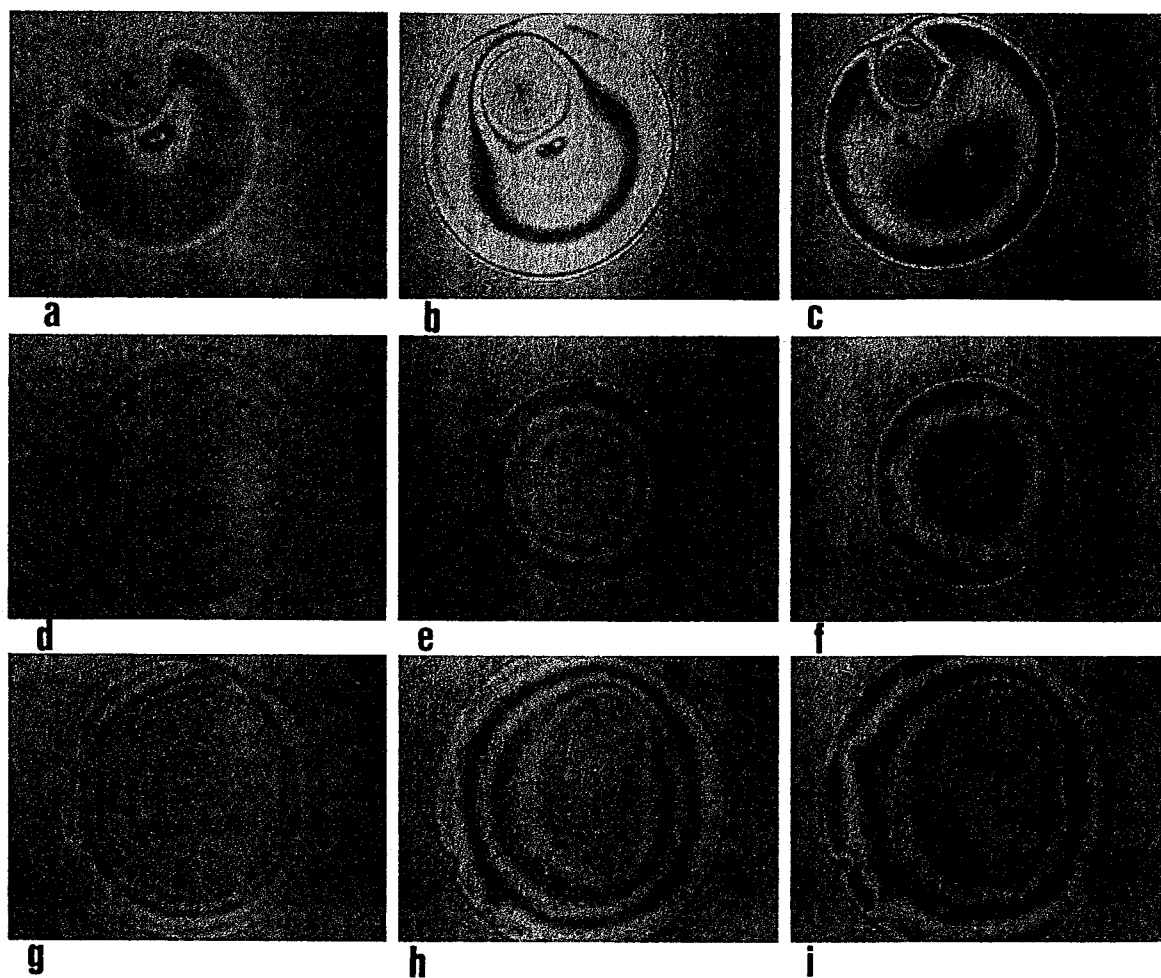


Figura 8.5.2. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) y Tween 20 ($2 \mu\text{M}$) sobre la interfase aire-disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|----|----|
| θ (min) | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 2,1 | 5 | 7,5 | 10 | 13 |

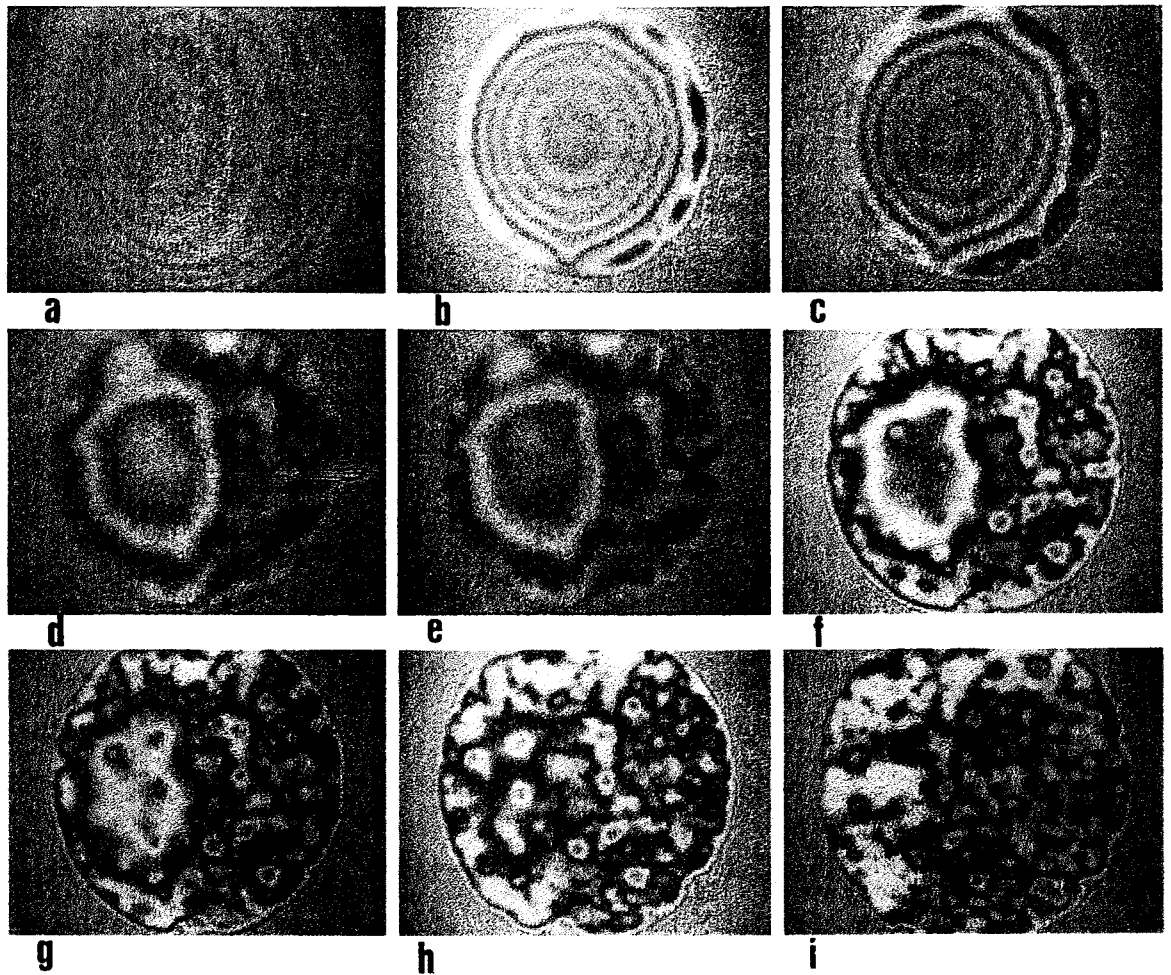


Figura 8.6.1. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) y Tween 20 ($2 \mu\text{M}$) sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura 20°C , $\text{pH} = 7$, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|---|-----|-----|---|----|----|----|
| θ (min) | 0,1 | 0,5 | 2 | 4,5 | 4,7 | 8 | 10 | 11 | 12 |

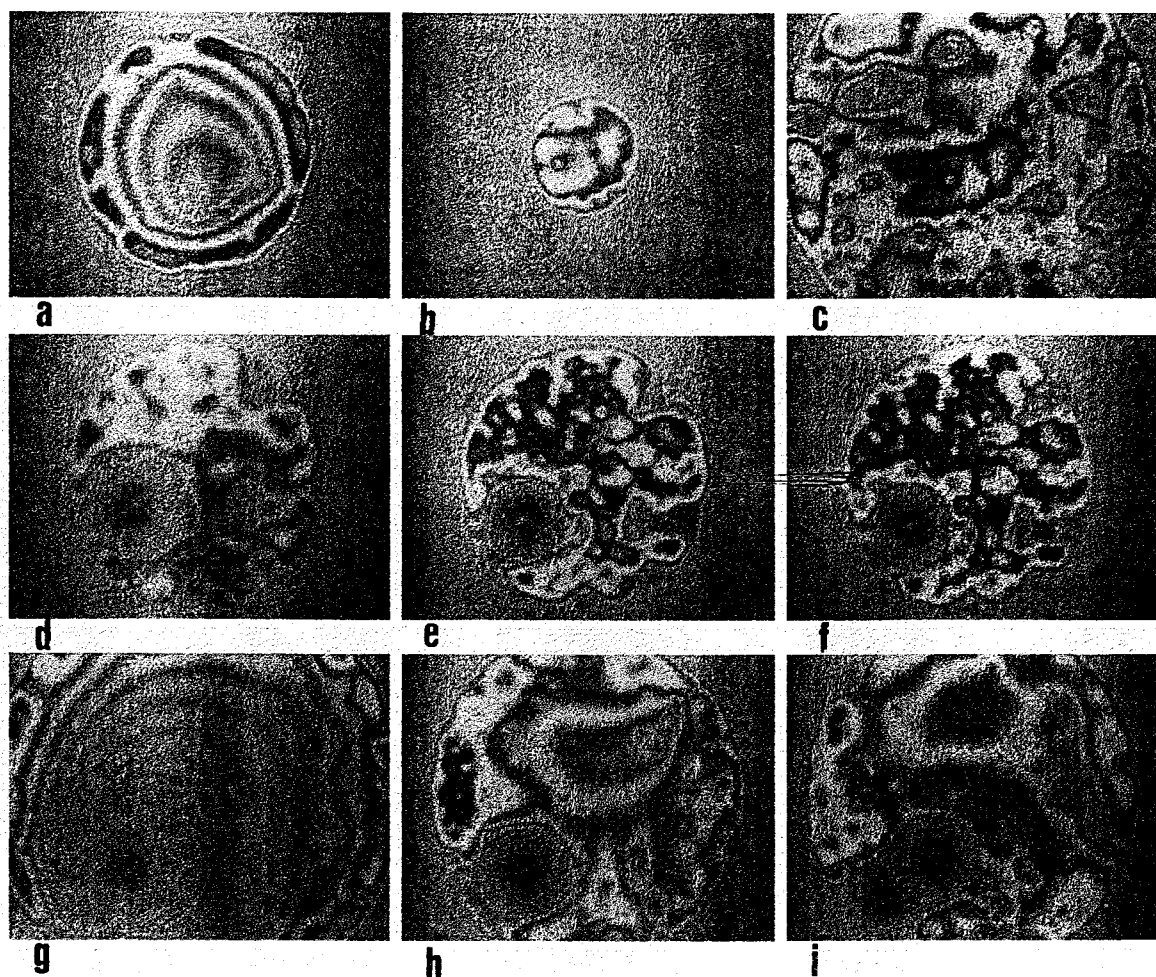


Figura 8.6.2. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) y Tween 20 (7 μ M) sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura 20 °C, pH = 7, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|------|------|------|-----|------|---|---|
| θ (min) | 0,1 | 3,5 | 3,75 | 4,25 | 4,75 | 5,5 | 6,25 | 7 | 9 |

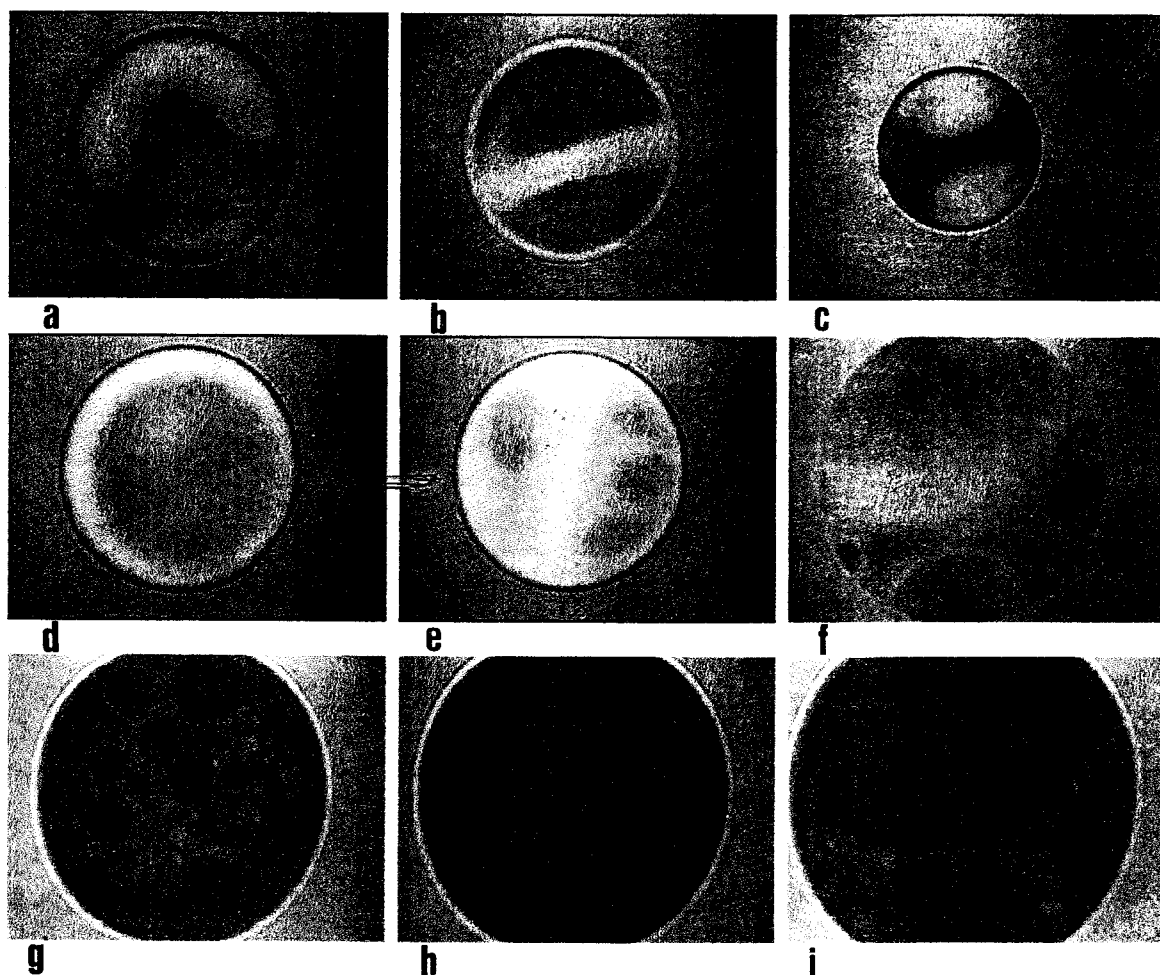


Figura 8.6.3. Fotografías del drenaje de películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 % en peso) y Tween 20 ($10 \mu\text{M}$) sobre la interfase aire-disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, fuerza iónica 0,05 M. Tiempo de drenaje (minutos):

| CLAVE | a | b | c | d | e | f | g | h | i |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|---|
| θ (min) | 0,1 | 2,5 | 2,7 | 3,5 | 3,7 | 5 | 5,5 | 5,7 | 7 |

Tabla 8.1. Principales características de drenaje de películas estabilizadas por Tween 20 sobre la interfase aire-medio acuoso, a 20 °C.

| SUBFASE | Tween 20 (μM) | Características de drenaje |
|---------------|-------------------------------|--|
| Agua | 1 | Película muy fluida e inestable. Se rompe rápidamente. |
| Agua | 10 | Típica de lípido. Inestable. Se rompe antes de llegar al espesor de equilibrio. |
| Agua | 50 | Típica de lípido. Inestable. |
| Agua | 100 | Típica de lípido. Estable. |
| Etanol 1M | 1 | Típica de lípido. Inestable. Drenaje rápido. |
| Etanol 1M | 10 | Típica de lípido. Estable en el equilibrio. |
| Etanol 1M | 50 | Similares a la anterior. Ver figura 8.2. |
| Etanol 1M | 100 | Película de color homogéneo. Color blanco que se transforma en gris. Película estable y fluida. |
| Sacarosa 0,5M | 1 | Típica de lípido. Inestable. La película se rompe antes de la llegada al espesor de equilibrio. |
| Sacarosa 0,5M | 10 | Similares a la anterior. |
| Sacarosa 0,5M | 50 | Típica de lípido tras su formación. Se forma una estrella blanca en el centro. Estable en el equilibrio. |
| Sacarosa 0,5M | 100 | Similares a la anterior, pero más estable. |

Tabla 8.2. Principales características de drenaje de películas estabilizadas por BSA sobre la interfase aire-medio acuoso, a 20 °C.

| SUBFASE | BSA (%, peso) | Características de drenaje |
|---------------|-------------------|---|
| Agua | $1 \cdot 10^{-1}$ | Típica de proteína. Estable. Drenaje lento. |
| Agua | $1 \cdot 10^{-2}$ | Similares a la anterior. Tiempo de drenaje superior a 3 horas. |
| Agua | $1 \cdot 10^{-3}$ | Típica de proteína. Inestable. La película se rompe a los 2 minutos desde su formación. |
| Agua | $1 \cdot 10^{-4}$ | Típica de proteína. Inestable. La película se rompe a los 30 segundos desde su formación. |
| Etanol 1M | $1 \cdot 10^{-1}$ | Típica de proteína. Anillo negro en la periferia con agregados. Drenaje lento. Ver figura 8.3.1. |
| Etanol 1M | $1 \cdot 10^{-2}$ | Típica de proteína. Existencia de agregados. Drenaje lento. Estabilidad dependiente de la edad*. Inestabilidad instantánea en películas de corta edad (menos de 20 minutos). Con una edad de 60 minutos, la película se rompe a los 5 minutos desde su formación. Ver figura 8.3.2. |
| Etanol 1M | $1 \cdot 10^{-3}$ | Película muy inestable y fluida. La película es inestable incluso tras en periodo de adsorción de 3 horas. |
| Sacarosa 0,5M | $1 \cdot 10^{-1}$ | Típica de proteína y estable (se observa durante horas). Drenaje lento. Anillos amplios. Ver figura 8.4.1. |
| Sacarosa 0,5M | $1 \cdot 10^{-2}$ | Típica de proteína y estable (la vida media es superior a 4 horas). Se observan agregados. Aparición de anillo negro en la periferia que crece de espesor con el tiempo. Ver figura 8.4.2. |
| Sacarosa 0,5M | $1 \cdot 10^{-3}$ | Película típica, con anillos anchos. Inestable, se rompe a los 3 minutos. Ver figura 8.4.2. |
| Sacarosa 0,5M | $1 \cdot 10^{-4}$ | Anillos típicos al comienzo de su formación. Película fluida e inestable (la vida media es inferior a 1 minuto). Ver figura 8.4.2. |

(*) Se entiende por edad de la película el tiempo que transcurre desde que se introduce el sistema en el capilar y su posterior succión y formación de la película (véase apartado 4.2.3, Figura 4.5). Durante este tiempo tiene lugar la adsorción de la BSA sobre la interfase.

Tabla 8.3. Principales características de drenaje de películas mixtas estabilizadas por BSA y Tween 20, sobre la interfase aire-medio acuoso, a 20 °C. Concentración de BSA: $1 \cdot 10^{-1}$ %, en peso.

| SUBFASE | Tween 20 (μ M) | Características de drenaje |
|---------------|---------------------|---|
| Agua | 1 | Típicas de proteína. |
| Agua | 5 | Típicas de películas mixtas en la zona de transición. Película inestable: se rompe frecuentemente. |
| Agua | 7 | Similares a la anterior. |
| Agua | 10 | Típica de lípido. Numerosas manchas que colapsan. Disco central negro en el equilibrio. |
| Etanol 1M | 1 | Película muy fluida. Presencia de agregados (manchas blancas). La estabilidad de la película depende de su edad. Con edad inferior a 20 min. la película se rompe frecuentemente. En películas de mayor edad formación de anillo negro en la periferia que crece en espesor hasta abarcar a toda la película, en el equilibrio. Ver figura 8.5.1. |
| Etanol 1M | 2 | Similares a la anterior. Ver figura 8.5.2. |
| Etanol 1M | 5 | Similares a la anterior. |
| Sacarosa 0,5M | 2 | Drenaje lento. Presencia de muchos agregados. Ver figura 8.6.1. |
| Sacarosa 0,5M | 5 | Similares a la anterior. |
| Sacarosa 0,5M | 7 | Anillos coloreados. Presencia de agregados con una gran segregación interfacial. Ver figura 8.6.2. |
| Sacarosa 0,5M | 10 | Típica de lípido. Película fluida y estable. Manchas oscuras en la periferia que crecen con el tiempo, hacia el centro de la película. Ver figura 8.6.3. |

disminución del espesor de la película cuando se incrementa la concentración de este último (Wilde y Clark, 1993; Coke et al, 1990; Clark et al, 1990). Además, para una cierta concentración molar, que es típica de ambos componentes, se observa una transición en el comportamiento de drenaje hacia un tipo de drenaje intermedio (Wilde et al, 1993; Clark et al, 1990, Clark, 1995). Este último participa de las características de drenaje típicas de películas de proteínas y de lípidos. Los típicos anillos de Newton se distorsionan una vez que la rígida película de proteína que estabiliza la interfase se hace más fluida. Por lo tanto, puede afirmarse que ocurren importantes cambios en las características de una película delgada cuando se usan lípidos o proteínas como estabilizantes de la misma.

8.2 DIFUSIÓN SUPERFICIAL EN PELÍCULAS DE BSA Y DE TWEEN 20.

La distinción entre los diferentes comportamientos de Tween 20 y de BSA en una película delgada, observados en el apartado anterior a partir de las experiencias de drenaje, puede analizarse, desde un punto de vista cuantitativo, con la determinación del coeficiente de difusión superficial.

En la figura 8.7 se presenta, a título de ejemplo, los resultados obtenidos con las experiencias de FRAP, utilizando BSA y Tween 20 puros, para estabilizar las películas sobre agua. Puede observarse que la película de BSA (Figura 8.7-A), en estas condiciones experimentales, no presenta recuperación de la fluorescencia, durante el tiempo del experimento. Por lo tanto, se le asigna un coeficiente de difusión cero. Por el contrario, el lípido muestra una recuperación completa de la fluorescencia (Figura 8.7-B), durante el tiempo invertido en el experimento, a partir de la cual se determina el coeficiente de difusión superficial, según el procedimiento expuesto en el apartado 4.2.4.

Sin embargo, cuando la película se estabiliza por la mezcla de BSA y Tween 20 las moléculas presentan una gran movilidad en la interfase, como se demuestra por las curvas de FRAP obtenidas (Figuras 8.8 a 8.10). Se incluye en estas figuras la línea continua resultante de aplicar la correlación (ecuación 4.11) a los datos procedentes de las diez medidas realizadas sobre cada una de las muestras, así como la línea base (ruido).

Un resumen de todos los valores del coeficiente de difusión superficial calculados a partir de los datos de FRAP se muestra en la Figura 8.11. De estos resultados se pueden deducir las siguientes consideraciones:

A) Las películas formadas con bajas concentraciones de Tween 20 poseen un coeficiente de difusión superficial nulo, similar al de la BSA pura.

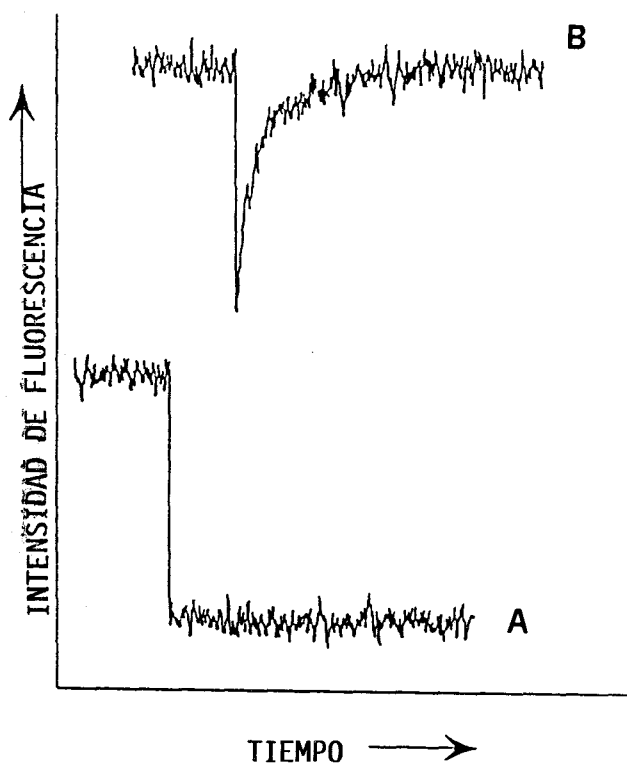


Figura 8.7. *Curvas típicas de FRAP obtenidas con películas delgadas estabilizadas por (A) BSA al 0,1 %, en peso, y por (B) Tween 20 (10 μ M), sobre disolución acuosa. Temperatura: 20 °C, pH = 7, fuerza iónica: 0,05M.*

B) Para cada sistema, dependiendo de la composición del medio acuoso, existe una concentración crítica de lípido, en la mezcla BSA-Tween 20, a partir de la cual las moléculas de Tween 20 en la interfase presentan una movilidad detectable. En estos sistemas el coeficiente de difusión superficial adquiere valores superiores a cero.

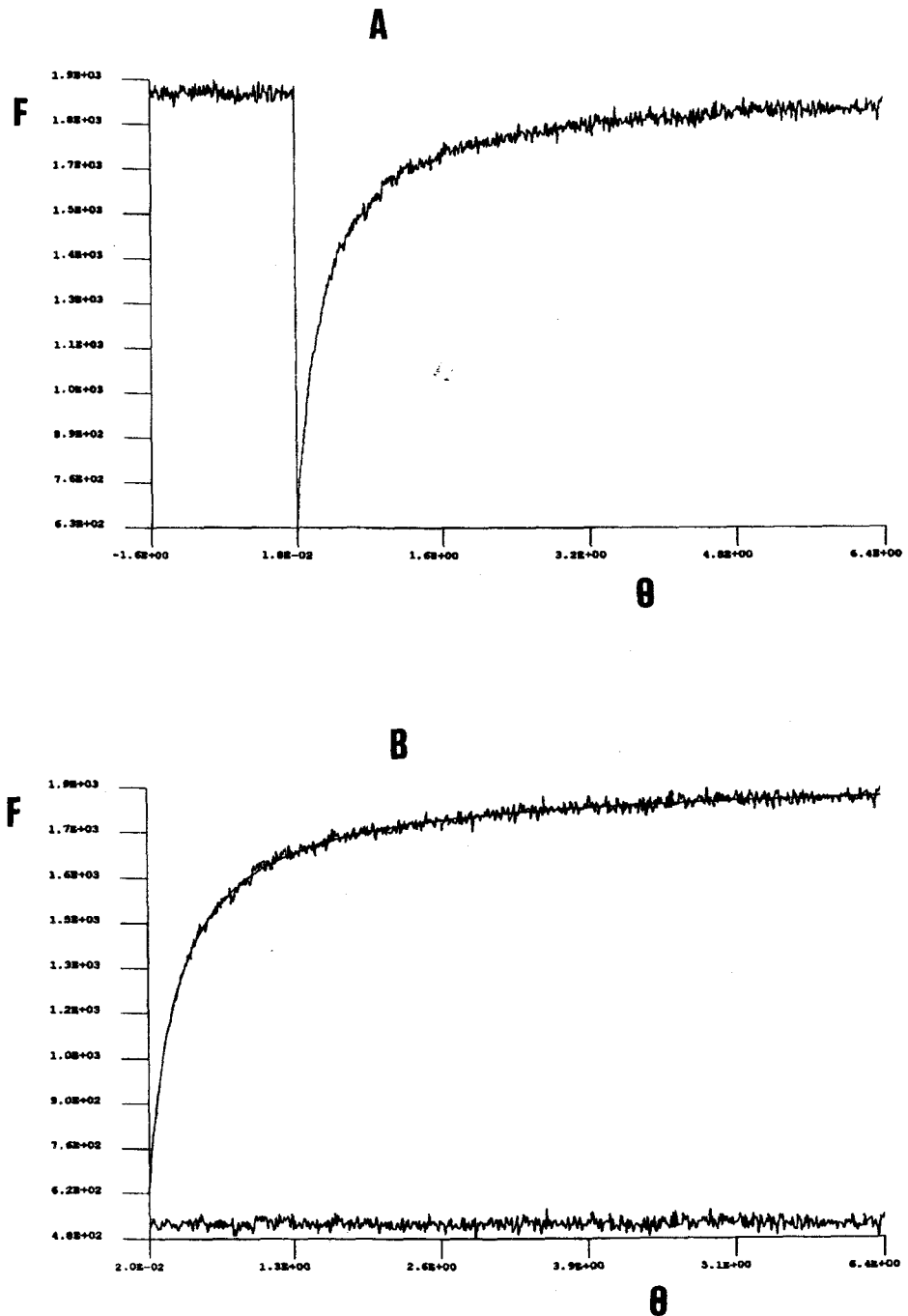


Figura 8.8. Curvas de FRAP obtenidas con películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 %, en peso) y Tween 20 ($15 \mu\text{M}$), sobre agua. Temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, fuerza iónica: $0,05\text{M}$. (A) Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (F: cuentas por canal). (B) La línea continua correlaciona los datos de 10 experiencias, según la ecuación 4.2.4. Se incluye la línea base (ruido).

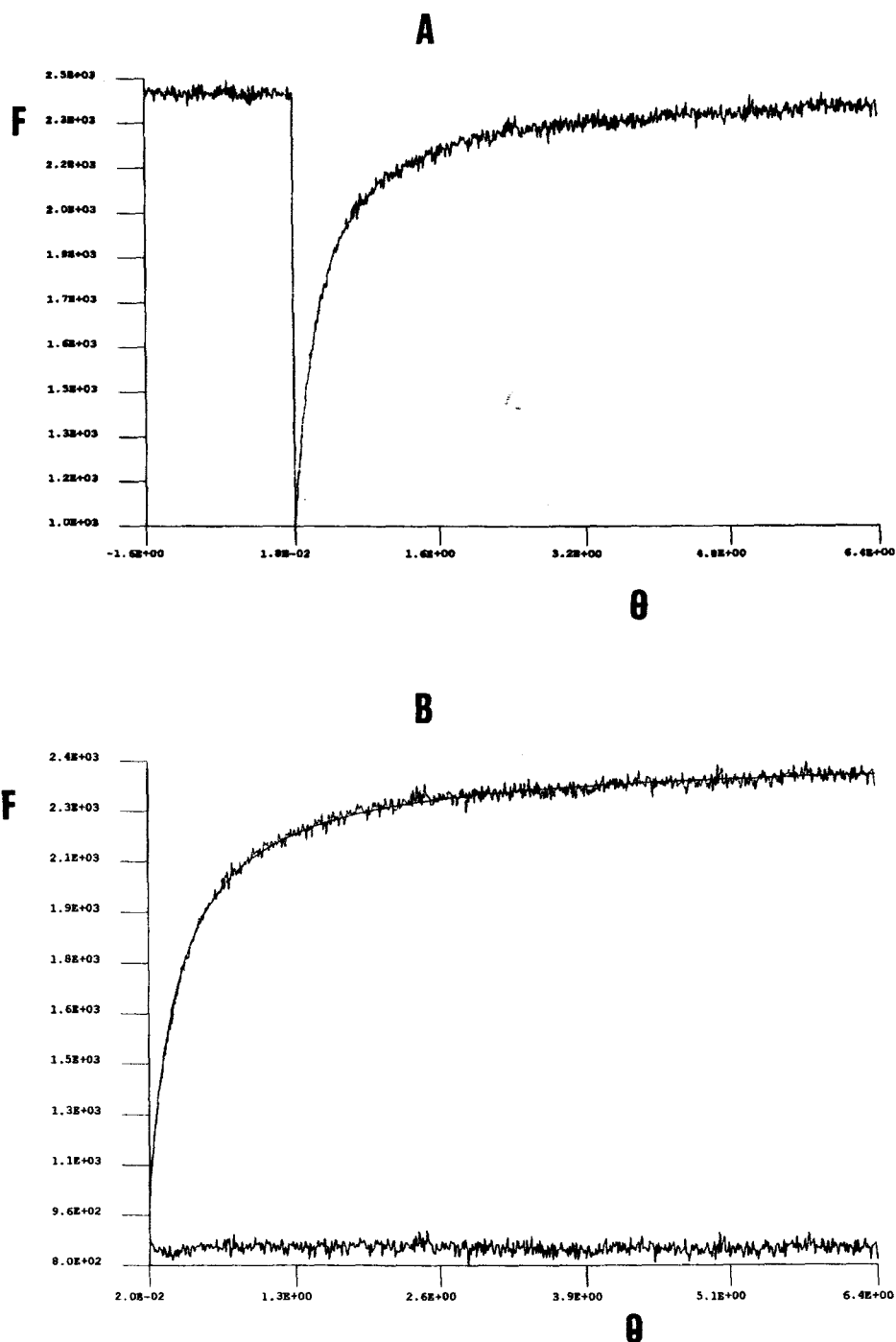


Figura 8.9. Curvas de FRAP obtenidas con películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 %, en peso) y Tween 20 (15 μ M), sobre disolución acuosa de etanol 1 M. Temperatura: 20 $^{\circ}$ C, pH = 7, fuerza iónica: 0,05M. (A) Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (F: cuentas por canal). (B) La línea continua correlaciona los datos de 10 experiencias, según la ecuación 4.2.4. Se incluye la línea base (ruido).

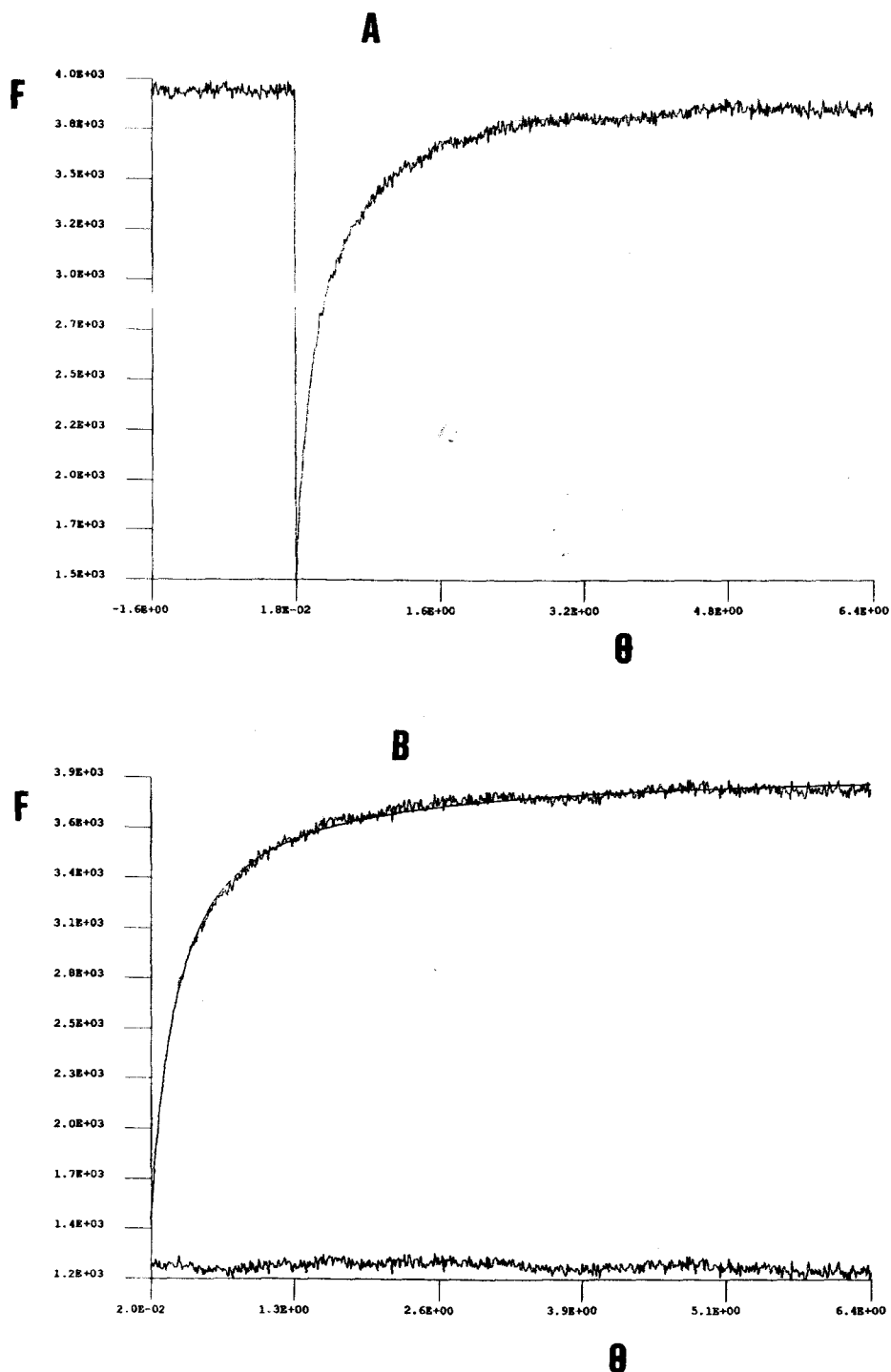


Figura 8.10. Curvas de FRAP obtenidas con películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA (0,1 %, en peso) y Tween 20 ($15 \mu\text{M}$), sobre disolución acuosa de sacarosa 0,5 M. Temperatura: 20°C , $\text{pH} = 7$, fuerza iónica: 0,05M. (A) Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (F: cuentas por canal). (B) La línea continua correlaciona los datos de 10 experiencias, según la ecuación 4.2.4. Se incluye la línea base (ruido).

C) La concentración crítica de Tween 20 a la cual el coeficiente de difusión superficial adquiere valores distintos de cero es similar para las disoluciones de las mezclas de BSA y Tween 20 sobre agua o disoluciones acuosa de etanol 1 M (7 μM), e inferior a la de la disolución acuosa de sacarosa 0'5 M. En este último caso la transición ocurre a una concentración de Tween 20 en la muestra de 10 μM .

D) El coeficiente de difusión superficial sobre disolución acuosa de etanol 0'5 M es dependiente de la edad de la película. Es decir, se requiere un cierto tiempo, antes de la formación de la película, para que el coeficiente de difusión sea mensurable. A tiempos inferiores, tras la formación de la película, su fluidez es elevada y la misma es inestable. La película se rompe continuamente, lo cual dificulta la realización de la medida. Esta dependencia de la edad de la película se observó también en las experiencias de drenaje, con los mismos sistemas, analizadas en el apartado anterior.

E) Existe un máximo en los valores del coeficiente de difusión superficial, sobre disolución acuosa de etanol 1 M. Este valor máximo se observa a una concentración de Tween 20 en la mezcla de ambos emulsionantes de 10 μM .

F) A la mayor concentración estudiada de Tween 20 (20 μM) el coeficiente de difusión molecular es prácticamente independiente de la composición de la fase acuosa. Como se observa en la Figura 8.8, el valor del coeficiente de difusión superficial es prácticamente el mismo sobre agua que sobre disoluciones acuosas de etanol 1 M o sacarosa 0'5 M.

Los resultados obtenidos sobre el coeficiente de difusión superficial confirman que se puede distinguir, desde un punto de vista cuantitativo, cual es el comportamiento que prevalece cuando existe una mezcla de BSA y Tween 20 adsorbidos sobre la interfase. En efecto, puesto que la principal diferencia entre las películas estabilizadas por proteínas y por lípidos de bajo peso molecular es su

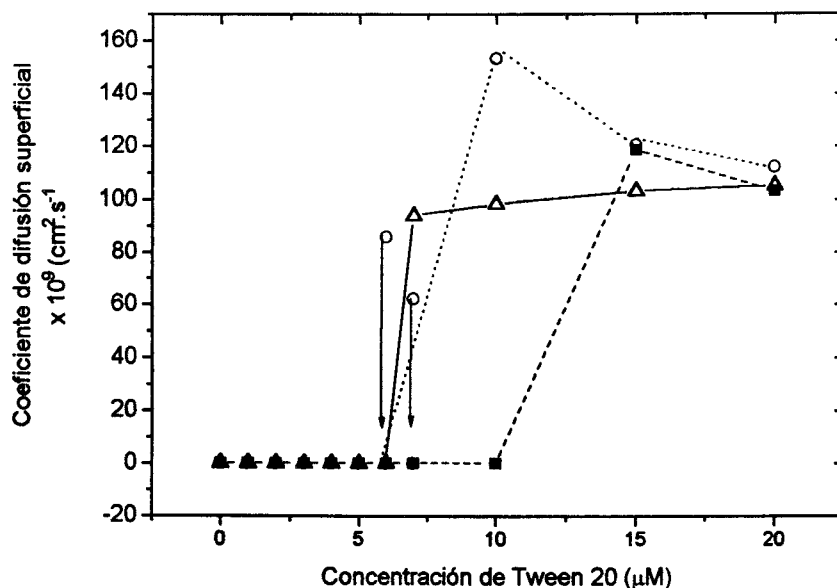


Figura 8.11. Dependencia con la concentración de Tween 20 del coeficiente de difusión superficial de 5-N-(octadecanoyl)aminofluoresceína en una película delgada estabilizada por la mezcla de BSA (0,1 %, en peso) y Tween 20, sobre agua (Δ) y disoluciones acuosas de etanol 1 M (\circ) y de sacarosa 0,5 M (\blacksquare).

diferente movilidad interfacial, puede tomarse el valor del coeficiente de difusión superficial como criterio para diferenciar el comportamiento dominante en la interfase, cuando existe una mezcla de BSA y Tween 20. Así, las películas mixtas que presentan un coeficiente de difusión nulo poseen un comportamiento interfacial similar al de las proteínas puras, mientras que el comportamiento del

Tween 20 predomina en la interfase cuando el valor del coeficiente de difusión es superior a cero. En otras palabras, los resultados obtenidos sobre el coeficiente de difusión superficial permiten confirmar cuantitativamente las conclusiones que se derivan de los datos obtenidos a partir de las experiencias de drenaje de películas delgadas.

8.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La movilidad de películas líquidas delgadas (drenaje y difusión superficial) formadas por BSA y sus mezclas con Tween 20, sobre agua y disoluciones acuosas de etanol 1M o de sacarosa 0,5 M, depende de las composiciones de la interfase (relación BSA-Tween 20) y de la fase acuosa. Estas dependencias son de importancia práctica debido a que la mayoría de las formulaciones alimentarias contienen lípidos y proteínas como emulsionantes, además de solutos en la fase acuosa -- tales como etanol (bebidas alcohólicas, productos de panadería y bollería, etc.) o sacarosa (cremas alcohólicas, helados, productos de panadería y de bollería, etc.).

A partir de los resultados que se representan en la Figura 8.11 se puede afirmar que la concentración crítica de Tween 20, en su mezcla con BSA al 0'1%, a partir de la cual predomina el comportamiento de lípido en la película mixta interfacial es similar para agua o disolución acuosa de etanol 1 M. El valor de esta concentración crítica de Tween 20 en la mezcla de ambos emulsionantes es de 7 μM .

Sin embargo, las películas mixtas de Tween 20 y de BSA adsorbidas desde la disolución alcohólica son inestables y su coeficiente de difusión es dependiente del tiempo. Desde un punto de vista práctico se puede afirmar que la formación de películas requiere un tiempo mínimo, para que las especies superficialmente activas puedan adsorberse sobre la interfase. Estos resultados son concordantes con los obtenidos sobre la adsorción de BSA sobre disoluciones alcohólicas, discutidos en los capítulos 5 y 7. Como se sabe, las moléculas de etanol pueden interactuar con las del lípido y las de la proteína, tanto en la interfase como en el seno de la fase.

Las técnicas de drenaje y de FRAP proporcionan datos complementarios relacionados con el comportamiento de películas delgadas. Bajo condiciones en las que las interacciones proteína-proteína son relevantes no se detecta la existencia de difusión en la película (Figura 8.11). Estas películas muestran también una serie de anillos concéntricos, blancos, negros y coloreados (anillos de Newton), que se transforman en un círculo negro cuando progresa el drenaje (Figura 8.1, tablas 8.2 y 8.3), aunque este proceso es muy lento. En contraste, cuando prevalece el Tween 20 en la estabilización de la película, el drenaje se caracteriza por un rápido movimiento de regiones de diferentes colores y espesores (Figura 8.1, tablas 8.1 y 8.3). Durante este proceso, la película se hace más delgada, hasta que se alcanza un espesor crítico, a partir del cual o bien se rompe o forma una película estable más delgada. Esta película, en el equilibrio, muestra un coeficiente de difusión mensurable (Figura 8.11).

De acuerdo con la teoría de estabilidad coloidal (teoría DLVO), los principales factores responsables del drenaje y estabilidad de una película son la succión capilar en los bordes de Plateau, las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostáticas. La presión capilar y las fuerzas de van der Waals crean una diferencia de presión entre la película y el seno de la fase, causando el drenaje del líquido hacia el exterior. La rotura de la película se puede producir una vez que se alcanza el espesor crítico (Kruglyakov, 1988; Scheludko, 1967; Vrij, 1966). Sin embargo, la rotura puede no producirse cuando la película es termodinámicamente estable, con un espesor mayor que el crítico, o cuando la película puede existir en forma estable con un espesor inferior al crítico.

Es conocido (Rao et al, 1982) que el espesor crítico decrece cuando se incrementa la concentración de tensioactivo y alcanza un valor constante cerca de la concentración micelar crítica (CMC). No obstante, a bajas concentraciones de tensioactivo la película puede romperse con un espesor superior al crítico. Cuando la concentración de tensioactivo se incrementa, la película drena hasta que se forma

una de menor espesor antes de que se produzca su ruptura y pueda observarse la formación de manchas negras sobre la superficie (Manev et al, 1974). Estos datos de la bibliografía están de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos de estabilidad de películas delgadas de Tween 20, en función de la concentración del mismo y de la composición del medio acuoso (tabla 8.1).

8.3.1. Películas delgadas estabilizadas por Tween 20.

Sobre agua (tabla 8.1), bajo la concentración micelar crítica (CMC) del Tween 20 el drenaje del líquido en la película es rápido y la película es inestable (la película se rompe tras su formación). A valores de la concentración superiores a la CMC, la película puede estar saturada por el Tween 20, debido a que tanto los monómeros como las micelas se difunden hacia la interfase, lo cual causa una reducción de la velocidad de drenaje y el incremento de la estabilidad de la película.

El comportamiento de las películas delgadas estabilizadas por Tween 20, sobre disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa, es algo diferente (tabla 8.1). La mayor movilidad y estabilidad de la película y la posterior unión de las manchas negras para formar una película negra en el equilibrio, antes de que se produzca su ruptura, puede estar relacionada con las interacciones etanol-Tween 20 y sacarosa-Tween 20 en la interfase y en el seno de la fase. Las interacciones lípido-soluto podrían hacer disminuir las interacciones lípido-lípido, como se ha deducido a partir de experiencias en balanza de superficie con lípidos polares sobre la interfase aire-medio acuoso (Rodríguez Patino et al, 1992a y 1992b, Fuente y Rodríguez Patino, 1995 y 1996, Ruiz y Rodríguez Patino, 1996). En estos sistemas, la película adelgaza lentamente hasta su espesor crítico, para, a continuación, romperse o formar una película más delgada y estable, como consecuencia de una transición en la misma, lo cual está de acuerdo con lo observado por Rao et al (1980).

8.3.2. Películas delgadas estabilizadas por BSA.

La dependencia con la concentración de BSA de las características de drenaje de películas delgadas (movilidad y estabilidad) es también evidente en los datos experimentales obtenidos (tabla 8.2). En efecto, sobre agua y disolución acuosa de etanol 1 M y de sacarosa 0,5 M, se necesita una concentración de BSA superior a la requerida para la saturación de la monocapa (véase apartado 5.4.1) para obtener la típica película estable de una proteína. Por encima de esta concentración de BSA -- que está comprendida entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ %, en peso -- las interacciones proteína-proteína en la capa adsorbida son máximas. Como resultado de estas interacciones se puede alcanzar una estructura de la capa adsorbida como la de un gel (Prins et al, 1995), o incluso puede tener lugar la formación de multicapas. Ambos fenómenos podrían justificarse por el marcado incremento de la viscoelasticidad de la película, observada en experiencias previas (véase capítulo 7).

8.3.3. Películas delgadas estabilizadas por la mezcla de BSA y Tween 20.

En las películas mixtas BSA-Tween 20, las características de drenaje (Figura 8.1, tabla 8.3) y la difusión superficial (Figura 8.11) son diferentes de las observadas con las películas estabilizadas por cualquiera de los dos emulsionantes por separado. De los datos obtenidos se deduce que el comportamiento de estas películas depende de la composición de la interfase y del medio acuoso.

Según lo admitido en distintos apartados de esta Memoria, y de acuerdo con los diversos resultados obtenidos, la BSA y el Tween 20 pueden interactuar entre sí, en la interfase y en el seno de la fase, como sucede con otros lípidos y proteínas (Cornell y Carroll, 1985; Erickson y Hegg, 1985; MacRitchie, 1978; Tanford, 1962; Wüstneck et al, 1988). En general, los lípidos y las proteínas

pueden interactuar en la interfase mediante la formación de complejos o por mecanismos de sustitución, dependiendo de las interacciones del lípido con la interfase y de los enlaces lípido-proteína. Sin embargo, estas interacciones son difíciles de cuantificar directamente en el laboratorio debido a su complejidad. Como consecuencia de estas interacciones, pueden verse afectadas las propiedades de la capa adsorbida en la interfase aire-agua o aceite-agua, lo cual puede repercutir sobre la estabilidad de una emulsión o una espuma (Chen y Dickinson, 1995a-c).

Mediante el análisis de los datos obtenidos en este capítulo, y de su comparación con los datos obtenidos en capítulos previos, relativos al uso de la tensiometría (capítulo 6) y a las características viscoelásticas (capítulo 7) de las películas mixtas BSA-Tween 20, adsorbidas sobre los mismos medios acuosos, permite deducir que la concentración de Tween 20 a la cual tiene lugar una transición en las características de drenaje y en la movilidad de la película, es coincidente con aquella a la que el módulo dilatacional superficial tiende a un valor máximo y constante. Esta transición ocurre, pues, a una concentración de Tween 20 próxima a su CMC en el medio.

8.3.4. Efecto de la composición del medio acuoso

Los resultados obtenidos en este apartado apoyan la hipótesis de que las interacciones lípido-proteína dependen, además de la relación ambas especies, de la composición del medio acuoso (en este estudio, de la presencia de etanol o de sacarosa en la subfase). El efecto del etanol, reduciendo la tensión superficial del agua, es una indicación de que este soluto puede estar presente en el seno de la fase acuosa y también en la interfase (en una mayor concentración). Además, el etanol tiene la capacidad de actuar como agente desnaturizante de la proteína (Tanford, 1962). Ambos fenómenos pueden causar una reducción de las

interacciones proteína-proteína sobre la interfase, lo que estaría de acuerdo con la mayor fluidez de la película observada a partir de los datos de drenaje (tablas 8.1 a 8.3, figuras 8.2 y 8.5), y con el elevado coeficiente de difusión superficial (Figura 8.11). Las propiedades reológicas superficiales de estas películas mixtas (apartado 7.3.3) proporcionan una evidencia adicional, que permite soportar esta hipótesis. En efecto, la fluidez y movilidad de la película, deducidas a partir de los datos obtenidos por aplicación de las técnicas de drenaje y de FRAP, se correlacionan con una reducción de la viscoelasticidad de la película, por la adición del etanol a la subfase.

Desde otro punto de vista, el efecto desnaturalizante del etanol sobre la proteína, podría producir un descenso en su solubilidad, lo cual puede repercutir negativamente sobre la estabilidad de la película, como se ha observado en los datos obtenidos en este capítulo (figuras 8.2 y 8.5, y tablas 8.2 y 8.3). Sin embargo, si el etanol actúa como un agente estabilizante para las proteínas (Brands y Hunt, 1967), el estado nativo de la proteína podría estar presente sobre la interfase, lo cual estaría de acuerdo con la apariencia de la película, deducida a partir de las experiencias de drenaje (Figuras 8.2 y 8.5), a concentraciones de Tween 20 superiores a la correspondiente a la transición. Finalmente, la influencia de la edad de la película en el comportamiento de la misma -- observada en las experiencias de drenaje (tablas 8.2 y 8.5) y de FRAP (Figura 8.11) -- podría deberse a la adsorción competitiva de las moléculas de etanol, Tween 20 y BSA sobre la interfase. Este fenómeno se discute en los capítulos 5, 6 y 7.

La adición de sacarosa al agua incrementa el valor de la tensión superficial (Tabla 5.1), lo que indica que este soluto no tiene tendencia a adsorberse sobre superficie del agua. Esto también indica que existe una mayor fuerza cohesiva entre las moléculas del agua y que la sacarosa es excluida de los dominios inmediatos de la proteína en la disolución (Crowe et al, 1987; Lee y Timasheff, 1981). Es decir, cuando la sacarosa está presente en el medio acuoso, la proteína estará

preferentemente hidratada. Debido a ello, se ha sugerido en apartados previos (capítulos 5, 6 y 7) que si la sacarosa limita la desnaturalización de la proteína y/o las interacciones proteína-proteína, la reducción en la agregación de la proteína permitirá la presencia de más proteína sobre la interfase. Como una consecuencia de este efecto; primero, se incrementa la estabilidad de la película delgada (tabla 8.1 a 8.3), lo cual podría atribuirse a la mayor viscosidad del seno de la fase acuosa por la presencia de la sacarosa. Segundo, decrecen las interacciones lípido-proteína sobre la interfase, lo cual está de acuerdo con la apariencia de la película delgada -- estas películas se caracterizan por su alto grado de segregación (Figuras 8.3 y 8.6). Es posible que la proteína nativa y el Tween 20 puedan estar presentes sobre la interfase, pero como una película mixta inmiscible. La hipótesis de la presencia de la proteína nativa sobre la interfase podría soportarse por su elevada velocidad de adsorción en presencia de sacarosa (capítulo 5). La menor viscoelasticidad superficial, observada en estas películas (apartado 7), está también de acuerdo con una reducción de las interacciones proteína-proteína en la capa adsorbida. Tercero, es necesaria una mayor concentración de Tween 20 para desplazar a la BSA desde la interfase, de acuerdo con los datos de difusión superficial (Figura 8.11). Es decir, en presencia de sacarosa, la BSA tiene tendencia a estar presente en la interfase, preferentemente.

Claramente, la composición interfacial no es el único parámetro que puede ejercer influencia sobre las características de las películas delgadas, tales como el drenaje y el coeficiente de difusión lateral. Este estudio ha puesto de manifiesto que existen complicados mecanismos en la formación y estabilidad de estas películas mixtas, que dependen de las interacciones entre moléculas en la película y de las interacciones película-soluto en el medio acuoso. La existencia de estas interacciones sobre la interfase y sus proximidades ejercen también su influencia sobre las características reológicas y sobre la estructura de las películas mixtas lípido-proteína, que son importantes para la formación y estabilidad de una

emulsión (Chen y Dickinson, 1995a-c) o de una espuma (Clark, 1995, Bos et al, 1996; Rodríguez Patino et al, 1996).

9. CONSIDERACIONES FINALES

9. CONSIDERACIONES FINALES.

El estudio de los coloides alimentarios puede considerarse como el estudio físico-químico de los alimentos, observados como un conjunto de partículas dispersas y macromoléculas en varios estados de organización microscópica y sub-microscópica. En el Grupo de Investigación, dentro de cuya programación se ha realizado esta investigación, se tiene como uno de los objetivos el estudio de la estructura y de la estabilidad del sistema, y de la forma en que las especies estabilizantes (tensoactivos, macromoléculas, cristales, hidrocoloides, etc.) están organizadas en la interfase entre la fase dispersa y el medio de dispersión. Por otra parte, se tiene especial interés en el estudio de la química de las pequeñas moléculas (agua, sales, etanol, azúcares, lípidos, etc.) por los efectos que ejercen sobre las interacciones entre las entidades dispersas (macromoléculas, gotas líquidas, burbujas gaseosas, partículas, etc.) y, consecuentemente, sobre su estado de agregación. El conocimiento de las características de la película interfacial -- tales como estructura, estabilidad, velocidad de formación, presión superficial, propiedades mecánicas, movilidad, etc. -- es de importancia práctica, dado que la utilidad del emulsionante y las propiedades del producto final son muy dependientes de las citadas características estructurales.

9.1. ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

Debido a que la aplicación de los emulsionantes tienen lugar, en la mayoría de los casos (especialmente en emulsificación y espumación), bajo condiciones no estacionarias, las propiedades dinámicas son de especial importancia. Uno de los objetivos de este trabajo se ha centrado en el estudio de la tensión superficial, bajo condiciones dinámicas y estáticas, de disoluciones de una proteína (BSA), de interés para las formulaciones alimentarias. Como variables de estudio se han analizado el efecto de la temperatura, de la concentración de proteína y de la presencia de solutos en el seno de la fase acuosa sobre las propiedades superficiales de la BSA, en la interfase aire-medio acuoso.

La complejidad del estudio del efecto de los solutos en el seno de la fase acuosa sobre la velocidad de incremento de la presión superficial -- una medida de la velocidad con la que la BSA se adsorbe y modifica su conformación sobre la interfase -- es debido al hecho de que las tres etapas asociadas con la adsorción de la proteína (difusión, penetración y reorganización de las moléculas adsorbidas) pueden ser procesos consecutivos o concurrentes, lo que al mismo tiempo depende del tipo de soluto presente en el seno de la fase. Además, puede producirse una parcial reorganización/desorganización de las moléculas de proteína, como consecuencia de los solutos presentes en la fase acuosa.

Según los resultados obtenidos (capítulos 5 y 7) se puede afirmar que la velocidad de adsorción de la BSA se incrementa con la temperatura y con la concentración de la proteína en el medio acuoso (apartado 5.1.2). La velocidad de adsorción de BSA es mayor en presencia de sacarosa (apartado 5.1.4) y se reduce significativamente en el seno de disoluciones acuosas de etanol (apartado 5.1.3). La

incidencia de las variables estudiadas sobre la velocidad de adsorción de BSA afecta tanto al proceso global (apartado 5.1), como a la etapa inicial de difusión (apartado 5.2).

Independientemente de la concentración del medio acuoso (disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa), la velocidad de adsorción de la BSA se favorece por la convección en la interfase y en el seno de la fase, que se origina por la agitación del sistema (apartado 5.3).

La adsorción de la BSA sobre la interfase aire-medio acuoso confiere a la película unas propiedades reológicas particulares, que dependen de la composición del medio acuoso (capítulo 7). En efecto, durante la adsorción de la proteína se produce un incremento significativo del módulo dilatacional superficial, en el mismo sentido que lo hace la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase. De nuevo, la presencia de etanol o sacarosa en el medio acuoso confiere características reológicas diferentes a la película de BSA adsorbida. En efecto, los resultados obtenidos sobre las características reológicas superficiales de las películas de BSA, muestran que la presencia de etanol en el medio acuoso produce una disminución significativa del módulo dilatacional superficial (apartado 7.2.1) -- que puede ser total a las mayores concentraciones de este reactivo en el medio acuoso (2M) --, mientras que la presencia de sacarosa en el medio acuoso (apartado 7.2.2), o bien no ejerce una influencia significativa o bien solo produce una moderada disminución del módulo dilatacional superficial, a la mayor concentración estudiada (1M).

La formación de una película de proteína en el equilibrio y sus características superficiales depende también de la composición del medio acuoso (apartado 5.4). En efecto, la formación de una película en el equilibrio se encuentra favorecida en

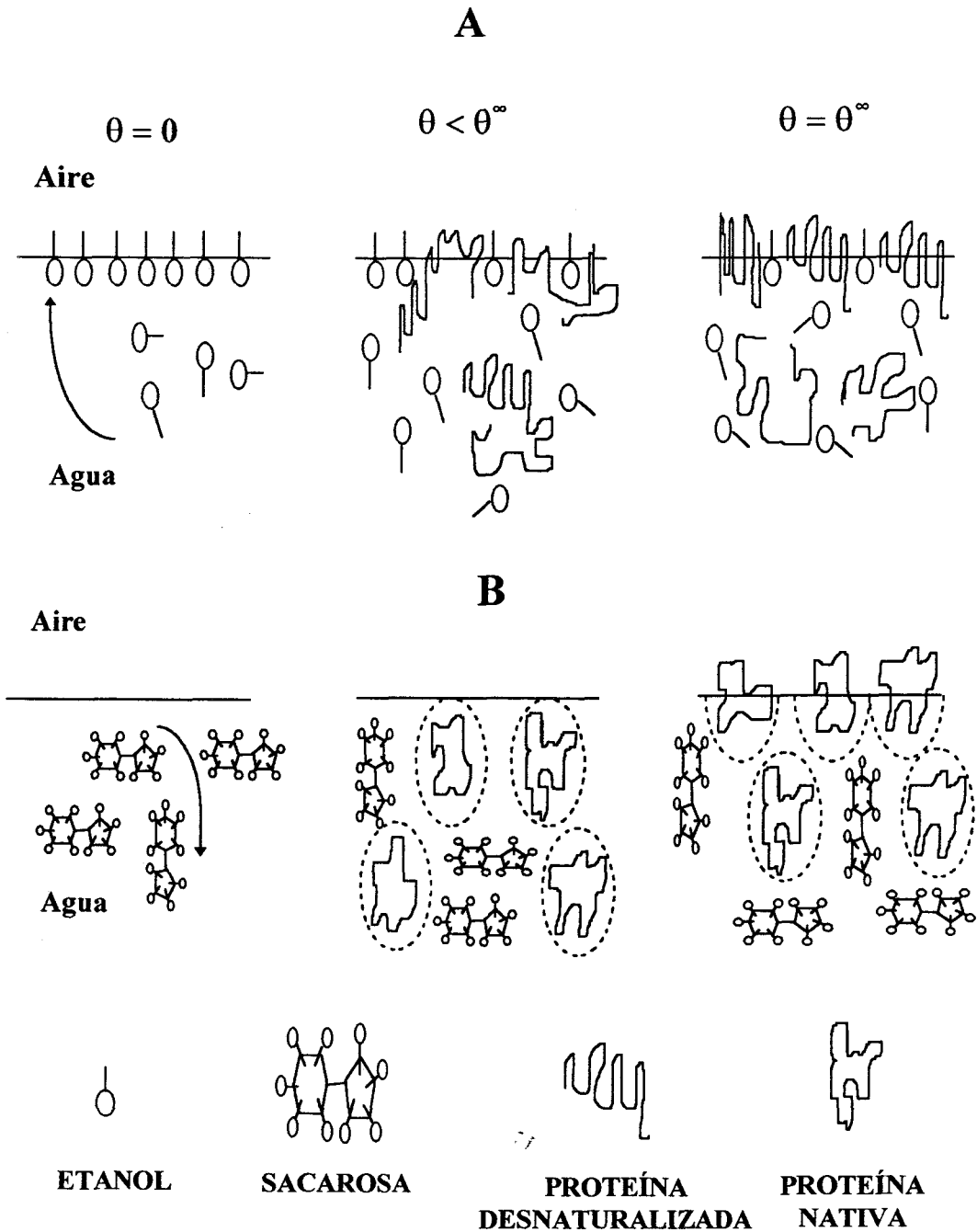


Figura 9.1. Modelos propuestos para la formación de una película de BSA sobre la interfase aire-medio acuoso, en función de la composición del medio (disolución acuosa de etanol o de sacarosa). Para una explicación ver el texto.

presencia de sacarosa, y se dificulta cuando en el medio acuoso está presente el etanol. Además, la presión superficial (actividad superficial) de la película de BSA decrece en el sentido de disolución acuosa de SACAROSA → AGUA → disolución acuosa de ETANOL. Es decir, la presión superficial de la película de BSA sobre una disolución acuosa de sacarosa es superior que sobre una disolución acuosa de etanol.

Como se ha discutido en los capítulos 5 y 7, la BSA puede adsorberse parcialmente desnaturalizada (por la presencia de etanol), o estabilizada (por la presencia de sacarosa). Estos fenómenos pueden visualizarse en los modelos que se presentan en la figura 9.1. Puede observarse que cuando existe etanol en el medio acuoso (Figura 9.1-A), debido a su carácter tensioactivo tiene tendencia a adsorberse sobre la interfase, con una mayor concentración superficial que la que corresponde al seno de la fase, y tanto mayor cuanto mayor sea su concentración en el medio acuoso. Por lo tanto las moléculas de BSA han de competir por la interfase con las de etanol. El resultado de esta competencia dependerá de la concentración relativa etanol-BSA en el sistema. Cuando la concentración del etanol es elevada, en relación a la de BSA, se frena la velocidad de adsorción de la proteína -- lo que explicaría la existencia de un periodo de inducción en estas condiciones -- y se dificulta la formación de una película de BSA -- como se ha observado a partir de las experiencias de adsorción en el equilibrio (apartado 5.4.1) y, especialmente, como se deduce de la drástica reducción del módulo dilatacional superficial (apartado 7.2.1.2). Sin embargo, no se puede descartar que las moléculas de etanol interaccionen con las de BSA en el seno de la fase acuosa y también sobre la interfase, pudiendo dar lugar a una película mixta con unas propiedades superficiales diferentes a las de la BSA pura.

La sacarosa presente en el medio acuoso (Figura 9.1-B), por el contrario, no tiene afinidad por la interfase, como se deduce del valor de la tensión superficial (mayor

que la del agua a la misma temperatura: tabla 5.1). Es decir, como consecuencia de su capacidad de estructurar las moléculas de agua, la tensión superficial de las disoluciones acuosas de sacarosa aumenta. El resultado es que la sacarosa puede limitar la desnaturalización de la proteína y las interacciones proteína-proteína. Como una consecuencia de este efecto se incrementaría la velocidad global de adsorción de la BSA (apartado 5.1.4) y se reduciría el módulo dilatacional superficial, especialmente a las mayores concentraciones de este reactivo en el medio acuoso (apartado 7.2.2)

Sin embargo, el mecanismo o mecanismos exactos, mediante los cuales un soluto estabiliza o desestabiliza a las moléculas de proteína no es conocido en la actualidad. Por lo tanto, la discusión de los efectos de los solutos presentes en el seno de la fase acuosa sobre la adsorción de las proteínas en la interfase aire-medio acuoso únicamente puede ser provisional en el presente. Según el modelo molecular propuesto (figura 9.1), se admite, sobre la base de la información bibliográfica consultada, que el etanol tiene la capacidad de desnaturalizar a la proteína en disolución, y posiblemente también sobre la interfase, mientras que la sacarosa potencia la existencia de la proteína en su estado nativo, tanto en el seno de la fase acuosa como sobre la interfase. Las consecuencias de esta hipótesis sobre la formación de una película en el equilibrio, velocidad de formación de la película y sobre las características dilatacionales superficiales estarían de acuerdo, de nuevo, con los resultados experimentales obtenidos (apartados 5.4, 5.1 y 7.2, respectivamente).

9.2. INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA

En este estudio, las interacciones lípido-proteína en la interfase aire-medio acuoso se han analizado sobre la base de los datos obtenidos por aplicación de diversas técnicas experimentales complementarias, tales como tensiometría (capítulo 6), reología superficial (apartado 7.3) y drenaje y difusión en películas delgadas (capítulo 8).

Independientemente del método experimental utilizado se ha podido deducir que las interacciones lípido-proteína y sus consecuencias sobre las propiedades de la película dependen de la relación lípido-proteína, del tipo de lípido -- sea este soluble (Tween 20) o insoluble (monoestearina y monooleína) en el medio acuoso -- y de la composición del medio acuoso -- disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa.

En general, el comportamiento de la película mixta coincidirá con el de cualquiera de los componentes puros en las regiones extremas de composiciones. Es decir, la tensión superficial de la película mixta (y por lo tanto, su actividad superficial) se asemeja a la de la BSA a las mayores concentraciones relativas de este emulsionante en la mezcla, mientras que para las menores concentraciones relativas de BSA en la mezcla predomina el comportamiento del lípido, sea este soluble (Tween 20) o insoluble (monoestearina o monooleína) (capítulo 6). La delimitación de estos comportamientos ha podido ser cuantificada a partir de las propiedades superficiales de la película. En efecto, en el caso de la proteína la isoterma de adsorción puede ser de gran utilidad en este estudio. Se ha observado que predomina el comportamiento de la BSA, en la mezcla con los lípidos, a las mayores concentraciones relativas de la proteína y siempre que se ha superado su concentración de saturación de la película, lo que se detecta por la presencia de una meseta en la isoterma de adsorción. En el caso de los lípidos estudiados, ha resultado ser de gran utilidad el disponer del dato de la

concentración micelar crítica (CMC), en el caso de un lípido soluble (Tween 20), o de los datos de la presión de esparcimiento en el equilibrio (Π_e), en el caso de los lípidos insolubles (monoestearina y monooleína).

En el caso concreto de las películas mixtas BSA-Tween 20 (apartado 6.3), para una composición constante de BSA en el medio acuoso de 0'1% en peso, predomina el comportamiento del lípido a concentraciones en el medio acuoso (agua o disoluciones acuosas de etanol o sacarosa) iguales o superiores al valor de la concentración micelar crítica, mientras que este comportamiento se aproxima al de la BSA a las concentraciones de Tween 20 de al menos dos órdenes de magnitud inferiores a la CMC.

En el caso de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína (apartado 6.2), para una concentración fija de lípido esparcido sobre la interfase (de 11,9 y 8,9 moléculas.nm², para monoestearina y monooleína, respectivamente, muy superior a las correspondientes al colapso de las monocapas), el comportamiento de la película mixta se asemeja al de la proteína una vez que se satura la película por la BSA (sobrepasada la meseta de la isoterma de adsorción), o bien se asemeja al del lípido puro a las mayores concentraciones relativas de este en la mezcla, a las cuales la presión superficial de la mezcla se aproxima al valor de la presión de esparcimiento en el equilibrio del lípido.

La existencia de interacciones entre los componentes de la mezcla se ponen de manifiesto en la zona intermedia de composiciones relativas, como se deduce a partir del cruce de las líneas que correlacionan la variación de la tensión superficial con la composición de Tween 20, en ausencia o en presencia de BSA en el sistema. En el caso de las mezclas de la BSA con lípidos insolubles, estas interacciones se producen en la

zona de composiciones delimitadas por los valores de la presión superficial correspondiente a la Π_e del lípido y a la presión de saturación de la película por la proteína (superado el valor de la concentración correspondiente a la presencia de una meseta en la isoterma de adsorción).

El análisis de estas interacciones -- en el caso concreto de las películas mixtas de la BSA con un lípido insoluble -- y de sus consecuencias sobre las propiedades de la película puede facilitarse con la ayuda de los modelos que se proponen en las figuras 9.2 y 9.3, relativos a las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, respectivamente, en función de la composición del medio acuoso y de la concentración del lípido esparcido sobre la interfase.

Para analizar el comportamiento diferente de las películas mixtas BSA-monoestearina y BSA-monooleína, es importante tener presente, en primer lugar, el comportamiento interfacial de cada uno de los lípidos por separado y de sus mezclas (apartado 7.1). Las películas de monoestearina (Figura 9.2) presentan una estructura líquido condensada (LC) en el equilibrio (cuyo esquema viene representado en la Figura 9.2-A₁) y cuando colapsan, a las mayores densidades superficiales (coincidiendo con la concentración superficial crítica), forman estructuras cristalinas tridimensionales sobre la interfase (Figura 9.2-A₁), lo que se corresponde con un elevado valor del módulo dilatacional superficial (apartado 7.1.1.1). Por el contrario, las películas de monooleína (Figura 9.3) poseen una estructura líquido expandida (LE) en el equilibrio (Figura 9.3-A₁), lo cual da lugar a una estructura heterogénea en forma de lentes tras el colapso (Figura 9.3-A₁), a las mayores densidades superficiales. Como consecuencia de este comportamiento, la variación de E con la densidad superficial es más compleja, incrementándose con la densidad superficial hasta describir un máximo a la concentración crítica superficial y

Densidad superficial
del lípido →

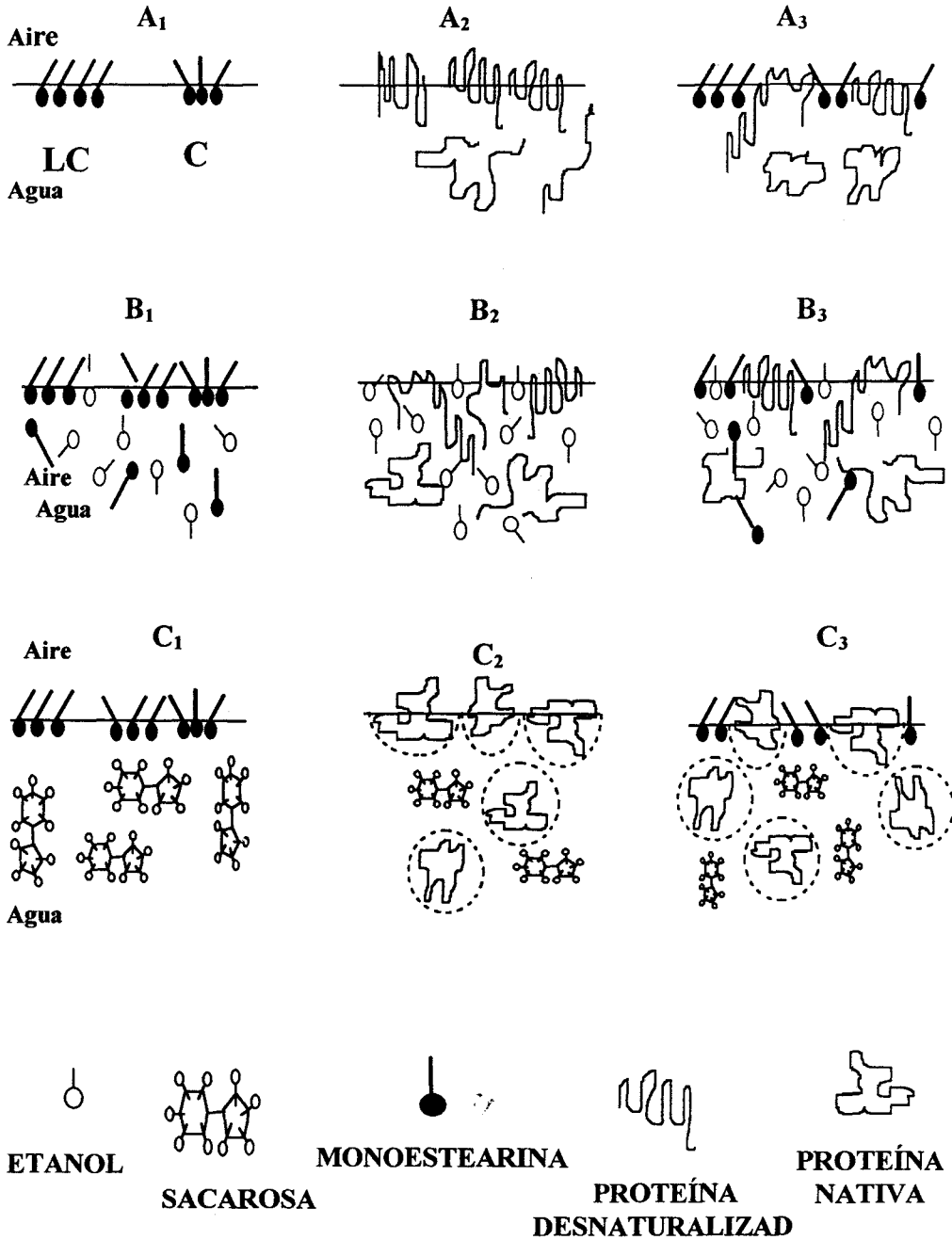


Figura 9.2. Modelos propuestos para la formación de una película mixta BSA-monoestearina sobre la interfase aire-medio acuoso. LC: estructura líquido condensada. C: monocapa colapsada. Para una explicación ver el texto.

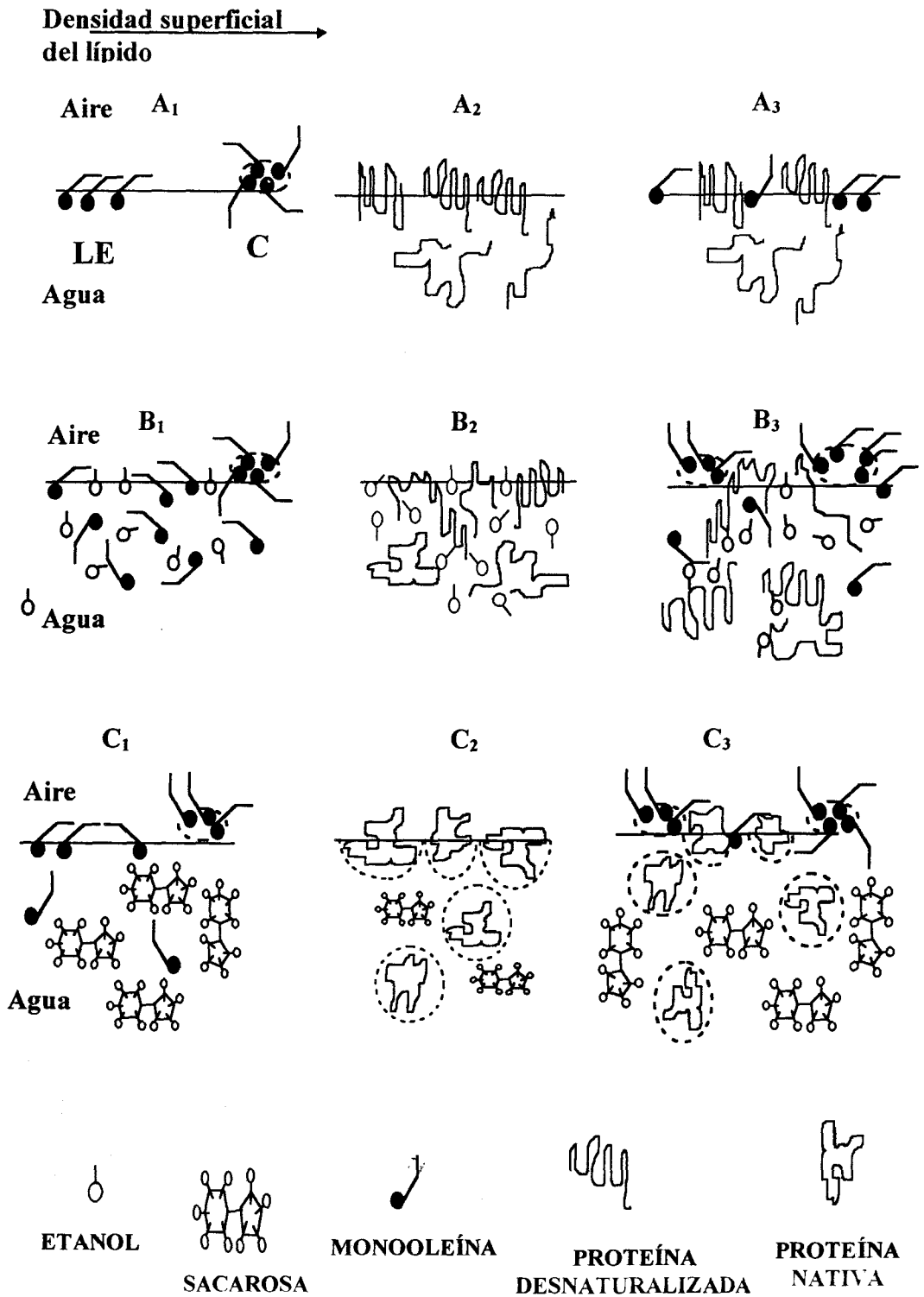


Figura 9.3. Modelos propuestos para la formación de una película mixta BSA-monoleína sobre la interfase aire-medio acuoso. LE: estructura líquido expandida. C: monocapa colapsada. Para una explicación ver el texto.

decrecer a partir de este valor, al aumentar la densidad superficial (apartado 7.1.2.1). Además, y relacionado con las diferentes estructuras, las películas mixtas monoestearina-monooleína son insolubles, lo cual se manifiesta por un valor de E inferior al que se correspondería si la mezcla entre ambos lípidos sobre la interfase fuese ideal (apartado 7.1.4).

En las películas mixtas BSA-monoestearina esparcidas sobre agua (Figura 9.2-A₃) y disoluciones acuosas de etanol (Figura 9.2-B₃) o de sacarosa (Figura 9.2-C₃), el esparcimiento de la monoestearina sobre una la película previamente adsorbida de BSA, produce un desplazamiento inicial de la proteína de la interfase para, seguidamente, interaccionar con el lípido y formar una película mixta (apartados 6.1 y 7.3.1). En estas películas mixtas predomina el comportamiento de la monoestearina al aumentar su concentración relativa. De hecho, se produce un incremento significativo del módulo dilatacional superficial a la concentración superficial crítica de la monoestearina (apartado 7.3.1), formando una meseta a las mayores densidades superficiales, independientemente de la composición del medio acuoso (disoluciones de etanol o de sacarosa). Sin embargo, las consecuencias de este fenómeno, desde un punto de vista práctico, son más importantes en el caso de las películas mixtas esparcidas sobre disoluciones acuosas de etanol, especialmente a las mayores concentraciones de este reactivo. En efecto, la existencia de una película mixta BSA-etanol (Figura 9.2-B₂) da lugar a un muy bajo valor de E , que se incrementa significativamente cuando se supera la concentración superficial crítica de la monoestearina esparcida. La sacarosa, al no poseer afinidad por la interfase (Figura 9.2-C₂), no ejerce una influencia tan negativa sobre el valor de E y, por lo tanto, el aumento porcentual de E en las películas mixtas BSA-monoestearina es menos importante que en caso de las disoluciones acuosas de etanol. No obstante, en ambos

casos el valor final de E se asemeja al de la monoestearina pura, cuando se supera el valor de la concentración superficial crítica.

En el caso de las películas mixtas BSA-monooleína (Figura 9.3), las consecuencias del esparcimiento del lípido sobre una película de BSA previamente adsorbida (apartado 7.3.2), son muy diferentes a las comentadas en el caso anterior, con relación a las películas mixtas BSA-monoestearina. En efecto, el hecho que las moléculas de monooleína formen lentes sobre la interfase, una vez superada la concentración superficial crítica (Figuras 9.3-A₁ , 9.3-B₁ y 9.3-C₁), produce una reducción de las interacciones de los constituyentes de la interfase -- de las moléculas de monooleína entre sí y con la BSA (Figuras 9.3-A₃ , 9.3-B₃ y 9.3-C₃). En consecuencia, la adición de monooleína, incluso a concentraciones superficiales superiores a la concentración superficial crítica, no produce un aumento significativo en los bajos valores de E, que se producen debido a las interacciones de la BSA con el etanol (Figura 9.3-B₂) y con la sacarosa (Figura 9.3-C₂).

En resumen, se puede afirmar que mientras que la monoestearina produce un incremento en el valor de E, tanto mayor cuanto mayor es su concentración en las películas mixtas con BSA, las películas mixtas BSA-monooleína poseen unos valores de E inferiores a las anteriores, sobre los mismos medios acuosos. Además, la presencia de monooleína en su película mixta con BSA no incrementa significativamente los valores de E. Por lo tanto, se puede suponer que las moléculas de monoestearina, por su estructura líquido condensada y por la formación de estructuras cristalinas superficiales tras el colapso, pueden desplazar a la proteína de la interfase, mientras que las moléculas de monooleína, con una estructura más expandida y por la formación de lentes sobre la interfase, pueden formar películas mixtas sobre la interfase, con unas

propiedades reológicas superficiales que son del mismo orden de magnitud que las de los componentes puros.

9.3. MECANISMOS DE ESTABILIDAD DE PELÍCULAS DELGADAS

Como se sabe, la coalescencia es uno de los mecanismos más importantes en el proceso de desestabilización de emulsiones y de espumas. Este proceso comprende la fusión de dos gotitas, en una emulsión, o de burbujas próximas, en el caso de una espuma, por rotura de la delgada película que mantiene separada a las porciones de la fase dispersa. Este fenómeno depende no solo de las características estructurales de la película interfacial, sino también del movimiento relativo de las distintas especies que conforman la película, si bien ambos fenómenos están interrelacionados.

El movimiento relativo de las moléculas de emulsionante que forman la película interfacial puede determinarse, desde un punto de vista cualitativo, mediante microscopía con epi-iluminación, a partir de experiencias de drenaje (apartado 8.1). Esta visión cualitativa del fenómeno ha podido ser complementada, desde un punto de vista cuantitativo, a partir de la medida del coeficiente de difusión superficial (apartado 8.2). De estas experiencias se concluye que las películas formadas por lípidos de bajo peso molecular (Tween 20, en este estudio) son más móviles que las formadas por la acción de proteínas (BSA, en este estudio). En el caso de películas mixtas (BSA-Tween 20), la movilidad superficial es una función de la especie que domina en la interfase que, como se ha observado en las experiencias realizadas, depende de la composición del medio acuoso desde el que se adsorbe el emulsionante (disoluciones acuosas de etanol y de sacarosa).

Estos resultados sugieren que las películas delgadas pueden ser estabilizadas por dos mecanismos, según se esquematiza en la figura 9.4 (Bos et al., 1996, Clark, 1995). Además, el mecanismo que prevalece depende de las composiciones de la interfase y del medio acuoso. Las consecuencias de estos fenómenos pueden ser decisivas, desde un punto de vista práctico.

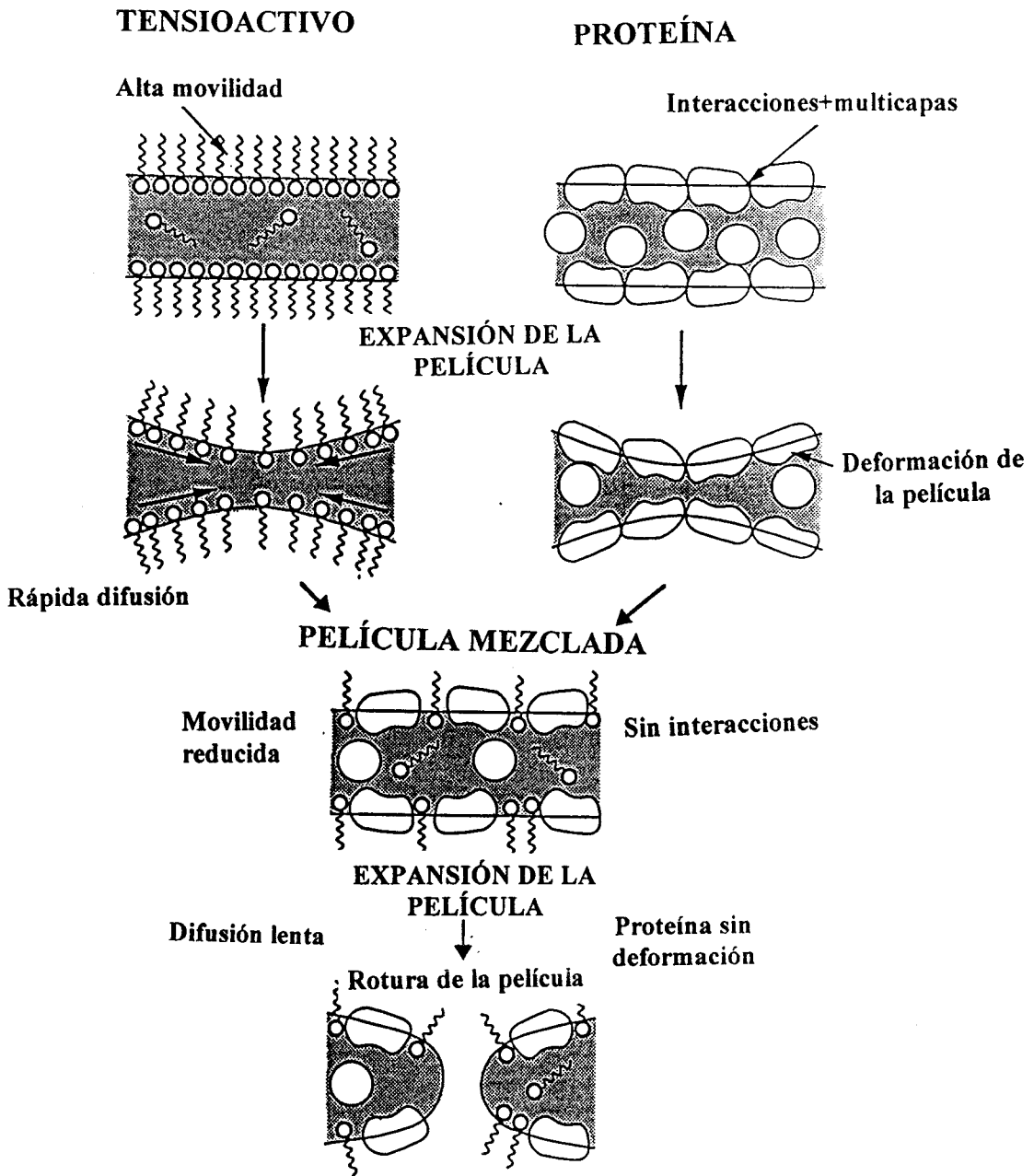


Figura 9.4. Diagrama esquemático mostrando los mecanismos posibles de estabilización de una película delgada. (A) El mecanismo Marangoni en el caso de películas de tensioactivos, (B) El mecanismo viscoelástico, en el caso de películas estabilizadas por proteínas, (C) Inestabilidad en el caso de películas mixtas.

Las películas de tensioactivos de bajo peso molecular pueden ser estabilizadas por el mecanismo de Gibbs-Marangoni (Ewers y Sutherland, 1952). Estas sustancias, entre las que se encuentran la mayoría de los lípidos polares utilizados como emulsionantes alimentarios, se concentran en la interfase y forman una capa fluida adsorbida, a temperaturas superiores a su temperatura de transición (Figura 9.4-A). Cuando el lípido que estabiliza la película es sometido a cualquier perturbación, una expansión (por ejemplo), tiene lugar la formación de un estrechamiento. Este es acompañado por la generación de un gradiente de tensión superficial a través de la región más delgada. La tensión superficial es mayor en la zona más delgada del estrechamiento, debido a que decrece la concentración de emulsionante en esta zona. Para que se recupere el valor de la tensión superficial de equilibrio es necesaria la difusión del tensioactivo hacia la zona más delgada de la película adsorbida. Este fenómeno se conoce a menudo como efecto Marangoni. Para que este mecanismo sea eficaz en la estabilización de películas se requiere una gran movilidad de las moléculas de la película, para restaurar el valor de la tensión superficial de equilibrio, cuando la película se somete a cualquier perturbación.

En contraste, las películas estabilizadas por proteínas se basan en las propiedades viscoelásticas de la película interfacial, debido a que las interacciones entre las moléculas de proteína adsorbidas sobre la interfase pueden disipar el efecto de cualquier perturbación de la película (Halling, 1981). Este mecanismo requiere, pues, la inmovilidad de las moléculas sobre la interfase (Figura 9.4-B).

La inestabilidad de la película puede surgir cuando ambas especies están presentes sobre la interfase, como es frecuente en muchos alimentos, ya que ambos mecanismos son incompatibles entre sí. Esta situación se esquematiza en la Figura 9.4-C). Cuando la difusión superficial del lípido es lenta, o cuando la deformación de la película de proteína se encuentra disminuida, como consecuencia de la adsorción competitiva de las moléculas de lípido (por ejemplo), puede producirse la rotura de la película. De nuevo, la movilidad e inestabilidad de la película en

presencia de etanol, o la existencia de una película estable frente al drenaje con una gran segregación entre los componentes de la interfase, en presencia de sacarosa, ponen de manifiesto la importancia de la composición del medio acuoso sobre las características de las películas mixtas de lípidos y de proteínas.

Se podría considerar que en una película mixta, la adsorción competitiva del lípido podría interferir o hacer disminuir las interacciones proteína-proteína, con lo que se destruiría la integridad de las propiedades viscoelásticas de la película adsorbida. La adsorción de más y más lípido podría, en último lugar, desplazar a toda la proteína de la interfase. Por lo tanto, se podría decir que el mecanismo que prevalece depende de la composición molecular de la interfase.

El conocimiento sobre la estabilización de películas puede mejora a partir de las medidas cuantitativas de la difusión superficial de las especies adsorbidas. En efecto, como resumen de los resultados obtenidos en el apartado 8.2 se puede afirmar que las películas de mayor movilidad, estabilizadas por pequeñas moléculas de emulsionantes (Tween 20, en este estudio), recuperan completamente la fluorescencia. En contraste, las curvas de FRAP obtenidas a partir de una película inmóvil de una proteína muestran una recuperación reducida o nula de la fluorescencia. A partir de estos resultados de FRAP se ha podido precisar cual es la concentración crítica de lípido en la película mixta que delimita su estabilidad, de acuerdo con los dos mecanismos citados previamente. Esta concentración crítica depende de la composición del medio acuoso (Figura 8.11), y es del mismo orden de magnitud que el valor de la concentración micelar del lípido en el medio acuoso (apartado 6.3.1).

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

De la labor experimental realizada y de su análisis e interpretación, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La velocidad de adsorción de la proteína BSA sobre la interfase aire-medio acuoso puede ser descrita mediante un modelo cinético con tres etapas, consecutivas y/o en paralelo, que comprenden la difusión de la proteína desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase, la adsorción y desdoblamiento de la proteína en la interfase y, finalmente, la reordenación de la proteína adsorbida en la interfase.

2. De los valores del incremento de la presión superficial con el tiempo y de las constantes cinéticas de primer orden, correspondientes a las etapas de adsorción y reordenación de la proteína sobre la interfase, se deduce:

2.1. Que la velocidad global de adsorción de la BSA en la interfase aumenta con la concentración de proteína en el seno de la fase acuosa.

2.2. Durante la primera etapa, la adsorción de la BSA en la interfase está controlada por un mecanismo de difusión. La difusión de la proteína aumenta con su concentración en el medio acuoso. La presencia de etanol en el medio acuoso hace disminuir la difusión de la proteína hacia la interfase, mientras que la presencia de sacarosa no ejerce un efecto significativo sobre esta etapa. Al aumentar el tiempo, especialmente cuando se superan los 60 segundos, existe una barrera de energía para la adsorción de la proteína, atribuido a las etapas de adsorción y reordenación.

2.3. En presencia de etanol en la fase acuosa, la existencia de un periodo de inducción, tras la difusión de la BSA hacia la interfase, se asocia con la presencia de una adsorción competitiva de ambas sustancias en la interfase y con la existencia de interacciones BSA-etanol en la interfase y en el seno de la fase. Con sacarosa en el seno de la fase acuosa, se facilita la adsorción de la BSA en la interfase, pero se impide su reordenamiento.

2.4. La velocidad global de adsorción de la BSA aumenta en presencia de sacarosa y se reduce en presencia de etanol en el seno de la fase acuosa.

3. La velocidad de absorción de la BSA en la interfase se incrementa en presencia de convección. En estas condiciones, la velocidad de penetración de la BSA en la interfase se reduce en presencia de etanol y, especialmente, cuando se reduce la concentración de la proteína en el seno de la fase acuosa.

4. La formación de una película saturada de BSA sobre la interfase se favorece con el aumento de temperatura y con la presencia de sacarosa en el medio acuoso y no se favorece en presencia de etanol en la fase acuosa.

5. La existencia de interacciones BSA-lípidos, confirmada a partir de las experiencias de tensiometría en condiciones dinámicas y en estado estacionario, depende del tipo de lípido -- insoluble (monoestearina y monooleína) o soluble (Tween 20) --, de la concentración relativa lípido-proteína y de la composición del medio acuoso.

5.1. Con lípidos insolubles (monoestearina y monooleína), las películas mixtas BSA-lípido están dominadas por la proteína a las mayores concentraciones relativas de

la misma, cuando la película está saturada por esta sustancia. Las características interfaciales están dominadas por el lípido cuando aumenta su concentración relativa en la mezcla y, especialmente cuando se alcanza el valor de su presión de esparcimiento en el equilibrio, en el medio acuoso.

5.2. Con un lípido soluble (Tween 20), la existencia de interacciones BSA-Tween 20 se circunscribe a la zona intermedia de concentraciones relativas, comprendidas entre la concentración micelar crítica del lípido y la concentración de BSA correspondiente a la saturación de la película.

5.3. La presencia de solutos en el medio acuoso (etanol y sacarosa) puede favorecer la existencia de cambios conformacionales en la BSA (el etanol) o, por el contrario, puede incrementar su estabilidad estructural (la sacarosa), fenómenos ambos que pueden incidir sobre la existencia de interacciones lípido-proteína.

6. Las películas de lípidos (monoestearina, monooleína y Tween 20), BSA y de sus mezclas, sobre los medios acuosos estudiados, presentan un comportamiento reológico viscoelástico, prácticamente elástico. El valor del módulo dilatacional superficial depende fundamentalmente del tipo de lípido, de su concentración sobre la interfase y de la composición del medio acuoso.

6.1. Con lípidos insolubles (monoestearina y monooleína) se ha definido una *concentración superficial crítica* (CSC) que delimita el valor del módulo dilatacional superficial (E) en función de la densidad superficial del lípido:

- (i) A concentraciones de monoestearina próximos a su CSC se produce un aumento brusco en el valor de E, que permanece constante a mayores densidades superficiales. Por el contrario, la monooleína presenta valores

máximos de E en las proximidades de su CSC, y disminuye a las mayores densidades superficiales. Para la misma densidad superficial, el valor de E es superior en las películas de monoestearina que en las de monooleína.

(ii) La presencia de solutos en el medio acuoso (etanol y sacarosa) produce una reducción significativa en el módulo dilatacional superficial, especialmente en presencia de etanol, a la concentración superficial crítica del lípido. Debe destacarse el muy bajo valor del módulo dilatacional superficial de las películas de monooleína sobre disoluciones de etanol.

(iii) Las películas mixtas monoestearina-monooleína presentan una reducción significativa del módulo dilatacional superficial, en relación a la que existiría si la mezcla entre los lípidos fuese ideal. Un fenómeno que se ha atribuido a la insolubilidad de ambos lípidos sobre la interfase.

6.2. En las películas de BSA, el valor del módulo dilatacional superficial es prácticamente independiente de la concentración de proteína, en el intervalo estudiado ($3 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-1}$ % en peso). Sin embargo, el valor de este parámetro reológico disminuye en presencia de solutos en el medio acuoso (etanol y sacarosa), especialmente a las mayores concentraciones de los mismos y, sobre todo, en el caso del etanol.

6.3. Las características reológicas superficiales de las películas mixtas BSA-lípidos, depende del tipo de lípido y de las composiciones de la interfase y del medio acuoso.

(i) En las películas mixtas BSA-monoestearina, el valor de E aumenta con la concentración de lípido sobre la interfase. Este efecto es de importancia práctica, especialmente cuando existen solutos presentes en el medio acuoso

(etanol y sacarosa), debido a que se invierte la dependencia observada con películas de BSA pura.

(ii) En las películas mixtas BSA-monooleína, el valor de E es prácticamente independiente, o disminuye, con la concentración de lípido sobre la interfase. Este efecto es de importancia práctica, especialmente cuando existen solutos presentes en el medio acuoso (etanol y sacarosa), debido a los bajos valores de E.

(iii) En las películas mixtas BSA-Tween 20 sobre agua y disolución acuosa de sacarosa, el valor de E es inferior que el de la BSA pura. Sin embargo, sobre disolución acuosa de etanol, el valor de E de las películas mixtas BSA-Tween 20 es mayor que el de la BSA pura. La influencia de la concentración relativa de Tween 20 en la película mixta con BSA es compleja y depende de la existencia o no de micelas de este lípido en el medio acuoso.

7. El drenaje de películas delgadas estabilizadas por Tween 20 es caótico y rápido, en contraste con lo que se observa con moléculas de BSA adsorbidas. El comportamiento de drenaje de películas mixtas de BSA y Tween 20 es intermedio entre los citados anteriormente. Esto es debido a que las moléculas de Tween 20 pueden reducir las interacciones BSA-BSA sobre la interfase. Las características de drenaje de películas delgadas depende también de la composición del medio acuoso. A partir de estos resultados se proponen dos mecanismos de estabilidad de películas delgadas, dependiendo de la especie que predomina sobre la interfase, el lípido o la proteína.

8. A partir de los valores del coeficiente de difusión superficial se ha podido establecer que las películas delgadas estabilizadas por Tween 20 poseen una gran movilidad superficial, en contraste con las películas delgadas estabilizadas por BSA, que poseen un coeficiente de difusión superficial prácticamente nulo. Los datos de

difusión superficial en películas delgadas estabilizadas por mezclas de BSA y Tween 20 permiten deducir una relación superficial crítica de ambos emulsionantes que delimita las características de la película y su estabilidad. Esta relación crítica superficial de ambos emulsionantes, depende, de nuevo, de la composición del medio acuoso.

11. BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFIA.

ADAM, N.K., *The Physics and Chemistry of Surfaces*, Oxford University Press, Oxford (1941).

ADAMSON, A.W., "*Physical Chemistry of Surfaces*", 5th ed., Wiley, New York (1990).

AHMED ,M.; DICKINSON E., *Colloids Surfaces*, **47** (1990) 353.

ALBRECHT, D.; GRUCER, H.; SACKMANN, E.J., *J. Physique*, **39** (1978) 301.

ALEXANDER, A.E.; TEORRELL, T., *Trans. Faraday Soc.*, **35** (1939) 727.

ALS, G.; KROG, N., *Proc. World Conf. on Oleochemicals into the 21st century*, Amer. Oil Chem. Soc., Champaing (1991), p. 67.

ANANTHAPADMANABHAN, K.P., en *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins* (Ananthapadmanabhan, K.P. y Goddard, E.D., Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, (1993), p. 319.

ANDRADE, J.D., en "*Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*", Andrade J.A. (Ed.), Vol. 2, Plenum, New York (1985), p. 1.

AOKI, H.; TANEYAMA, O.; ORIMA, N.; KITAGAWA, I., *J. Food Sci.*, **46** (1981) 1192.

AXELDORD, D.E.; KOPPEL D.E.; SCHELLINGER J.; ELSON E.; WEBB W.W., *Biophys. J.*, **16** (1976) 1055.

AXELROD, D., en "*Spectroscopy and Dynamics of Molecular Biological Systems*", P.M. Nayley y R.E. Dale (Eds.), Academic Press, London (1985), p. 163.

BACK, J.F.; OAKENFULL, D.; SMITH, M.B., *Biochemistry*, **18** (1979) 5191.

BANKS, W.; MUIR, D.D., *Food Chem.*, **18** (1985) 139.

BANKS, W.; MUIR, D.D.; WILSON, A.G., *J. Food Technol.*, **16** (1981) 587.

BANKS, W.; MUIR, D.D.; WILSON, A.G., *J. Soc. Dairy Technol.*, **35** (1982) 41.

BECK, K., DALE, R.E. (Eds.) Academic Press, London (1985), p. 177.

BECK, K.; PETERS, R., en "*Spectroscopy and Dinamics of Molecular Biological Systems*", P.M. Bayley y R.E. Dale (Eds.), Academic Press, London (1985), p.177.

BECHER, P., en "*Microemulsions and Emulsions in Foods*", El-Nokaly M. y Cornell D. (Eds.), ACS Sym. Ser. **448**, Amer. Chem. Soc., Washington (1991).

BENDER, M. (Ed.), "*Interfacial Phenomena in Biological Systems*", Marcel Dekker, New York (1991).

BENJAMINS, J.; DE FEIJTER, F.A.; EVANS, M.T.A.; GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C., *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **59** (1975) 218.

BENSON, J.R., *Nonionic Surfactants*, M.J. Schick (De.), Dekker, New York (1987).

BIKERMAN, J.J., *"Foams"*, Springer-Verlag, Berlin (1973).

BRANDS, J.F.; HUNT, L., *J. Am. Chem. Soc.*, **89** (1967) 4826.

BRASH, J.L., en *"Interactions of Blood with Natural and Artificial Surfaces"*, Salzman E.W. (Ed.), Dekker, New York (1981), p. 37.

BRASH, J.L.; HORBETT, T.A. (Eds.), *"Proteins at Interfaces"*, ACS Symposium Series, Amer. Chem. Soc., Washington (1987).

BROW, E.M.; FARRELL, H.M.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **185** (1978) 156.

BOS, M.; NYLANDER, T.; ARNEBRANT, T.; CLARK, D.C., en *Food Emulsifiers and Their applications*, Chapman & Hall, New York (1996). En prensa.

BROWN, E.M., *J. Dairy Sci.*, **67** (1984) 713.

BUHAENKO, M.R.; GRUNDY, M.J.; RICHARDSON, R.M., *Thin Solid Film*, **159** (1988) 171.

BULL, H.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **67** (1945) 8.

CASSEL, H., *J. Phys. Chem.*, **48** (1944) 195.

CLARK, D.C., en "*Characterization of Food: Emergin Methods*", Gaonkar A. (Ed.), Elsevier, Amsterdam (1995), p. 23.

CLARK, D.C.; DANN, R.; MACKIE, A.R.; MINGINS, J.; PINDER, A.C.; PURDY, P.W.; RUSSELL, E.J.; SMITH, L.J.; WILSON, D.R., *J. Colloid Interface Science*, **138** (1990a) 195.

CLARK, D.C.; COKE, M.; WILDE, P.J.; WILSON, D.R., en "*Food Polymers, Gels and Colloids*", E. Dickinson (De.), Royal Society Special Publication No. 82, Cambridgem (1990b), p. 272.

CLARK, D.C.; MACKIE, A.R.; WILDE, P.J., WILSON, D.R., *Royal Soc. Chem Faraday Discussion*, **98** (1994) 253.

CLARK, D.C.; WILDE, P.J.; WILSON, D.R., *Colloid Surface*, **59** (1991) 209.

CLARK, D.C.; WILDE, P.J.; WILSON, D.R., *Food Hydrocolloids*, **6** (1992) 173.

CLARK, N.O.; BLACKMAN, R.P., *Trans. Faraday Soc.*, **44** (1948) 1.

CLINT, J.H., *Surfactant Aggregation*, Chapman and Hall, New York, Cap. 2. (1992).

COKE, M.; WILDE, P.J.; RUSSELL, E.J.; CLARK, D.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **138** (1990) 489.

CORNELL, D.G., *J. Colloid Interface Sci.*, **88**, 536 (1982).

CORNELL, D.G.; CARROLL, R.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **108** (1985) 226.

COURTHAUDON, J.-L., DICKINSON, E.; DALGLEISH, D.G., *J. Colloid Interface Sci.*, **145** (1991a), 390.

COURTHAUDON, J.-L., DICKINSON, E.; MATSAMURA, Y., CLARK, D.C., *Colloids surfaces*, **56** (1991b), 293.

CRAIG, I.S.K.; WILDE, P.J.; CLARK, D.C., *Colloids Surfaces B*,

CREAMER, I. K., *Biochemistry*, **34** (1995) 7170.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; WISTROM, C.A., *Biochem. J.*, **242** (1987) 1.

CHANG, R.C.; SCHOEN, H.M.; GROVE, C.S., *Ind. Eng. Chem.*, **48** (1956) 2035.

CHARALAMBOUS, G.; DOXASTAKIS, G. (Eds.), *Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications*, Elsevier, Amsterdam (1989).

CHEFTEL J.C.; CUQ J.L.; LORIENT D., "*Proteínas Alimentarias*", Acribia, Zaragoza (1989).

CHEN, J.; DICKINSON, E.; IVESON, G., *Food Structure*, **12** (1993) 135.

CHEN, J.; DICKINSON, E., *Food Hydrocolloids*, **9** (1995a) 35.

CHEN, J.; DICKINSON, E., *Colloids Surfaces A*, **100** (1995b) 225.

CHEN, J.; DICKINSON, E., *Colloids Surfaces A*, **100** (1995c) 267.

DAMODARAN, S., *Adv. Food Nutr. Res.*, **34** (1990) 1.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J.E., *J. Agric. Food Chem.*, **28** (1980) 567.

DAMODARAN, S.; SONG, K.B., *Biochim. Biophys. Acta*, **954** (1988) 253.

DAMODARAN, S.; SONG, K.B., *Colloids Surfaces*, **50** (1990) 75.

DARLING, D.F., en "*Food Structure and Behaviour*", Blansshard and Lillford (Ed.), Academic Press, New York (1987).

DAS, K.P.; KINSELLA, J.E., *Adv. Food Nutr. Res.*, **34** (1990) 81.

DAVIES, J.T., *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953) 165.

DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K., "*Interfacial Phenomena*", 2nd ed., Academic Press, New York (1963).

DE BOER, J.H., *The Dynamical Character of Adsorption*, Oxford Univ. Press., Londres (1953).

DE FEIJTER, J.A.; BENJAMINS, J., en *Food Emulsions and Foams* (E. Dickinson, Ed.), Royal Soc. Chem., London (1987), p. 72.

DE FEIJTER, J.A.; BENJAMINS, J.; TAMBOER, M., *Colloids Surfaces*, **27** (1987) 243.

DE FEIJTER, J.A.; VRIJ, A., en *Adsorption at Interfaces*, K.L. Mittal (Ed.), Ame. Che. Soc. Symposium Series, No. 8, Amer. Chem. Soc., Washington, DC (1974), p. 183.

DERVICHIAN, D.G., *J. Chem. Phys.*, **7** (1939) 931.

DICKINSON, E. (Ed.), "*Food Emulsions and Foams*", Royal Soc. Chem., Londres (1987).

DICKINSON, E., en *Food Structure: Its Creation and Evaluation*, (J.M. Blaushard y J.R. Mitchell, eds.), Butterworths, Londres, p. 41.

DICKINSON, E., *An Introduction to Food Colloids*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1992.

DICKINSON, E., *Colloids Surfaces*, **42** (1989) 191.

DICKINSON, E.; MURRAY, B.S.; STAINSBY, G., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **84** (1988) 871.

DICKINSON, E.; NARHAM, S.K.; STAINSBY, G., *J. Food Sci.*, **54** (1989) 77.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. (Eds.), *Colloids in Food*, Applied Science, Londres (1982).

DICKINSON, E.; STAINSBY, G., *Colloids Surfaces*, **41** (1987), 74.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. (Eds.), "*Advances in Food Emulsions and Foams*", Elsevier, London (1988).

DICKINSON, E.; STAINSBY G., *Food Technol.*, **41** (1987) 74.

DICKINSON, E.; WALSTRA, P. (Eds.), "*Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*", The Royal Soc. Chem., Cambridge (1993).

DICKINSON, E.; WOSKETT, C.M., *Food Hydrocolloids*, **2** (1988) 187.

DICKINSON, E.; WOSKETT, C.M., en *Food and Colloids* (Bee, r.d., Richmond, P., Mingins, J., Eds.), Royal Society of Chem., Londres, p. 74 (1989).

DJABBARAH ,N.F.; WASAN, D.T., *AIChE Jl.*, **31** (1985) 1041.

DOBIAS, B. (Ed.), "*Coagulation and Flocculation: Theory and Applications*", Marcel Dekker, New York (1993).

DOUILLARD, R.; DAOUD, M.; LEFEVRE, J.; MINIER, C.; LECANNU, G.; COUTRET, J., *J. Colloid Interface Sci.*, **163** (1994) 277.

DOXASTAKIS, G.; SHERMAN, P., en "*Instrumental Analysis of Foods*", Charalambous G., y Inglett G. (Eds.), Vol. 2, Academic Press, New York (1983), p. 219.

DOXASTAKIS, G.; SHERMAN, P., *Colloid Polym. Sci.*, **262** (1984) 902.

DOXASTAKIS, G.; SHERMAN, P., *Colloid Polym. Sci.*, **264** (1986) 254.

DUKHIN, S.S.; KRETZSCHMAR, G.; MILLER, R. (Eds.). *Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces*, Elsevier, Amsterdam (1995).

DUSSAUD, A.; HAN, G.B.; TER MINASSIAN-SARAGA, L.; VIGNES-ADLER, M., *J. Colloid Interface Sci.*, **167** (1994a) 247.

DUSSAUD, A.; VIGNES-ADLER, M., *J. Colloid Interface Sci.*, **167** (1994b), 256.

DUSSAUD, A.; VIGNES-ADLER, M., *J. Colloid Interface Sci.*, **167** (1994c), 266.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARRELL, H.M.; HARWALKAR, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R.McL., *J. Dairy Sci.*, **67** (1984) 1599.

EL-NOKALY, M.; CORNELL, D. (Eds.), "*Microemulsions and Emulsions in Food*", ACS Symposium Series, Amer. Chem. Soc., New York (1991).

ERICSSON, B.; HEGG, P.O., *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **70** (1985) 92.

EXEROWA, D.; BALINOV, B.; KASHCHIEV, D., *J. Colloid Interface Sci.*, **94** (1983) 45.

EXEROWA, D.; ZACHARIEVA, M.; COHEN, R.; PLATIKANOV, D., *Colloid Polym. Sci.*, **257** (1979) 1089.

FEW, A.V.; OTTEWILL, R.H.; PARREIRA, H.C., *Biochim. Biophys. Acta*, **18** (1955) 136.

FIDELIO, G.D.; MAGGIO, B.; CUMER, F.A., *Biochim. Biophys. Acta*, **862** (1986) 49.

FLEER, G.J.; SCHEUTJENS, J.M.H.M., en "*Coagulation and Flocculation: Theory and Applications*", B. Dobias (Ed.), Dekker, New York (1993).

FLEER, G.J.; SCHEUTJENS, J.M.H.M.; COHEN STUART, M.A., *Colloids Surfaces*, **31** (1989) 1.

FOX, P.F.; MULVIHILL, D.M., *J. Dairy Res.*, **49** (1982) 679.

FRAPIN, D.; DUFOUR, E.; HAERTLÉ, T., *J. Prot. Chem.*, **12** (1993) 443.

FRIBERG, S.E.; BLUTE, I.; STENIUS, P., *J. Colloid Interface Sci.*, **127** (1989) 573.

FRUMKIN, A., *Z. Phys. Chem.*, **116** (1925) 466.

FUENTE, J. F.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M., *Colloids Surfaces A*, **104** (1995) 29.

FUENTE, J.F.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M., *AIChE Jl.*, **42** (1996) 1416.

GARLAND, P., *Biophys. J.*, **33** (1981) 481.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S.N., *Biochemistry*, **20** (1981) 4667.

GERMAN, J.B., O'NEILL, T.E.; KINSELLA, J.E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1358 (1985).

GAINES, G.L., *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience Pub., New York (1966).

GERSHFELD, N., *J. Colloid Interface Sci.*, **85** (1982) 28.

GODDARD, E.D., *Colloids Surfaces*, **19** (1986) 255 y 301.

GODDARD, E.D.; PETHICA, B.A., *J. Chem. Soc.*, **73** (1951) 2659.

GONZÁLEZ, G.; MACRITCHIE, F., *J. Colloid Interface Sci.*, **32** (1970) 55.

GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **70** (1979a) 403.

GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **70** (1979b) 415.

GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **76** (1980) 227.

GREENE, B.; VAN GILDER R., *J. Colloid Interface Sci.*, **101** (1984) 593.

GUILLERME, C.; LOISEL, W.; BERTRAND, D.; POPINEAU, Y., *J. Texture Stud.*, **24** (1993) 287.

HALLING, P.J., *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15** (1981) 155.

HARKINS, W.D., *The Physical Chemistry of Surface Films*, Reinhold, New York (1952).

HASSAN, P.A., BHAGWAT, S.S.; MANOHAR, C., *Langmuir*, **11** (1995) 470.

HAUGLAND, R.P.,² en "*Handbook of Fluorescence Probes and Research Chemicals*", Molecular Probes Inc. (1992).

HAYNES, C.A.; NORDE, W., *Colloids Surfaces B*, **2** (1994) 517.

HEERTJE, Y.; NEDERLOF, J.; HENDRICKX, H.A.C.M., LUCASSEN-REINDERS, E. *Food Structure*, **9** (1990) 305.

HÜCKEL, E., *Trans. Faraday Soc.*, **28** (1932) 442.

IVANOVA, M.; PANAIOTOV, I.; TRIFONOVA, T.; ECHKENAZI, M.; KONSTANTINOV, G.; IVANOVA, R., *Colloids Surfaces*, **10** (1984) 269.

JAELENI, S.A.K.; FIDI, N.; HARTLAND, S., *Chem. Eng. Sci.*, **45** (1990) 1048.

JOHNSON, T.M.; ZABIK, M.E., *J. Food Sci.*, **46** (1981) 1237.

JONES, M.N.; SKINNER, H.A.; TIPPING, E., *Biochem. J.*, **147** (1975) 229.

JONES, M.N.; WILKINSON, A., *Biochem. J.*, **153** (1976) 713.

JOOS, P.; VAN UFFELEN, M.; SERRIEN, G., *J. Colloid Interface Sci.*, **152** (1992) 521.

KAKO, M.; KONDO, S., *J. Colloid Interface Sci.*, **69** (1979) 163.

KAREL, M., *J. Food Sci.*, **38** (1973) 756.

KASCHIEV, D.; EWEROWA, D., *J. Colloid Interface Sci.*, **77** (1980) 501.

KEISER, P.; JOOS, P., *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 274.

KIM, S.H.; KINSELLA, J.E., *J. Food Sci.*, **50** (1985) 1526.

KINSELLA, J.E., *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **21** (1984) 197.

KINSELLA, J.E., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **10** (1978) 147.

KINSELLA, J.E., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **7** (1976) 219.

KINSELLA, J.E., en "*Food Proteins*" (Fox P.F. y Condon S., Eds.), Applied Sci., Londres (1982), p. 51.

KINSELLA, J.E., *Food Chem.*, **7** (1981) 273.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M., *Adv. Food Nutr. Res.*, **33** (1989) 343.

KITABATAKE, N.; SASAKI, H.; DOI E., *Agric. Biol. Chem.*, **46** (1982) 2881.

KOZARAC, Z.; DHATHATHREYAN, A.; MOBIUS, D., *Colloids Surfaces*, **33** (1988) 11.

KRESHECK, G.C.; HARGRAVES, W.A.; MANN, D.C., *J. Phys. Chem.*, **81** (1977) 532.

KRISTOV, KHR.; MAYSA, K.; EXEROWA, D., *Colloids Surfaces*, **11** (1984) 39.

KROG, N.J., en *Food Emulsions* (K. Larsson y S.E. Friberg., Eds.), Marcel Dekker, New York (1990), p. 127.

KROG, N., en "*Emulsions - A Fundamental and Practical Approach*", Kluwer Academic Publ., Holanda (1992), p. 61.

KROG, N.J.; RIISON, T.H.; LARSSON, K., in P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Vol. 2, Marcel Dekker, New York (1985), p. 321.

KRUGLYAKOV, P.M., *Surfactant Sci. Ser. (Thin Solid Films)*, **59** (1988) 767.

LALCHEV, ZDR.; KHRISTOV, KHR.; EXEROWA, D., *Colloid Polymer Sci.*, **257** (1979), 1248.

LANGHE, H.; JASCHKE, P., en *Nonionic Surfactants. Physical Chemistry*, M.J. Schick (Ed.), Dekker, New York (1987).

LANGMUIR, I., *Proc. Nat. Academy of Sciences*, **3** (1917) 141.

LANGMUIR, I., *J. Amer. Chem. Soc.*, **15** (1918) 75.

LARSSON, K., "*Lipids: Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*", The Oily Press, Dundee (1994).

LARSSON, K., *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, **16** (1978) 163.

LARSSON, K.; FRIBERG, S.E., "*Food Emulsions*", 2nd ed., Dekker, New York (1990).

LEADBETTER, S.L., "*Food Focus*", No. 9, Leatherhead Food R.A. (1990).

LEE, J.C.; TIMASHEFF, S.N., *J. Biol. Chem.*, **256** (1981) 7193.

LEHNERT, S.; TARABISHI, H.; LEUENBERGER, H., *Colloids Surfaces A*, **91** (1994) 227.

LOBO, L.; IVANOV, I.; WASAN, D., *AIChE Jl.*, **39** (1993) 322.

LOEB, G.I., *J. Colloid Interface Sci.*, **31** (1969) 572.

LUDAHAL, P.; GREIJER, E.; SANDBERG, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **873** (1986) 20.

LUNDQUIST, M., *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, **16** (1978) 101.

MacRITCHIE, F., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **25** (1986) 341.

MacRITCHIE, F., *Adv. Protein Chem.*, **32** (1978) 283.

MacRITCHIE, F., *Colloids Surfaces*, **41** (1989) 25.

MacRITCHIE, F.; ALEXANDER, A.E., *J. Colloid Sci.*, **18** (1963) 458.

MacRITCHIE, F.A.; ALEXANDER, A.E., *J. Colloid Interface Sci.*, **16** (1961) 57.

MANEV, E.; SCHELUDKO, A.; EXEROWA, D., *Colloid Polymer Sci.*, **252** (1974) 586.

McCLEMENTS, D.J.; DUNGAN, S.R.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E., *J. Colloid Interface Sci.*, **156** (1993) 425.

MEANS, G.E.; FEENEY, R.E., en "*Chemical Modification of Proteins*", Holden Day, San Francisco, 1971.

MILLER, D.D.; LENHART, W.; ANTALEK, B.J.; WILLIAMS, A.J.; HEWITT, J.M., *Langmuir*, **10** (1994) 68.

MITA, T.; ISHIDA, E.; MATSUMOTO, N., *J. Colloid Interface Sci.*, **64** (1978) 143.

MITCHELL, J.; IRONS, L.; PALMER, G.J., *Biochim. Biophys. Acta*, **200** (1970) 138.

MOHAN, V.; MALVIA, B.K.; WASAN, D.T., *Can. J. Chem. Eng.*, **54** (1976) 515.

MONAHAN, I.J.; McCLEMENTS, D.J.; KINSELLA, J.E., *J. Agric. Food Chem.*, **41** (1993) 1826.

MORR, C.V., *Food Technol.* **38** (1984) 39.

MOTOMURA, K.; ARONOTO, M., en *Mixed Surfactants Systems* (Ogino K. Y Abe, M. Eds.) Surfactant Science Series. Vol. 46. Marcel Dekker Inc., New York (1993), p. 99.

MUSSELWHITE, P.R.; KITCHENER, J.A., *J. Colloid Interface Sci.*, **24** (1967) 80.

MYERS, D., "*Surfactant Science and Technology*", VCH Publ. Inc., New York (1988).

NELSON, C.A., *J. Biol. Chem.*, **246** (1971) 3895.

NISHIKIDO, N.; TAKAHARA, H.; KOBAYASHI, H.; TANAKA, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55** (1982) 3085).

NORDE, W.; LYKLEMA, J., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **2** (1991) 183.

NOZATI, Y.; REYNOLDS, J.A.; TANDFORD, C., *J. Biol. Chem.*, **249** (1974) 4452.

O'NEILL, T.E.; KINSELLA, J.E., *J. Agric. Food Chem.*, **35** (1987) 770.

PALE, C.N., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **3** (1975) 1.

PAQUIN, P.; BRITTEN, M.; LALIBERTÉ, M.-F.; BOULET, M., *ACS Symp. Ser.*, No. 343, p. 677 (1987).

PAQUIN, P.; DICKINSON, E., *Proceeding XXIII International Dairy Congress*, Vol. 2, p. 1492, Montreal (1990).

PARKER, N.S., *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **25** (1988) 716.

PARRIS, N.; BARFORD, R. (Eds.), *"Interactions of Food Proteins"*, ACS Symposium Series, Amer. Chem. Soc., Washington (1991).

PETERAS, J.M.C.; HOWELLS, K.F.; ROSENTHAL, A.J., *J. Food Sci.*, **59** (1994) 168.

PETERS, R., *Naturwissenschaften*, **70** (1983) 294.

PETERS, R.; SCHOLTZ, R.J., en *"New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy"*, R.J. Cherry (De), Macmillan, London, 1990, p. 199.

PETERS, T., en *"The Plasma Proteins"*, Putnam F.E. (Ed.), 2nd Ed. Vol. 1, p. 133, Academic Press, New York (1975).

PEZRON, E.; CLAEISSON, P.M.; BERG, J.M.; VOLLHARDT, D., *J. Colloid Interface Sci.*, **138** (1990) 245.

PHILLIPS, M.C.; HAUSER, H., *J. Colloid Interface Sci.*, **49** (1974) 31.

PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A.; WEDLOCK, D.J. (Eds.), "*Gums and Stabilizers for the Food Industry. 6*", IRL Press, Oxford (1992)

PHILLIPS, M.C., *Food Technol.*, **January** (1981) 50.

PLATIKANOV, D.N.; YAMPOL'SKAYA, G.P.; RANGELOVA, n.i.; ANGARSKA, ZH.K.; BOBROVA, L.E.; IZMAILOVA, V.N., *Kolloidn. Zh.*, **42** (1980) 893.

POHL, F.M., *European J. Biochem.*, **7** (1968) 146.

POOLE, S.; WEST, S.I.; FRY, J.C., *Food Hydrocolloids*, **1** (1987) 301.

PRINS, A.; JOCKEMS, A.M.P.; WIJNEN, M.E., *Trends in Colloid and Surface Sci.* Enviado (1995). En prensa.

PROCHASKA, K.; SZYMANOWSKI, J., *Prog. Colloid Polym Sci.*, **79** (1989) 321.

PROCHASKA, K.; ALEJSKI, K.; SZYMANOWSKI, J., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60** (1994) 195.

RAHMAN, A.; SHERMAN, P., *Colloid Polymer Sci.*, **260** (1982) 1035.

RAMASWAMI, S.; HARTLAND, S.; BOURNE, J.R., *Chem. Eng. Sci.*, **48** (1993) 1709.

RAO, A.A.; WASAN, D.T., AICHe Annual Meeting, Chicago (1980).

RAO, A.A.; WASAN, D.T.; MANEV, E.D., *Chem. Eng. Commun.*, **15** (1982) 63.

RAZAFINDRALAMBO, H.; CHRISTOPHE, B.; DELHAYE, S.; PAQUOT, M., *J. Colloid Interface Sci.*, **174** (1995) 373.

REYNOLDS, J.A.; TANFORD, C. *J. Biol. Chem.*, **245** (1970) 5161.

RICHARSON, T.; KESTER, J.J., *J. Chem. Ed.*, **61** (1984) 325.

RIVAS, H.J.; SHERMAN, P., *Colloids Surfaces*, **11** (1984) 155.

RODRÍGUEZ PATINO, J.M.; RUÍZ, M.D.; FUENTE, J.F., *J. Colloid Interface Sci.*, **154** (1992b) 146.

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; DOMINGUEZ, M.R., *Colloid Surfaces A*, **75** (1993b) 217.

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; DOMINGUEZ, M.R.; FERIA, J.F., *J. Colloid Interface Sci.*, **157** (1993a) 343.

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; FERIA, J.F.; GOMEZ HERRERA, C., *J. Colloid Interface Sci.*, **148** (1992a) 233.

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; MARTIN, R., *J. Colloid Interface Sci.*, **167** (1994) 150.

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; RODRIGUEZ NIÑO, M.R., en *Food Macromolecules and Colloids*, (E. Dickinson and P. Walstra Eds.), Royal Soc. of Chem., London. p. 103 (1995a).

RODRIGUEZ PATINO, J.M.; RODRIGUEZ NIÑO M.R., *Colloids Surfaces A*, **103** (1995b) 91.

RODRÍGUEZ PATINO, J.M.; RODRÍGUEZ NIÑO, M.R.; ÁLVAREZ, G.J.M., *Food Hydrocolloids*, 1996. En prensa.

ROSEN, M.J., *"Surfactants and Interfacial Phenomena"*, John Wiley and Sons, New York (1989).

RUIZ, M.D.; RODRÍGUEZ PATINO, J.M., *Colloids Surfaces A*, (1996)

SARKER, D. K.; WILDE, P.J.; CLARK, D.C., *Colloids Surfaces B*, **3** (1995) 349.

SHIRAHAMA, K.; TSUJII, K.; TAKAGI, T., *J. Biochemistry*, **75** (1974) 309.

SJOBLOM, J (Ed.), *"Emulsions - A Fundamental and Practical Approach"*, Kluwer Academic Publ., London (1992).

SMITH, R.D.; BERG, J.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **74** (1980) 273.

SONG, K.B.; DAMODARAN, S., *Langmuir*, **7** (1991) 2737.

SOVILJ, V.; DJAKOVIC, L.; DOKIC, P., *J. Colloid Interface Sci.*, **158** (1993) 483.

SU, Y.-Y.T.; JIRGENSONS, B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **181** (1977) 137.

SUBRAMANIAN, M.; SHESHADRI, B.S.; VENKATAPPA, P.M., *J. Biosci.*, **10** (1986) 359.

SUTTIPRASIT F.; KRISDAHASIMA V.; MCGUIRE J., *J. Colloid Interface Sci.*, **154** (1992) 316.

SUTTIPRASIT, P.; MCGUIRE, J., *J. Colloid Interface Sci.*, **154** (1992) 327.

SWAISGOOD, H.E., en "*Developments in Dairy Chemistry. I*", (Fox P.F., Ed.), Vol. 1, Applied Sci., Londres (1982), p. 1.

SZYSŁOWSKI, B. von, *Z. Phys. Chem.*, **64** (1908) 385.

TADROS, T.F.; VINCENT, B., en "*Encyclopedia of Emulsion Technology*" (P. Becher, Ed.), Vol. 1, Dekker, New York (1983), p. 1.

TANEVA, S.; PANAIOTOV, I.; TER-MINASSIAN-SARAGA, L., *Colloids Surfaces*, **10** (1984) 101.

TANFORD, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **84** (1962) 4240.

TANFORD, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley and Sons, Inc., New York (1980).

TANFORD, C., *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley, New York (1961).

TERNES, R.L.; BARNES, J.C., *J. Colloid Interface Sci*, **98** (1984) 471.

TER MINASSIAN-SARAGA, L., *J. Chim. Phys.* **52** (1955) 80, 99 y 181.

TIMASHEFF, S.N.; LEE, J.C.; PITZ, E.P.; TWEEDY, N., *J. Colloid Interface Sci.*, **55** (1976) 658.

TORNBERG, E., *J. Colloid Interface Sci.*, **61** (1977) 223.

TORNBERG, E., *J. Colloid Interface Sci.*, **64** (1978a) 391.

TORNBERG, E., *J. Sci. Food Agric.*, **29** (1978b) 762.

TORNBERG, E.; GRANFELDT, Y.; HAKANSON, C., *J. Sci. Food Agric.*, **33** (1982) 904.

TRAUBE, Y., *Liebigs Ann.*, **265** (1891) 27.

TRURNIT, H.J., *J. Colloid Sci.*, **15** (1960) 1.

VERWEY, J.W., OVERWEEN, Th.G., "*Theory of Stability of Lyophobic Colloids*", Elsevier, Amsterdam (1948).

VOLMER, M., *Z. Phys.Chem.*, **115** (1925) 253.

WALSTRA, P., en "*Food Structure and Behaviour*", Blansshard and Lillford (Ed.), Academic Press, New York (1987).

WAN, P.J. (Ed.), "*Food Emulsions and Foams: Theory and Practice*", AIChE Symposium Series, AIChE, New York (1990).

WARD, A.F.H.; TORDAI, L., *J. Chem. Phys.*, **14** (1946) 453.

WARD, A.J.I.; REGAN, L.H., *J. Colloid Interface Sci.*, **78** (1980) 389.

WEAST, R.C., (Ed), *CRC Handbook of chemistry and Physics*, 66th de., CRC Press, Boca Ratón, FL (1986).

WHITNEY,, R.McL.; BRUNNER J.R.; EBNER, K.E.; FARREEL, H.M.; JOSEPHSON, R.W.; MORR, C.V.; SWAISGOOD H.E., *J. Dairy Sci.*, **59** (1976) 795.

WILDE, P.J.; CLARK, D., *J. Colloid Interface Sci.*, **155**, 48 (1993).

WILDE, P.J.; CLARK, D.C.; MARION, D., *J. Agric.Fodd Chem.*, **41** (1993) 1579.

WOLF, D.E., en “*Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*”. Parte B, D.L. Lansing Taylor y Y. Wang (Eds.), Academic Press, San Diego (1989), p. 271.

WÜSTNECK, R.; KROTOV, V.V.; ZILLER, M., *Colloid Polym. Sci.*, **262** (1984) 67.

WÜSTNECK, R.; MÜLLER, H.-J., *Colloid Polym. Sci.*, **264** (1986) 97.

WÜSTNECK, R.; WETZEL, R.; BUDER, E.; HERMEL, H., *Colloid Polym. Sci.*, **266** (1988) 1001.

XU, S.; DAMODARAN, S., *Langmuir*, **10** (1994) 472.

XU, S.; DAMODARAN, S., *Langmuir*, **8** (1992) 2021.

XU, S.; DAMODARAN, S., *J. Colloid InterfaceSci.*, **167** (1994) 314.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas, celebrada el día 24 de Enero de 1997, a las 10:00 horas, en el aula de la Facultad de Ciencias Químicas, bajo la presidencia de D. ROSARIO RODRIGUEZ NIÑO.

Temas: ESTUDIO DE PELICULAS DE LIPIDOS Y DE PROTEINAS
SOBRE LA INTERFASE AIRE-MEDIO ACUOSO

APTO CON LAUDE POR

UNANIMIDAD

24

ENERO

1997

El Vocal,

R. Rodríguez Niño
El Presidente

Paula Ruiz
El Secretario,

E. Soler
El Doctorado,

El Doctorado,

A. U. Vega

Paula Ruiz

M. L. Ruiz



500832003

FQU I T/614-II