



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

“Estudio de los Efectos del Agregado de *lambda*-carragenina sobre la Estabilidad de Emulsiones preparadas con Concentrado de Suero Lácteo Comercial”

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Maria Sol Lizarraga

Director: M. Sc. Liliana G. Santiago

Co-Director: Ing. Rolando J. González

Jurados: - Dr. Jorge R. Wagner
- Dr. Claudio L. A. Berli
- Dr. Juan C. Basílico
-

2007

RESUMEN

Estudio de los Efectos del Agregado de *lambda*-carragenina sobre la Estabilidad de Emulsiones Preparadas con Concentrado de Suero Lácteo comercial.

La estabilidad de los sistemas coloidales tipo emulsiones es de gran importancia no solo a nivel industrial, dado que puede ser uno de los parámetros que determinan la vida útil del producto, sino también desde el punto de vista del consumidor, ya que la percepción de calidad está influenciada por la apariencia.

Las proteínas de suero lácteo comercial son un excelente ingrediente dada su capacidad emulsionante y su valor nutricional. Sin embargo, las emulsiones preparadas pueden resultar inestables por lo que es necesario utilizar un polisacárido para aumentar la estabilidad de las mismas. Por otro lado, los distintos tiempos de hidratación de las proteínas y los polisacáridos crean complicaciones desde el punto de vista operativo, por lo cual el desarrollo de un aditivo tipo emulsionante/ estabilizante puede ser de gran valor industrial. Por esta razón se produjo un producto de concentrado de proteínas lácteas (WPC) y *lambda*-carragenina (λ -C) a partir de la mezcla de suspensiones de estas macromoléculas, el cual fue secado en el secadero spray de la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA - UNL).

Resumen

La producción de emulsiones estables es un tema clave en la industria de los alimentos y requiere de un buen entendimiento de las interacciones macromoleculares complejas que surgen durante los procesos tecnológicos.

El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar un ingrediente de funcionalidad específica, de aplicación en alimentos formulados, que posea propiedades de emulsificación/ estabilización a partir de la mezcla de concentrado de proteína de suero (WPC) y *lambda* - carragenina. Los objetivos específicos de esta tesis fueron los siguientes:

1-Estudiar y caracterizar la fase continua a ser utilizada para las emulsiones en estudio: se prepararon dispersiones de WPC comercial, de *lambda* - carragenina, de mezclas de ambas macromoléculas en distintas proporciones y del ingrediente co-secado WPC/ λ -C y se realizaron mediciones de cromatografía (SE-HPLC), calorimetría (DSC), solubilidad y viscosidad (a 20 y 50 °C). El concentrado de proteínas de suero lácteo comercial mostró la presencia de agregados de elevado peso molecular, debidos probablemente a la desnaturalización térmica de las proteínas durante proceso de elaboración del WPC. Estos agregados serían principalmente de naturaleza hidrofóbica. La presencia de la λ -C habría desagregado en gran medida dichos agregados lo cual estaría indicando un cierto grado de interacción, que sería de naturaleza electrostática.

El WPC utilizado presentó la ventaja de una elevada solubilidad en distintos solventes, la cual se vio favorecida notablemente por la presencia de la *lambda*-carragenina, mostrando nuevamente que existirían interacciones del tipo

Resumen

electrostático entre ambas macromoléculas. Esto último se vería corroborado en los estudios de viscosidad y por su parte, los resultados de DSC mostraron un incremento en la estabilidad térmica de las proteínas del WPC en presencia de λ -C.

2- Estudiar y caracterizar las emulsiones aceite-en-agua: se prepararon las mismas al 50% con la mezcla co-secada a distintas concentraciones y con WPC solo a las concentraciones de proteína de la mezcla co-secada. Además, se evaluó en cada caso la metodología de emulsificación, Ultra-Turrax (UT) y homogeneizador a válvula (HV), sobre la estabilidad de las mismas. Para tal fin, se realizaron mediciones de tamaños de partículas, microscopia, viscosidad y estabilidad (caracterización óptica por Quickscan).

En condiciones de homogeneización a baja potencia (UT), las emulsiones con WPC presentaron un comportamiento acorde al de sistemas poli-dispersos que se fueron tornando mono-dispersos con el incremento de la concentración, de elevada fracción en volumen y con un bajo grado de floculación. Las emulsiones preparadas con el CS presentaron características similares a las de las anteriores pero con un mayor grado de estabilidad lo cual se debería principalmente a la reducción en el tamaño de las gotas y al incremento en la viscosidad de la fase continua debido a la presencia de la *lambda*-carragenina. Las emulsiones preparadas en el HV con WPC presentaron la formación de una estructura que influyó en la estabilidad de las mismas. Se propone que dicha estructura podría ser atribuida a un mecanismo de floculación por depleción que podría estar ocurriendo inicialmente debido a la presencia de agregados de

Resumen

elevado peso molecular, seguido de una estabilización por puentes o multi-capas entre las proteínas, a medida que la emulsión envejece. En las emulsiones con CS en el HV, a baja concentraciones de proteína, la λ -C incrementó la velocidad de desestabilización de la emulsión favoreciendo la formación de flóculos probablemente a través de un mecanismo de puentes entre las gotas. Desde una concentración de 0,73 % (p/ p) de proteína, las emulsiones con CS mostraron un comportamiento acorde al de un mecanismo combinado de floculación por puentes o multi-capas entre las proteínas y, principalmente, por depleción por la presencia de la λ -C, siendo prueba de esto el incremento de la viscosidad a bajos gradientes y una relación del mismo con la concentración de sólidos totales, la ruptura de los flóculos por efecto de la dilución, una rápida desestabilización y posterior re-estabilización de la emulsión con 1,0 % (p/ p) ST (0,73 % de proteína) y, tiempos de retardo en las emulsiones con mayores concentraciones de CS.

Estos resultados demuestran que sería posible desarrollar un aditivo tipo agente emulsionante/ estabilizante con los sistemas estudiados.

Agradecimientos

Agradecimientos

En primer lugar, deseo agradecer a mi directora, la Ing. Liliana Santiago, por su conducción, invaluable apoyo, amistad y cariño durante estos años de trabajo.

Al Ing. Rolando González, por su colaboración y guía.

A la Dra. Maria Cristina Añón, por sus consejos, su colaboración y apoyo en todo este tiempo.

A la Dra. Amelia Rubiolo y su grupo de trabajo, en especial al Tec. Daniel De Piante, por la colaboración y apoyo brindados.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos por haber colaborado con la concreción de este trabajo, y a todo el personal, en particular a la Tec. Sup. en Alimentos, Adriana Bonaldo por su apoyo y calidez.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (UNLP - CONICET) por haberme permitido realizar tareas utilizando parte de su equipamiento.

A los siguientes proyectos: CAID+D N° 12H/429; PICTO .-UNL 2005 - N° 36237; CYTED XI.17; CYTED N° 105 PI0274, por los fondos para la pasantía en el CIDCA bajo la supervisión de la Dra. María Cristina Añón.

Al Lic. Carlos Carrara, por su permanente colaboración y apoyo.

Al Bioq. Lucas Pan, por su invalorable ayuda y por todo lo compartido.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a mis amigos y a todos aquellos que colaboraron directa o indirectamente con este trabajo dándome su apoyo y acompañándome en este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Listado de abreviaturas	i
Listado de tablas	iv
Listado de figuras	v
CAPITULO I - INTRODUCCIÓN	
1.1 Aspectos teóricos	2
1.2 Objetivos	63
CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Introducción	66
2.2 Materiales	67
2.3 Metodología	74
2.3.1 Métodos de caracterización de la fase continua	75
2.3.2 Métodos de caracterización de las emulsiones	82
CAPÍTULO III - RESULTADOS - CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA	
3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	89
3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	94
3.3 Solubilidad	97
3.4 Viscosidad	100
- Dispersiones de WPC	100
- Soluciones de <i>lambda</i> -carragenina	105
- Mezclas de WPC y λ -C	108
- Efecto de la Temperatura	119
3.5 Conclusiones	126
CAPÍTULO IV - RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	
4.1 Emulsiones preparadas en Ultra Turrax	128
4.1.1 Emulsiones con WPC	128
4.1.2 Emulsiones con mezcla co-secada	141

ÍNDICE

4.2 Emulsiones preparadas en Homogeneizador a válvula	157
4.2.1 Emulsiones con WPC	157
4.2.2 Emulsiones con mezcla co-secada	176
CAPÍTULO V - CONCLUSIONES	193
Bibliografía	199

Listado de abreviaturas

Abreviaturas

A	área interfacial
Ac/ A	aceite en agua
A_D	área superficial específica de la fase dispersa
alfa-lact	alfa-lactoalbúmina
beta-Lg	beta-lactoglobulina
BSA	albúmina de suero bovina
C*	concentración de superposición incipiente de cadenas poliméricas
C**	concentración de contracción máxima de las cadenas poliméricas
CS	mezcla 8:1 WPC/ <i>lambda</i> - carragenina co-secada
D (1,0)	diámetro medio en relación al número de partículas
D (3,2)	diámetro medio en relación al área ocupada por las partículas
D (4,3)	diámetro medio en relación al volumen ocupado por las gotas
DSC	calorimetría diferencial de barrido
D. O.	densidad óptica
Ea	energía de activación
f (φ)	factor de impedimento
g	aceleración de la gravedad
HV	homogeneizador a válvula
I	fuerza iónica
IgG	inmunoglobulina G
K	índice de consistencia
K_∞	factor de frecuencia
l_e	tamaño de un remolino almacenador de energía
l_o	tamaño de un remolino disipador de energía
Mz	mezcla 8:1 WPC/ λ-C sin co-secar
n	índice de fluidez o comportamiento de flujo
NSI	índice de nitrógeno soluble
PM	peso molecular
PP	fracción proteasa peptona

Listado de abreviaturas

r	radio de la gota
Re	número de Reynolds
SDS	sodio dodecil sulfato
SE-HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños
ST	sólidos totales
T_o	temperatura de inicio de desnaturalización
T_p	temperatura del pico de transición
U	velocidad de cremado
u	velocidad de flujo local
\bar{u}	velocidad de flujo promedio en el tiempo
u'	relación entre la velocidad de flujo local y la velocidad de flujo promedio en el tiempo
U_A	potencial atractivo
U_A' (r)	potencial atractivo por depleción
U_R	potencial de repulsión
U_s	velocidad de Stokes
UT	homogeneizador Ultra Turrax
Ve	volumen de elusión
WPC	concentrado de proteínas de suero lácteo
WPI	aislado de proteínas de suero lácteo
ϵ	densidad de energía
ϕ	fracción en volumen de las partículas
ϕ_{\max}	fracción en volumen de empaquetamiento máximo de las partículas
γ	tensión interfacial
$\dot{\gamma}$	gradiente de velocidad de deformación o de corte
$\eta_{\infty A}$	factor de frecuencia
η	viscosidad
η'	viscosidad plástica o de Bingham

Listado de abreviaturas

η_a	viscosidad aparente
η_c	viscosidad de la fase continua
η_{red}	viscosidad reducida
η_s	viscosidad del solvente
η_{sp}	viscosidad específica
$[\eta]_0$	viscosidad intrínseca
ρ_c	densidad de la fase continua
ΔBS	delta de retro-dispersión de luz
$\Delta H t$	cambio de entalpía aparente calorimétrica total
Δp	presión de Laplace
τ	tensión de deformación o de corte
τ_0	tensión de fluencia
$\lambda-C$	<i>lambda</i> - carragenina
ν	frecuencia

Listado de tablas

TABLA N°	Pag.
1. Principales factores que afectan la estabilidad de una emulsión.	66
2. Temperaturas del pico (T_p), Temperaturas de inicio de desnaturalización (T_o) y cambios de entalpía aparente (ΔH_p) para el WPC, la mezcla 8:1 WPC/ λ -C y el CS a pH 6,7	96
3. Valores de los parámetros η (modelo de Newton) y de K y n (modelo de ley de potencia) de las dispersiones de WPC.	103
4. Valores de los parámetros K y n (modelo de ley de potencia) para las soluciones de λ -C.	106
5. Valores de los parámetros K y n (modelo de ley de potencia) para las mezclas WPC + 1,0 % (p/ p) λ -C.	110
6. Valores de los parámetros η (modelo de Newton) y de K y n (modelo de ley de potencia) para las soluciones de CS	117
7. Valores de η (modelo de Newton) y de K y n (modelo de ley de potencia), de las emulsiones con CS preparadas en el UT	147

Listado de figuras

Figura N°	Pag.
1. Mecanismos de desestabilización de una emulsión (Tadros, 2004)	3
2. Potencial total de interacción entre dos partículas a una dada fuerza iónica (DLVO) (Tadros, 2004)	53
3. Floculación por depleción o exclusión por polímeros	55
4. Representación del proceso de adsorción de una proteína (a) estabilización estérica de las partículas por una capa proteica saturada, (b) inmovilización de las partículas cubiertas de proteína en una estructura tipo gel y (c) floculación por puentes a baja concentraciones de proteína (Dickinson, 1998)	58
5. Reómetro RS600 ThermoHAAKE	81
6. Esquema de montaje PIDS (Barrido diferencial de intensidad de polarización) en el analizador de tamaño de partícula LS230	83
7. Analizador de barrido óptico vertical Quickscan.	86
8. (a). HPLC de exclusión por tamaños de los patrones de proteína (b) Ln PM versus Ve (volumen de elusión) de los patrones de proteína corridos por SE-HPLC	89
9. HPLC de exclusión por tamaños del WPC utilizando buffer fosfato 0,05M, pH 6,8 como fase móvil	91
10. HPLC de exclusión por tamaños del WPC utilizando buffer fosfato 0,05M, pH 6,8 + 0,15 M NaCl como fase móvil	92
11. HPLC de exclusión por tamaños de la mezcla co-secada utilizando buffer fosfato 0,05M, pH 6,8 como fase móvil	93
12. HPLC de exclusión por tamaños de la mezcla co-secada utilizando buffer fosfato 0,05M, pH 6,8 + 0,15 M NaCl como fase móvil	93
13. Calorimetría diferencial de barrido de las dispersiones de (a) WPC, (b) lambda-carragenina, (c) mezcla WPC/ λ -C y (d) el CS, a pH 6,7	94
14. Solubilidad del WPC y del CS en distintos solventes	98
15. (a) Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de WPC de concentración desde 0,37 a 10,5 % (p/ p) ST	101

Listado de figuras

Figura N°	Pag.
(b) Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de concentraciones desde 2,0 a 32,0 % (p/ p) ST	102
16. Viscosidad específica versus concentración de las dispersiones de WPC	104
17. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las soluciones de λ -C desde 0,1 a 2,0 % (p/ p)	105
18. Viscosidad específica versus concentración de las soluciones de lambda-carragenina	108
19. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las mezclas WPC (2,0 a 25,0 % (p/ p) ST) + 1,0 % (p/ p) λ -C	109
20. Viscosidad específica versus concentración de ST de las mezclas WPC + 1,0 % (p/ p) λ -C	112
21. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las mezclas WPC/ λ -C 8:1, 16:1 y 32:1 y de la dispersión de WPC al 32,0 % (p/ p) ST	114
22. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de CS a distintas concentraciones y la mezcla sin co-secar (MZ, curva de color negro)	116
23. Viscosidad específica versus concentración de sólidos de las dispersiones de CS	118
24. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de WPC a las concentraciones de las mezclas (a) 10,5; (b) 19,5; (c) 24,5 % (p/ p) ST y a la concentración de secado de la industria, (d) 32,0 % (p/ p) ST, a 20° y a 50 °C	120
25. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las soluciones de λ -C de (a) 0,77, (b) 1,22 y (c) 1,30 % (p/ p) a 20° y 50° C	122
26. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las mezclas (a) 8:1, (b) 16:1 y (c) 32:1 WPC/ λ -C a 20° y a 50 °C	124

Listado de figuras

Figura N°	Pag.
27. Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones preparadas con WPC en el UT de concentraciones (a) 0,37 y (b) 2,93 % (p/ p) de proteína	129
28. D (4,3) en función de la concentración de proteína de las emulsiones con WPC preparadas en el UT, con y sin SDS	130
29. Micrografías de las emulsiones con WPC preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína	131
30. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas con 0,37 a 2,93 % (p/ p) de proteína de WPC en el Ultra-Turrax	132
31. Retro-dispersión versus la altura de la muestra a distintos tiempos de las emulsiones con WPC preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína	133 - 134
32. Cinética de cremado de las emulsiones con WPC preparadas en el UT	135
33. Velocidad de cremado versus concentración de proteína de las emulsiones con WPC preparadas en el UT	137
34. Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones con CS preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,5 y (b) 4,0 % (p/ p) ST	141
35. D (4,3) versus concentración de sólidos de las emulsiones con CS preparadas en el UT	142
36. D (4,3) versus concentración de proteína de las emulsiones con WPC y CS preparadas en el UT	143
37. Micrografías de las emulsiones con CS preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST	144
38. Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones con 0,5 a 4,0 % (p/ p) ST de CS preparadas en UT	146
39. Tensión de corte a bajo gradiente versus concentración de sólidos de CS para las emulsiones preparadas en el UT	147

Listado de figuras

Figura N°	Pag.
40 Deltas de retro-dispersión de las emulsiones preparadas en el UT con CS de concentraciones (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST	148 - 149
41 Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el UT con el CS	150
42 Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37 y (b) 2,93 % (p/ p) de proteína	158
43 D (4,3) versus concentración de proteína de WPC con y sin SDS de las emulsiones preparadas en el HV	159
44 D (4,3) versus la concentración de proteína de las emulsiones preparadas con el WPC en el UT y en el HV	160
45 Micrografías de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína	161
46 Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas en el HV con WPC	162
47 Deltas de retro-dispersión de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína	163-164
48 Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el HV y estabilizadas con WPC	165
49 Tiempo de retardo versus concentración de proteína de WPC de las emulsiones preparadas en el HV	166
50 Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones preparadas en el HV con CS de (a) 0,5 y (b) 4,0 % (p/ p) de ST	176 - 177
51 D (4,3) versus concentración de ST de CS, con y sin SDS, de las emulsiones preparadas en el HV	178
52 D (4,3) versus la concentración de proteína %/ ST % de las emulsiones preparadas con el WPC/ CS en el HV	179
53 D (4,3) versus la concentración de sólidos de las emulsiones preparadas con CS en el UT y en el HV	180

Listado de figuras

Figura N°		Pag.
54	Micrografías de las emulsiones preparadas en el HV con CS de concentraciones (a) 0,5; (b) 2,5 y (c) 4,0 % (p/ p) ST	181
55	Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas en el HV con CS	182
56	Tensión de corte versus concentración de sólidos totales de CS a bajo gradiente (0,1 1/s) para las emulsiones preparadas en el HV	183
57	Delta de retro-dispersión versus la altura de la emulsión con (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST de CS para las emulsiones preparadas en el HV	185
58	Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el HV a distintas concentraciones de CS	187

Capítulo I

Introducción

y

Objetivos

1.1 Aspectos Teóricos

Las emulsiones han sido ampliamente utilizadas por la industria y, en particular en la de los alimentos, las mismas forman parte de un gran número de formulaciones. Dentro del área extremadamente amplia de aplicaciones prácticas de las emulsiones alimenticias podemos encontrar sistemas semi-sólidos, tales como la margarina y la manteca, y sistemas semi-líquidos como la leche, salsas, aderezos, mayonesas, formulaciones para bebés y distintas bebidas. Sumado a esto, el concepto de emulsión alimenticia también abarca una gama de productos que contiene tanto sólidos como gases en dos fases líquidas, tal como es el caso del helado.

En la tecnología de las emulsiones el factor más importante que ha de considerarse es su estabilidad dado que la percepción del consumidor acerca de la calidad del producto está influenciada por su apariencia.

Una emulsión es un sistema constituido por, al menos, dos líquidos inmiscibles los cuales se encuentran uno disperso en forma de gotas (fase dispersa) en el otro (fase continua). Debido a la inmiscibilidad de los líquidos, una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable y la llamada “estabilidad de la emulsión” se puede lograr únicamente de forma cinética. Por lo tanto, una emulsión estable es aquella con ningún cambio discernible en la distribución de tamaños de las gotas, en su estado de agregación o en su arreglo espacial dentro del volumen de muestra, durante el tiempo de observación (Dickinson, 2001).

INTRODUCCIÓN

Existe una serie de mecanismos a través de los cuales se produce el proceso de desestabilización tales como la coalescencia, la floculación, y la maduración de Ostwald, que incluyen una variación en el tamaño de partícula, y procesos como el cremado o la sedimentación, en los que se produce una migración de las mismas. Además, otro fenómeno que puede estar presente en una emulsión es la inversión de fases en el cual la fase continua y la fase dispersa se intercambian, es decir, la primera pasa a formar las gotas mientras que la segunda pasa a formar el medio de esas gotas. La caracterización y el control de estos mecanismos son claves a la hora de lograr la estabilidad de las emulsiones en los procesos tecnológicos (Figura 1).

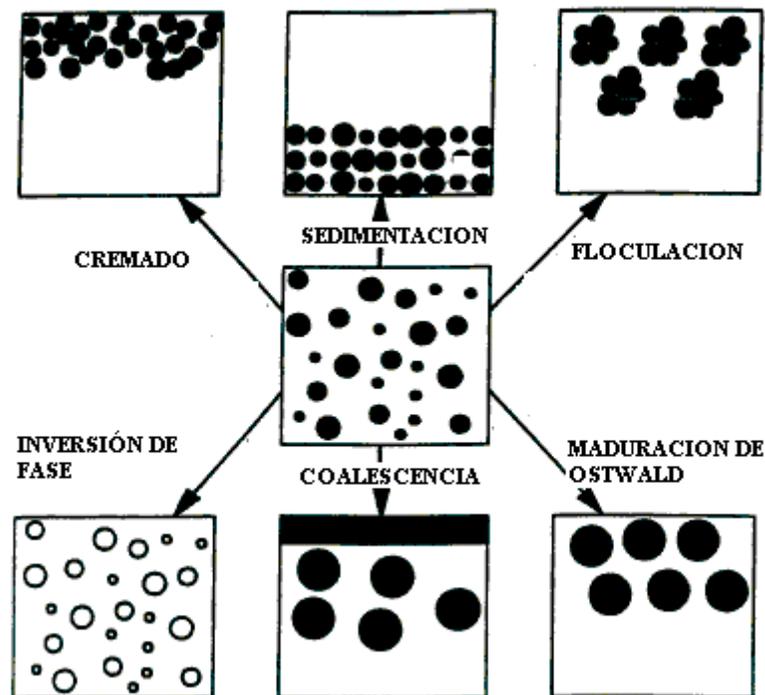


Figura 1: Mecanismos de desestabilización en una emulsión (Tadros, 2004).

INTRODUCCIÓN

En la formulación de emulsiones se puede normalmente distinguir entre dos tipos de ingredientes: el agente emulsificante (o emulsionante) y el estabilizante. El primero es una especie química simple o mezcla de especies que promueve la formación de la emulsión y la estabilización a corto plazo por acción interfacial. Existen dos clases de agentes emulsionantes utilizados en el procesamiento de alimentos los cuales pueden ser solubles en agua o en aceite: los surfactantes de molécula pequeña o bajo peso molecular tales como los monoglicéridos, polisorbatos, ésteres de sucrosa, lecitinas, etc., y los emulsionantes macromoleculares tales como las proteínas las cuales usualmente provienen de la leche, el huevo o la soja (Dickinson, 1992; Santiago y col., 1999, 2000; Bos y col., 2001; Wilde y col., 2004). Dadas sus características estructurales, cada clase de surfactante actúa en la interfase de un modo diferente.

Para que un emulsionante sea efectivo debe ser surfactivo, es decir, que tenga la capacidad de bajar la tensión de la interfase aceite-agua tanto substancialmente como rápidamente cuando está presente a las concentraciones típicamente utilizadas en el proceso de emulsificación. Cuanto más baja sea la tensión interfacial mayor será el grado de ruptura de las gotas durante la agitación o el flujo turbulento (Dickinson, 2001). Es decir, el efecto primario de tal adsorción molecular es reducir la tensión de la interfase pero tal reducción no explica en sí misma la formación de una emulsión más que con una estabilidad transiente.

INTRODUCCIÓN

En el caso de los surfactantes de bajo peso molecular, los mismos estabilizan la interfase a través de un mecanismo dinámico de auto-reparación. Sin un surfactante, la tensión interfacial del *film* líquido sería uniforme e insuficientemente estable ante una ruptura inducida por algún disturbio local en su superficie. Sin embargo, en presencia de un surfactante el mismo disturbio crearía un gradiente momentáneo en la adsorción y por lo tanto un gradiente en la tensión interfacial. De este modo, las áreas del *film* con alta tensión ejercerán una atracción sobre las áreas de menor tensión adyacentes lo cual resulta en un flujo de las moléculas hacia los sitios más delgados del *film*. Así, los surfactantes pueden hacer que la superficie resista cualquier deformación que cree un gradiente en la tensión interfacial y proveen de un mecanismo de auto-reparación denominado de Gibbs-Marangoni (Lucassen - Reynders, 1993; Wilde y col., 2004).

Por lo tanto, la función estabilizante esencial de las moléculas surfactivas durante la emulsificación es permitir a la interfase resistir deformaciones tangenciales y de este modo, una interfase cubierta por un emulsificante puede comportarse como una estructura bidimensional con propiedades dinámicas específicas.

Los cambios en la tensión superficial se deben a cambios en el área de la partícula y el efecto inmediato de tal expansión de la superficie es una disminución de la concentración adsorbida. Si no hay una reposición del surfactante desde la fase continua y si además, la tensión interfacial se ajusta inmediatamente al valor de equilibrio de la nueva adsorción la elasticidad de la

INTRODUCCIÓN

interfase será limitada. Por lo tanto, procesos de relajación tales como la difusión del surfactante a la superficie desde la fase continua y el re-arreglo de las moléculas en la superficie afectarán la elasticidad. El primer proceso es inevitable en las emulsiones donde la solubilidad es una característica necesaria del material surfactivo utilizado (Lucassen - Reynders, 1993).

De lo anterior se deduce que para lograr gotas pequeñas durante la emulsificación, el tiempo entre las colisiones de las gotas debe ser largo en relación con tiempo que le toma al emulsificante adsorberse a la nueva interfase aceite-agua y crear una capa estabilizante transiente, es decir, no necesariamente una cubierta de saturación completa.

A diferencia de los surfactantes de bajo peso molecular, las proteínas son menos surfactivas, tienen un mayor tamaño y se encuentran ancladas a la interfase en múltiples puntos por lo cual su movilidad es limitada y su mecanismo de estabilización es diferente.

Las proteínas son la clase de agente emulsionante más comúnmente utilizado por la industria alimenticia ya que son naturales, no tóxicas, baratas y están ampliamente disponibles, lo que las hace ingredientes ideales. Las mismas, por su carácter anfifílico, actúan como tensoactivos macromoleculares y tienen la particularidad de estabilizar la emulsión a través de la formación de una cubierta viscoelástica cuyas propiedades mecánicas influyen en la estabilidad del sistema coloidal.

Las proteínas tienen una morfología estructural compleja y el grado de adsorción a la interfase es afectado por su hidrofobicidad superficial, su carga,

INTRODUCCIÓN

su flexibilidad, etc. El cambio estructural que acompaña a la adsorción de la proteína puede ser suficiente para provocar la desnaturalización de la misma ya que un plegamiento alternativo de la molécula para minimizar la energía libre hidrofóbica es posible. De este modo, cadenas de aminoácidos anfifílicos se ubican en contacto con la superficie mientras que rulos y colas de aminoácidos hidrofílicos o hidrofóbicos se localizan alejados en cualquiera de las dos fases (Phillips, 1981; Dickinson y col., 1997; Dickinson, 2001; Wilde y col., 2004).

Las proteínas pueden dividirse simplemente en dos clases estructurales: aquellas que son desestructuradas y flexibles o *random-coil*, y aquellas que poseen una estructura tridimensional bien definida en solución. Se sabe que cuando estas últimas se adsorben a una superficie se desnaturalizan en tal grado que su estructura cambia de un estado nativo a estados que poseen estructuras menos regulares. Las proteínas de molécula globular rígida forman *films* altamente cohesivos y son más resistentes a la deformación mecánica que los *films* que poseen moléculas flexibles. Esto se debe a que las primeras poseen mas estructura residual que las segundas generándose un mayor número de entrecruzamientos entre las moléculas y dando mayor resistencia. La principal proteína del suero lácteo, la β -lactoglobulina, forma una capa densa y delgada la cual, luego de su adsorción, puede ser considerada como una monocapa compacta de partículas deformables. A medida que las moléculas globulares se despliegan se convierte en una capa bidimensional similar a un gel siguiendo la consolidación de las interacciones

INTRODUCCIÓN

intermoleculares no covalentes y los entrecruzamientos covalentes lentos. Además, al ser las proteínas polielectrolitos, confieren a la superficie una alta densidad de carga favoreciendo las fuerzas de repulsión coloidales de largo alcance (Dalglish, 1996; Dickinson, 2001).

El desarrollo de dicha película interfacial con elevada resistencia mecánica no es factible en el caso de los tensoactivos de bajo peso molecular debido a que las interacciones moleculares son más débiles. Individualmente, cada mecanismo (membrana viscoelástica y de Gibbs-Marangoni) puede conferir una alta estabilidad pero son mutuamente incompatibles. Esto causa un problema en los sistemas alimenticios que puede comprometer una mezcla de proteínas y surfactantes, ya que puede resultar en una competencia entre los dos mecanismos y conducir a la inestabilidad de la dispersión (Cornec y col., 1998; Rodríguez Patino y col, 2001).

En resumen, un agente emulsionante ideal, capaz de producir gotas pequeñas, está típicamente formado por especies de relativamente baja masa molecular con una buena solubilidad en la fase continua acuosa. Para que un biopolímero sea efectivo en la estabilización de partículas dispersas o gotas de emulsión debe exhibir las siguientes cuatro características: una fuerte adsorción, que forme una cubierta superficial completa, la formación de una capa estabilizante estérica gruesa y cargada (Dickinson, 2001).

Las proteínas lácteas, tanto en su forma soluble como dispersas, son de gran valor como ingredientes alimenticios con excelentes características surfactivas y estabilizantes. Las dos principales clases de proteínas lácteas son las caseínas

INTRODUCCIÓN

y las proteínas del suero. En términos de estructura de la capa adsorbida y propiedades mecánicas es conveniente distinguir entre ellas ya que las caseínas poseen una estructura desordenada y flexible mientras que las proteínas del suero tienen una estructura globular compacta.

Para conferir a una emulsión una estabilidad substancial se requiere de la presencia de un estabilizante. Este puede definirse como una especie química simple (o mezcla) que confiere a la emulsión una estabilidad a largo plazo, posiblemente por un mecanismo de adsorción, pero no necesariamente (Dickinson, 2003). Los estabilizantes, también conocidos como hidrocoloides o gomas, son una clase de polisacáridos de alto peso molecular, solubles en agua y de grado alimenticio. Tradicionalmente han sido considerados como agentes espesantes cuya funcionalidad cuenta con un aumento de la viscosidad, la formación de gel y la habilidad para ligar agua. Esta funcionalidad va a depender de la forma y tamaño de sus moléculas y de la conformación que adopten en la solución. Por otro lado, muchos hidrocoloides exhiben propiedades funcionales secundarias relacionadas tales como emulsificación, estabilización y encapsulación, pero dichas propiedades son generalmente limitadas lo que se atribuye a un insuficiente carácter anfifílico para producir una disminución rápida y substancial de la tensión interfacial durante la formación de las gotas. Además, el gran tamaño molecular de los hidrocoloides los hace un candidato improbable como buen agente emulsionante.

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones pueden además ser estabilizadas a través de partículas como es el caso de las micelas caseínicas y los cristales de grasa (Syrbe y col., 1998; Smewing, 1999; Dickinson, 2003).

Además de prolongar la vida útil de un producto, los hidrocoloides son utilizados por su capacidad para controlar la textura de los alimentos. Cada hidrocoloide confiere atributos texturales únicos pero la manera en que los imparte en un alimento puede variar de acuerdo al ingrediente en cuestión y dependerá, por ejemplo, del tipo, origen y concentración así como también de las propiedades físicas del sistema en particular. Factores tales como temperatura, agitación, pH y fuerza iónica influyen en el desempeño de un hidrocoloide en cualquier aplicación y los efectos que estos factores pueden tener sobre la funcionalidad son específicos del hidrocoloide en cuestión (Smewing, 1999).

Los polisacáridos son agregados a las emulsiones alimenticias para estabilizar las gotas frente al cremado y, como ya dijimos, para modificar sus propiedades texturales. La estabilización se da, ya sea, porque aumentan la viscosidad de la fase continua o, en emulsiones concentradas, forman una red tridimensional similar a un gel que imparte propiedades elásticas adicionales a todo el sistema de forma tal que el cremado de la emulsión queda fuertemente inhibido (Quintana y col, 2002).

Se sabe que el uso de tal estrategia lleva el riesgo de la floculación de las gotas a través de un mecanismo de depleción. Los hidrocoloides que inducen una fuerte floculación por depleción, sin embargo, pueden producir una

INTRODUCCIÓN

reestabilización aparente con respecto a la separación del suero debido a la formación de una red estable de gotas agregadas similar a un gel (Manoj y col., 1998; Gunning y col., 1988; Robins y Hibberd, 1998; Dickinson, 2001). No obstante, existen limitaciones en el agregado de polímeros a una formulación no sólo por las razones antes expuestas si no también porque un aumento del nivel de concentración por arriba de ciertos límites puede resultar en texturas y/o “flavours” desagradables.

Los polisacáridos más comúnmente utilizados en los alimentos son: almidones, goma guar, goma locust bean, pectinas, alginatos, goma xántica, goma arábica, derivados de la celulosa, carrageninas y, en menor medida, agar y gomas karaya y tragacanto (Smewing, 1999).

Las carrageninas son un material polisacárido que se produce naturalmente el cual llena los espacios en la estructura celulósica de las algas rojas. Como resultado de su capacidad gelificante y de su interacción con las proteínas lácteas, este material hidrocoloide extraído es extensamente usado por la industria alimenticia para gelificar, espesar y estabilizar sistemas de alimentos (Thomas, 1999).

La interacción entre proteínas y polisacáridos es una excelente alternativa para mejorar la funcionalidad de las proteínas como emulsionantes y su manipulación ofrece una oportunidad para controlar sensiblemente la estabilidad y la textura de sistemas alimenticios estructurados multicomponentes. Los complejos proteína-polisacárido pueden ser considerados como componentes alimenticios teniendo propiedades

funcionales características propias y una ventaja de su utilización es la amplia aceptación de estas mezclas como ingredientes alimenticios potencialmente seguros.

Fase Continua

Componentes de la Fase Continua

Una emulsión es básicamente un sistema formado por dos fases: una acuosa o continua y una aceite o dispersa. En la primera, se encuentran generalmente disueltos el agente emulsionante y el agente estabilizante pero también, en menor medida y de acuerdo a su afinidad por el solvente, pueden encontrarse disueltos en la fase aceite. Como se mencionó previamente, la formación y la estabilidad de las emulsiones dependen primariamente del comportamiento de los agentes surfactivos, y los ingredientes de proteínas de suero lácteo son, con frecuencia, elegidos por este rol funcional. La creciente preferencia del consumidor por productos alimenticios más sabrosos, saludables, convenientes y naturales, ha provisto a la industria láctea de una oportunidad única de desarrollar y suministrar ingredientes de proteínas lácteas para mejorar las propiedades funcionales de los productos alimenticios. Las proteínas del suero se pueden encontrar comercialmente bajo dos formas: como aislados proteicos (WPI) o como concentrados proteicos (WPC), conteniendo el primero una mayor concentración de proteína y menos impurezas que el segundo pero de mayor costo debido a que requiere mayor procesamiento. Cuando la caseína se forma dentro de la estructura del queso o se retira de la leche para producir caseinato

INTRODUCCIÓN

o ingredientes caseínicos, el suero remanente contiene aproximadamente 0,6 % de proteína y 93 % de agua. Este suero puede ser procesado en ingredientes alimenticios secando simplemente, o bien, el contenido de proteína puede luego ser incrementado removiendo los lípidos, minerales y la lactosa. Producir concentrados de proteínas de suero (25 - 80 % de proteína) y aislados (\geq 90 % de proteína) requiere que grandes cantidades de compuestos no proteicos sean removidos por lo que las tecnologías de separación fueron el foco durante el primer desarrollo de estos productos (Foegeding y col., 2002).

Los principales componentes de las proteínas de suero son la β -lactoglobulina (60 %), la α -lactoalbúmina (22 %), la albúmina de suero bovino (BSA) (5,5 %) y las inmunoglobulinas (9,1 %) (Bryant y Mc Clements, 1998). Las dos proteínas más importantes (la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina) consisten en cadenas de aminoácidos plegadas en una estructura tridimensional compacta mantenida por muchos enlaces no covalentes débiles y algunos puentes disulfuro (Yamul - Lupano, 2003).

Las proteínas de suero exhiben propiedades funcionales únicas tales como emulsificación, gelación, espesamiento, espumado y capacidad para ligar agua. Además, tienen la ventaja de su alto valor nutritivo y de tener grado GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) haciéndolo un ingrediente confiable (Bryant y Mc Clements, 1998; Berli y Deiber, 1997; Dickinson, 2001).

Tales propiedades funcionales han sido tratadas de explicar en términos de propiedades a nivel monomérico o molecular pero se ha reconocido que generalmente estructuras de mayores niveles, terciaria o cuaternaria, pueden

INTRODUCCIÓN

jugar un rol significativo. Además, la presencia de otros ingredientes y las operaciones de procesamiento modifican dichas propiedades funcionales (Boulet, Britten y Lamarche, 2000; Foegeding y col., 2002).

Las propiedades de espesamiento o de formación de geles de las proteínas de suero dependen de su habilidad para formar agregados. En su estado nativo, las fuerzas atractivas entre las moléculas de proteínas (principalmente de van der Waals e hidrofóbicas) no son lo suficientemente fuertes para superar las fuerzas repulsivas (principalmente electrostáticas, de hidratación y de entropía) y las moléculas tienden a existir ya sea como entidades individuales o como pequeños agregados. Muchos de los aminoácidos reactivos (residuos no polares y de cisteína) están localizados en el interior de las proteínas globulares y por lo tanto, es necesario usualmente promover algún grado de desnaturalización para que la agregación ocurra (Bryant y Mc Clements, 1998; Euston y col., 2000).

Las propiedades espumantes y emulsificantes de las proteínas de suero se deben a su habilidad para comportarse como un agente tensoactivo. Como ya vimos, el éxito de estas proteínas como emulsificantes se debe por un lado a su capacidad para adsorberse a la interfase aceite-agua y estabilizar las gotas a medida que se van formando en el homogeneizador y, por el otro, a que forman una membrana protectora que previene de la coalescencia. Las proteínas de suero, con relación a proteínas tales como las caseínas, presentan una serie de ventajas y desventajas. Por un lado, las proteínas de suero pueden ser utilizadas en un mayor rango de pH que las caseínas. Esto se debe a que su

INTRODUCCIÓN

solubilidad pasa por un mínimo en su punto isoeléctrico (próximo a 5) mientras que las caseínas son insolubles a pHs por debajo de su punto isoeléctrico (alrededor de 4,5). Esto hace que las proteínas de suero sean particularmente adecuadas para la emulsificación en condiciones ácidas. Por otro lado, la estabilidad al calor de las emulsiones estabilizadas con proteínas de suero es menor que la de las emulsiones con caseínas. Esto es un resultado de las características de desnaturalización de la β -lactoglobulina y de la α -lactoalbúmina las cuales, cuando son calentadas por arriba de la temperatura de desnaturalización (arriba de 65° C), se despliegan y agregan (Dalglish, 1996; Euston y col., 2000).

Por sus excelentes propiedades emulsificantes las proteínas de suero han sido utilizadas en un amplio rango de productos alimenticios procesados y han sido objeto de numerosos estudios (Pearce y Kinsella, 1978; Yamauchi y col., 1980; Demetriades y col., 1997; Reiffers-Magnani y Watzke, 1999, 2000; Ye y Singh, 2000; İbaloğlu, 2002; Chanamai y McClements, 2002; Keowmaneechai y McClements, 2002; Kulmyrzaev y Schubert, 2004).

Existen principalmente dos razones para la utilización de hidrocoloides en la industria láctea: en primer lugar, mejoran la textura, dando cuerpo a las formulaciones líquidas y produciendo geles; tal es el caso del yogur bebible, de flanes, postres, etc; y, en segundo lugar, incrementan la vida útil del producto, el cual, de otro modo, sufriría un proceso de sedimentación o flotación de partículas y de cremado o floculación de gotas; por ejemplo, en bebidas frutales, leches acidificadas, leches chocolatadas, crema, fórmulas infantiles,

INTRODUCCIÓN

etc.. Entre los hidrocoloides utilizados en la industria láctea con un pH aproximadamente neutro, las carrageninas son probablemente las principales. Se pueden distinguir dos aplicaciones, las cuales difieren significativamente en el nivel de concentración de carragenina. Por un lado, productos gelificados que contienen carrageninas como agentes gelificantes a altas concentraciones, y, por el otro lado, emulsiones o suspensiones lácteas donde las carrageninas ejercen una función estabilizante a concentraciones diez veces más bajas (Syrbe y col., 1998). El término carrageninas describe un rango de polisacáridos lineales sulfatados compuestos por residuos de galactosa unidos por enlaces glicosídicos alternados β -1,3 y α -1,4. Las tres principales fracciones de las carrageninas son la kappa (κ), la iota (ι) y la *lambda* (λ) las cuales se diferencian en el número y posición de los grupos sulfato y en la cantidad de 3,6-anhidro-D-galactosa que contienen. La kappa-carragenina posee un grupo sulfato, la iota dos y la *lambda* tres. La κ - y la ι -carragenina sufren, en solución acuosa, una transición reversible dependiente de la temperatura de una estructura desordenada (*random coil*) a una estructura ordenada (hélice) a través de los grupos sulfato y del anillo 3,6-anhidro-D-galactopiranosil. La temperatura de transición depende principalmente del medio iónico y la conformación en hélice está fuertemente asociada con la formación de gel. Por su parte, la λ -carragenina posee una conformación *random coil* a cualquier temperatura y medio iónico y es incapaz de gelificar debido a que no posee el anillo 3,6-anhidro-D-galactopiranosil. Estas diferencias estructurales tienen un importante efecto no solo sobre sus propiedades gelificantes sino también

INTRODUCCIÓN

texturales, de solubilidad, sinérgicas y temperaturas de fusión (Thomas, 1999; Langendorff y col., 1999; Rodd y col., 2000; Gu, Decker y McClements, 2004).

Las carrageninas tienen numerosas aplicaciones debido a que un amplio rango de propiedades puede ser desarrollado utilizando las interacciones entre los distintos tipos de carrageninas, las proteínas lácteas y otros hidrocoloides (harina konjac, goma locust bean) (Thomas, 1999). Como parte del grupo de los polisacáridos sulfatados, las carrageninas interactúan con las proteínas a pHs tanto por arriba como por debajo del punto isoeléctrico de las mismas. Las interacciones por arriba del punto isoeléctrico, donde tanto las proteínas como las carrageninas tienen carga neta negativa, han sido atribuidas a la habilidad de los grupos sulfato aniónicos de las carrageninas de formar interacciones electrostáticas con los grupos catiónicos de las proteínas (Syrbe y col., 1998; Dickinson, 1998; De Kruif y Tuinier, 2001; Tolstoguzov, 2003). Estas interacciones iónicas han sido demostradas para las tres carrageninas con las micelas caseínicas bajo ciertas condiciones (Langendorff y col., 2000).

Caracterización de la Fase Continua

La forma en la que las proteínas y los polisacáridos se comportan en un sistema alimenticio dado o aplicación alimenticia, es decir su funcionalidad, es una manifestación de las propiedades fisicoquímicas fundamentales de los mismos bajo determinadas condiciones. Debido a que los sistemas alimenticios generalmente son muy complejos, involucrando numerosos constituyentes, y a que las propiedades funcionales son muy sensibles a las operaciones de

INTRODUCCIÓN

procesamiento, a los métodos de preparación y a las condiciones de medición, ha sido difícil estandarizar los ensayos funcionales, generalizar los hallazgos y utilizar los resultados medidos en un sistema para predecir el comportamiento en otro.

Con el objeto de obtener información tanto del agente emulsionante como del agente estabilizante presentes en la fase continua, se pueden realizar ensayos tales como:

Calorimetría Diferencia de Barrido: La desnaturalización térmica de la β -lactoglobulina, la proteína más abundante en el suero, ha sido ampliamente estudiada (Boye y col., 1995; Baeza & Pilosof, 2002; Spahn y col., 2007) y la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido muy útil en su estudio. No obstante, el análisis termodinámico de las curvas de DSC puede ser dificultoso debido a la irreversibilidad de la reacción que surge de la contribución de la agregación de la proteína desnaturalizada. Ya que la desnaturalización es un proceso endotérmico y la agregación uno exotérmico, y ambos se superponen, solo un pico se observa en los termogramas.

La presencia de polisacáridos en soluciones proteicas influye de gran manera en el comportamiento funcional y térmico de las mismas. Por arriba del punto isoeléctrico de la proteína la incompatibilidad termodinámica entre ambos se produce debido a las interacciones electrostáticas repulsivas y a las diferentes afinidades por el solvente. Por lo tanto, la proteína y el polisacárido pueden coexistir en una sola fase pero en dominios en los cuales se excluyen mutuamente o segregan en diferentes fases (Tostoguzov, 1986; Dickinson,

INTRODUCCIÓN

1998; Syrbe y col., 1998; De Kruif y Tuinier, 2001; Baeza y Pilosof, 2001; Tolstoguzov, 2003).

Solubilidad: La solubilidad, junto con la viscosidad, son dos propiedades experimentalmente mensurables que pueden generar información acerca del comportamiento funcional así como también de la naturaleza fisicoquímica de las proteínas.

La importancia de esta propiedad reside en que provee, en algunos casos, un índice de la estructura nativa de la proteína y a que es un pre-requisito para utilizar la misma en bebidas, alimentos fluidos y para la formación de emulsiones y espumas. Idealmente, la solubilidad en condiciones de saturación representa el equilibrio entre las fases sólida y soluble. Sin embargo, esta propiedad depende, como se menciono anteriormente, de las condiciones de procesamiento y de los métodos utilizados para su determinación. La mayoría de las proteínas alimenticias son poblaciones heterogéneas de diferentes proteínas con diferentes propiedades, cada una de las cuales puede responder de manera particular a las distintas condiciones de procesamiento. Algunas fracciones pueden ser muy susceptibles a la desnaturalización mientras que otras pueden ser altamente estables. Por lo tanto, la solubilidad depende de las propiedades inherentes a la misma (composición, tamaño, carga superficial) y de las condiciones prevalecientes del medio.

La solubilidad de una proteína refleja su conformación, la cual en cambio, es gobernada en gran parte por la estructura y el estado físico del agua. La habilidad de una proteína para plegarse y ubicar la mayoría de sus residuos

INTRODUCCIÓN

apolares internamente le permite solubilizarse. Debido a que las fuerzas hidrofóbicas juegan un rol significativo en la solubilidad de una proteína, los factores que alteren la estructura del agua, como por ejemplo las sales y la urea, alteran la conformación proteica y su solubilidad.

Esta propiedad de las moléculas proteicas en agua es afectada por numerosos parámetros. Desde el punto de vista termodinámico, la solubilización corresponde a una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las de proteínas, previa a una dispersión de estas últimas en el disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente. Por lo tanto, para que una proteína pueda solubilizarse será necesario que reaccione, todo lo posible, con el disolvente (enlaces puente hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas). La solubilidad depende fundamentalmente del pH, la fuerza iónica, el tipo de disolvente y la temperatura.

Una proteína en solución, con valores de pH superiores o inferiores al punto isoeléctrico (pI), tiene carga negativa o positiva y las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización. Además, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienen la tendencia a repelerse y por lo tanto a disociarse y desdoblarse. Para los valores de pH próximos al pI, las moléculas proteicas manifiestan un mínimo de interacciones con el agua y sus cargas netas son lo bastante débiles para que las cadenas polipeptídicas puedan aproximarse. Algunas veces se forman

INTRODUCCIÓN

agregados que pueden conducir a una precipitación (Pelegri y Gasparetto, 2005).

Por su parte, la fuerza iónica puede afectar a la solubilidad de una proteína de dos maneras diferentes. El efecto de una sal depende de su concentración, de la carga de los iones y de su efecto sobre la estructura del agua. Los iones de sales neutras a bajas concentraciones pueden aumentar la solubilidad de la proteína (efecto salting-in). Esto se debe a que los iones de las sales interactúan con las cargas de las proteínas y disminuyen la atracción electrostática entre cargas opuestas de grupos próximos. Por lo tanto, la solvatación debido a estos iones permite aumentar la solvatación de las proteínas y por lo tanto, su solubilidad.

Si la concentración de las sales neutras se incrementa, la solubilidad de la proteína disminuye y puede conducir a la precipitación. Este efecto (salting-out) resulta de la competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua necesarias para su solvatación. En estas condiciones, las interacciones proteína-proteína resultan más importantes que las interacciones proteína-agua y esto puede conducir a la agregación seguida de la precipitación de las moléculas proteicas.

La adición de algunos disolventes, tales como el etanol o la acetona, a una solución acuosa de proteína disminuye la constante dieléctrica (ϵ) del medio. De esta forma disminuyen las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre las moléculas proteicas lo que contribuye a su agregación y precipitación.

Como regla general, la solubilidad de las proteínas aumenta cuando la temperatura se eleva de 0 a 40 - 50 °C. Por arriba de estas temperaturas el

INTRODUCCIÓN

movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Esta desnaturalización va seguida, frecuentemente, de una agregación y la solubilidad de la proteína desnaturalizada llega a ser menor que la de la proteína nativa (Pelegri y Gasparetto, 2005).

Con el fin de intentar predecir las posibles interacciones entre las moléculas proteicas en solución, otra posibilidad es analizar el uso de distintos solventes. La mayor parte de los solventes orgánicos pueden considerarse como agentes desnaturalizantes. Modifican la constante dieléctrica del medio y por lo tanto las fuerzas electrostáticas que contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Los solventes orgánicos apolares pueden penetrar en las zonas hidrófobas, romper las interacciones hidrofóbicas y favorecer la desnaturalización. Su acción también puede ser el resultado de su interacción con el agua.

Varios compuestos orgánicos, tal como la urea y las sales de guanidina contribuyen, en soluciones concentradas, a la ruptura de enlaces puente hidrógeno y provocan, con variada intensidad, una desnaturalización de la proteína. Estos compuestos también disminuyen las interacciones hidrofóbicas al aumentar la solubilidad en el agua de los residuos de aminoácidos apolares.

Los agentes tensoactivos, tales como el SDS (Sodio dodecil sulfato), son agentes desnaturalizantes enérgicos. Estos compuestos actúan como intermediarios entre las regiones hidrófobas de la proteína y el entorno hidrófilo, por lo que rompen las interacciones hidrofóbicas y contribuyen al desdoblamiento de la proteína nativa.

INTRODUCCIÓN

Los agentes reductores (cisteína, ácido ascórbico, β -mercaptoetanol ditioneitol) reducen las uniones disulfuro y modifican así la conformación de las proteínas. Las proteínas en solución pueden asumir numerosas conformaciones diferentes y así incrementar su entropía conformacional. La cadena polipeptídica de las proteínas, o *estructura primaria*, tiende a formar conformaciones de una manera específica, también llamadas *estructuras secundarias*, como por ejemplo α -hélice, β -hoja plegada o *random coil*. Las *estructuras terciarias* y *cuaternarias* de las proteínas son las denominaciones de la estructura tridimensional y de la asociación de entidades proteicas en solución, respectivamente. La integridad y la estabilización de estas estructuras en un sistema proteico dado dependen de diferentes fuerzas las cuales usualmente son no covalentes pero en algunas proteínas alimenticias los enlaces covalentes disulfuro son también importantes como por ejemplo en las proteínas de soja y en las β -lactoglobulinas. Las fuerzas no covalentes usualmente involucran puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

Las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno son ambos de naturaleza iónica, donde el primero involucra cualquier grupo catiónico o aniónico de la proteína y el último se refiere a enlaces donde el átomo de H esté involucrado. Fuerzas electrostáticas repulsivas/ atractivas se producen entre cargas similares/ diferentes sobre la molécula proteica, respectivamente. Tanto el pH como la fuerza iónica de la solución tienen un gran efecto sobre esta clase de fuerzas. Por ejemplo, cuanto más alejado esté el pH del punto

INTRODUCCIÓN

isoeléctrico mas extendida será la conformación debido a fuerzas repulsivas mientras que más cerca del mismo es probable que se produzca la atracción entre cargas opuestas lo que conducirá a la formación de puentes internos y a una conformación más compacta. Esta última conformación generalmente da lugar a una menor solubilidad.

Las fuerzas de Van de Waals son generales, no específicas, de corto alcance y operan entre grupos próximos opuestos en polipéptidos adyacentes. Las interacciones hidrofóbicas se basan en la atracción usualmente fuerte entre grupos no polares (hidrofóbicos) sobre la molécula proteica en agua. Estas fuerzas son las principales detrás del plegamiento proteico en la estructura terciaria.

La formación de la estructura cuaternaria en solución es generada por la asociación de subunidades proteicas en unidades mayores y está principalmente gobernada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

En solución, la mayoría de las proteínas globulares están compactamente plegadas con los grupos polares y cargados expuestos al medio acuoso y los residuos no polares plegados hacia el interior, lejos de la fase acuosa. Las proteínas globulares tienden a ser esféricas para crear la mayor superficie posible para la hidratación de los grupos polares. No obstante, a medida que el tamaño molecular se incrementa hay una tendencia de la relación entre los residuos hidrofílicos/ hidrofóbicos a disminuir. Sin embargo, el área superficial puede incrementarse a volumen constante haciendo que la forma de la proteína sea más asimétrica, es decir, ciertas proteínas de alto peso molecular asumen

INTRODUCCIÓN

formas elipsoidales para acomodar más grupos polares en la superficie. Si estos cambios no pueden lograrse entonces resultan estructuras de subunidades oligoméricas.

Cuando la asociación de las entidades proteicas es demasiado grande, conduciendo a una menor estabilidad coloidal del sistema, la solubilidad de la proteína disminuye. Por lo tanto, la solubilidad es una de las características a medir a la hora de estudiar proteínas alimenticias en solución (Shenz, 1981; Kinsella, 1982; Cheftel, 1989).

Las principales fracciones proteicas del suero lácteo, la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, no forman la misma estructura cuaternaria que las caseínas. La α -lactoalbúmina existe en forma monomérica en la región alcalina del punto isoeléctrico (pI 4,2 - 4,5) mientras que la β -lactoglobulina (pI 5,35) forma dímeros a pH 5,1 y octámeros a pHs en el rango de 3,7 a 5,1. De acuerdo a Tornberg y col. (1997), se ha observado una apreciable disociación de estas estructuras a pHs menores de 3,5 y mayores de 7,5. Estas interacciones que dependen del pH son debidas a cambios en la ionización de aminoácidos ácidos y básicos que tienen un efecto sobre la formación y disociación de enlaces hidrofóbicos y disulfuro.

Viscosidad: La propiedad del material más ampliamente utilizada para la caracterización de fluidos es la viscosidad debido a que esta, como ya dijimos, nos provee información tanto de las propiedades funcionales como fisicoquímicas de la muestra en estudio. La viscosidad se puede definir como la resistencia interna de un líquido a fluir. Ésta fricción o rozamiento interno,

INTRODUCCIÓN

difiere del de los sólidos en que, tratándose de un verdadero fluido, la más mínima fuerza aplicada de un modo continuo durante un largo período de tiempo, produce un flujo continuo.

Con el objetivo de deformar un material, ya sea romper una estructura o inducir el flujo, se debe aplicar una fuerza. La deformación lograda va a depender del área sobre la cual la fuerza actúe. Por esta razón podemos definir la *tensión* como la fuerza por unidad de área y medir, consecuentemente, la *deformación* inducida. Actualmente existen equipos de medición que permiten aplicar una deformación sobre la muestra y medir la tensión producida.

En el caso de los fluidos se habla de tensión de corte (τ), que es aquella tensión aplicada tangencialmente, y de gradiente de velocidad de deformación o de corte ($\dot{\gamma}$), que se define como el gradiente de velocidad establecido en un fluido como resultado de la tensión de corte aplicada (Rao, 1999). De esta forma podemos introducir la definición de viscosidad de la siguiente manera:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{Ec. N}^\circ 1)$$

La función de viscosidad puede utilizarse para clasificar el comportamiento de flujo de una muestra. Se habla de un comportamiento *newtoniano* cuando la viscosidad es independiente de la velocidad de deformación y de su historial de deformación previo. Por lo tanto la viscosidad es una constante y solo se ve influenciada por la temperatura y la composición.

INTRODUCCIÓN

En general, se puede decir que las disoluciones tienen un comportamiento Newtoniano cuando las moléculas son de tamaño pequeño (menos de mil átomos), aunque también influye la concentración. Incluso disoluciones macromoleculares pueden ofrecer un comportamiento newtoniano si se encuentran a bajas concentraciones. Para que una suspensión macromolecular ofrezca comportamiento newtoniano la macromolécula debe presentar simetría, una estructura discontinua y no debe presentar variaciones de forma y de tamaño durante la medición. Además es preciso que no haya interacciones entre las macromoléculas o que la interacción sea independiente de la velocidad de flujo (Rao, 1999).

Teniendo en cuenta que la mayoría de los alimentos son sistemas multicomponentes o multifásicos, la primera consideración que hay que hacer es como se comporta un componente disperso o disuelto en una matriz, que generalmente es agua pero que también puede ser grasa, aceite, alcohol o un ester. Con este fin, se deben considerar en primer lugar las soluciones y dispersiones diluidas. El sistema de dos fases más simple es un modelo de partículas esféricas pequeñas que no interactúan, dispersas en un fluido de baja viscosidad; y para el cual interesa conocer como afecta a la viscosidad el incremento en el número de tales partículas. El análisis a este problema se puede hacer a través de la ecuación de Einstein:

$$\eta = \eta_s (1 + k \phi) \quad (\text{Ec. N}^\circ 2)$$

INTRODUCCIÓN

donde ϕ es la fracción en volumen de las partículas, es decir, el volumen de las partículas dividido el volumen de las partículas mas el volumen del solvente; η es la viscosidad de la suspensión, η_s es la viscosidad del solvente solo y k es una constante con un valor de 2,5 para esferas.

Tal ecuación puede ser escrita de la siguiente manera:

$$k = (\eta - \eta_s) / (\eta_s \phi) \quad (\text{Ec. N}^\circ 3)$$

Si las densidades de la fase dispersa y de la fase fluida son próximas a uno, la fracción en volumen ϕ es igual a la concentración. De esta forma queda definida la viscosidad reducida del sistema independizándonos de la masa:

$$\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{sp}} / c \quad (\text{Ec. N}^\circ 4)$$

A su vez, podemos definir la viscosidad intrínseca del sistema, $[\eta]_0$, como:

$$[\eta]_0 = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{\text{red}} \quad (\text{Ec. N}^\circ 5)$$

de esta fórmula se desprenden dos puntos importantes: la viscosidad intrínseca para partículas esféricas es independiente del tamaño de partícula y es igual a $2,5 \times 10^{-2}$ dl / g, y, segundo, que la viscosidad intrínseca no tiene

INTRODUCCIÓN

unidades de viscosidad sino la recíproca de la concentración y provee información acerca de la naturaleza de las especies dispersas aisladas.

En la medición de las proteínas globulares se encuentran desviaciones a este valor de viscosidad intrínseca y esto es debido no tanto al efecto del tamaño como a las variaciones en la forma de las moléculas.

Un número de componentes alimenticios, incluyendo a los polisacáridos, se comporta de forma similar a un polímero sintético *random coil* en solución. Con relación a las proteínas globulares, un polisacárido *random coil* ocupa un volumen mucho mayor aunque la densidad de segmentos por unidad de volumen es menor. Sin embargo, la viscosidad intrínseca mide el volumen abarcado por la cadena polimérica (volumen hidrodinámico), y aunque en promedio, gran parte de este volumen está ocupado por solvente, el flujo de este hacia el centro de la cadena polimérica es restringido.

La ecuación de Einstein solo se aplica para fracciones en volumen de fase dispersa muy pequeñas o para soluciones de muy bajas concentraciones. En la realidad, la viscosidad se incrementa muy rápidamente a medida que se incrementa la fracción de fase dispersa y, a una cierta concentración, se vuelve demasiado grande para medirla. Para partículas rígidas este límite corresponde al estado en que todas las partículas de la fase dispersa se están tocando entre sí, es decir, cuando la fracción en volumen de las partículas es igual a la fracción de empaquetamiento máximo, ϕ_{\max} . Esta fracción de empaquetamiento depende de la forma de las partículas y de la manera en la cual se empaquetan.

INTRODUCCIÓN

Para partículas no rígidas, tal como una esfera blanda hipotética adoptada por un polímero flexible en solución, las cadenas tienden a interpenetrar unas a otras los dominios de las esferas. Al igual que para las partículas rígidas, a medida que ϕ se aproxima a ϕ_{\max} hay un incremento dramático en la viscosidad. La concentración a la cual este cambio ocurre está inversamente relacionada con el volumen ocupado por las cadenas aisladas y, en términos de concentración, es aquella a la cual la superposición incipiente de las cadenas ocurre, C^* , y está dada por:

$$c^* \approx S / [\eta] \quad (\text{Ec. N}^\circ 6)$$

donde S es un parámetro que refleja el grado de interpenetración y el efecto de la interacción entre cadenas.

Por lo tanto, por arriba de C^* la viscosidad se incrementa muy rápidamente con el incremento de la concentración y al mismo tiempo la viscosidad misma se vuelve más dependiente de la velocidad de deformación. Estas soluciones se conocen como soluciones semi-diluidas. Cuando $C = C^*$, las moléculas comienzan a superponerse pero no hay contracción de las mismas. A medida que C se incrementa, las cadenas poliméricas se contraen pero este fenómeno no ocurre indefinidamente y la cadena alcanza una dimensión mínima a una concentración C^{**} que es independiente del peso molecular. Por arriba de C^{**}

INTRODUCCIÓN

el régimen se conoce como concentrado y en este punto, la viscosidad nuevamente se incrementa rápidamente con la concentración.

Existen numerosas expresiones que modelan el incremento de la viscosidad con la concentración pero en la práctica a medida que la viscosidad aumenta la suspensión tiende a ser cada vez menos ideal.

Los fluidos que no siguen un comportamiento newtoniano son llamados fluidos *no newtonianos* y la velocidad de deformación afecta las propiedades de flujo. De esta forma, para cada valor de velocidad de deformación voy a tener un valor de viscosidad diferente. A esta viscosidad se la denomina viscosidad aparente.

Dentro de los fluidos con comportamiento *no newtoniano* podemos encontrar dos categorías: aquellos que son *independientes del tiempo* y los que son *dependientes del tiempo*. En el primer caso, a una temperatura y concentración dadas, la viscosidad depende solo de la velocidad de deformación; mientras que en el segundo, la viscosidad depende además del tiempo que se aplica la velocidad de deformación.

Así, se pueden clasificar los fluidos no Newtonianos independientes del tiempo en: *pseudoplásticos* y *dilatantes*, de acuerdo a si la viscosidad aparente disminuye o se incrementa, respectivamente, con el aumento de la velocidad de deformación. Así mismo, los fluidos no newtonianos con un comportamiento dependiente del tiempo se pueden subdividir en fluidos *tixotrópicos* y *reopéxicos*. A una velocidad de deformación dada, la viscosidad aparente disminuye con el tiempo en el caso de los fluidos tixotrópicos y aumenta en los

INTRODUCCIÓN

fluidos reopéxicos. Ambos fenómenos pueden ser irreversibles, reversibles o parcialmente reversibles. Todos estos términos reflejan una “estructura” generada ya sea por la aglomeración de partículas o la asociación de cadenas poliméricas.

Los numerosos modelos de flujo que se encuentran en la literatura son ecuaciones matemáticas que proveen una manera conveniente y concisa de describir los datos y han sido extensamente utilizados en el análisis del comportamiento de alimentos fluidos. Estos modelos pueden ser divididos entre aquellos para comportamientos de flujo independientes del tiempo y para dependientes del tiempo. Entre los modelos para comportamientos de flujo independientes del tiempo encontramos:

Modelo Newtoniano

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Ec. N}^\circ 7)$$

Para la definición de un fluido Newtoniano la tensión de corte (τ) es proporcional a la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), y un único parámetro, la viscosidad, η , caracteriza los datos.

Modelo de Bingham

$$\tau - \tau_0 = \eta' \dot{\gamma} \quad (\text{Ec. N}^\circ 8)$$

En este caso el fluido presenta características plásticas y exhibe una tensión inicial (τ_0) y una viscosidad plástica o de Bingham (η').

INTRODUCCIÓN

En el caso de los fluidos pseudo-plásticos y dilatantes, las curvas requieren mas de un parámetro para describir sus datos. Con el fin de hacer más fácil su manejo se crearon modelos tales como:

Modelo de Ley de Potencia

Muchas curvas de tensión de corte versus gradiente de velocidad de alimentos fluidos se tornan lineales cuando son graficadas en coordenadas logarítmicas dobles, y el modelo de ley de potencia describe los datos de fluidos pseudo-plásticos y dilatantes.

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. N}^\circ 9)$$

Donde K, el índice de consistencia (Pa.sⁿ), es la tensión de corte a una velocidad de deformación de 1.0 s⁻¹, y el exponente n, el índice de comportamiento de flujo, es adimensional y refleja la proximidad al comportamiento de un fluido Newtoniano. En el caso especial de un fluido Newtoniano (n = 1), el índice de consistencia K es igual a la viscosidad del fluido. Cuando n < 1 el fluido es de naturaleza pseudo-plástica y cuando n > 1 el fluido es dilatante.

Dado que el modelo de ley de potencia es débil en el tratamiento de datos a bajas y altas velocidades de deformación, se desarrollaron otros modelos matemáticos tales como: el modelo de Herschel-Bulkley, de Casson, de Quemada, etc.

A concentraciones suficientemente altas, la mayoría de las dispersiones pseudo-plásticas exhiben una respuesta viscosa en tres etapas, cuando son

INTRODUCCIÓN

evaluadas en un amplio rango de velocidades de deformación. A bajas velocidades, las dispersiones presentan propiedades Newtonianas con una viscosidad constante dentro de un rango limitado de velocidades; esto es seguido por un rango de pseudo-plasticidad donde la viscosidad disminuye de acuerdo al modelo de ley de potencia. En la tercer etapa, a altas velocidades de deformación, las dispersiones muestran una viscosidad limitante y constante a tiempo infinito. Este comportamiento en etapas se cree que es debido a un re-arreglo de la conformación de las moléculas del polímero en la dispersión debido al flujo de corte. Con el fin de evaluar este comportamiento se desarrollaron modelos tales como el de Cross y Carreau. Para el análisis de soluciones y dispersiones con comportamientos de flujo dependientes del tiempo encontramos modelos como el de Weltman, de Tiu y Boger, etc. (Rao, 1999).

Otra variable a tener en cuenta es que durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos fluidos pueden encontrarse un amplio rango de temperaturas, y por ende, su efecto sobre las propiedades reológicas debe ser estudiado (Rao, 1999). El notable crecimiento en el estudio físico de los materiales alimenticios ha permitido un entendimiento menos empírico de la relación estructura - función - comportamiento mecánico, pero aun sigue siendo un desafío su relación con la percepción del consumidor.

Formación y Estabilidad de la emulsión

A la hora de evaluar una proteína como agente emulsionante se deben considerar dos aspectos de una emulsión: su formación y su estabilidad.

Formación de una emulsión

La importancia del procedimiento de emulsificación en la evaluación de una proteína como agente emulsionante ha sido previamente mostrada por autores como Tornberg y Lundh (1978). Trabajos previos han mostrado que los parámetros de procesamiento influyen de una manera decisiva en los parámetros estructurales tales como: la distribución de tamaños de partícula, las interacciones entre las gotas, la reología de la fase continua, etc., afectando así las características reológicas de la emulsión.

Existen numerosas formas de producir una emulsión a partir de dos fases que son mutuamente insolubles o ligeramente solubles, pero tal proceso generalmente se realiza a través de la aplicación de energía mecánica. En primer lugar la interfase se deforma de manera tal que se generan gotas. Estas gotas son en su mayoría demasiado grandes por lo que las mismas son subsecuentemente rotas hasta obtener partículas de menor tamaño. Por lo tanto, esta etapa de disrupción de las gotas es un paso crítico en el proceso de emulsificación.

Durante la deformación de una gota para lograr su disrupción existe una presión que se opone a tal proceso denominada presión de Laplace. La presión del lado cóncavo de una interfase curvada con una tensión interfacial γ es mayor que la del lado convexo y está dada por Δp , donde:

$$\Delta p = \gamma \left[\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right] \quad (\text{Ec. N}^\circ 10)$$

r_1 y r_2 son los radios principales de curvatura. Para una gota esférica de radio r este valor es $\Delta p = 2\gamma/ r$ y cualquier deformación de la gota conduce a un incremento de Δp . Para romper una gota, tal presión debe ser aplicada externamente a lo largo de una distancia r , lo cual significa un gradiente de presión del orden de $2\gamma/ r^2$. Las gotas pueden también ser deformadas por fuerzas viscosas ejercidas por el fluido que las rodea (fase continua), y la tensión viscosa de esta fase debe ser al menos de la misma magnitud que la presión de Laplace. Los gradientes de velocidad o de presión necesarios son principalmente suministrados por la agitación. Cuanto más pequeñas son las gotas, más intensa debe ser la agitación para romperlas. Por lo tanto, el movimiento del fluido durante el proceso de emulsificación es usualmente turbulento, a menos que la viscosidad de la fase continua sea elevada.

Como hemos dicho anteriormente para producir una emulsión es necesario un surfactante adecuado. El surfactante baja la tensión interfacial γ , y por lo tanto la presión de Laplace, lo cual facilita la deformación y así la interrupción de las gotas. Para que sea activo, el mismo debe ser transportado a la interfase donde se adsorbe formando una capa interfacial. Este transporte es considerablemente acelerado por la agitación intensa. Debido a que durante

INTRODUCCIÓN

este proceso se forma una gran interfase, la fase continua que contiene al surfactante se va vaciando del mismo.

Durante la emulsificación, luego de formarse las gotas, las mismas pueden coalescer nuevamente y esta puede ser otra etapa crítica. La velocidad a la que coalescen es muy variable y depende de muchos factores pero principalmente de la naturaleza y de la concentración del surfactante. Además, las gotas pueden flocular durante el proceso pero los flóculos son en su mayoría rotos nuevamente en muy cortos períodos de tiempo.

Los procesos mencionados ocurren simultáneamente y sus velocidades dependen de varios factores, cada uno de diferente modo, y a su vez, influyendo uno en el otro.

Durante la emulsificación, el área interfacial A , se torna cada vez mayor y la energía libre superficial del sistema, se incrementa una cantidad $\gamma\Delta A$. Asumiendo que se forman gotas de $r = 1 \mu\text{m}$, que la fracción en volumen, es $\phi = 0,1$ y que $\gamma = 0,01 \text{ N m}^{-1}$, la cantidad de energía libre superficial es 3 kJ m^{-3} , lo cual es una cantidad de energía muy pequeña. En la práctica la energía necesaria para producir una emulsión es de al menos 3 MJ m^{-3} , es decir 1000 veces más.

El gran exceso de energía necesario es predominantemente debido al alto gradiente de la presión de Laplace: alrededor de $2 \times 10^{10} \text{ Pa m}^{-1}$ sería necesario en el caso anterior o un gradiente de velocidad de alrededor 10^7 s^{-1} , asumiendo que la viscosidad de la fase continua, η_c , es 1 mPa s . Tales condiciones solamente pueden ser producidas por una agitación muy intensa, lo cual en

INTRODUCCIÓN

cambio, insume mucha energía. Excepto por la mínima fracción que es necesaria para la energía libre superficial, esta energía es disipada como calor. La intensidad de la agitación es gobernada en gran parte por la densidad de energía ε en el líquido, es decir, la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo. Por lo tanto, la efectividad de la emulsificación (por ejemplo, medida por el área superficial específica de la fase dispersa A_d , obtenida) depende en gran parte de ε . En el ejemplo dado, ε debería ser del orden de 10^{10} W m^{-3} , lo que es suficiente para calentar la emulsión hasta el punto de ebullición durante 0,03 s (Walstra, 1983). Tales densidades de energía pueden ocurrir solo localmente y por tiempos muy cortos. Para lograr una emulsificación eficiente, por lo tanto, es conveniente disipar la energía disponible en un corto tiempo ya que esta da una alta densidad de energía. Agregando un surfactante adecuado se puede reducir considerablemente la energía de agitación necesaria para obtener cierto tamaño de partícula. En algunos casos se puede obtener una reducción de 10 veces o más.

Como se mencionó, las gotas pueden ser deformadas o rotas por fuerzas de naturaleza viscosa o inercial. Las fuerzas viscosas generan tensiones tangenciales y normales a la superficie de la gota mientras que las fuerzas inerciales generan diferencias de presión. En la práctica es útil distinguir tres situaciones: el flujo laminar, el flujo turbulento y la cavitación.

En el *flujo laminar* predominan las *fuerzas viscosas*. El flujo se puede producir de forma rotacional o elongacional, siendo este último generalmente más efectivo.

INTRODUCCIÓN

En el *flujo turbulento* predominan las *fuerzas inerciales* pero también pueden estar involucradas las *fuerzas viscosas* y, por lo tanto, hay frecuentemente solo una diferencia gradual con las condiciones en flujo laminar. Sin embargo, las condiciones de flujo varían a lo largo de pequeñas distancias y por cortos tiempos.

Durante la *cavitación* se forman pequeñas gotas de vapor las cuales, subsecuentemente colapsan de manera extremadamente rápida generando densas *ondas de choque* en el líquido (fase continua) que pueden romper las gotas. El líquido se agita intensamente y el flujo es turbulento. Por lo tanto la situación es comparable a aquella durante la disrupción por turbulencia. Un prerrequisito es que la presión caiga, al menos localmente, por debajo de la presión de vapor.

La ocurrencia o preponderancia de cualquiera de estos mecanismos no solo depende del tipo de dispositivo de emulsificación si no que puede depender de la η_c y de los detalles constructivos (Walstra, 1983; Flourey y col., 2002).

Existe un gran número de métodos y dispositivos para producir emulsiones cuyos principios y condiciones de trabajo son muy diferentes. Algunos de los más utilizados son los siguientes: batido, flujo en cañería (laminar o turbulento), inyección, agitación (agitador simple, agitador a rotor, raspador, vibrador), molino coloidal, homogeneizador a alta presión y ultrasonido.

El agitador a rotor (UltraTurrax) y el homogeneizador a presión, dispositivos utilizados en esta tesis para producir las emulsiones, se caracterizan por la formación de las gotas bajo las tres condiciones anteriormente mencionadas,

INTRODUCCIÓN

flujo laminar y turbulento en el agitador a rotor y flujo laminar, turbulento y cavitación en el homogeneizador a presión (Walstra, 1983).

Para analizar la *formación de una gota en flujo laminar* debemos hacer ciertas consideraciones. Una gota puede ser rota si es acelerada con respecto a la fase continua, pero en el proceso de emulsificación, dado que no se puede obtener un delta de velocidad alto para una gota pequeña en un líquido, este efecto inercial puede ser descartado.

Los efectos inerciales en la fase continua ocurren si el número de Reynolds (cociente entre las fuerzas inerciales y viscosas) es alto. En este caso tendremos que considerar el número de Reynolds de la gota, y para un flujo laminar de gradiente de velocidad $\dot{\gamma}$, tendremos:

$$Re = 2 r^2 \dot{\gamma} \rho_c / \eta_c \quad \text{Ec. N}^\circ 11$$

Donde r es el radio de la gota, ρ_c es la densidad de la fase continua y η_c la viscosidad de la fase continua. Es necesario que el número Re de la gota sea $\ll 1$, para evitar los efectos inerciales, y entonces el flujo es llamado *reptante*. Otra condición es que el flujo sea estacionario, es decir que $\dot{\gamma}$ no se modifique en el tiempo (Walstra, 1983).

Cuando la η_c es baja, las condiciones de flujo durante la emulsificación son generalmente turbulentas. Como vimos, las fuerzas inerciales ahora predominan y pueden conducir a la disrupción de las gotas. El *flujo turbulento* se caracteriza usualmente por una velocidad de flujo local (u) con respecto a su

INTRODUCCIÓN

valor promedio en el tiempo (\bar{u}). Usualmente, la relación anterior (u') depende de la dirección; el flujo es isotrópico si u' es la misma en cualquier dirección. Un flujo isotrópico puede ser caracterizado de manera sencilla pero prácticamente es difícil de realizar.

Los grandes remolinos del flujo turbulento tienen una u' pequeña; los mismos transfieren su energía cinética a remolinos más pequeños los cuales tienen una u' mayor, y estos a otros más pequeños y así sucesivamente. De este modo existe un espectro de remolinos de distintos tamaños. Aquellos que poseen la mayor cantidad de energía cinética son llamados remolinos almacenadores de energía y tienen un tamaño l_e . Los más pequeños tienen una u' tan alta que su energía cinética es disipada como calor. Son llamados remolinos disipantes de energía y su tamaño es l_0 (Walstra, 1983).

Una gota de diámetro d experimentará una diferencia de velocidad entre los lados opuestos cuando esté próxima a un remolino almacenador de energía lo cual conduce a una diferencia de presión. Para que la gota se rompa este valor deberá ser mayor que la presión de Laplace. Es materia de debate si un solo encuentro de la gota con un remolino adecuado es suficiente para su disrupción; es posible que sea necesario que la gota pase por varios remolinos a intervalos regulares para que la misma oscile.

En el flujo turbulento hay un amplio espectro de tamaños de remolinos y por lo tanto esto resultará en una distribución de tamaños de gotas. Si el flujo permanece isotrópico, un cambio en ε no modificará el espectro relativo de

INTRODUCCIÓN

remolinos y, por ende, tampoco se alterará la forma de la distribución de tamaños de gotas.

Existen por supuesto una serie de condiciones que deben cumplirse. Además que el número de Reynolds, Re , debe ser alto, d_{\max} debe ser mayor a l_0 . Es aconsejable que el número de Reynolds de la gota, Re^* , sea mayor a 5, de otro modo el flujo cerca de la gota se vuelve laminar y la disrupción por fuerzas inerciales se torna imposible. Además, el tiempo de relajación de la deformación no debe ser mayor que el tiempo del remolino ya que de otro modo no habría tiempo suficiente para que la gota se deforme.

Hay que tener en cuenta que el tamaño de la gota puede ser la resultante de la disrupción y de la coalescencia, y si esta última es el mecanismo determinante del tamaño, las relaciones pueden ser diferentes.

En los *agitadores a rotor*, como el Ultra Turrax, se pueden encontrar d_{\max} relativamente pequeños (de alrededor de 10 μm). La relación entre ε y la frecuencia, $\nu = \omega / 2\pi$, es complicada y depende de los detalles constructivos (Walstra, 1983).

En el caso de los *homogeneizadores a presión*, esta última puede variar, por ejemplo, de 3 a 50 Mpa, que conduce a valores de $D(3,2)$, por ejemplo, de 1 a 0,2 μm . Como se mencionó previamente, una condición es que el tamaño inicial de las gotas no debe ser muy grande ($< 50 \mu\text{m}$), ya que de otra manera se obtienen emulsiones muy poli-dispersas. Otra condición es que haya suficiente surfactante presente para cubrir las gotas recientemente formadas, ya que,

INTRODUCCIÓN

nuevamente, se obtendrá una distribución de tamaños muy grande (Walstra, 1983).

Evaluación de una emulsión

Existen diferentes métodos para evaluar el proceso de emulsificación los cuales se pueden agrupar de la siguiente manera:

Formación de una emulsión

- *Capacidad emulsionante*: es la máxima cantidad de fase dispersa que puede ser emulsionada bajo condiciones especificadas. Este procedimiento fue originalmente desarrollado por Swift y col. (1961) pero existen muchas modificaciones del mismo (Tornberg y Hermansson, 1977)
- *Índice de Actividad Emulsionante*: permite determinar por métodos espectrofotométricos el área generada por gramo de proteína (Pearce y Kinsella, 1978).
- *Tamaño de las gotas*: su medición permite evaluar la formación de la emulsión y la capacidad emulsionante de una proteína a través de la determinación del área interfacial.

Estabilidad de una emulsión

- *Estabilidad al cremado*: está relacionado con la migración de partículas y por lo tanto, con la separación de fase que tiene lugar. Los métodos involucrados van desde la simple observación visual hasta la utilización de equipos de escaneo óptico vertical.

INTRODUCCIÓN

- *Tamaño de las gotas*: lo cual puede ser un promedio o una distribución. La misma se puede alterar luego de la emulsificación debido a la coalescencia o a la maduración de Ostwald (a menos que la fase dispersa sea totalmente insoluble en la fase continua).

Rara vez los alimentos poseen partículas todas del mismo tamaño (monodispersas), y para muchos propósitos es importante medir la distribución total de tamaños presentes. En el caso de las emulsiones, estas mediciones contribuyen principalmente a la interpretación de los datos de estabilidad de las mismas.

Aun cuando es conveniente utilizar valores medios de diámetros, la distribución determina la relación entre distintos tipos de medias obtenidas para una muestra. Existen distintas definiciones de los valores medios más comúnmente utilizados para describir un tamaño de partícula y su distribución. Entre ellos encontramos la media en número ($D(1,0)$), la cual indica el número de partículas de cada diámetro; el diámetro medio en volumen o hidrodinámico ($D(4,3)$), el cual indica el volumen de partícula promedio y el diámetro medio en superficie ($D(3,2)$) o diámetro Sauter, que indica el área superficial total ocupada por las partículas. La polidispersidad y las formas irregulares son dos características recurrentes, y la técnica óptima para un producto específico depende de alguna propiedad de su uso final que sea importante (Robins, 2000b).

INTRODUCCIÓN

Fenómenos de desestabilización

Como se mencionó previamente, a la hora de evaluar una proteína como agente emulsionante es importante estudiar la estabilidad de la emulsión que se quiere preparar. Entre los diferentes mecanismos de desestabilización que conducen, finalmente, a la separación de las fases encontramos: la floculación, el cremado o la sedimentación, la coalescencia, la maduración de Ostwald y la inversión de fases.

1- El *proceso de coalescencia* se produce cuando las gotas entran en contacto entre sí y se fusionan, formando gotas de mayor tamaño y a su vez, una mayor dispersión del mismo. La velocidad a la que se produzca la coalescencia va a depender de la velocidad a la que colisionen las gotas y de las propiedades superficiales de las mismas (Robins y Hibberd, 1998). Es decir, procesos tales como el cremado, la floculación y los movimientos browniano y de agitación favorecerán este mecanismo de desestabilización.

Una forma de evitar que se produzca la coalescencia es a través de la utilización de surfactantes, los cuales pueden ser iónicos o no iónicos. Los surfactantes iónicos se caracterizan por dar una carga superficial a las gotas y de este modo se generan fuerzas electrostáticas que se oponen a la colisión entre las mismas. Los surfactantes no iónicos no pueden incrementar la carga superficial de modo que estabilizan la emulsión a través de un mecanismo estérico. Estos tienen grandes grupos hidrofílicos los cuales se ubican de forma alejada de la superficie e imponen una barrera para la colisión entre las gotas.

INTRODUCCIÓN

Entre los surfactantes más utilizados se encuentran las proteínas. Estas tienen la capacidad de formar películas alrededor de las gotas y las propiedades mecánicas de esta película interfacial son las responsables de la resistencia a la coalescencia. Debido a su naturaleza anfipática las proteínas tienen propiedades surfactivas. Cuando una proteína se adsorbe en la superficie aceite/ agua es posible una forma alternativa de plegamiento de la molécula para minimizar la energía libre hidrofóbica; así, además de plegarse hacia el interior de un rulo en la fase acuosa, las cadenas laterales apolares pueden estar localizadas en la fase aceite. Una proteína *random coil* se puede plegar de modo tal que cadenas de aminoácidos se localicen en la superficie y los rulos y las colas de residuos se ubiquen en alguna de las dos fases. En general, las proteínas *random coil* como las caseínas forman monocapas en la superficie de la gota de aceite mientras que las proteínas globulares, como la beta-lactoglobulina, conglucina y glicina de soja, forman películas concentradas.

Tanto los surfactantes iónicos como no iónicos de bajo peso molecular pueden adicionalmente incrementar la estabilidad a la coalescencia a través del mecanismo de auto-reparación conocido como de *Gibbs-Marangoni*. En el caso de las proteínas, estas tienen la particularidad de formar una película viscoelástica alrededor de las gotas de los lípidos favoreciendo la resistencia mecánica de las películas frente al mecanismo de desestabilización por la coalescencia.

2- Por su parte, el *proceso de cremado* es aquel en el cual, por acción de la gravedad, la fase menos densa tiende a subir y a acumularse en la superficie. El

INTRODUCCIÓN

cremado (o la sedimentación, en el sentido opuesto) se produce debido a la diferencia de densidad entre la fase continua y la fase dispersa y, por lo tanto, la composición de la emulsión va a dictar su comportamiento de cremado. Aunque esta diferencia de densidad es el factor primario en este proceso de separación, existen otros parámetros que son obviamente importantes, tales como la concentración de gotas, la poli-dispersidad y las interacciones inter-partículas.

El caso de cremado más simple es aquel en el que si las gotas son mono-dispersas y altamente cargadas o cubiertas con un surfactante efectivo, se repelen unas a otras y creman como partículas individuales. A dilución infinita, la velocidad de cremado para una gota esférica se puede describir a través de velocidad de Stokes, U_s :

$$U_s = \frac{\Delta\rho d^2 g}{18 \eta} \quad \text{Ec. N° 12}$$

donde $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre las fases continua y dispersa, d es el diámetro de la gota, g es la aceleración de la gravedad y η es la viscosidad de la fase continua. De la ecuación se deduce que en una emulsión poli-dispersa las gotas individuales se fraccionan de acuerdo a su tamaño cuando son sometidas a una fuerza gravitatoria. Sin embargo, cuando hay un número significativo de otras gotas de fracción en volumen ϕ la presencia de gotas cercanas y el consecuente flujo de la fase continua en contra del movimiento de

INTRODUCCIÓN

las mismas produce una reducción en la velocidad final de las gotas de modo tal que creman a una velocidad:

$$U = U_s \cdot f(\phi) \quad \text{Ec. N° 13}$$

El factor de impedimento, $f(\phi)$, es menor a uno y, en el caso ideal, depende solo de la concentración local de gotas. Cuando las gotas alcanzan la parte superior de la emulsión forman una capa compacta o crema de fracción en volumen ϕ_m . Para reducir el cremado la estrategia más simple es reducir la diferencia de densidad entre la fase continua y la fase dispersa. Esto puede lograrse ya sea eligiendo un sistema con densidades similares o bien agregando agentes espesantes apropiados a alguna de las fases. La segunda mejor estrategia es reducir el tamaño de gota. Para una gota aislada en un medio muy diluido, la ley de Stokes establece que la velocidad de cremado se incrementa con el cuadrado del diámetro. Además, a medida que el tamaño de las gotas se reduce la velocidad de auto-difusión se incrementa hasta un punto tal que las gotas muy pequeñas pueden mantenerse sin cremar por mezclado difusional, aunque haya una gran diferencia de densidad entre las dos fases (Robins y Hibberd, 1998; Manoj y col., 1998; Robins, 2000; Santiago y col., 2002).

Cuando ninguna de las dos estrategias anteriores se puede aplicar, otra posibilidad es incrementar la viscosidad de la fase continua mediante la adición de polímeros de alto peso molecular. Estos incrementan la viscosidad en tal grado que la velocidad de cremado se vuelve despreciable. Sin embargo, éstos

INTRODUCCIÓN

polímero también actúan reduciendo la estabilidad del sistema a la floculación, lo cual conduce a un cremado más rápido.

Por último, y la estrategia más difícil, es diseñar una emulsión lo suficientemente rígida para resistir las fuerzas del cremado. En algunas emulsiones una solución aceptable es la utilización de agentes gelificantes los cuales se ubican en la fase continua inmovilizando la fase dispersa. Sin embargo, un requisito común es que el sistema sea rígido al cremado pero presente un comportamiento fluido durante el procesamiento o la aplicación final. Para lograr este propósito se utilizan polímeros de alto peso molecular que imparten estas propiedades al sistema. Otra alternativa para retardar el cremado es flocular la fase dispersa formando una estructura de gotas.

3- El *fenómeno de la floculación* ocurre cuando la energía libre de interacción entre gotas cercanas se torna apreciablemente negativa. El arreglo espacial de las gotas en agregados aislados o estructuras similares a un gel sin disrupción de la capa estabilizadora de emulsionante en la interfase aceite/ agua es una característica del estado floculado.

En una emulsión estable moderadamente diluida, la presencia de flóculos genera que el cremado o la separación del suero se produzca mucho más rápido de lo esperado, si los cálculos se basan en la ley de Stokes. Por otro lado, la formación de una estructura de gotas floculadas en una emulsión moderadamente concentrada puede tener el efecto contrario y proteger frente a la desestabilización gravitacional (Dickinson, 1998).

INTRODUCCIÓN

A- Teoría DVLO: la estabilidad a la floculación (y a la coalescencia) de un sistema emulsionado puede entenderse mejor si se consideran las fuerzas de interacción entre las gotas. Estas fuerzas aparecen a partir de un rango de fenómenos y varían de sistema en sistema. La más ubicua de estas fuerzas es la fuerza atractiva de Van der Waals la cual aparece a partir de fluctuaciones momentáneas en la distribución de cargas a lo largo de la molécula, dándole a la misma una naturaleza dipolar fluctuante. La inducción de dipolos complementarios en moléculas adyacentes conduce a una fuerza atractiva débil entre ellas. Una atracción similar ocurre entre partículas coloidales y el potencial resultante cae con la inversa del cuadrado de la separación entre las gotas (Robins y Hibberd, 1998):

$$U_A = - \frac{AH}{12} \quad \text{Ec. N}^\circ 14$$

donde:

A es la constante de Hamaker

$$H = \frac{1}{x^2 + 2x} + \frac{1}{x^2 + 2x + 1} + 2 \ln \left[\frac{x^2 + 2x}{x^2 + 2x + 1} \right] \quad \text{Ec. N}^\circ 15$$

$$x = \frac{h}{2r} \quad \text{Ec. N}^\circ 16$$

donde h es la separación entre las partículas y r es el radio de las mismas.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas acuosos el potencial repulsivo más importante surge de las repulsiones electrostáticas. Las gotas están usualmente cargadas en mayor o menor grado y sus superficies atraen iones del solvente formando una doble capa eléctrica difusa alrededor de cada gota. Las dobles capas de gotas adyacentes interactúan dando un potencial repulsivo entre ellas, el cual varía con la separación de las gotas:

$$U_R = \frac{\epsilon r \zeta^2 q}{2} \ln [1 + \exp (- k h)] \quad \text{Ec. N}^\circ 17$$

siendo

$$\kappa^2 = \left[\frac{8 \pi e^2 N}{1000 \epsilon k_B T} \right] (I) \quad \text{Ec. N}^\circ 18$$

ϵ la constante dieléctrica de la fase continua

r el radio de la partícula

ζ el potencial de la superficie

e la carga eléctrica del electrón

N el número de Avogadro

k_B la constante de Boltzmann

T la temperatura absoluta

I la fuerza iónica del medio

INTRODUCCIÓN

Un potencial de interacción total se puede obtener sumando los potenciales de las fuerzas de Van der Waals y de las fuerzas electrostáticas (Figura 24). A cortas separaciones de las gotas este potencial total es dominado por la atracción de las fuerzas de Van der Waals formando un potencial atractivo también llamado mínimo primario. Desplazándose a mayores separaciones, la curva crece hacia un máximo primario, el punto más alto en la curva de potencial total, donde los potenciales electrostáticos dominan. Continuando hacia aún separaciones mayores la curva una vez más desciende, cruzando el eje de h para formar un segundo potencial atractivo también llamado mínimo secundario. Este ocurre dado que, si bien las fuerzas atractivas de Van der Waals son débiles a grandes separaciones, las mismas se propagan más allá que el potencial electrostático. Finalmente, la curva crece una vez más para encontrar el eje de h ya que los dos potenciales tienden a cero a grandes distancias (Robins y Hibberd, 1998).

Teniendo en cuenta el potencial de interacción total, la estabilidad de una emulsión simple puede entenderse claramente. Las gotas presentan un movimiento Browniano constante debido a las fluctuaciones térmicas. Esto conduce a colisiones al azar entre las gotas con la magnitud promedio de la fuerza impulsora, siendo el encuentro del orden de la energía térmica del sistema, $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. El resultado del encuentro depende luego de la forma del potencial total de interacción (Robins y Hibberd, 1998).

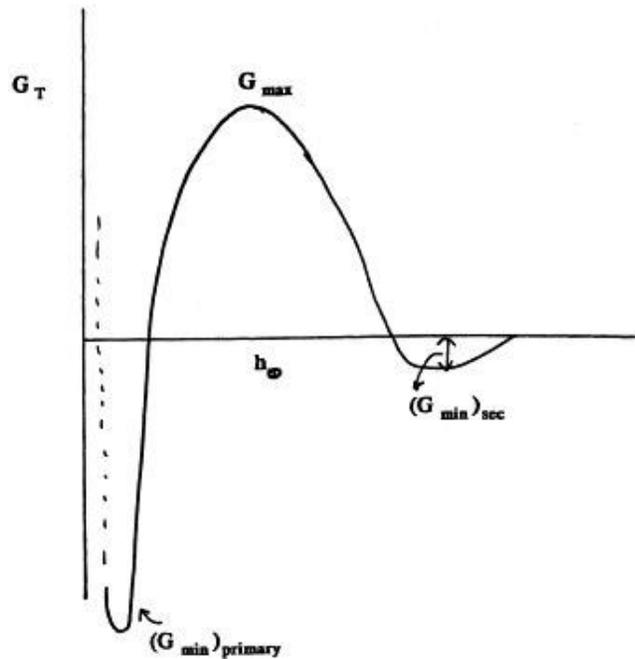


Figura 2: Potencial total de interacción entre dos partículas a una dada fuerza iónica (DLVO) (Tadros, 2004).

En general, las emulsiones aceite/ agua estabilizadas con proteínas son particularmente propensas a la floculación. Un número de mecanismos diferentes puede actuar dependiendo de cómo las moléculas de proteínas interactúan entre ellas y con otras especies del sistema. La floculación de una emulsión inicialmente estable puede ser inducida, por ejemplo, bajando el pH hasta el punto isoelectrico, aumentando la fuerza iónica (I), por adición de cationes divalentes (especialmente Ca^{+2}), bajando la calidad del solvente, por puentes con un polímero adsorbido o por depleción con un polímero no adsorbido. Cualquier proceso, ya sea un tratamiento térmico, de alta presión o

INTRODUCCIÓN

la acción de enzimas, que genere puentes entre las moléculas de proteínas adsorbidas en las gotas, puede también producir floculación. Es decir, la susceptibilidad de una emulsión a los diferentes mecanismos de desestabilización es influenciada por la cantidad de proteína presente durante la emulsificación en comparación con aquella requerida para la completa saturación de la interfase aceite/ agua.

El proceso de floculación se puede producir por cuatro mecanismos:

- A - DLVO: modificando el pH y I
- B- por depleción
- C- capas de proteínas adsorbidas
- D- por puentes o entrecruzamientos entre gotas

B- La *floculación por depleción* se produce cuando el polímero agregado no se puede adsorber en la superficie de las gotas. Esta situación puede ocurrir cuando la cantidad de proteína agregada como emulsionante es mayor a la requerida para cubrir la superficie de las gotas. Bajo estas condiciones, existe una zona alrededor de las gotas en la cual la concentración de polímero libre difiere de la concentración del mismo en el resto de la solución. El origen de esta zona vacía yace en una restricción geométrica impuesta por el volumen finito de la molécula de polímero. Si se considera la molécula como una esfera de radio r_g , cuya posición está definida por su centro, y que el polímero no se

INTRODUCCIÓN

puede adsorber a la superficie, lo más cerca que puede estar de la gota es tocando su superficie.

Si ahora consideramos varias gotas o la emulsión completa, el volumen de solvente total dentro del sistema que está vacío de polímero puede reducirse si las gotas se acercan unas a otras lo suficiente para superponer sus regiones vacías. Al superponerse estas regiones el solvente es liberado hacia zonas sin gotas, diluyendo el polímero que allí se encuentra y disminuyendo la diferencia de presión osmótica entre ambas zonas (Figura 3). Dado que este es un proceso termodinámicamente favorable, las gotas tienden a incrementar la floculación.

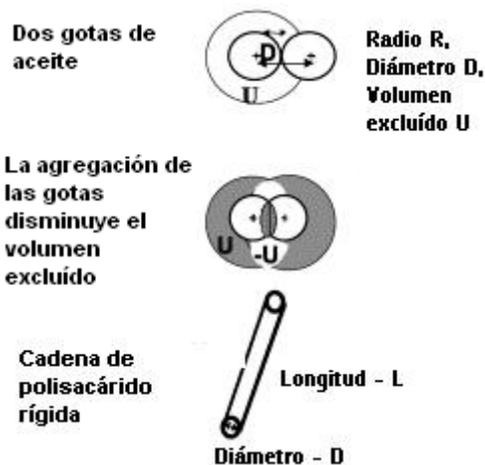


Figura 3: Floculación por depleción o exclusión por polímero.

Por lo tanto, la exclusión estérica del polímero de la superficie de la gota genera un potencial atractivo a una distancia menor que dos veces el radio de

INTRODUCCIÓN

giro de la molécula. Este potencial es relativamente pequeño pero se extiende mas allá de la superficie de la gota que la fuerza electrostática repulsiva más grande, creando así un mínimo secundario poco profundo. Esto último permite que la floculación por depleción, a diferencia de las otras clases de floculaciones, sea reversible, estableciéndose un equilibrio entre la separación de las fases floculadas y no floculadas. Dicho potencial está definido de la siguiente manera:

$$U_A'(r) = \begin{cases} -\frac{4\pi}{3} d_{23}^3 \left[1 - \frac{3r}{4d_{23}} + \frac{r^3}{16d_{23}^3} \right] P_{osm}, & d_2 \leq r \leq 2d_{23} \\ 0, & 2d_{23} < r \end{cases} \quad \text{Ec. N° 19}$$

donde $d_{23} = (d_2 + d_3) / 2$

$P_{osm} \cong n k_B T$, n = densidad del polímero

El solvente es considerado como la fase continua y las partículas coloidales como esferas duras de diámetro d_2 . Las moléculas de polímero también se consideran como esferas duras de diámetro d_3 que forman una cubierta de volumen excluido alrededor de cada partícula. A medida que dos partículas se aproximan entre sí dentro de una distancia $(d_2 + d_3)$ las moléculas del polímero son excluidas de ese espacio y esta exclusión resulta en una atracción neta entre las partículas. La fuerza atractiva iguala a la presión osmótica al tiempo que el área se torna inaccesible a las moléculas de polímero.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de desestabilización por depleción ha sido demostrado en emulsiones estabilizadas con surfactantes que contienen ya sea un polímero no adsorbente o un exceso de micelas de surfactante, y en emulsiones estabilizadas con proteínas con un exceso de proteína (Fillery-Travis y col., 1993; Hibberd y col., 1997; Dickinson, 1998; Robins y Hibberd, 1998; Berli, Quemada y Parker, 2002).

En los otros mecanismos distintos al de depleción o exclusión por polímero, la estabilidad está determinada por la estructura y las interacciones de la capa adsorbida a la superficie de las gotas.

C- En el tercer mecanismo de floculación, *por capas de proteínas adsorbidas*, una proteína desordenada anfifílica forma una monocapa en las superficies líquidas o sólidas hidrofóbicas. Las largas secuencias de residuos no polares de la proteína se pegan muy próximos a la superficie formando una capa interna densamente empaquetada y, las secuencias altamente cargadas forman rulos o si se encuentran al final de la cadena se sumergen lejos de la superficie en la fase acuosa (Figura 4a). La floculación aparece cuando alguna clase de unión se forma entre gotas próximas. El origen de la unión puede encontrarse en interacciones electrostáticas entre grupos cargados o hidrofóbicas entre grupos no polares que se encuentran sobre diferentes superficies poliméricas, o a uniones covalentes entre dos polímeros que se encuentran en las superficies de dos gotas distintas (Dickinson, 1998).

D- El cuarto mecanismo o *floculación por puentes* ocurre cuando las superficies de las gotas son atractivas a la proteína agregada. Cuando la cantidad de

INTRODUCCIÓN

proteína es insuficiente para cubrir el área creada, pueden producirse colisiones entre las gotas de modo tal que un área con proteína adsorbida encuentre un área libre de polímero en una segunda gota. Bajo estas circunstancias, la molécula de proteína ya adsorbida en una gota puede adsorberse en otra gota creando un puente entre ambas. La elasticidad del mismo mantiene las gotas a una corta distancia, es decir, flocluladas (Figura 4c).

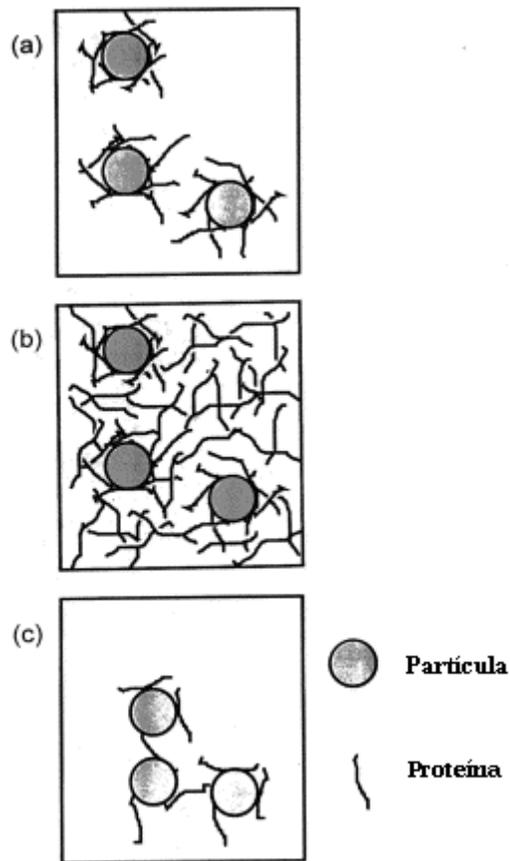


Figura 4: Representación del proceso de adsorción de una proteína. (a) estabilización estérica de las partículas por una capa proteica saturada, (b) inmovilización de las partículas cubiertas de proteína en una estructura tipo gel, y (c) floclulación por puentes a bajas concentraciones de proteína (Dickinson, 1998).

INTRODUCCIÓN

Para que este mecanismo se produzca se deben dar varias condiciones. La primera, y más obvia, es que las superficies deben estar supeditadas a la adsorción de la proteína. En emulsiones con suficiente cantidad de surfactante para cubrir la superficie, solo proteínas con suficiente afinidad superficial para desplazar al surfactante o con una afinidad específica por el surfactante mismo, pueden adsorberse y formar puentes. Una segunda condición es el límite en el tamaño de la proteína en un sistema dado. Claramente, las gotas parcialmente cubiertas deben encontrar otras gotas que se aproximen lo suficiente para que la molécula de la proteína una el espacio entre las mismas. Esto significa que las moléculas de proteína deben ser capaces de extenderse más allá del máximo primario en el potencial total de interacción. El límite absoluto en el tamaño de la proteína será definido por la posición del máximo primario y el radio de giro de la molécula. Sin embargo, en la práctica, cuando la molécula de proteína se adsorbe a las superficies de las gotas la conformación de la misma frecuentemente se altera, permitiendo múltiples uniones a la superficie lo cual puede reducir la distancia a la cual la proteína se extiende en la solución.

Una última condición restringe la cantidad de proteína que puede ser agregada al sistema y conduce a estimar la cantidad óptima de la misma para maximizar la floculación. Si se agrega suficiente proteína al sistema para cubrir completamente las superficies de las gotas, luego, futuras adsorciones no podrán ocurrir y el sistema se estabilizará frente a la floculación por puentes. Como primera aproximación, la floculación será mayor cuando las superficies

INTRODUCCIÓN

de las gotas estén sólo el 50 % cubiertas con proteína y se reducirá a cero a medida que la superficie cubierta tienda ya sea a 100 % o a 0 %.

A este proceso de adsorción de las moléculas desde la solución le puede tomar varias horas alcanzar las condiciones de equilibrio, tiempo durante el cual la tendencia a flocular puede cambiar radicalmente. Consecuentemente, muchos sistemas que sufren floculación por puentes están frecuentemente en estado de no equilibrio con respecto de la adsorción, lo cual lo hace un proceso muy difícil de modelar (Dickinson, 1998; Robins y Hibberd, 1998).

4- Por último, el *proceso de maduración de Ostwald* consiste en el transporte de fase dispersa a través de la fase continua de gotas pequeñas hacia las gotas más grandes. Ya que las gotas más grandes tienen una menor relación superficie/ volumen que las más pequeñas, este proceso ocurre con una reducción neta de la energía interfacial. Sin embargo, la fase dispersa debe ser significativamente soluble en la fase continua para que este proceso se produzca (Robins y Hibberd, 1998.)

El eventual equilibrio de una emulsión se rompe cuando, por último, la misma se separa completamente en dos fases. Este proceso puede tomar desde pocos minutos a varios años. En la práctica, existe un conjunto de inter-relaciones entre los distintos mecanismos y todos ocurren, de algún modo, hasta la separación completa final de las fases.

Las complejas interdependencias entre los mecanismos de desestabilización coloidal hacen extremadamente difícil la predicción del inicio y de los tiempos de la desestabilización. Por lo tanto, cuando se desarrolla una emulsión es muy

INTRODUCCIÓN

importante eliminar el mayor número posible de mecanismos desestabilizantes.

Los fenómenos de estabilidad / inestabilidad de las emulsiones tienen muchas características en común con las suspensiones por lo que las mediciones reológicas pueden ser utilizadas para obtener información acerca de la estabilidad física de las mismas (Tadros, 2004). El cremado o la sedimentación, fenómenos que ocurren debido a la diferencia de densidad entre el aceite y el agua utilizados, pueden ser determinados realizando mediciones de viscosidad a bajos gradientes o bien, ensayos a tensión controlada y realizando medidas de la deformación a tiempos tendientes a cero (ensayo de Creep). La floculación puede ser evaluada realizando medidas de viscosidad en las cuales la presencia de comportamientos pseudo-plásticos y/ o tixotrópicos reflejan la presencia de estructuras agregadas y el grado de interacción entre las mismas. También pueden utilizarse mediciones a tensión controlada y mediciones dinámicas u oscilatorias. En el caso de la coalescencia, en ausencia de floculación y a una fracción en volumen de aceite determinada, un incremento en el tamaño de las gotas resulta en una reducción de la viscosidad de la emulsión, particularmente en el caso de las emulsiones concentradas. Además pueden realizarse mediciones a tensión controlada y ensayos oscilatorios.

De este modo, la fracción en volumen de la fase dispersa también es un factor muy importante a la hora de evaluar el comportamiento reológico de una emulsión. En una emulsión diluida, las partículas están alejadas entre sí y las interacciones inter-partículas son relativamente débiles, como es el caso de la

INTRODUCCIÓN

leche descremada. Sin embargo, en una emulsión concentrada, las partículas se encuentran muy próximas y existen fuertes interacciones inter-partículas, como es el caso de la mayonesa. Dado que muchos factores afectan la reología de las emulsiones alimenticias, dicho comportamiento no se puede predecir y el estudio experimental sobre un sistema dado es necesario.

A pesar de la vasta bibliografía existente en el tema de estabilidad de emulsiones preparadas con WPC y estabilizadas con distintos biopolímeros, son muy pocos los estudios encontrados en los que se utilice la *lambda*-carragenina. Yeun y col. (2005), realizó estudios en emulsiones preparadas con β -lactoglobulina, donde analizó la influencia del pH y del tipo de carragenina en la estabilidad de las mismas, demostrando interacciones electrostáticas a pHs 3 y 5 para las tres carrageninas y un gran proceso de agregación y cremado para las emulsiones estabilizadas con ι - y λ -carragenina. Dicho proceso se adjudicó a la presencia de puentes de carragenina o de complejos proteína-carragenina entre las gotas. A pH 6 la estabilización con ι -carragenina condujo a la formación de una cubierta interfacial de un complejo proteína-polisacárido que mejoró la estabilidad de la emulsión, mientras que las emulsiones estabilizadas con κ - y λ -carragenina fueron inestables al cremado por arriba de cierta concentración crítica debido a una floculación por depleción. El comportamiento de la ι -carragenina se atribuyó a la relativamente alta densidad de carga y estructura helicoidal de la misma, características que favorecen las interacciones electrostáticas, mientras que la menor interacción de las otras carrageninas a este pH se atribuyó a la menor densidad de carga en el caso de

INTRODUCCIÓN

la κ - y a la conformación *random coil* de la λ -carragenina la cual genera menos grupos aniónicos expuestos que la conformación helicoidal.

La Argentina posee un papel muy importante en la producción lechera y gran parte del volumen de la leche procesada es destinado a producir leche en polvo, concentrados y aislados proteicos (WPC y WPI, respectivamente). Dado que la provincia de Santa Fe cuenta con importantes industrias lácteas productoras de concentrado de proteína de suero, el cual es la base para la formación de las emulsiones en este trabajo, cabe destacar la importancia de otorgar un valor agregado a dicho subproducto de la industria. De este modo, se buscará mejorar el uso del WPC a través de su interacción con la *lambda*-carragenina con el objeto de obtener un ingrediente alimenticio estable en el tiempo, de larga vida útil, que pueda ser utilizado como agente emulsionante y estabilizante.

El presente trabajo pretende aportar al conocimiento de sistemas mixtos proteína - polisacárido secados en planta piloto (co-secado) en la formación de una emulsión Ac/ A concentrada y el rol en la estabilidad de las mismas. El conocimiento generado permitirá el desarrollo de ingredientes específicos para diferentes alimentos, sobre la base de mecanismos físico - químicos que regulan las características y estabilidad de los mismos.

1.2 Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido desarrollar un ingrediente de funcionalidad específica, de aplicación en alimentos formulados, que posea

INTRODUCCIÓN

propiedades de emulsificación, a partir de la mezcla de concentrado de proteína de suero (WPC) comercial y *lambda*-carragenina.

Como objetivos específicos de esta tesis se destacan:

Primer etapa:

- Estudiar y caracterizar la fase continua a utilizar para preparar las emulsiones en estudio.

Segunda etapa:

- Estudiar y caracterizar las emulsiones preparadas con WPC comercial solo a las concentraciones de proteína de la mezcla.
- Estudiar y caracterizar las emulsiones con la mezcla co-secada a distintas concentraciones.
- Estudiar y caracterizar las emulsiones preparadas por dos metodologías de homogeneización diferentes.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Introducción

En el estudio de la estabilidad de sistemas emulsionados existen diferentes mecanismos a través de los cuales se pueden evaluar distintos aspectos de la misma. Por lo tanto, es necesario un conjunto de estudios a los fines de poder predecir el tiempo de estabilidad y el mecanismo de desestabilización predominante de una emulsión.

Teniendo en cuenta el concepto de estabilidad, es decir, una emulsión estable es aquella con ningún cambio discernible en la distribución de tamaños de las gotas, en su estado de agregación o en su arreglo espacial dentro del volumen de muestra durante el tiempo de observación (Dickinson, 2001), los principales factores que afectan la misma se pueden agrupar de la siguiente manera

(Tabla 1):

Distribución de Tamaños de Gotas
Inicialmente determinada por: Equipo de emulsificación Concentración de emulsificante Tipo de emulsificante Relación aceite/ agua Otros factores (temperatura, pH, viscosidad)
Naturaleza de la capa interfacial adsorbida
Determinada por: Concentración y tipo de emulsificante Interacción de las especies adsorbidas Competición entre las especies adsorbidas
Naturaleza de la fase acuosa continua
Reología, calidad del solvente, ambiente iónico, polímeros no adsorbidos y anfífilicos
Naturaleza de la fase dispersa
Contenido sólido/ líquido Solubilidad en la fase continua

Tabla 1: Principales factores que afectan la estabilidad de una emulsión.

MATERIALES Y MÉTODOS

En principio, para caracterizar completamente a una emulsión se requiere la medición de la distribución de tamaños de gotas, la cual está inicialmente determinada por el equipo utilizado para preparar la emulsión, la clase y la concentración de emulsificante utilizada, la relación aceite/ agua y otros factores tales como la temperatura, el pH y la viscosidad.

Se debe además tener en cuenta la naturaleza de la capa interfacial adsorbida, es decir, el tipo de agente emulsionante utilizado y su concentración, las posibles interacciones de las especies adsorbidas y la competencia entre las mismas.

Por su parte, se deben también caracterizar las fases continua o acuosa y dispersa o aceite. En el primer caso, se pueden hacer mediciones reológicas, evaluar la calidad del solvente, la fuerza iónica del medio, la presencia de polímeros no adsorbentes y anfífilicos. En el caso de la fase dispersa se pueden realizar estudios del contenido sólido/ líquido y de solubilidad en la fase continua (Dickinson, 2003).

2.2 Materiales

Proteínas

Para la preparación de las emulsiones se utilizó un concentrado de proteínas de suero lácteo o WPC (whey protein concentrate) de origen comercial, el cual fue gentilmente suministrado por la empresa Milkaut S.A., Frank, Santa Fé, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La composición del concentrado de proteínas fue la siguiente:

- Proteína (base seca)	82,38 % (IDF FIL 20B:1993)
- Lactosa	5,0 % (IDF FIL 28: 1974)
- Materia Grasa	7,0 % (IDF FIL 9C:1987)
- Cenizas	4,33 % (FIL - IDF 27:1964)
- Humedad	5,56 % (IDF FIL 26A:1993)

Para la preparación de las dispersiones de WPC se procedió de la siguiente manera: el polvo de WPC se dispersó en agua destilada agitando suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente para asegurarse la completa hidratación. Luego, la solución se almacenó durante 24 h a 4 °C previo a las mediciones o a la preparación de las emulsiones. En todos los casos se trabajó por pesada expresando los resultados en % p/ p de sólidos totales (ST). El pH de las dispersiones se llevó a pH 6,7 con soluciones de NaOH o ClH 0,1 N o 1N y se agregó azida de sodio al 0,03 % a los fines de evitar el desarrollo microbiano.

Polímero

El biopolímero de alto peso molecular elegido para su estudio en esta tesis fue la *lambda*-carragenina (λ -C). Dicho polímero fue suministrado por la empresa SKW Biosystems, Buenos Aires, Argentina. La *lambda*-carragenina es un polisacárido lineal de 800 kDa (dato suministrado por el proveedor) constituido por unidades repetitivas de galactosa y pocas o ninguna de 3,6-

MATERIALES Y MÉTODOS

anhidrogalactosa y con un 35 % de sulfatación aproximadamente que no forma gel.

De acuerdo a las indicaciones del fabricante, para la hidratación de la *lambda*-carragenina no se requiere de una etapa de calentamiento, a diferencia de las otras clases de carrageninas que si lo requieren. Para corroborar esta información se preparó una solución del biopolímero al 2 % y se midió la viscosidad de dicha solución a distintos tiempos hasta observar que la misma se mantuvo estable. Dado que los extractos de *lambda*-carragenina numerosas veces se encuentran contaminados con las carrageninas gelificantes iota y kappa, a los fines de descartar dicha posibilidad se preparó una solución de *lambda*-carragenina al 2 % agitando y calentando a 80 °C durante 30 minutos. Se almacenó durante una noche y se verificó al día siguiente la no gelificación. Para la preparación de las soluciones de *lambda*-carragenina se procedió de la siguiente manera: en primer lugar se dispersó el polvo de polímero en agua destilada agitando continuamente durante 4 h a temperatura ambiente. Luego se almacenó la solución a 4 °C durante 24 h antes de realizar las mediciones o de preparar las emulsiones.

Mezclas

Se prepararon distintos tipos de mezclas de WPC y λ -C. Dados los diferentes tiempos de hidratación, se partió de dispersiones de las proteínas y del biopolímero preparadas como se explicó previamente, que se procedieron a

MATERIALES Y MÉTODOS

mezclar por agitación continua durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las mezclas se dejaron reposar durante 2 horas, previo a cualquier medición.

Se prepararon dos clases de mezclas:

- en primer lugar, se prepararon mezclas a partir de soluciones, fijando la concentración de λ -C (1 % p/ p) e incrementando la concentración de WPC (2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0 y 25 % (p/ p) ST).
- en segundo lugar, se prepararon mezclas en distintas proporciones de WPC y λ -C (8:1, 16:1, 32:1) a partir de soluciones concentradas de las mismas (30,0 %; 40,0 % y 50,0 % (p/ p) sólidos totales (ST) de WPC y 2 % (p/ p) de λ -C. Las concentraciones de las mezclas fueron las siguientes:
 - mezcla 8:1 - WPC/ λ -C - 10,5 % (p/ p) ST/ 1,3 % (p/ p).
 - mezcla 16:1 WPC/ λ -C - 19,5 % (p/ p) ST/ 1,2 % (p/ p).
 - mezcla 32:1 WPC/ λ -C - 24,5 % (p/ p) ST/ 0,8 % (p/ p).

Mezcla de WPC/ λ -C co-secada

Teniendo en cuenta la viscosidad de la dispersión de WPC de 32 % (p/ p) ST utilizada en el proceso de secado spray por la industria local, la concentración de proteína, y con el fin de preparar un ingrediente de fácil utilización para la industria, la mezcla 8:1 WPC/ λ -C fue sometida a un proceso de secado en spray en un equipo de secadero NIRO ATOMIZER de la planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) perteneciente a la Facultad de Ingeniería Química de la UNL. Las condiciones de dicho proceso fueron las

MATERIALES Y MÉTODOS

siguientes: inicialmente se precalentó la mezcla en un baño a 50 °C agitando continuamente hasta que la misma alcanzó dicha temperatura; luego se pasó la mezcla por el equipo de secado siendo la temperatura del aire de entrada de 180 °C y la temperatura de cámara de 85 °C. Se obtuvo una mezcla co-secada con un contenido de humedad de 8,08 % y de proteína en base tal cual de 67,34 % (Método de Kjeldhal, A.O.A.C, 1980).

Preparación de las emulsiones

En este trabajo se estudiaron emulsiones Ac/ A al 50 % (p/ p) utilizando aceite comercial de maíz. Como fase acuosa se utilizaron:

- 1) dispersiones de concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC).
- 2) dispersiones de la mezcla 8:1 WPC/ λ -C co-secada (CS).

Las mismas se realizaron a temperatura ambiente a través de dos procedimientos:

- en el primer caso, se prepararon emulsiones con un homogeneizador Ultra - Turrax T25 (IKA-Labortechnik, Alemania) utilizando un rotor S25 N-10 G (7,5 mm de diámetro). Las mismas se agitaron a 25.000 rpm durante 3 minutos.
- en el segundo caso, se realizaron pre-emulsiones por el procedimiento anterior y luego, se pasaron una vez por un homogeneizador a válvula Stanted - DRG (Stanted Fluid Power Ltd., Essex, U.K.) a 40 MPa la primer bomba y 4 MPa la segunda.

MATERIALES Y MÉTODOS

En las emulsiones preparadas por el segundo procedimiento se realizó una pre-emulsión con el agitador a rotor dado que, de acuerdo a Walstra (1983), una condición para preparar una emulsión con un homogeneizador a válvula es que el tamaño inicial de las gotas no sea demasiado grande, es decir $< 50 \mu\text{m}$, ya que de otra manera se obtendrían emulsiones muy poli-dispersas. La razón es que, presuntamente, el tiempo es insuficiente para romper las gotas tan grandes y, además, una gota de ese tamaño puede tapar la salida de la válvula. Para la realización de la presente etapa se procedió según el siguiente esquema de trabajo:

1° Emulsiones preparadas en el Ultra-Turrax

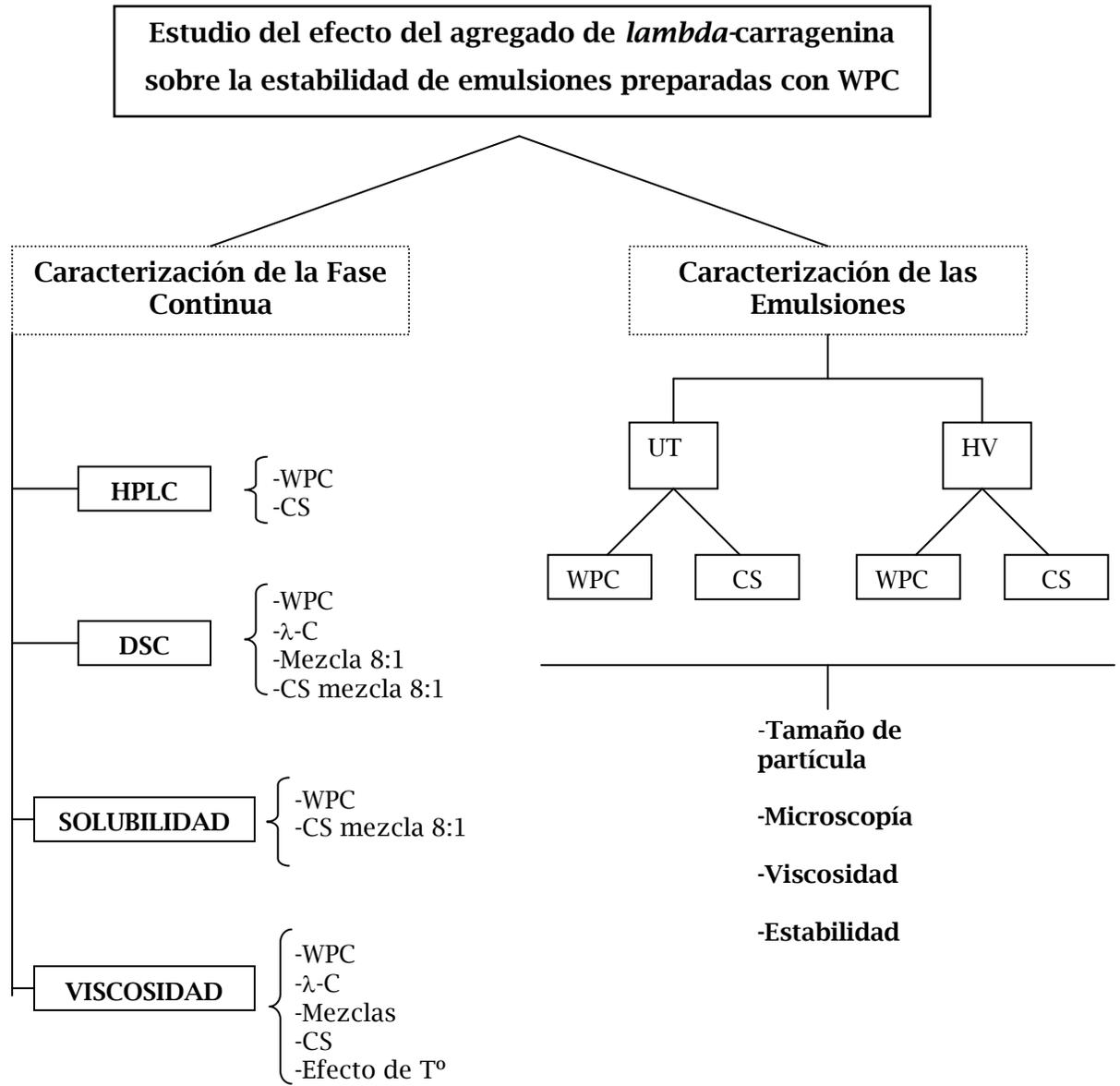
- Efecto de la concentración de proteína de WPC en la fase continua sobre la formación y estabilidad de las emulsiones. Concentraciones evaluadas: 0,37; 0,73; 1,10; 1,46; 1,83; 2,20; 2,56 y 2,93 % (p/ p) de proteína (concentraciones de proteína correspondientes a las de las dispersiones de CS evaluadas).
- Efecto de la concentración de la mezcla CS y de la presencia de la *lambda*-carragenina en la fase continua sobre la formación y estabilidad de las emulsiones. Concentraciones evaluadas: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 y 4,0 % (p/ p) de sólidos totales (ST).

2º Emulsiones preparadas en el Homogeneizador a válvula

- Efecto de la concentración de proteína de WPC en la fase continua sobre la formación y estabilidad de las emulsiones. Concentraciones evaluadas: 0,37; 0,73; 1,10; 1,46; 1,83; 2,20; 2,56 y 2,93 % (p/ p) de proteína.
- Efecto de la concentración de la mezcla CS y de la presencia de la *lambda*-carragenina en la fase continua sobre la formación y estabilidad de las emulsiones. Concentraciones evaluadas: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 y 4,0 % (p/ p) de sólidos totales (ST)

2.3 Metodología

Esquema de Trabajo



2.3.1 Métodos de Caracterización de la Fase Continua

HPLC de exclusión por tamaños

Tanto sea para separar un analito y evitar interferencias en su posterior análisis como para evaluar los constituyentes de una mezcla, la cromatografía se encuentra entre los métodos de separación más utilizados. La misma se puede definir como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria inmisible, de gran área superficial, y la otra es un fluido o fase móvil que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

En esta tesis se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC de exclusión por tamaños a los fines de separar los constituyentes del WPC y de la mezcla co-secada. Dicha cromatografía, también denominada de filtración por geles, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de elevado peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. Las moléculas son atrapadas en los poros y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio del poro son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen, y así son las primeras en eluir. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas

MATERIALES Y MÉTODOS

durante más tiempo, por lo tanto son las últimas en fluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo tiene lugar el fraccionamiento que está directamente relacionado con el tamaño molecular y, en cierto modo, con la forma molecular.

Las separaciones por exclusión por tamaño difieren de otras cromatografías en que no implican interacciones químicas o físicas entre los analitos y la fase estacionaria; hechos que se procuran evitar a los fines de no originar una mala eficiencia de la columna. Otra diferencia de esta técnica con otras es que existe un límite superior para el tiempo de retención ya que ningún analito es retenido más que aquel para el cual la penetración en la fase estacionaria es total.

La caracterización cromatográfica del WPC y del CS fue realizada en una columna Biosep SEC S2000 Hydrophilic Bonded Silica ps 5 μm de rango de exclusión, nativa 1 a 300 KDa. La columna fue ajustada a un equipo de HPLC modelo Varian 9012 provisto de un detector Varian 9050 y las corridas se realizaron a velocidad de flujo de 0,4 ml/ min utilizando una fase móvil de tampón fosfato 0,05 M, pH 6,8 con/ sin 0,15 M NaCl.

Para la realización de las mediciones, se prepararon dispersiones de WPC y de la mezcla WPC/ *lambda*-carragenina co-secada pesando 16 mg en cada caso, disolviendo en buffer tampón fosfato 0,05 M, pH 6,8 con/ sin 0,15 M NaCl, y luego filtrando las dispersiones a través de una membrana de 0,45 μm . Previo a las corridas de las muestras, se realizó una calibración con los siguientes

MATERIALES Y MÉTODOS

patrones: Tiroglobulina (670 KDa), Gamma globulina (158 KDa), Ovoalbúmina (44 KDa), Mioglobina (17KDa) y Vitamina B12 (1,35 KDa). El eluato de la columna fue monitoreado a 280 nm. Las corridas se realizaron por duplicado, a temperatura ambiente.

Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que permite estudiar procesos en los que se produce absorción o desprendimiento de calor. Existen dos clases de calorímetros que se basan en principios diferentes:

- Calorimetría diferencial de barrido por compensación de energía (“Power-compensation DSC”)
- Calorimetría diferencial de barrido por flujo de calor (“Heat-flux DSC”)

Este último es el principio del equipo utilizado en estas mediciones. En esta metodología se aceptan como hipótesis que el calorímetro es simétrico y que la resistencia térmica es idéntica en la muestra y en la referencia a cualquier temperatura dada, con lo que el flujo de calor de la muestra a la referencia puede despreciarse, pudiéndose describir la respuesta del instrumento haciendo un balance calórico.

Mediante lo planteado anteriormente se registra cualquier cambio térmico o flujo de calor que ocurra en la muestra y en la referencia, lo que es registrado en un termograma, y registro a través del cual se obtiene el flujo de calor, $\partial H / \partial t$, en función de la temperatura o el tiempo. La integración del flujo

MATERIALES Y MÉTODOS

diferencial de calor respecto de la temperatura (o el tiempo) proporciona el valor del cambio entálpico inducido por el calor asociado con el cambio de estado ocurrido en la sustancia estudiada.

Para estudiar la transición térmica de las proteínas del WPC solas y en presencia del biopolímero *lambda*-carragenina se utilizó un calorímetro Polymer Laboratories, controlado por el software PL-V5.41 y calibrado con sustancias de alta pureza, utilizándose indio, ácido láurico y ácido esteárico para la escala de temperaturas (ASTME967-83). La determinación de entalpías de transición también requirió una calibración con sustancias de alta pureza (Indio) (ASTM E968-83).

El calorímetro posee una celda que utiliza un disco de constantan como medio primario de transferencia de calor a las posiciones ocupadas por la muestra y el material de referencia, y como uno de los elementos de unión termoelectrónica para la medición de la temperatura. La muestra y el material de referencia se colocan en cápsulas de aluminio que se asientan sobre plataformas elevadas del disco de constantan. El calor se transfiere desde el disco hacia arriba dentro de la muestra, y través de la cápsula. El flujo diferencial de calor es monitoreado por una termocupla de cromel-constantan, la cual está formada por la unión del disco de constantan y una delgada chapa de cromel que cubre la parte inferior de la plataforma. En la parte inferior de cromel se conectan alambres de cromel y alumel, y las termocuplas resultantes cromel-alumel, se utilizan para medir la temperatura de la muestra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las mediciones se realizaron por duplicado utilizando cápsulas de aluminio en las cuales se colocaron alrededor de 40 mg de muestra y se sellaron herméticamente. Como referencia se utilizó una cápsula doble de aluminio vacía.

Se midieron soluciones al 20 % (p/ p) ST de WPC, de la mezcla 8:1 WPC/*lambda*-carragenina y de la mezcla 8:1 co-secada. Se utilizó una velocidad de calentamiento de 10 °C/ min y un rango de temperaturas entre 5 y 100 °C. Luego de la corrida en el DSC, las cápsulas fueron perforadas y secadas en estufa a 105 °C hasta peso constante para determinar el contenido de materia seca. Además, muestras pasadas dos veces por el equipo demostraron que el proceso de desnaturalización no era reversible bajo estas condiciones.

La temperatura del pico (T_p), que indica la temperatura de desnaturalización aparente, fue determinada a partir del flujo de calor máximo. El cambio de entalpía aparente calorimétrico total (ΔH_i) fue calculado a partir del área del pico utilizando una línea de base entre las temperaturas de inicio y finalización de la transición térmica. Todos los parámetros informados fueron obtenidos a través del software PL-V5.41 y corresponden a las medias de al menos dos mediciones.

Solubilidad

La solubilidad del WPC, de la mezcla 8:1 y del CS fue determinada por la técnica del Índice de Nitrógeno Soluble (NSI), (A.A.C.C., 1983). Esta técnica

MATERIALES Y MÉTODOS

consiste en preparar dispersiones al 2 % (p/ v) de la muestra en estudio en agua destilada (pH 6,7), agitando con agitador magnético durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, la solución se centrifuga a 2000 g durante 30 minutos y se filtra el sobrenadante. Se determina el contenido de proteína por el método de Kjeldahl (A.O.A.C, 1980), expresado como nitrógeno, en la solución antes de centrifugar y en el sobrenadante. Dado que se evaluaron proteínas de suero lácteo, el factor de conversión del nitrógeno utilizado fue 6,38.

El NSI se calcula de la siguiente manera:

$$\text{NSI} = \frac{\text{N (sobrenadante)}}{\text{N (total)}} \times 100 \quad (\text{Ec. N}^\circ 20)$$

Esta misma técnica se utilizó para evaluar la solubilidad del WPC, la mezcla 8:1 y el CS en otros solventes tales como 0,2 M NaCl, en 0,5 % SDS (dodecil sulfato de sodio) y en 0,2 M 2-Mercaptoetanol, todas a pH 6,7. En todos los casos las medidas se realizaron por duplicado a temperatura ambiente.

Viscosidad

Tanto las soluciones de WPC, de *lambda*-carragenina como de las mezclas fueron sometidas a mediciones de viscosidad en un reómetro de stress controlado RS 600 (ThermoHaake, Alemania) (Figura 5) con un baño termostático K 15 (Haake, Alemania), utilizando una geometría de plato y plato

MATERIALES Y MÉTODOS

de 60 mm de diámetro y 1 mm de separación. Las mismas se realizaron a $20 \pm 0,1^\circ \text{C}$ y, en algunos casos, a $50 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Las muestras fueron cubiertas con aceite siliconado a los fines de evitar la evaporación.

Se llevaron a cabo curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte (τ) versus gradiente de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) en un rango de 1 - 100 [1/s] durante 300 s cada una. Cada medición se realizó por duplicado o triplicado.

Los datos experimentales de las curvas descendentes fueron modelados con el software Rheowin para manejo de datos.



Figura 5: Reómetro RS 600 ThermoHAAKE

2.3.2 Métodos de Caracterización de las Emulsiones

Tamaño de partícula

Se realizaron medidas de las distribuciones de tamaño de partículas de las emulsiones en un analizador de tamaño de partícula por difracción de láser (LS-230, Beckman Coulter Inc., Fullerton, Ca., USA). Este equipo posee un sistema de medición de barrido diferencial de intensidad de polarización el cual utiliza tres longitudes de onda, filtradas por polarización en los planos horizontal y vertical. Tiene además seis detectores (sumados a los 126 detectores de luz refractada) ubicados a 90° del paso de la luz para medir la intensidad diferencial entre la luz refractada de las polarizaciones horizontal y vertical (Figura 6). Realiza un total de 42 mediciones a seis ángulos de refracción y tres longitudes de onda, cada uno a dos polarizaciones. La combinación de las múltiples longitudes de onda y de las dos polarizaciones provee información que permite diferenciar entre tamaños de partículas del orden del sub-micrón e incrementar notablemente la resolución. La tecnología de este equipo se basa en las teorías de Fraunhofer y Mie de difracción de luz que permite convertir la información obtenida en datos de tamaño de partícula.

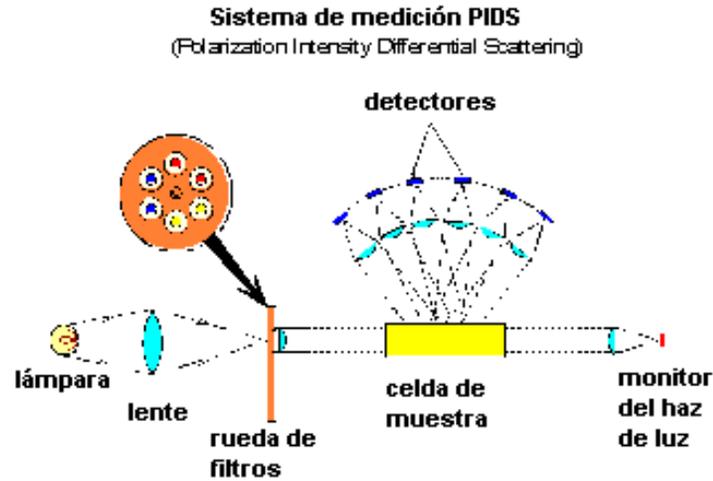


Figura 6: Esquema del montaje PIDS (Barrido Diferencial de Intensidad de Polarización) en el Analizador de Tamaño de Partícula LS230 Beckman Coulter.

La distribución de tamaño de partículas con relación al volumen, expresado como $D(4,3)$, fue medida en cada muestra por duplicado. En el caso de las emulsiones, dado que la propiedad final importante es la estabilidad a la separación, el diámetro hidrodinámico es el parámetro de tamaño apropiado a medir (Robins, 2000b). Dicho parámetro expresa el volumen de las gotas promedio y se define de la siguiente manera:

$$D[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^N (n_i d_i^4)}{\sum_{i=1}^N (n_i d_i^3)} \quad \text{Ec. N}^\circ 21$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde d es el diámetro de la gota, N es el número total de gotas y n_i es el número total de gotas de diámetro d_i .

Además, cada muestra fue sometida por duplicado a una medición en la cual se realizó previamente una dilución 1/10 con 0,1 % SDS. Las mediciones en presencia de SDS permitieron evaluar el tamaño de partícula individual sin floculación (Palazolo y col. 2005).

Microscopía

La microestructura de las emulsiones recién preparadas fue observada colocando 10 μ L de emulsión sobre un portaobjetos y colocando un cubreobjetos cuidadosamente, sin deslizar, para no inducir la coalescencia. Previo a la observación se realizó una dilución 1/10 con 0,1 % SDS. Las emulsiones se observaron en un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania) con un aumento de 400X y se tomaron fotos de las mismas con una cámara Leica DC 100 (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania).

Analizador de barrido óptico vertical

Las emulsiones recientemente preparadas fueron caracterizadas frente a la estabilidad global utilizando un analizador de barrido óptico vertical (Quickscan™, Beckman - Coulter Inc. Fullerton. Ca., USA) (Figura 7). El equipo

MATERIALES Y MÉTODOS

consiste en una celda de medición de vidrio cilíndrica en la cual se coloca la muestra en estudio. Cerca de la celda se encuentra un cabezal de lectura compuesto de una fuente de luz en el infrarrojo cercano pulsátil ($\lambda = 850 \text{ nm}$) y dos detectores sincronizados. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra (0°) mientras que el detector de retro-dispersión recibe la luz dispersada por la muestra (135°). El cabezal de luz recorre la longitud de la muestra (65 mm aproximadamente) adquiriendo datos de retro-dispersión (BS) cada cierto tiempo. De este modo se pueden obtener curvas del flujo de luz retro-dispersada como un porcentaje, relativo a estándares externos como función de la altura de la muestra en mm. En todos los casos los resultados se expresan en relación a un perfil de referencia (tiempo = 0) generándose los correspondientes perfiles de delta de retro-dispersión (ΔBS). De este modo, y junto a otras medidas, es posible discriminar entre procesos tales como el cremado o la sedimentación, la floculación y la coalescencia.

La cinética de migración de las partículas tal como sucede en el cremado, fue evaluada registrando la variación del ancho del pico de ΔBS a un valor límite en función del tiempo; es decir, la velocidad de cremado fue determinada a partir de la pendiente de la gráfica de la altura del límite inferior entre el suero y la fase crema en función del tiempo en las etapas iniciales del cremado (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Lizarraga y col., 2007). Las determinaciones ser realizaron por duplicado o triplicado.

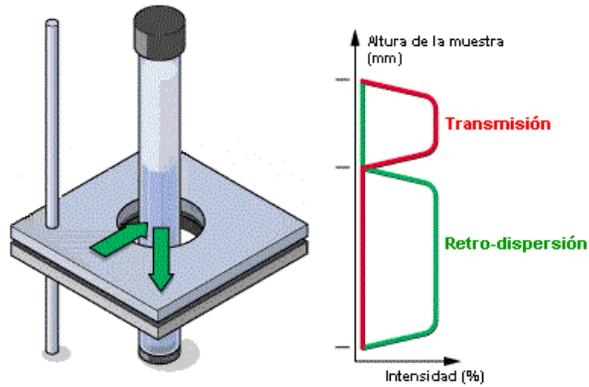


Figura 7: Analizador de barrido óptico vertical Quickscan.

Viscosidad

Las emulsiones recién preparadas tanto con WPC solo como con las mezclas WPC/ *lambda*-carragenina fueron sometidas a mediciones de viscosidad a $20 \pm 0,1$ °C en un reómetro de stress controlado RS 600 (ThermoHaake, Alemania) con un baño termostático K 15 (Haake, Alemania), utilizando una geometría de plato y plato de 60 mm de diámetro y 1 mm de separación. Una vez colocadas las muestras en la geometría, la misma fue cubierta con aceite siliconado a los fines de evitar la evaporación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte (τ) versus gradiente de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) en un rango de 1 - 100 [1/s] durante 300 s cada una. Cada medición se realizó por duplicado o triplicado. Los datos experimentales de las curvas descendentes fueron modelados utilizando el software Rheowin para manejo de datos.

Capítulo III

Resultados

Caracterización de la Fase

Continua

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

3.1 Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (size -exclusion HPLC o SE-HPLC)

A los fines de evaluar las distintas fracciones proteicas del WPC y los posibles cambios sufridos por las mismas ante la presencia de la *lambda*-carragenina y el proceso de co-secado de dicha mezcla, se realizaron corridas cromatográficas por SE-HPLC. Con el objeto de realizar una comparación aproximada de los pesos moleculares de las distintas fracciones, en la Figura 5a se presenta la corrida cromatográfica realizada con diferentes patrones de proteína. Con los datos provistos por dicha corrida se confeccionó la curva Ln PM (peso molecular) versus V_e (Volumen de elusión) con un $R^2= 0,9912$ (Figura 8b).

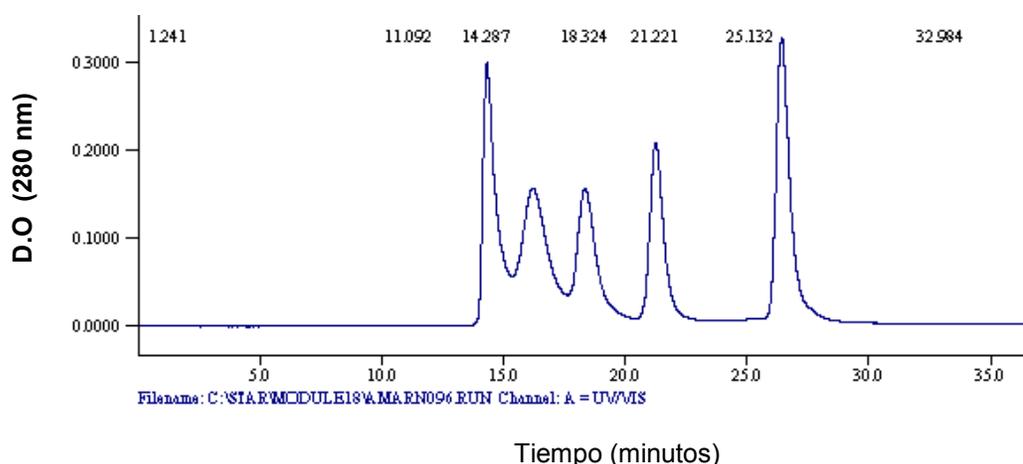


Figura 8a: SE-HPLC de exclusión por tamaño de patrones de proteínas.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

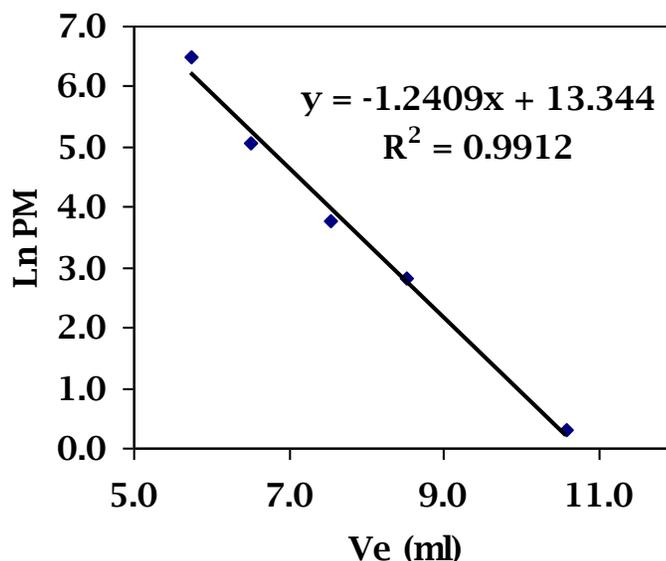


Figura 8b: $\ln PM$ versus V_e (volumen de elución) de los patrones corridos por SE-HPLC.

La corrida realizada con WPC se muestra en la Figura 9 donde se pueden apreciar los diferentes constituyentes proteicos. Se observan dos picos importantes que corresponderían a las dos principales proteínas del WPC, la beta-lactoglobulina (alrededor de 18 kDa) y la alfa-lactoalbúmina (alrededor de 14 kDa). Además, se pueden apreciar tres picos más pequeños, de mayor peso molecular, que corresponderían a los componentes de la fracción proteosa-peptona (PP), la albúmina de suero bovina (BSA) y la inmunoglobulina G (IgG). Dichos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Kinghorn y col. (1995), quienes compararon la electroforesis capilar con los métodos tradicionales para analizar el WPC, entre ellos la SE-HPLC. Por último, alrededor de los 13 minutos o $\cong 5$ mL de V_e , se observa un pico ligeramente más

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

importante que los últimos tres que sería probablemente debido a la presencia de agregados de elevado peso molecular ($\cong 890$ kDa).

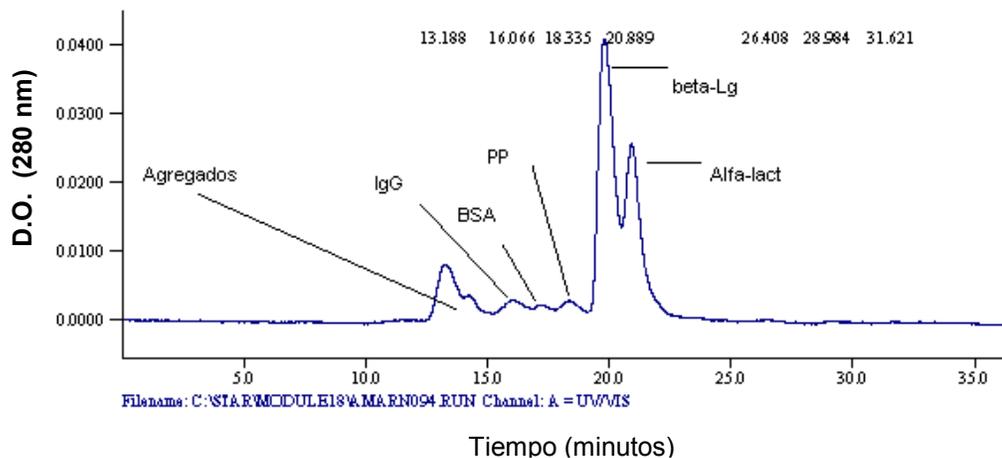


Figura 9: HPLC de exclusión por tamaños del concentrado de proteínas de suero utilizando buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8 como fase móvil.

En la Figura 10 se muestra la corrida cromatográfica del WPC utilizando buffer fosfato (0,05 M, pH 6,8) + 0,15 M NaCl como fase móvil. Se puede apreciar que el aumento de la fuerza iónica produjo en la separación de las fracciones un incremento del pico de los agregados de elevado peso molecular observados anteriormente ($\cong 890$ KDa) y además, se observó la aparición de un nuevo pico (mas allá de la alfa-lactoalbúmina) que se debería probablemente a la presencia de polipéptidos de bajo peso molecular.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

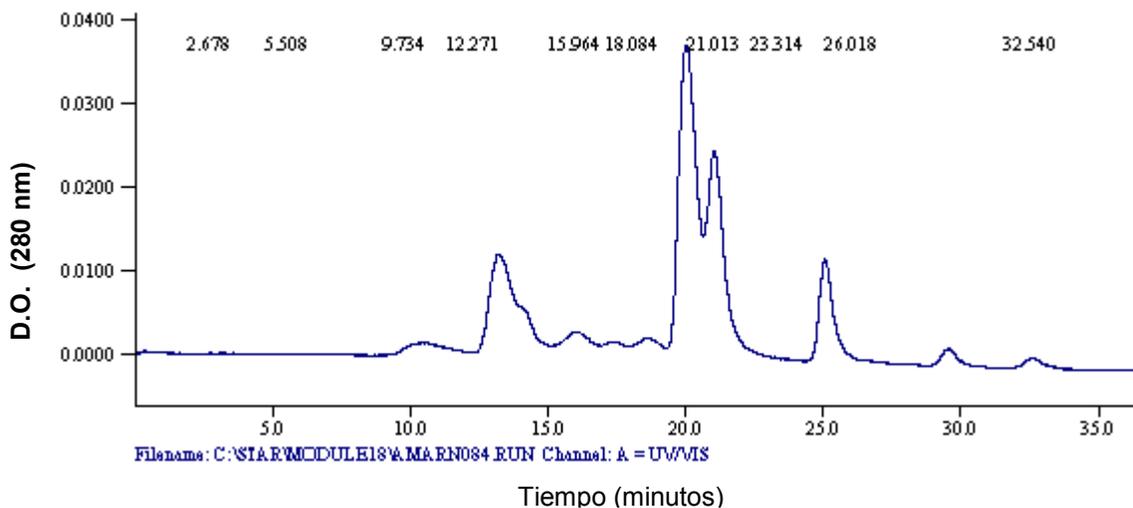


Figura 10: HPLC de exclusión por tamaños del WPC utilizando buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8 + 0,15 M NaCl como fase móvil.

La corrida cromatográfica de la mezcla co-secada se presenta en la Figura 11. Se puede apreciar en este caso que los agregados de $\cong 890$ KDa que se presentaron en la corrida del WPC (sin NaCl), dejaron de observarse al agregar la *lambda*-carragenina.

Cuando la mezcla co-secada fue sometida a una corrida cromatográfica con una fase móvil con 0,15 M NaCl (Figura 12), el pico correspondiente a los agregados de elevado peso molecular ($\cong 890$ kDa) observados en la corrida del WPC se apreció nuevamente. No sucedió así con aquel pico observado a elevados V_e (bajo PM) presente en la corrida del WPC con NaCl.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

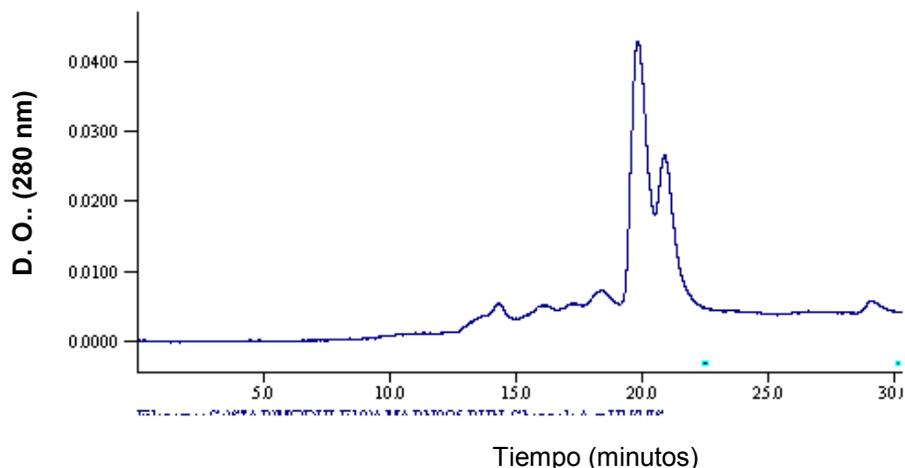


Figura 11: HPLC de exclusión por tamaños de la mezcla co-secada utilizando buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8 como fase móvil.

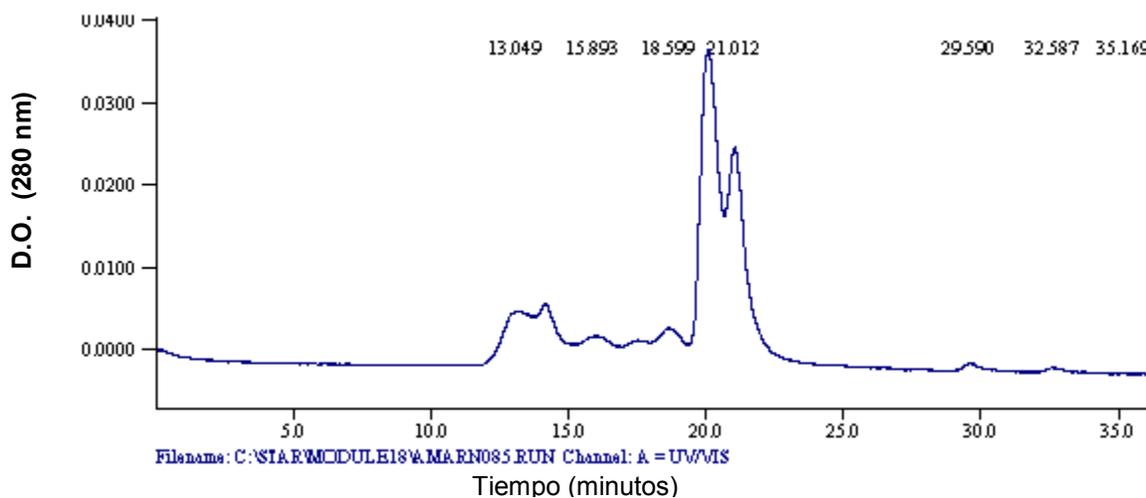


Figura 12: HPLC de exclusión por tamaños de la mezcla co-secada utilizando buffer fosfato 0,05 M, pH 6,8 + 0,15 M NaCl como fase móvil.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

En la figura 13 se muestran ejemplos de las curvas de DSC que se obtuvieron para (a) el concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC), (b) la *lambda*-carragenina, (c) la mezcla 8:1 WPC/ *lambda*-carragenina y (d) la mezcla 8:1 co-secada, a pH 6,7.

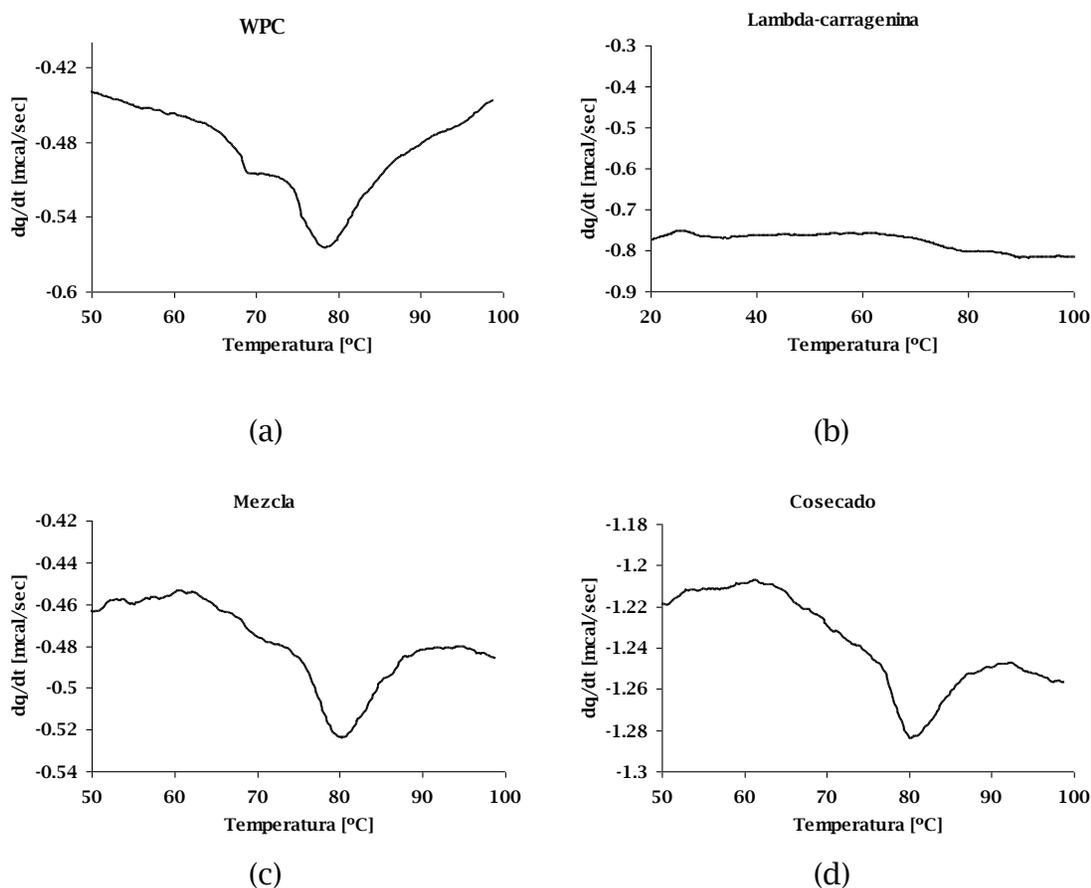


Figura 13: Calorimetría diferencial de barrido de las dispersiones de (a) WPC, (b) *lambda*-carragenina, (c) mezcla WPC/ λ -C y (d) el CS, a pH 6,7.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

En el gráfico del WPC se puede apreciar que el pico de transición para las proteínas fue amplio, asimétrico, con la aparición un pico de menor tamaño anterior al pico principal, y con un cambio gradual en el flujo de calor desde la temperatura de inicio. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Boye y col. (1995) al estudiar los factores que afectan las características moleculares de la gelificación de las proteínas de suero lácteo. Dado que el WPC consiste en una mezcla de proteínas, el perfil del termograma sería el resultado de la contribución de la desnaturalización y agregación de los distintos constituyentes, pero al ser la beta-lactoglobulina la proteína más abundante en el suero, dominaría el comportamiento térmico del sistema.

Durante el calentamiento la β -lactoglobulina sufre cambios complejos. Al aumentar la temperatura la estructura dimérica, predominante en solución acuosa a pH 5,5 - 7, se disocia en monómeros. Por arriba de los 60 °C el monómero se desnaturaliza parcialmente exponiendo los grupos no polares y los grupos tiol ocultos. Subsecuentemente la agregación proteica depende principalmente de la concentración proteica y del pH. A pH neutro se producen principalmente reacciones de intercambio tiol/ disulfuro que conducen a la formación de enlaces disulfuro. A pH 6 la contribución de los grupos tiol a la formación de agregados es menor y los grandes agregados que se forman a este pH son físicos y no involucran enlaces covalentes. Debido a esto último, los termogramas a pH 6 presentan un pico más estrecho, son más asimétricos y con una transición más definida. (Bryant y McClements, 1998; Baeza y Pilosof, 2001). Dado que el pH de las dispersiones en estudio fue de 6,7, la agregación

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

proteica durante el calentamiento habría sido debida tanto a la contribución de los grupos tiol como a interacciones físicas, siendo los primeros más importantes.

En presencia de la *lambda*-carragenina, tanto la mezcla sin co-secar como el CS mostraron termogramas similares entre sí y al del WPC, siendo más asimétricos y el pico de menor tamaño anterior al pico principal observado en el WPC solo, prácticamente imperceptible.

Como se puede apreciar en la Tabla 2, las temperaturas del pico de transición (T_p) se desplazaron a valores mayores en presencia del polisacárido, del orden de +1,97 °C para la mezcla y +2,10 °C para el CS, al igual que las temperaturas de inicio (T_0) que se incrementaron de 1 a 2 °C. Las curvas de DSC para la *lambda*-carragenina no mostraron transiciones en el rango de temperaturas estudiado (Figura 13b).

Tabla 2: Temperaturas del pico (T_p), Temperaturas de inicio de desnaturalización (T_0) y cambios de entalpía aparentes (ΔH_T) para el WPC, la mezcla 8:1 WPC/ *lambda* - carragenina y el CS, a pH 6,7.

	T_p [°C]	T_0 [°C]	ΔH_T [J/g]
WPC	78,38 ± 0,04	60,26 ± 0,06	6,65 ± 0,24
Mezcla	80,35 ± 0,01	62,91 ± 0,93	8,18 ± 1,27
CS	80,48 ± 0,36	61,79 ± 0,47	6,80 ± 0,57

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos obtenidos por Baeza y Pilosof (2002) al realizar estudios calorimétricos de la desnaturalización térmica de la beta-lactoglobulina en presencia de polisacáridos. Estos autores atribuyen el comportamiento a una limitada compatibilidad termodinámica entre el biopolímero y las proteínas en solución, lo cual incrementaría la concentración efectiva. La concentración de cada biopolímero en las diferentes fases podría producir un acceso restringido de las moléculas de agua hacia la proteína, lo cual dificultaría la disrupción y subsiguiente desdoblamiento de la beta-lactoglobulina y promovería la formación de grandes agregados. A diferencia de estos autores, los resultados obtenidos de ΔH_T [J/g] en esta tesis no mostraron diferencias entre sí. Cabe destacar además que, desde este punto de vista, no habría diferencias entre la mezcla sin co-secar y el CS.

3.3 Solubilidad

A los fines de evaluar el efecto del procesamiento y de la presencia de la *lambda*-carragenina sobre el WPC, se evaluó la solubilidad a temperatura ambiente tanto del concentrado proteico como de la mezcla WPC/ *lambda* - carragenina co-secada, en distintos solventes. En la Figura 14 se puede apreciar que, tanto el WPC como el CS tendrían una elevada solubilidad en todos los solventes, siendo esta mayor al 80% en todos los casos.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

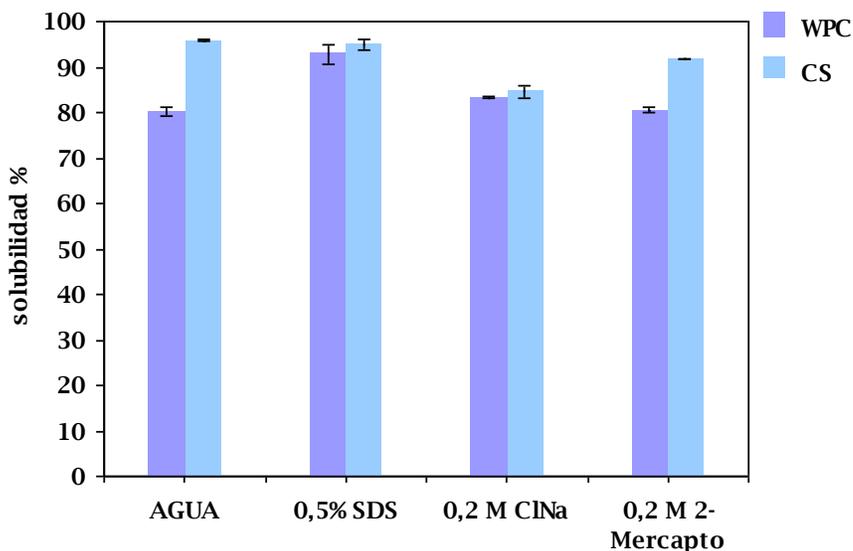


Figura 14: Solubilidad del WPC y del CS en distintos solventes.

Los resultados del WPC muestran un ligero incremento de la solubilidad con el aumento de la fuerza iónica (0,2 M NaCl). Este fenómeno se estaría produciendo debido al efecto salting- in generado por la sal a bajas concentraciones y estaría indicando la presencia de algunas interacciones electrostáticas entre las moléculas. Al evaluar la solubilidad del WPC en 0,5% SDS, la misma se habría encontrado favorecida notablemente. Dado que los detergentes aniónicos rompen los enlaces hidrofóbicos y, a causa del pKa de sus grupos ionizables, aportan a las proteínas una importante carga neta negativa a pHs próximos a la neutralidad (aumentando así las fuerzas repulsivas internas), favorecen el

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

desdoblamiento de las moléculas proteicas. Por lo tanto, este resultado estaría indicando la presencia de interacciones hidrofóbicas y de puente de hidrógeno entre las partículas. La solubilidad del WPC en 0,2 M 2-mercaptoetanol no muestra diferencias con la solubilidad en agua. Como se mencionó previamente, este compuesto es un potente agente reductor que rompe enlaces disulfuro, y dado los resultados obtenidos, no habría un número significativo de interacciones del tipo covalentes entre las partículas. Debido a la baja tendencia a asociarse de las proteínas de suero lácteo, la solubilidad del WPC no depende tan drásticamente del pH y de la fuerza iónica pero existe una región isoelectrica en el rango de pHs 4,6 - 5,0 donde la solubilidad disminuye. Los resultados de solubilidad en agua del CS muestran que la misma fue considerablemente mayor que la del WPC, por lo que la presencia de la *lambda*-carragenina estaría favoreciendo la solubilidad de las proteínas. Este resultado concuerda con aquellos observados en las mediciones del CS por SE-HPLC. Se puede apreciar además que la solubilidad del CS disminuyó con el incremento de la fuerza iónica (0,2 M NaCl) hasta ser similar a la del WPC, lo que condice con el resultado encontrado por SE-HPLC para el CS cuando se incorporó NaCl al buffer de corrida y se encontró que se formaban nuevamente los agregados de proteína al aumentar la fuerza iónica. Este fenómeno podría deberse a que al incrementar la fuerza iónica se estarían neutralizando las cargas y se estarían favoreciendo las interacciones hidrofóbicas disminuyendo así la solubilidad. Por su parte, la solubilidad en 0,5 % SDS es fue similar a la del CS en agua, resultado que estaría demostrando que las interacciones entre los

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

biopolímeros serían principalmente de carácter electrostático. La solubilidad del CS en 0,2 M 2-mercaptoetanol no habría revelado la presencia de interacciones covalentes entre el WPC y la *lambda*-carragenina.

Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos de Pérez y col. (2007), quienes estudiaron las interacciones de las proteínas del lactosuero y polisacáridos aniónicos (*lambda*-carragenina y alginato de sodio) en solución y encontraron que existirían interacciones electrostáticas atractivas entre el WPC y la *lambda*-carragenina.

3.4 Viscosidad

Dispersiones de WPC

Se evaluó la viscosidad de dispersiones del concentrado de proteínas de suero de las siguientes concentraciones de sólidos (ST): 0,37; 0,73; 1,10; 1,46; 1,83; 2,0; 2,20; 2,56; 2,93; 3,4; 4,0; 8,0; 10,0; 10,5; 19,5; 24,5 y 32,0 % (p/ p).

La Figura 15 (a y b) muestra las curvas de tensión de corte versus gradiente de deformación para las soluciones de WPC a las diferentes concentraciones evaluadas.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

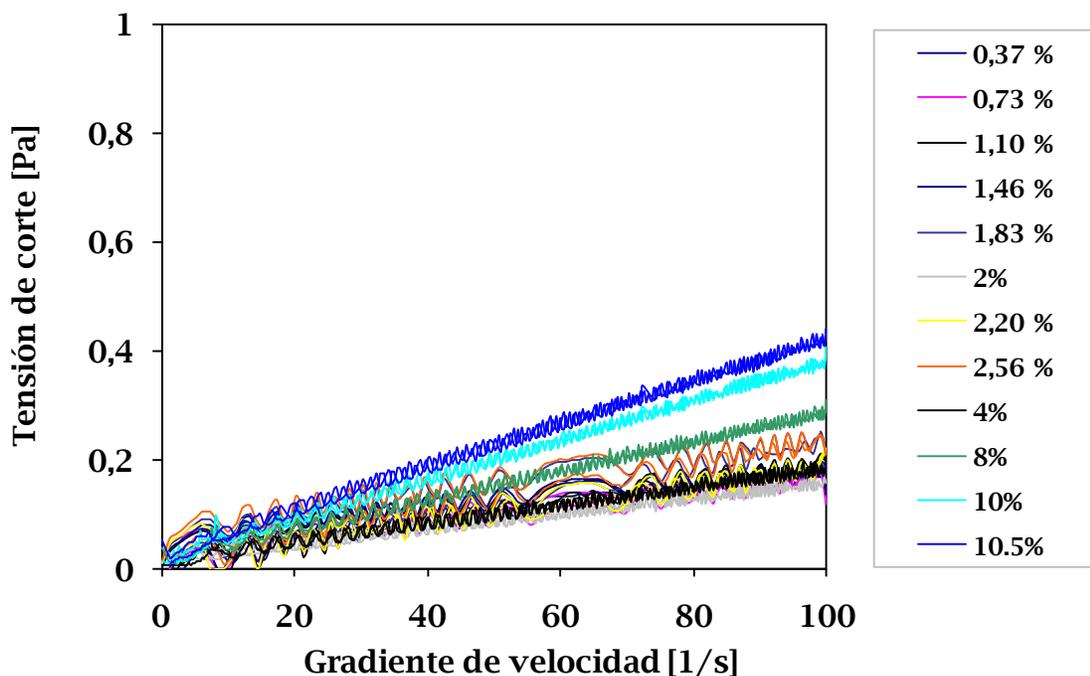


Figura 15 (a): Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de WPC, con concentraciones desde 0,37 a 10,5 % (p/ p) ST.

Se puede apreciar que la tensión de corte (a igual gradiente de velocidad) aumentó con el incremento de la concentración de sólidos. El comportamiento de flujo para las soluciones de WPC en el rango de 0,37 - 10,5 % (p/ p) fue prácticamente Newtoniano, para concentraciones mayores a 10,5 % (p/ p) las soluciones mostraron una creciente pseudo-plasticidad y a la concentración de 32,0 % de sólidos la solución presentó además histéresis, siendo por lo tanto no Newtonianas.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

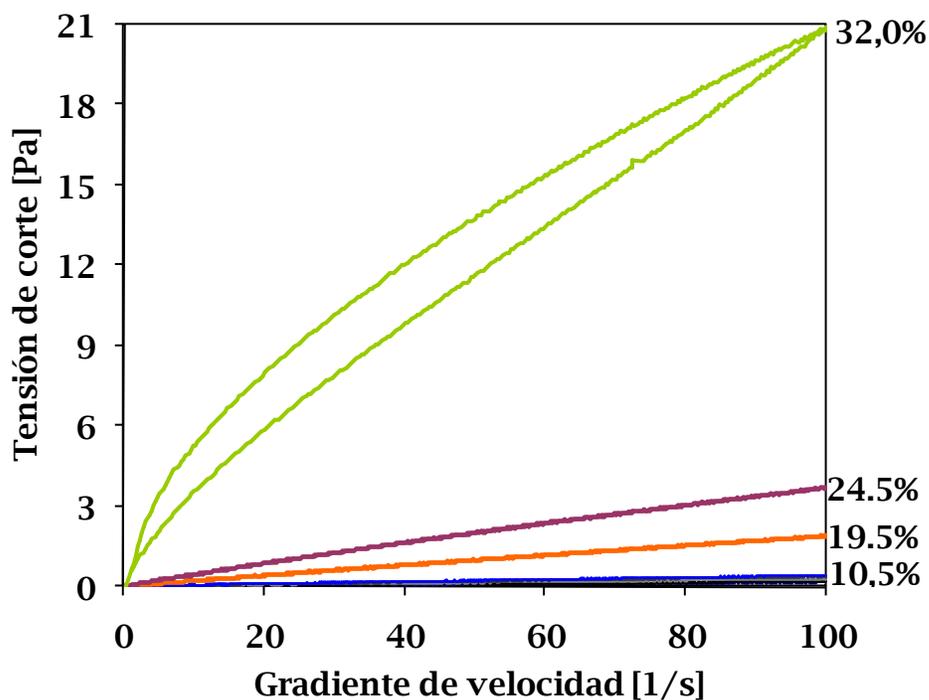


Figura 15 (b): Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de WPC, con concentraciones desde 2,0 a 32,0 % (p/ p) ST.

De acuerdo al modelo de Ley de Potencia (Tabla 3), el incremento del contenido de sólidos de las soluciones de WPC para concentraciones mayores a 10,5 % (p/ p) mostró un incremento en el índice de consistencia (K), desde 0,0253 a 0,0623 ($R^2 > 0,9996$), y valores del índice de flujo (n) menores a 0,94. Estos resultados de los parámetros K y n corresponderían al incremento de la tensión de corte con la concentración de sólidos de WPC y al comportamiento pseudo-plástico observados en los perfiles de las soluciones.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

Tabla 3: Valores de los parámetros η (modelo de Newton) y de K y n (modelo de ley de potencia) de las dispersiones de WPC.

Concentración WPC % (p/p) ST	η (Pa.s)	R^2	
2,9	0,0025	0,8785	
3,4	0,0031	0,9181	
4,0	0,0037	0,9678	
8,0	0,0047	0,9861	
10,0	0,0059	0,9924	
10,5	0,0115	0,9946	
	K (Pa.s ⁿ)	n	R^2
19,5	0,0257	0,9318	0,9996
24,6	0,0623	0,8957	0,9998
32,0	0,5277	0,7949	0,9977

Con el fin de establecer los regímenes de concentración para las soluciones de WPC se graficó la viscosidad específica (η_{sp}) versus la concentración (viscosidad a gradiente 0,1 1/s)) y los tres regímenes fueron claramente observados (Figura 16).

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

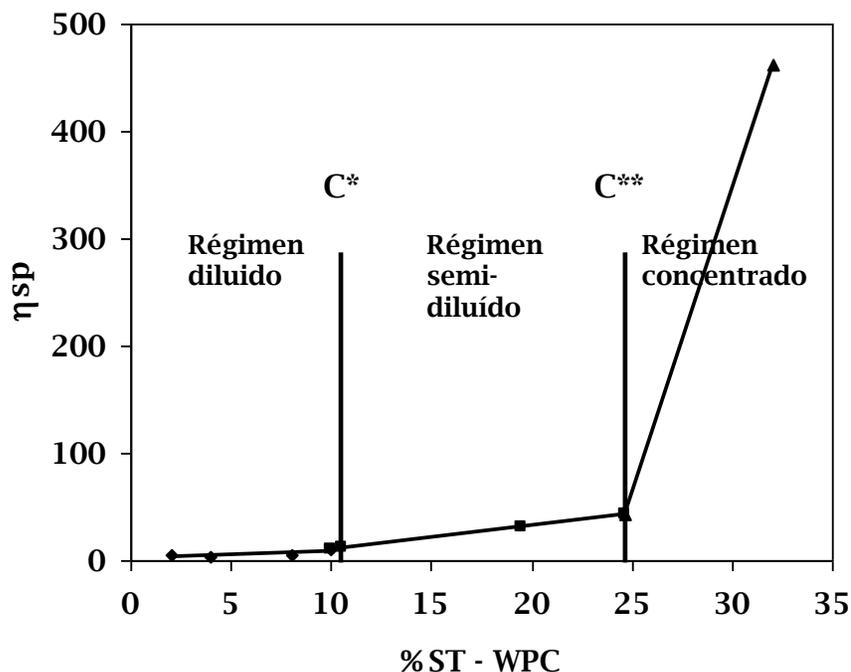


Figura 16: Viscosidad específica versus concentración de las dispersiones de WPC.

Para concentraciones de WPC menores a 10,5 % (p/ p) S el régimen sería diluido; es decir, por debajo de esta concentración las moléculas se encontrarían separadas unas de otras sin interactuar entre sí. Al alcanzar esta concentración (C^*), las moléculas comenzarían a interactuar y por ende, la viscosidad aumenta muy rápidamente. Así, para concentraciones mayores a 10,5 % (p/ p) S y menores a 24,6 % (p/ p) S el régimen sería semi-diluido y para concentraciones de WPC mayores a 24,6 % (p/ p) S el régimen sería concentrado. Durante el régimen semi-diluido las moléculas continúan superponiéndose y, con el incremento de la concentración, comenzaría a haber

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

una contracción de las mismas. Esta contracción alcanzaría su máximo en C^{**} , es decir cuando comienza el régimen concentrado. Los resultados para el régimen semi-diluido coinciden con aquellos obtenidos por Berli y Deiber (1997) quienes estudiaron la evolución térmica de suspensiones acuosas de concentrados de proteínas de suero lácteo.

Soluciones de lambda-carragenina

Se midió la viscosidad de soluciones del biopolímero *lambda*-carragenina de las siguientes concentraciones: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,3 y 2,0 % (p/ p).

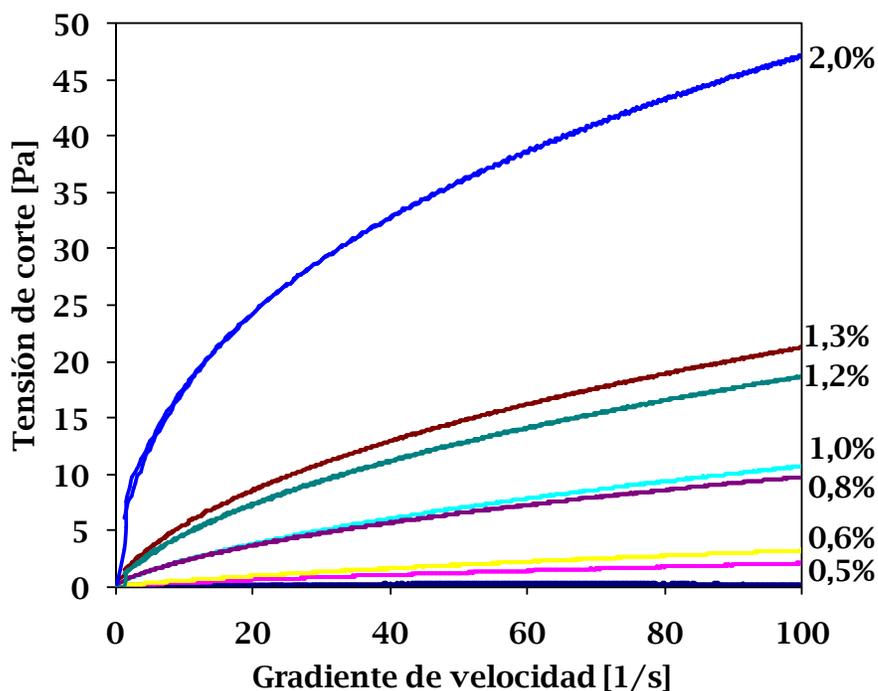


Figura 17: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las soluciones de *lambda*-carragenina desde 0,1 a 2,0 % (p/ p) de concentración.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

Para todas las concentraciones medidas de *lambda*-carragenina, la tensión de corte (a un gradiente de velocidad dado) se incrementó con el aumento de la concentración (Figura 17). Para el rango de 0,1 - 0,5 % (p/ p), la tensión de corte de la solución polimérica mostró una dependencia prácticamente lineal con el gradiente de velocidad, es decir, serían esencialmente Newtonianas. A partir de una concentración de 0,6 % (p/ p) hubo un súbito incremento en la dependencia en el gradiente de velocidad y las soluciones poliméricas mostraron un claro comportamiento pseudo-plástico. Este incremento se observó una vez más a partir de la concentración de 1,0 % (p/ p). En ningún caso se observó histéresis.

Tabla 4: Valores de los parámetros K y n (modelo de ley de potencia) para las soluciones de *lambda*-carragenina.

Concentración λ -C % (p/p)	K (Pa.s ⁿ)	n	R ²
0,1	0,0051	0,8665	0,9825
0,2	0,0083	0,8915	0,9954
0,3	0,0165	0,8767	0,9989
0,5	0,0562	0,7802	0,9996
0,6	0,1008	0,7549	0,9994
0,8	0,5319	0,6528	0,9991
1,0	0,6351	0,6025	0,9989
1,2	1,2980	0,5771	0,9988
1,3	1,5230	0,5735	0,9987
2,0	6,6615	0,4261	0,9972

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

El índice de consistencia (K) es un indicador de la naturaleza viscosa de una solución y, como era de esperarse, en el caso de las soluciones de *lambda*-carragenina el mismo se incrementó con la concentración, desde 0,0051 a 6,6615 ($R^2 > 0,9825$). Desde una concentración de 0,1 % (p/ p) el parámetro n disminuyó con la concentración, desde 0,8665 a 0,4261 ($R^2 > 0,9825$), lo que indicaría la naturaleza pseudo-plástica de las soluciones (Tabla 4).

El comportamiento pseudo-plástico observado en las soluciones de *lambda*-carragenina podría ser explicado en términos de entrecruzamientos poliméricos, donde la velocidad de ruptura de los entrecruzamientos excede la velocidad a la cual los nuevos entrecruzamientos se forman y esto conduciría a una reducción en la densidad de cruces y, en consecuencia, en la viscosidad, como fue reportado por Manoj y col. (1998) quienes analizaron el comportamiento de flujo de soluciones de hidroxietilcelulosa.

Al igual que para las soluciones de WPC, a los fines de evaluar los regímenes de concentración, se graficó la viscosidad específica versus la concentración (viscosidad a gradiente 0,1 1/s) para las soluciones de *lambda*-carragenina (Figura 18).

Para concentraciones menores a 0,58 % (p/ p) el régimen sería diluido, para concentraciones mayores a 0,58 % (p/ p) y menores a 1,2 % (p/ p) el régimen sería semi-diluido, y para concentraciones mayores a esta última el régimen sería concentrado. Por lo tanto, los resultados indican que en el régimen diluido las soluciones de *lambda*-carragenina se comportan como Newtonianas y, a partir del régimen semi-diluido donde las macromoléculas comienzan a

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

interaccionar el comportamiento comienza a ser pseudo-plástico. Estos resultados son similares a los obtenidos por Santiago y col. (2002), quienes evaluaron los distintos regímenes de concentración para la goma xántica y la *lambda*-carragenina.

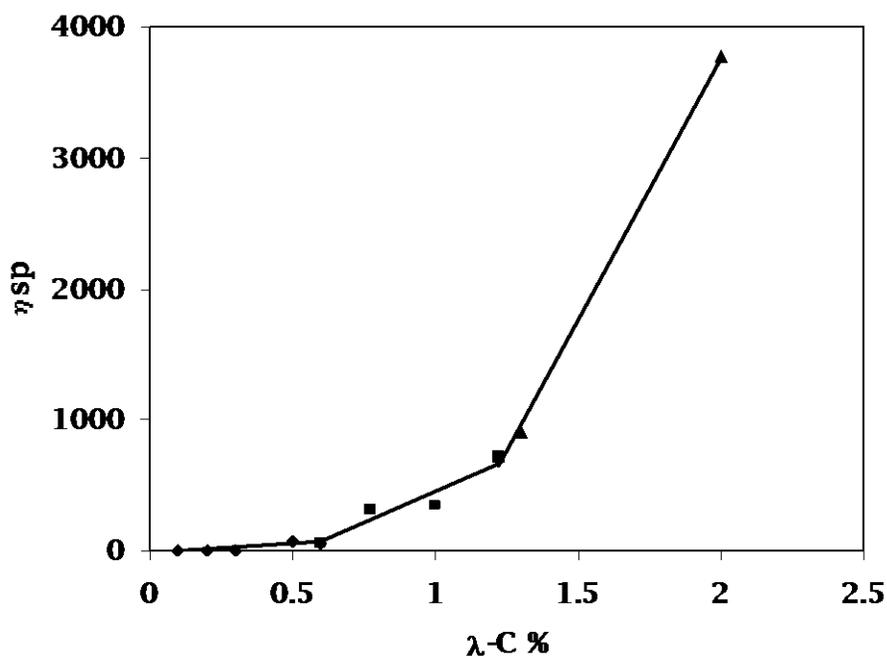


Figura 18: Viscosidad específica versus concentración de las soluciones de *lambda*-carragenina.

Mezclas de WPC y λ -C

- Mezclas de WPC y 1 % λ -C

Se evaluó en primer lugar la viscosidad de mezclas de suero lácteo y *lambda*-carragenina incrementando la concentración del WPC (2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 15,0;

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

20,0 y 25,0 % (p/ p) ST) y fijando la concentración de la carragenina en 1,0 % (p/p).

Los perfiles de las mezclas (Figura 19) mostraron un comportamiento predecible con el incremento de la concentración de WPC, es decir, la viscosidad aumentó con el incremento de la misma. Todas las soluciones presentaron un comportamiento de flujo pseudo-plástico y las tres concentraciones más altas (15,0; 20,0; 25,0 % (p/ p) ST) mostraron además histéresis.

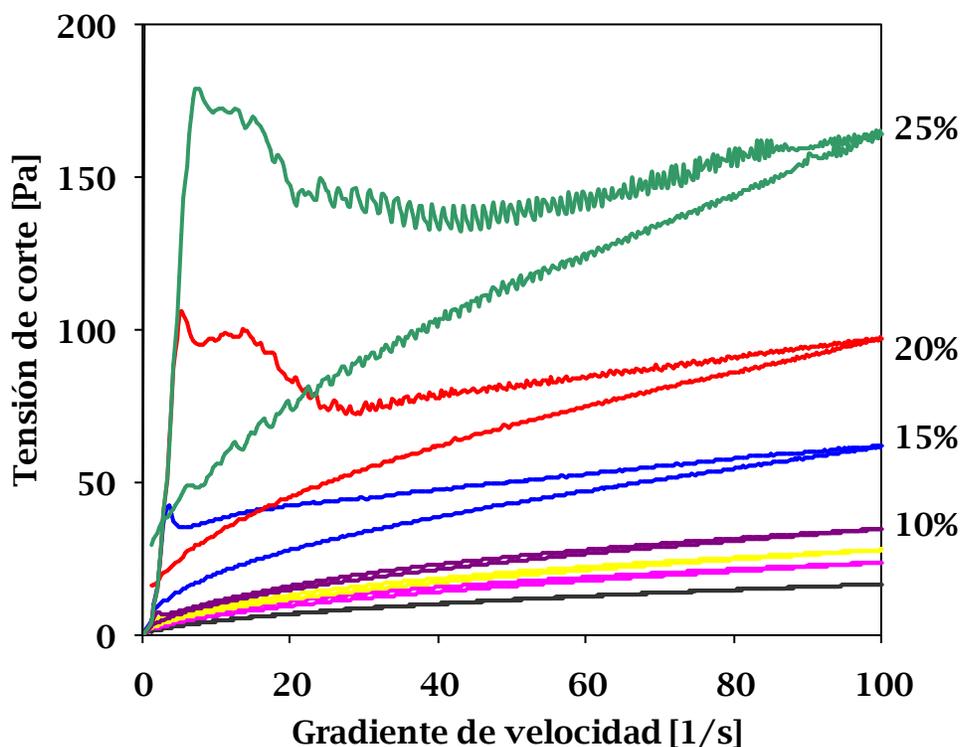


Figura 19: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las mezclas WPC (2,0 a 25,0 % (p/ p)) + 1 % λ -C.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

Se calcularon los parámetros K y n del modelo de ley de potencia para las mezclas en el rango de 2,0 - 10,0 % (p/ p) ST (Tabla 5). Se puede apreciar que el índice de consistencia (K) se incrementó de manera sistemática con el aumento de la concentración de WPC mientras que el índice de comportamiento de flujo (n) disminuyó, reflejando estos resultados la naturaleza pseudo-plástica de las mezclas.

Tabla 5: Valores de los parámetros K y n (modelo de ley de potencia) para las mezclas WPC + 1,0 % (p/ p) λ -C.

Concentración WPC % (p/ p) ST + 1,0 % (p/ p) λ-C	K (Pa.sⁿ)	n	R²
2,0	1,1960	0,5717	0,9992
4,0	1,7750	0,5685	0,9998
8,0	2,2000	0,5463	0,9996
10,0	2,8770	0,5373	0,9998

Comparando las viscosidades de estas mezclas con las viscosidades de las soluciones de WPC (Figura 15) y *lambda*-carragenina (Figura 17) de las correspondientes concentraciones, se puede apreciar que las viscosidades de las mezclas son mayores que la suma de la viscosidad de la solución proteica + la viscosidad de la solución polimérica. Además, la histéresis mostrada por las mezclas de 15,0 - 25,0 % (p/ p) ST WPC + 1,0 % (p/ p) λ -C no se observó ni en las soluciones de WPC ni en la de *lambda*-carragenina de concentraciones similares.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

El comportamiento presentado en las mezclas WPC/ *lambda*-carragenina podría deberse a la limitada compatibilidad termodinámica de las proteínas y el polisacárido ya que, al pH de las mezclas, tanto las proteínas del WPC como la *lambda*-carragenina poseen una carga neta negativa. Teniendo en cuenta que la *lambda*-carragenina es un polisacárido *random-coil* con un peso molecular promedio de 800 kDa, y de acuerdo a los resultados obtenidos por HPLC, que las proteínas más abundantes del suero lácteo, la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoalbúmina, tienen respectivamente un peso molecular de 18 y 14 kDa y que el WPC utilizado mostró la presencia de agregados proteicos de un peso molecular de $\cong 890$ kDa, este fenómeno podría describirse como inclusiones o agregados de proteínas entre moléculas del polisacárido, y estos agregados, sumado a la repulsión entre las moléculas, estarían incrementando la viscosidad. Por otro lado, de acuerdo a Dickinson (1998), Kruif y Tuinier (2001), Tolstoguzov (2003) y Perez y col. (2007) el comportamiento podría también ser atribuido a la presencia de interacciones sinérgicas entre las proteínas y el polisacárido debido al carácter anfotérico de las proteínas y al alto contenido de grupos sulfato de la *lambda*-carragenina, es decir, la atracción involucraría los grupos locales cargados positivamente de la proteína que interactuarían con el polisacárido aniónico.

Con el objetivo de evaluar los regímenes de concentración de este sistema se graficó también la viscosidad específica versus la concentración (viscosidad a gradiente 1,0 1/s) (Figura 20). Teniendo en cuenta que en estas mezclas se incrementó la concentración de sólidos de WPC manteniendo la concentración

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

de *lambda*-carragenina constante (1 % (p/ p)) y que esta última se encuentra en el régimen semi-diluido, los regímenes de las mezclas WPC/ λ -C hallados fueron los siguientes: para concentraciones de WPC menores a 10,0 % (p/ p) ST la solución sería semi-diluida y para concentraciones mayores a esta el régimen sería concentrado. Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos para las dispersiones del WPC solo, cabe destacar el notable corrimiento a menores concentraciones de C^{**} , siendo de 24,6 % (p/ p) ST para el WPC solo y de 10,0 % (p/ p) ST ante el agregado de 1,0 % (p/ p) de *lambda*-carragenina. Este resultado estaría demostrando el elevado grado de interacción entre ambas macromoléculas.

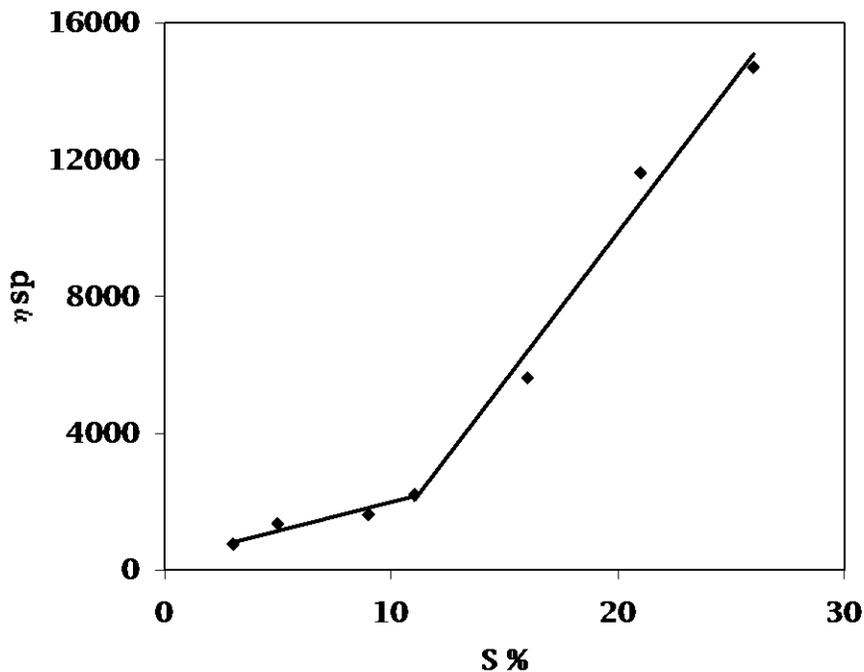


Figura 20: Viscosidad específica versus concentración de sólidos de las mezclas WPC + 1 % (p/ p) λ -C

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

- Mezclas de WPC y *lambda*-carragenina en distintas proporciones.

A los fines de seleccionar una mezcla adecuada para someter al proceso de secado en spray y obtener un ingrediente con valor agregado para la industria, se evaluó la viscosidad de tres mezclas WPC/ λ -C en distintas proporciones:

- mezcla 8:1 WPC/ λ -C - 10,5 % (p/ p) ST/ 1,3 % (p/ p).

- mezcla 16:1 WPC/ λ -C - 19,5 % (p/ p) ST/ 1,2 % (p/ p).

- mezcla 32:1 WPC/ λ -C - 24,5 % (p/ p) ST/ 0,8 % (p/ p).

En la Figura 21 se pueden apreciar los perfiles de tensión de corte versus gradiente de velocidad de las tres mezclas y de la solución de WPC al 32 % (p/ p) de sólidos, concentración a la cual la industria somete a las proteínas del suero lácteo al secado en spray durante el proceso de obtención del WPC.

En todos los casos las mezclas WPC/ λ -C mostraron un comportamiento de flujo pseudoplástico e histéresis. Este último comportamiento no se observó en las soluciones de WPC y *lambda*-carragenina de las correspondientes concentraciones. Además, como se observó anteriormente, la viscosidad de cada mezcla fue mayor que la suma de la viscosidad de la solución de WPC más la viscosidad de la solución del polímero.

Al comparar a igual gradiente (100 1/s) el perfil de la mezcla 32:1 WPC/ λ -C con el perfil de la solución de WPC de la correspondiente concentración (24,5 % (p/ p) ST (Figura 15b) se puede apreciar que con una concentración de *lambda*-carragenina relativamente baja (0,8 % (p/ p)) la viscosidad aparente de la mezcla fue 25 veces mayor que la de la solución de WPC y 5 veces mayor que la de la solución de WPC al 32,0 % (p/ p) ST.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

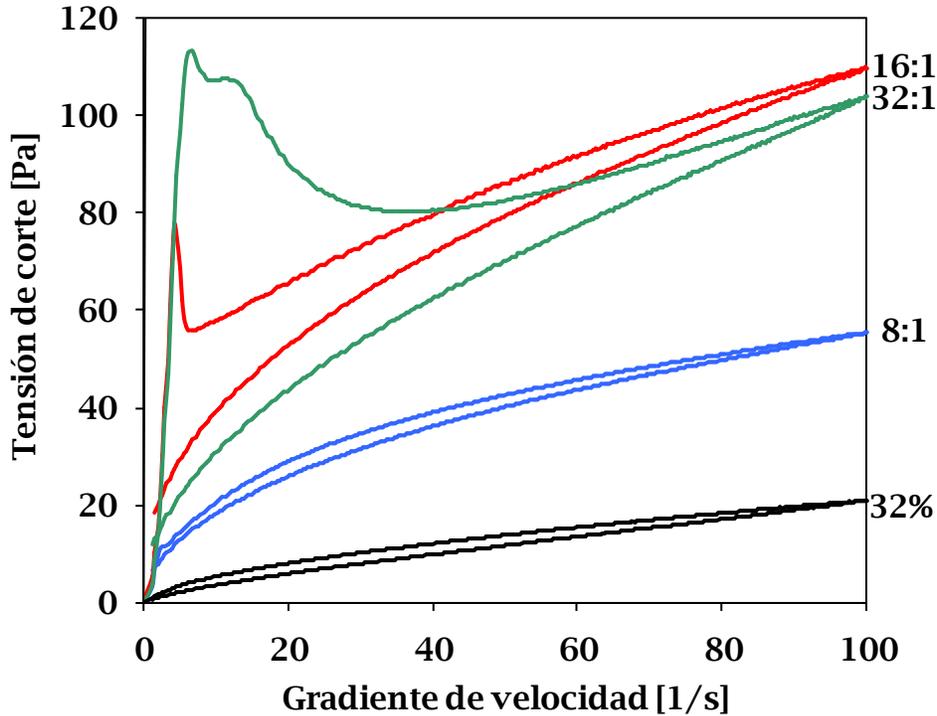


Figura 21: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las distintas mezclas WPC/ *lambda*-carragenina, 8:1, 16:1 y 32:1 y la dispersión de WPC al 32,0 % (p/ p) ST.

Por otra parte, al comparar los perfiles de las tres mezcla a bajos gradientes de velocidad se puede observar que tanto el τ_0 como el comportamiento tixotrópico se incrementan con la concentración de sólidos de WPC. Este fenómeno podría deberse a que se estaría produciendo un sistema con una mayor estructuración que se rompe parcialmente con el incremento del gradiente de velocidad y el tiempo. Esta estructura no puede ser atribuida a la presencia de *lambda*-carragenina dado que la concentración del polisacárido disminuye con el incremento de la concentración de WPC, pero tampoco fue

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

observada en las dispersiones de proteína solas. Por lo tanto, este comportamiento podría estar confirmando la existencia de interacciones entre los dos biopolímeros, como fue anteriormente discutido.

A elevados gradientes de velocidad, la viscosidad de la mezcla 32:1 WPC/ λ -C fue menor que la viscosidad de la mezcla 16:1. Este resultado estaría indicando que, una vez rota la estructura observada a bajos gradientes, tendría mayor importancia el contenido del biopolímero, siendo menor este en la primer mezcla.

Si ahora se comparan las tres mezclas con la solución de WPC al 32,0 % (p/ p) ST, se puede apreciar que solo la mezcla 8:1 WPC/ λ -C sería factible de pasar por el secadero spray dado que las otras dos mezclas poseen estructuras difíciles de romper y viscosidades considerablemente mas altas.

- Mezcla de WPC y λ -C co-secada (CS)

Se evaluó la viscosidad de la mezcla co-secada 8:1 WPC/ λ -C a diferentes concentraciones de sólidos. En la Figura 22 se pueden observar los perfiles de tensión de corte versus gradiente de velocidad para las distintas concentraciones de dicha mezcla.

Para todas las concentraciones medidas, la viscosidad aumentó con el incremento de la concentración de sólidos (Tabla 6). Hasta una concentración de 3,0 % (p/ p) ST las soluciones fueron prácticamente Newtonianas y a partir de esta concentración las mismas mostraron un comportamiento de flujo

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

pseudo-plástico el cual se acentuó con el incremento de la concentración. A partir de una concentración de 8,0 % (p/ p) ST las soluciones presentaron histéresis, la cual se incrementó con la concentración de sólidos.

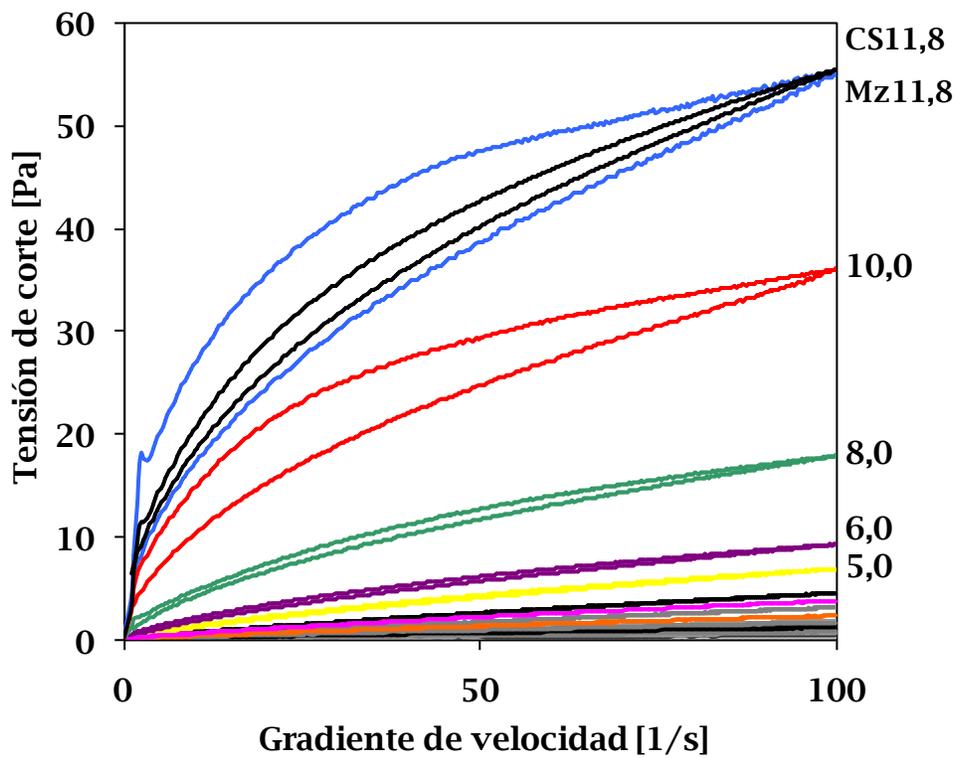


Figura 22: Tensión de corte versus gradiente de velocidad del CS a distintas concentraciones y la mezcla sin co-secar (Mz, curva color negro).

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

Tabla 6: Valores de los parámetros η (modelo de Newton) y K y n (modelo de ley de potencia) para las dispersiones de CS.

Concentración de CS % (p/ p) ST	η (Pa.s)	R^2	
0,5	0,0033	0,9074	
1,0	0,0044	0,9319	
1,5	0,0070	0,9780	
2,0	0,0126	0,9870	
2,5	0,0134	0,9945	
3,0	0,0176	0,9775	

Concentración de CS % (p/ p) ST	K (Pa.s ⁿ)	N	R^2
3,5	0,0556	0,8118	0,9985
4,0	0,0969	0,7960	0,9995
5,0	0,2158	0,7497	0,9999
6,0	0,3720	0,7025	0,9998

En la Figura 23 se graficó la viscosidad específica versus la concentración de sólidos para las soluciones de CS (viscosidad a gradiente 0,1 1/s). A partir de la misma se obtuvieron los tres regímenes de concentración: para $C < 2,27$ % (p/ p) ST el régimen sería diluido, para $2,27$ % $< C < 7,95$ % (p/ p) ST el régimen sería semi-diluido y para $C > 7,95$ % (p/ p) ST el régimen sería concentrado. Si se comparan estos regímenes con los del WPC sin la *lambda*-carragenina, puede apreciarse un notable corrimiento a menores concentraciones ante el agregado

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

del biopolímero. Esto sería debido a la mayor concentración de moléculas por unidad de volumen que se encontrarían en la mezcla, y de este modo, habría una mayor interacción entre las mismas y los regímenes se observarían a menores concentraciones.

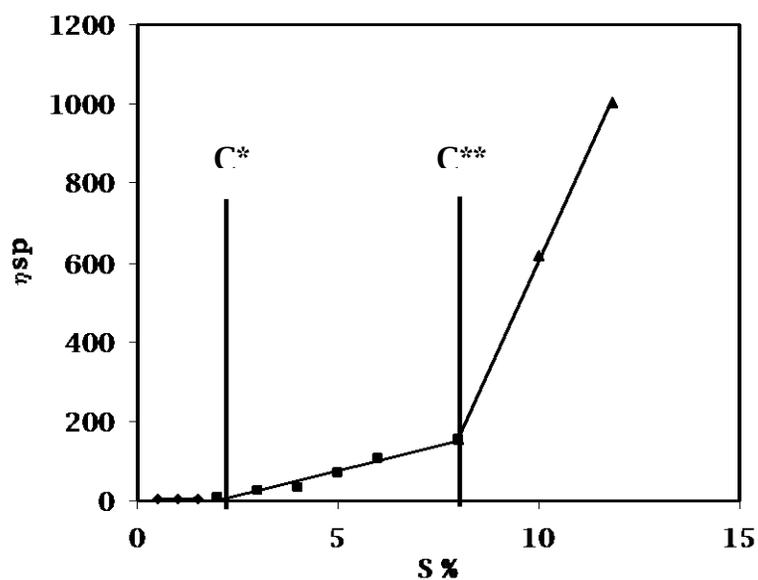


Figura 23: Viscosidad específica versus concentración de sólidos del CS.

Por otra parte, en la Figura 22 se incluyó la gráfica de la mezcla sin co-secar para una concentración de 11,8 % de sólidos. Se puede apreciar que, tanto el comportamiento pseudo-plástico como la histéresis son menores en la mezcla sin pasar por el proceso de secado. Este comportamiento podría deberse a que el calentamiento que sufrió la mezcla en este proceso habría inducido pequeñas modificaciones en el estado de agregación y, en algunos casos, cambios conformacionales reversibles. Dado que, como se verificó previamente

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

en las mediciones de DSC, no habrían existido diferencias en el grado de desnaturalización entre la mezcla sin co-secar y el CS. La re-organización de los agregados conduciría a la formación de estructuras más fuertes que podrían explicarse por el desarrollo de nuevas interacciones electrostáticas inter-macromoleculares, polímero-polímero y polímero-proteína, durante el proceso de secado (Salvador, Sanz & Fiszman, 2001).

- Efecto de la temperatura

Dispersiones de WPC

Se midió la viscosidad a 20 °C y a 50 °C de soluciones de WPC a las concentraciones correspondientes a las mezclas (10,5 %; 19,5 % y 24,5 % (p/ p) ST). En las figuras 24 (a, b, c y d) se muestra la tensión de corte versus el gradiente de velocidad para cada una de las concentraciones.

A 50 °C, para una concentración de 10,5 % (p/ p) ST, el comportamiento continuó siendo Newtoniano mientras que para las concentraciones en el rango semi-diluido (19,5 % y 24,5 % (p/ p) ST) comenzó a observarse histéresis. Para la concentración de 32,0 % (p/ p) ST no hubo un cambio apreciable en la histéresis observada ya a 20 °C pero tanto en esta concentración como en la de 24,5 % (p/ p) ST se pudo observar la aparición de un valor de τ_0 .

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

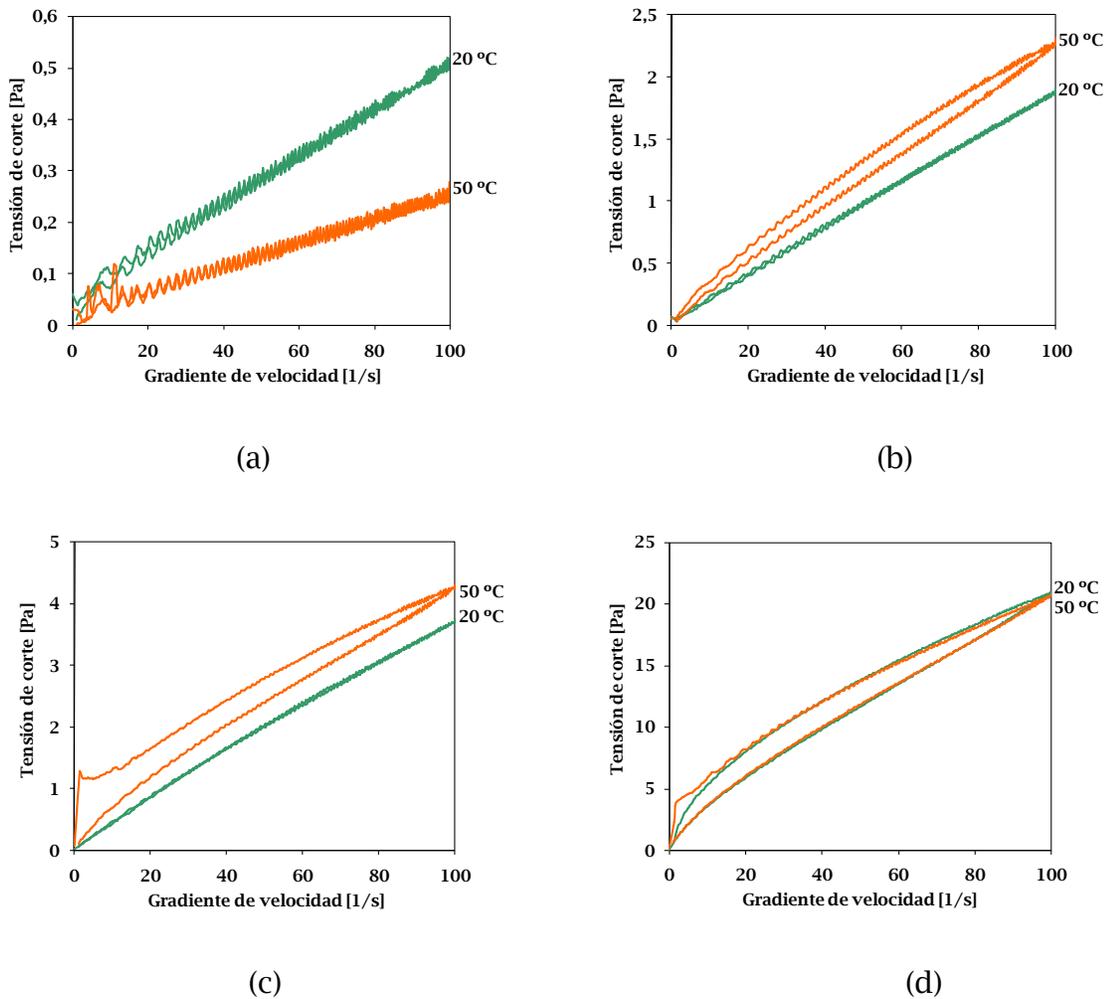


Figura 24: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las dispersiones de WPC a las concentraciones de las mezclas: (a) 10,5; (b) 19,5, (c) 24,5 % (p/ p) ST y a la concentración de secado de la industria, (d) 32,0 % (p/ p) ST, a 20 °C y a 50 °C.

Los cambios observados a 50 °C estarían indicando que a esta temperatura se habrían producido cambios estructurales en las proteínas que se manifestarían con la aparición de agregados atribuibles a interacciones de tipo hidrofóbicas. Estas estructuras son más resistentes ya que soportan mayores deformaciones. Este efecto está en relación con el hecho que la desnaturalización (y

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

desplegamiento) de las proteínas globulares por acción del calor comienza a 40 °C y procede lentamente hasta 60 °C, lo cual es acompañado por un aumento del agua ligada a las proteínas (hinchamiento). De este modo aumenta el radio hidrodinámico de las moléculas proteicas y ocurre una mayor interacción molecular (Aguilera, 1995). Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos en las mediciones de DSC donde se encontró que la temperatura de desnaturalización de las proteínas del WPC se inicia alrededor de los 60 °C.

La histéresis surge como resultado de la dependencia de la viscosidad con el des-balance entre la ruptura de la estructura debido al esfuerzo de corte y a la formación de estructuras generadas por movimientos brownianos y por una débil agregación molecular (Berli y Deiber, 1997).

Se puede observar que a 20 °C ninguna de las soluciones de WPC de concentraciones en el rango diluido y semi-diluido presenta histéresis ni tensión de fluencia (τ_0), mientras que la solución concentrada de 32,0 % (p/ p) ST muestra histéresis pero no muestra evidencias de τ_0 . Esto último estaría evidenciando la presencia de interacciones que generan estructuras débiles y fácilmente destruibles durante la aplicación del esfuerzo de corte.

Soluciones de lambda-carragenina

Se midió la viscosidad a 20 y a 50 °C de las soluciones de *lambda*-carragenina a las concentraciones de las mezclas (0,8 %, 1,2 % y 1,3 % (p/ p)). En la figura 25 (a, b y c) se puede observar la tensión de corte versus el gradiente de velocidad de las soluciones del biopolímero a las dos temperaturas.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

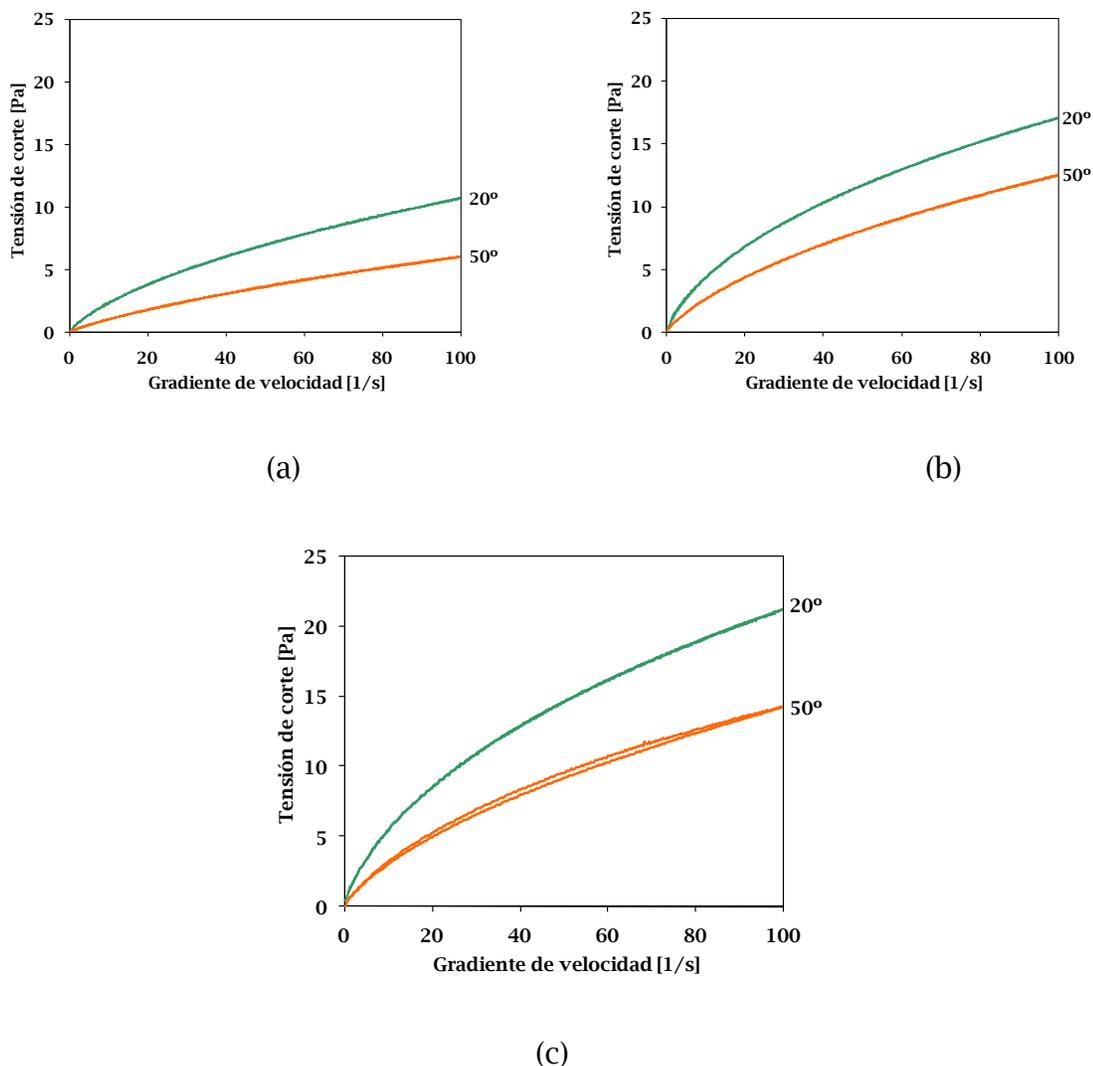


Figura 25: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las soluciones de λ -carragenina de (a) 0,8, (b) 1,2 y (c) 1,3 % (p/ p); a 20 ° y 50 °C.

En todos los casos se puede apreciar que la viscosidad de las soluciones de λ -C disminuye con el incremento de la temperatura, conservando a 50 °C el comportamiento pseudoplástico observado a 20 °C. A diferencia de las otras carrageninas, iota y kappa, las cuales pasan de una conformación *random-coil* a una estructura helicoidal con el incremento de la temperatura por lo cual

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

gelifican, la conformación de la *lambda*-carragenina no se ve afectada por la misma ya que presenta una estructura *random-coil* cualquiera sea la temperatura y fuerza iónica del medio (Sharma, 1981; Thomas, 1999; Langendorff y col., 2000).

Mezclas de WPC/ λ -C

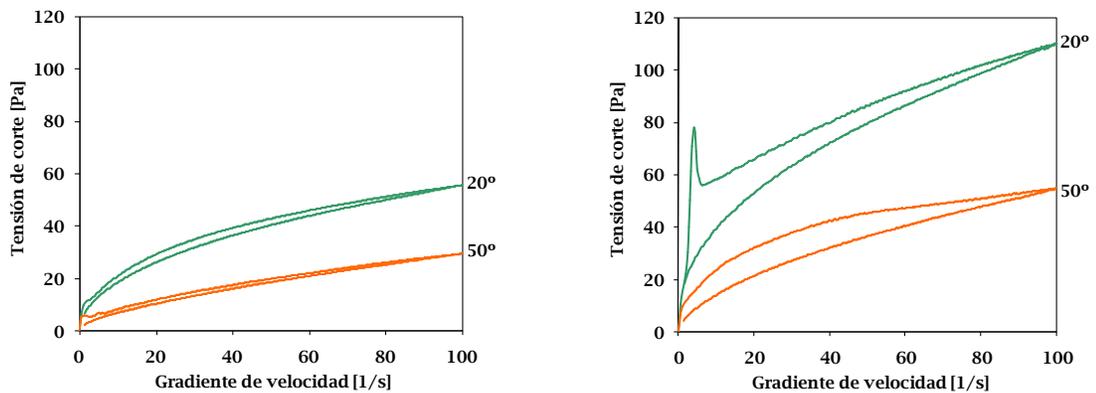
Se midió la viscosidad a 20 y 50 °C de las tres mezclas WPC/ λ -C en distintas proporciones. La figura 26 (a, b y c) muestra la tensión de corte versus el gradiente de velocidad para las mezclas 8:1, 16:1 y 32:1 WPC/ λ -C.

Se puede apreciar que a 50 °C las mezclas conservaron el comportamiento pseudo-plástico, y en el caso de las mezclas 16:1 y 32:1, la histéresis observados a 20 °C. Sin embargo, en todos los casos la viscosidad disminuyó con el incremento de la temperatura. La mezcla 16:1 mostró a 20 °C una tensión de fluencia (τ_0) que desapareció a 50 °C, mientras que la mezcla 32:1 presentó este comportamiento en ambas temperaturas, siendo mayor a 20 que a 50 °C.

Por otra parte, estos resultados permitieron apreciar el efecto de la temperatura sobre la viscosidad de las mezclas a la temperatura a la que

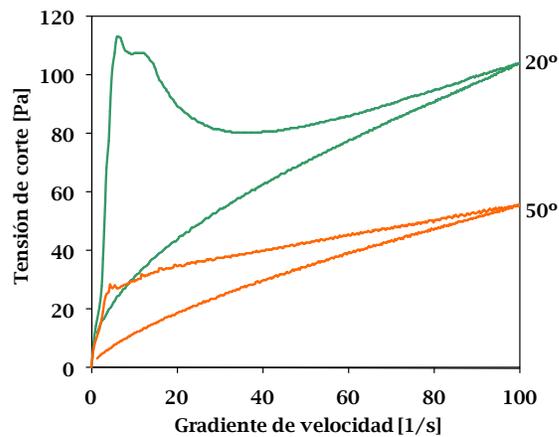
CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

ingresa en el equipo de secado, a los fines de seleccionar cual podía ser sometida a este proceso. Dado que solo la mezcla 8:1 disminuyó su viscosidad considerablemente sin presentar además comportamiento tixotrópico, se seleccionó la misma para ser co-secada.



(a)

(b)



(c)

Figura 26: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las mezclas (a) 8:1, (b) 16:1 y (c) 32:1 WPC/ λ -C a 20° y 50 °C.

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

3.5 Conclusiones

El WPC de origen comercial utilizado contendría agregados de elevado peso molecular y su presencia se debería probablemente a un fenómeno de desnaturalización térmica de las proteínas del WPC como consecuencia del proceso de elaboración industrial de las mismas.

Dichos agregados serían de naturaleza principalmente hidrofóbica dado que, ante el aumento de la fuerza iónica y la correspondiente neutralización de cargas, se incrementó su número. Resultado que se corroboró al evaluar la solubilidad del concentrado proteico en 0,5 % SDS y encontrar que la misma se vería favorecida notablemente.

La presencia de la *lambda*-carragenina habría desagregado en gran proporción dichos agregados lo cual estaría indicando un cierto grado de interacción entre los biopolímeros.

Semejante interacción sería probablemente de naturaleza electrostática dada la nueva aparición de los agregados ante la adición del NaCl. La sal estaría neutralizando las cargas que participarían de la interacción entre las proteínas del WPC y la *lambda*-carragenina, lo cual llevaría nuevamente a una reducción de la repulsión entre las proteínas y a un aumento de la hidrofobicidad.

La elevada solubilidad del WPC mostrada en distintos solventes es una ventaja que permite una rápida y completa dispersión de las moléculas o partículas proteicas conduciendo a un sistema coloidal finamente disperso, con una estructura macroscópica homogénea y una textura suave. Además, la elevada solubilidad inicial de las proteínas de suero lácteo facilita su difusión hasta las

CARACTERIZACIÓN DE LA FASE CONTINUA

interfases. Esta propiedad del WPC se vería favorecida notablemente por la presencia de la *lambda*-carragenina mostrando, además, que existirían interacciones del tipo electrostático entre ambos biopolímeros.

Los resultados en las mediciones de viscosidad también habrían demostrado la existencia de interacciones entre las proteínas del WPC y la *lambda*-carragenina. El notable incremento en la viscosidad al mezclar ambas macromoléculas, el corrimiento en los regímenes de concentración a menores valores y la disminución de la viscosidad frente a la temperatura serían prueba de dichas interacciones, probablemente del tipo electrostático. Los resultados obtenidos con DSC estarían corroborando un incremento en la estabilidad térmica de las proteínas del WPC en presencia de la *lambda*-carragenina.

Capítulo IV

Resultados

Caracterización de las

Emulsiones

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

4.1 Emulsiones preparadas en Ultra Turrax

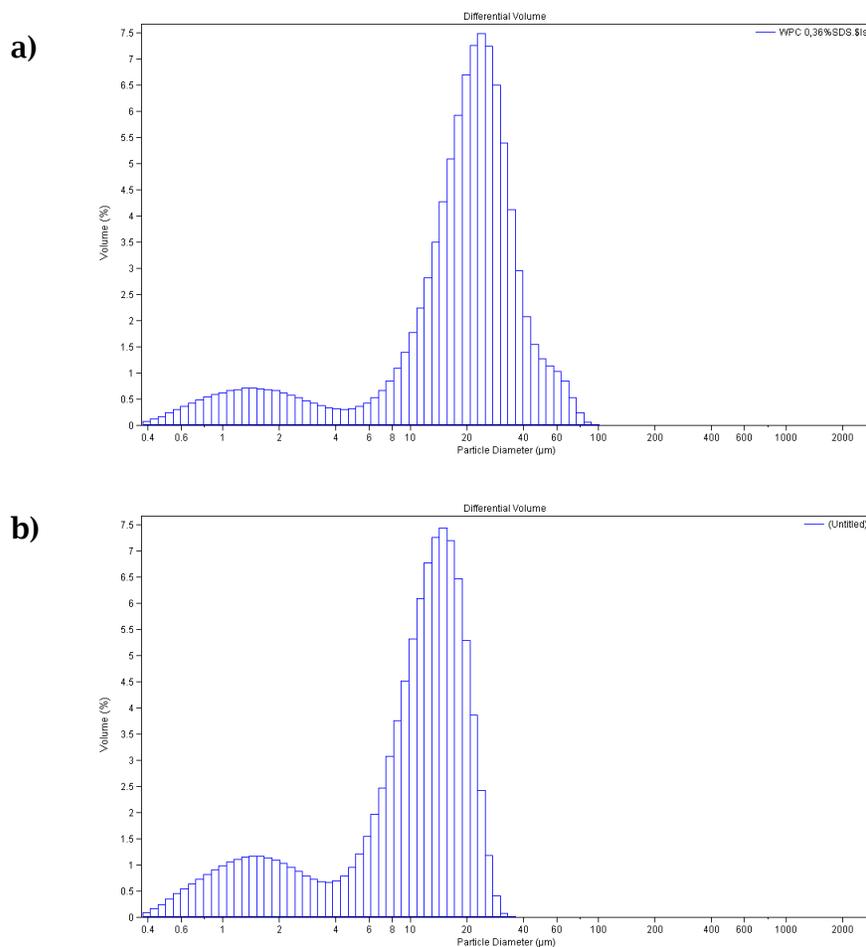
-Efecto de la concentración y tipo de biopolímero en la fase continua

4.1.1 Emulsiones con WPC

-Tamaño de Partícula

Para evaluar el tamaño de las gotas de las emulsiones en estudio se seleccionó el $D(4,3)$ el cual indica el volumen ocupado por las gotas, dado que la propiedad importante en este caso es la estabilidad a la separación (Robins, 2000b). En las Figuras 27 se muestran ejemplos de las distribuciones de tamaño ($D(4,3)$) de las emulsiones con WPC preparadas con el Ultra Turrax para una concentración de proteína en la fase continua de 0,37 y de 2,93 % (p/p); y en la Figura 28 se presenta el $D(4,3)$ en función de la concentración de proteína. En este caso, el incremento de la concentración de WPC generó variaciones tanto en las distribuciones como en la media. Las distribuciones de tamaño de las emulsiones con la menor concentración de proteína presentaron tres poblaciones de partícula: una población principal de alrededor de 20 μm y dos poblaciones más pequeñas (una mayor y otra menor en tamaño). Al incrementar la concentración de proteína, la población principal se desplazó a menores tamaños (alrededor de 10 μm), la población de mayor tamaño disminuyó hasta desaparecer y la población más pequeña se incrementó. Por su parte, la media en volumen disminuyó constantemente con la concentración de proteína, siendo alrededor de 26 μm para la emulsión con 0,37 % y de 11 μm para la de 2,93 % (p/p) de proteína (Figura 28).

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES



Figuras 27: Distribuciones de tamaños de las emulsiones preparadas con WPC en el UT de concentraciones (a) 0,37 y (b) 2,93 % (p/ p) de proteína.

El agregado de SDS a las emulsiones, con el fin de de-flocular las gotas, no produjo cambios o muy ligeros incrementos de las medias para las concentraciones a partir de 0,73 % (p/ p) (Figura 28), excepto para la concentración de 2,56 % (p/ p) para la cual el incremento fue significativo ($p < 0,05$). En la emulsión con la menor concentración de proteína (0,37 % (p/ p)), el agregado de SDS generó una reducción de la población de partículas más

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

grandes (> 100 micrones) lo que condujo a una disminución de la media en volumen. Esto último estaría indicando que a esta concentración de proteína habría floculación de las gotas.

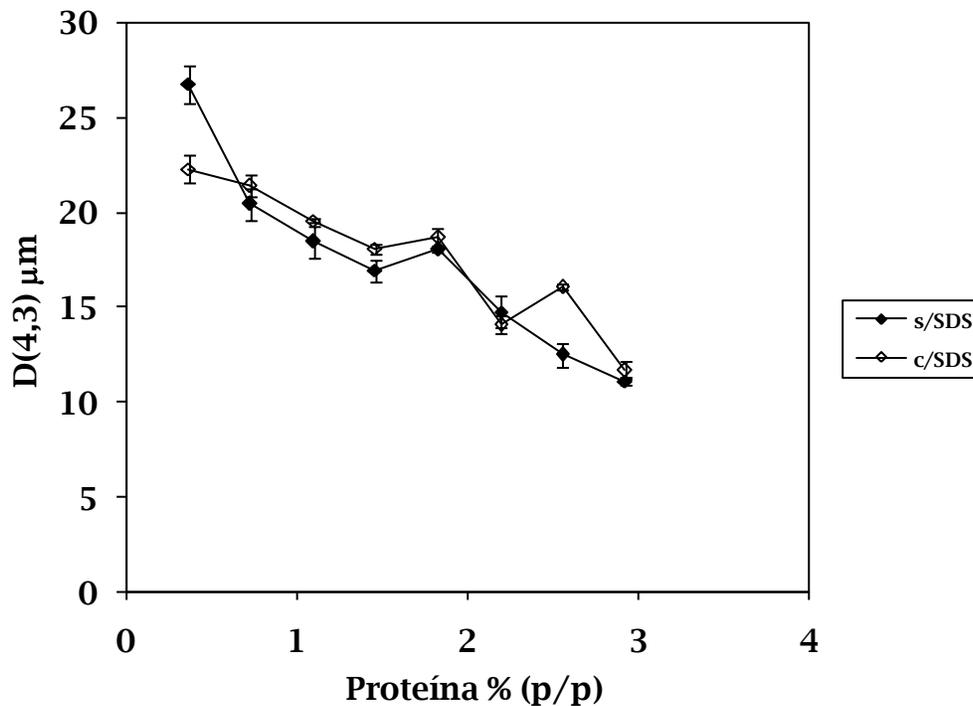


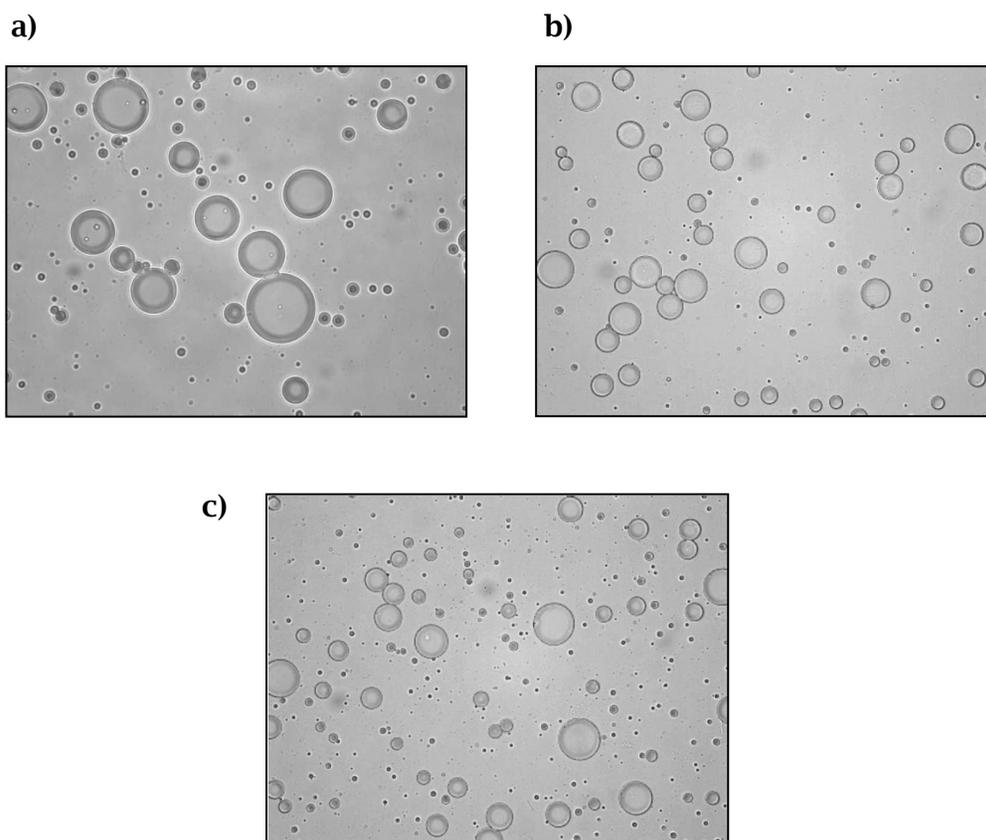
Figura 28: D (4,3) en función de la concentración de proteína de las emulsiones con WPC preparadas en el UT, con y sin SDS.

- Microscopía

En las Figuras 29 se presentan ejemplos de los resultados del estudio de microscopia realizado en las emulsiones preparadas con WPC en el Ultra Turrax. Como se puede apreciar en las microfotografías, la distribución de gotas obtenida con el Ultra Turrax consiste en una distribución bimodal

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

constituida por una población de gotas grandes y otra de gotas pequeñas. Con el incremento en la concentración de proteína de suero lácteo se produjo una reducción en el tamaño de las gotas de la emulsión, principalmente de las de mayor tamaño. Estos resultados concuerdan con lo observado en las mediciones de tamaño de partícula de las mismas.



Figuras 29: Micrografías de las emulsiones con WPC preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

- Viscosidad

En la Figura 30 se presenta la viscosidad de las emulsiones con proteína de suero lácteo preparadas en el Ultra Turrax a distintas concentraciones de proteína.

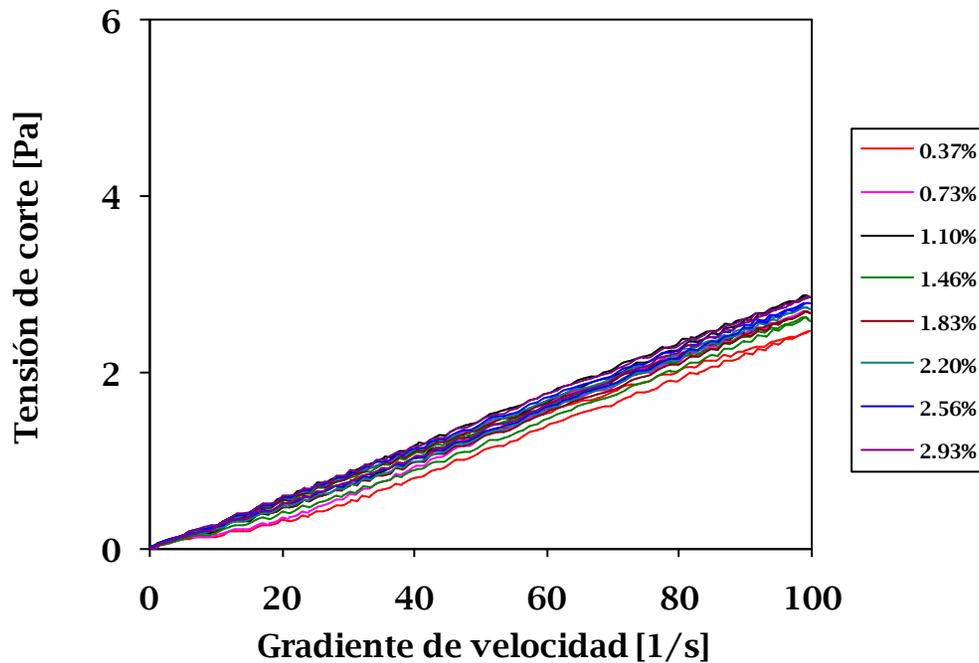


Figura 30: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas con 0,37 a 2,93 % (p/ p) de proteína de WPC en el Ultra-Turrax.

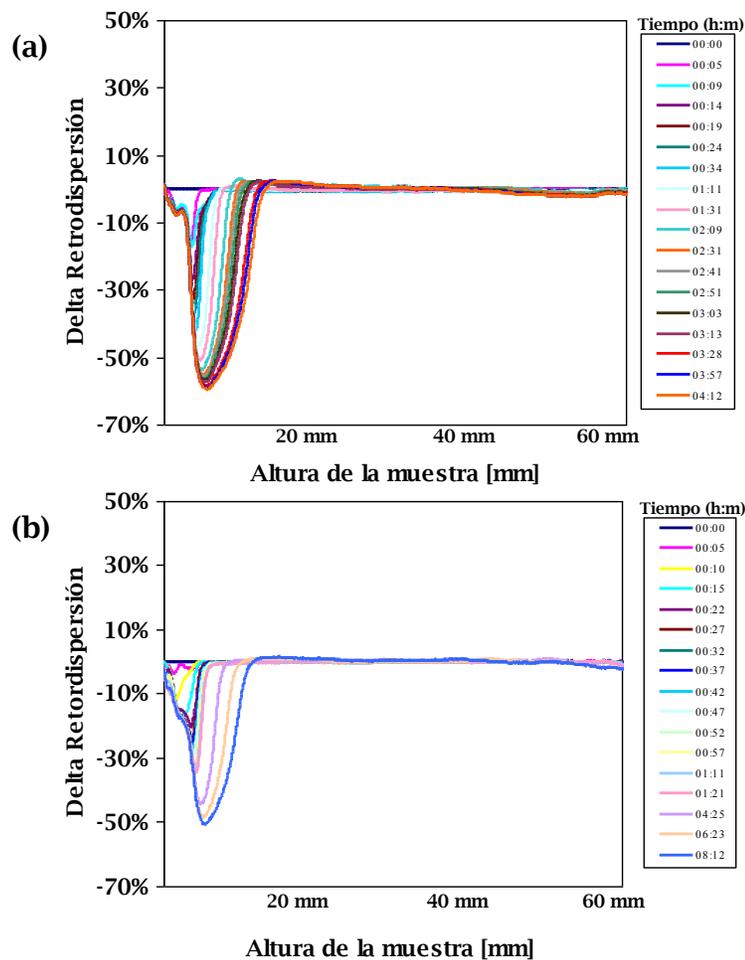
Se puede apreciar que el comportamiento de las emulsiones con WPC fue prácticamente Newtoniano para todo el rango de concentraciones estudiado y que, el aumento de la concentración de proteína produjo un muy ligero incremento de la viscosidad. De acuerdo a Tadros (2004), las mediciones de viscosidad permitirían evaluar el grado de floculación de una emulsión y los

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

resultados obtenidos corroborarían el hecho que las emulsiones preparadas con el UT no estarían floculadas o ligeramente, como se asumió previamente.

- Estabilidad (Quickscan)

Ejemplos de las representaciones gráficas de la caracterización óptica a diferentes tiempos (horas) de las emulsiones con proteína de suero lácteo de concentraciones 0,37; 1,83 y 2,93 % (p/ p) preparadas en Ultra Turrax pueden apreciarse en la Figura 31.



CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

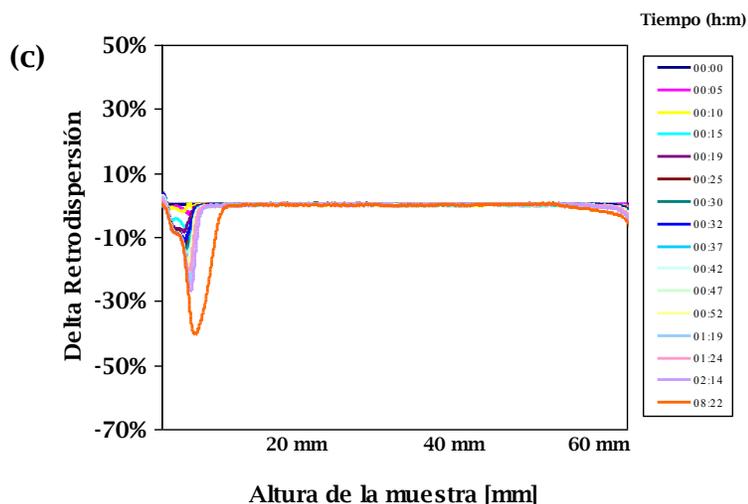


Figura 31: Retro-dispersión versus la altura de la muestra a distintos tiempos de las emulsiones con WPC preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína.

Los perfiles de delta de retro-dispersión (Δ BS) de luz medidos en función de la altura de la emulsión a distintos tiempos fueron evaluados a diferentes concentraciones de proteínas. Se puede apreciar en todos los casos que, inicialmente, el registro de Δ BS es constante a lo largo de toda la emulsión debido a que la distribución de gotas es homogénea a través del sistema. A medida que las gotas se desplazan hacia arriba, debido a la gravedad, hay una disminución del Δ BS en la parte inferior de la emulsión, ya que la concentración de gotas disminuye (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Chanamai y McClements, 2000a, 2000b; Robins, 2000b).

En la emulsión con una concentración de proteína de 0,37 % (p/ p) (Fig. 31 (a)) puede apreciarse un importante proceso de cremado que tuvo lugar en la parte inferior de la muestra a medida que se va vaciando de gotas en el tiempo; evidenciado por el incremento del ancho del pico del Δ BS. En las

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

representaciones siguientes se puede apreciar que, al incrementar la concentración de proteína, un proceso de separación menos importante tuvo lugar en la parte inferior de la muestra.

Si se compara el Δ BS de la emulsión con 0,37 % (p/ p) de proteína con el de la emulsión de 2,93 % (p/ p) se observa que, alrededor de las 8 horas de almacenada la muestra, hubo una separación de la fase acuosa de 20 mm para la primera mientras que para la segunda fue solo de 10 mm. Este incremento en la estabilidad de las emulsiones sería debido principalmente a la disminución del tamaño de partícula que se produjo al incrementar la concentración de la proteína de WPC, resultado observado en la Figura 28.

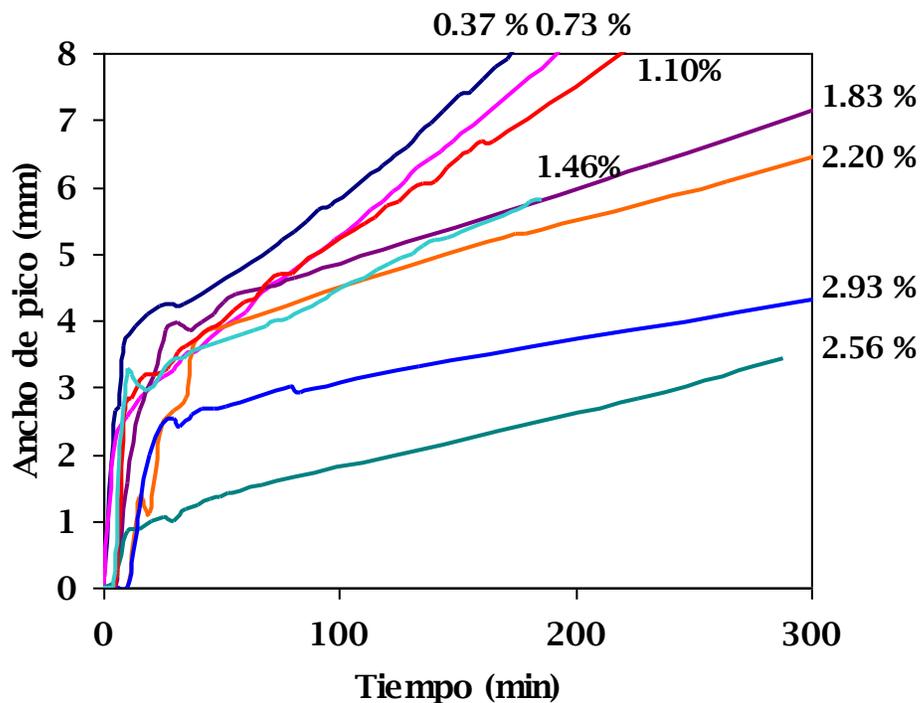


Figura 32: Cinética de cremado de las emulsiones con WPC preparadas en el UT.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

La cinética de cremado de las emulsiones se presenta en la Figura 32 en la cual se puede apreciar que, en todas las concentraciones hubo inicialmente una separación muy rápida de las fases seguida de una etapa de separación más lenta. Se puede apreciar también que con el incremento de la concentración de proteína la velocidad de cremado de ambas etapas disminuyó.

Este comportamiento estaría relacionado con el hecho que estas emulsiones presentan una distribución de gotas bimodal la cual se va aproximando a una distribución monomodal con el incremento de la concentración de proteína. Como se analizó previamente, la correlación entre velocidad de cremado y tamaño de partícula está dada por la ley de Stokes. La primera etapa de la cinética se produciría por el desplazamiento de las gotas más grandes que creman en primer lugar mientras que la segunda etapa se debería al cremado de la población de gotas más pequeñas. A medida que se incrementa la concentración de proteína el número de las gotas más grandes disminuye y se incrementa el número de gotas más pequeñas. De acuerdo a este comportamiento la cinética de cremado muestra una reducción de la primer etapa de cremado junto con una disminución de la velocidad, mientras que, en la segunda etapa, solo muestra una reducción de la velocidad de cremado. Esto último estaría indicando una mayor estabilidad de la emulsión frente a este proceso. La dependencia de la concentración de la velocidad de cremado de la segunda pendiente se muestra en la Figura 33. En este caso se encontró una reducción exponencial de la velocidad de cremado cuando la concentración de proteína de WPC se incrementó ($R^2= 0,9635$) (Lizarraga y col., 2007).

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

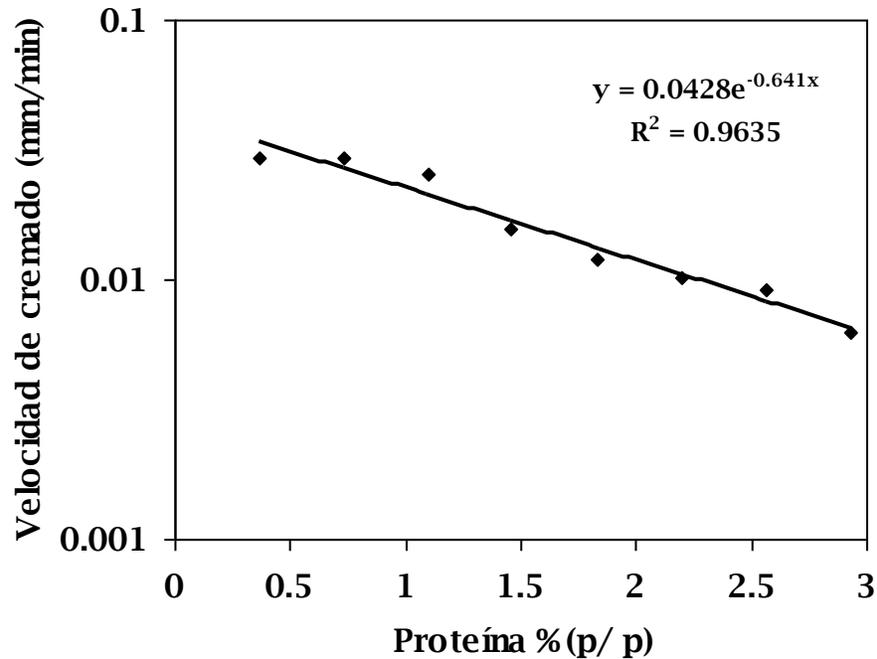


Figura 33: Velocidad de cremado versus concentración de proteína de las emulsiones con WPC preparadas en el UT.

Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Robins y Hibberd (1998). De acuerdo a estos autores el perfil de cremado de una emulsión mono-dispersa debería ser el siguiente: inicialmente la fracción en volumen es uniforme en toda la emulsión pero, después de un tiempo t , todas las gotas se desplazan hacia arriba a una velocidad U y algunas gotas alcanzan la capa crema. Ya que todas las gotas se mueven a la misma velocidad, la capa por debajo de las mismas es la fase continua o suero, y la interfase entre ellas es definida. Del mismo modo, se genera un límite claro entre las gotas que creman y la capa crema superior. Cuando una emulsión es poli-dispersa, hay una separación difusa entre las gotas y el suero, y este límite es difícil de

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

monitorear visualmente, aunque las gotas aún se mueven a velocidad constante dependiendo de su tamaño. En el caso más simple, en una emulsión bi-dispersa, las gotas grandes creman más rápido que las pequeñas y dos límites se forman en la parte inferior de la emulsión los cuales se desplazan hacia arriba a dos velocidades. Las velocidades a las cuales estos límites suben, a dos fracciones en volumen, son suficientes para definir completamente la distribución de tamaño acumulativa de una emulsión bi-dispersa. Las emulsiones poli-dispersas son tratadas como una extensión de una emulsión bi-dispersa, sin embargo, este análisis sólo es aplicable en emulsiones muy diluidas, donde la ley de Stokes es válida. Por otro lado, en esta clase de emulsiones la fase crema puede alcanzar un grado de empaquetamiento mayor que en las emulsiones mono-dispersas. En las emulsiones concentradas las gotas interfieren unas con otras, se producen colisiones entre las mismas, y el efecto del contra flujo de la fase continua se vuelve significativo. La mayoría de los sistemas concentrados también presentan separaciones y la presencia de las mismas introduce el efecto de borde conduciendo al contra flujo de la fase continua a llenar espacios dejados por las gotas.

En el caso de gotas pequeñas hay además un efecto de difusión significativo. Una difusión en gradiente, la cual ocurre a lo largo de los gradientes de concentración de gotas inducidos por el cremado, produce un flujo de partículas opuesto a la dirección del mismo, siendo este efecto menos simple de predecir y generando interferencias. En los sistemas concentrados las gotas pueden además sufrir un movimiento cooperativo y desplazarse en la corriente

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

de otras gotas. Sumado a todos estos efectos, si la temperatura del sistema no es constante, corrientes de convección térmica actuarán complicando el proceso de cremado (Robins y Hibberd, 1998; Manoj y col., 1998; Robins, 2000a; Santiago y col., 2002).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos para las emulsiones con WPC preparadas en el UT, surge la siguiente discusión: cuando se evaluó la fase continua, la viscosidad de la misma fue esencialmente Newtoniana para el rango de concentraciones estudiado y presentó ligeros cambios con la concentración de proteína. Por lo tanto, la reducción en el tamaño de partícula en estas emulsiones sugiere que un ligero aumento en la viscosidad de la fase continua habría generado un incremento en la energía aplicada. Por otra parte, dada la elevada fracción en volumen de las emulsiones, la distribución de las gotas que está siendo modificada habría probablemente cambiado la tensión de corte ejercida por el fluido sobre cada una de las gotas. De este modo, la distribución de tamaños disminuyó probablemente como resultado de un efecto combinado de la viscosidad de la fase continua, la mayor disponibilidad de proteína y la elevada concentración de gotas.

Los resultados obtenidos con el SDS, la microscopía y la viscosidad permitieron concluir que en estas condiciones de homogeneización a baja potencia, a baja concentración de proteína (0,37 %), la emulsión estaría ligeramente floculada

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

probablemente por un mecanismo por puentes mientras que las emulsiones con una concentración mayor o igual a 0,73 % no estarían floculadas.

De acuerdo a Robins (2000a), el comportamiento de la velocidad de cremado observado corresponde a gotas de tamaño poli-disperso y no floculadas o que forman agregados muy pequeños los cuales se comportan como partículas individuales. En este tipo de emulsiones, un límite difuso separa la fase emulsión de la fase suero y este límite es difícil de monitorear visualmente, aunque dentro de la emulsión las gotas están moviéndose a velocidad constante, dependiendo de su tamaño. Cuando las gotas alcanzan la parte superior de la emulsión, estas forman una fase crema uniforme, la cual, en el caso de las emulsiones poli-dispersas, se puede reacomodar con una fracción de empaquetamiento mayor que en el caso de las mono-dispersas. Este último fenómeno no fue observado en las emulsiones estudiadas lo cual podría deberse a la elevada fracción en volumen de las mismas.

Cuando los datos obtenidos fueron aplicados a la ecuación de velocidad de cremado de Stokes, surgieron los siguientes resultados: dado que el tamaño de partícula disminuyó casi a la mitad entre la menor (0,37 %) y la mayor (2,93 %) concentración de proteína estudiada y la viscosidad de la fase continua tuvo poca contribución en la viscosidad de las emulsiones, la velocidad de cremado tendría que haber disminuido alrededor de seis veces, sin embargo, disminuyó aproximadamente siete veces. Las diferencias entre los datos experimentales y teóricos podrían ser debidos a la elevada fracción en volumen evaluada y las interacciones entre las gotas.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

4.1.2 Emulsiones con mezcla co-secada 8:1 WPC/ λ -carragenina

- *Tamaño de partícula*

En las Figuras 34 (a y b) se muestran ejemplos de las distribuciones de tamaño de gota (D(4,3)) para las emulsiones preparadas en el Ultra Turrax con 0,5 y 4,0 % (p/ p) ST de CS .

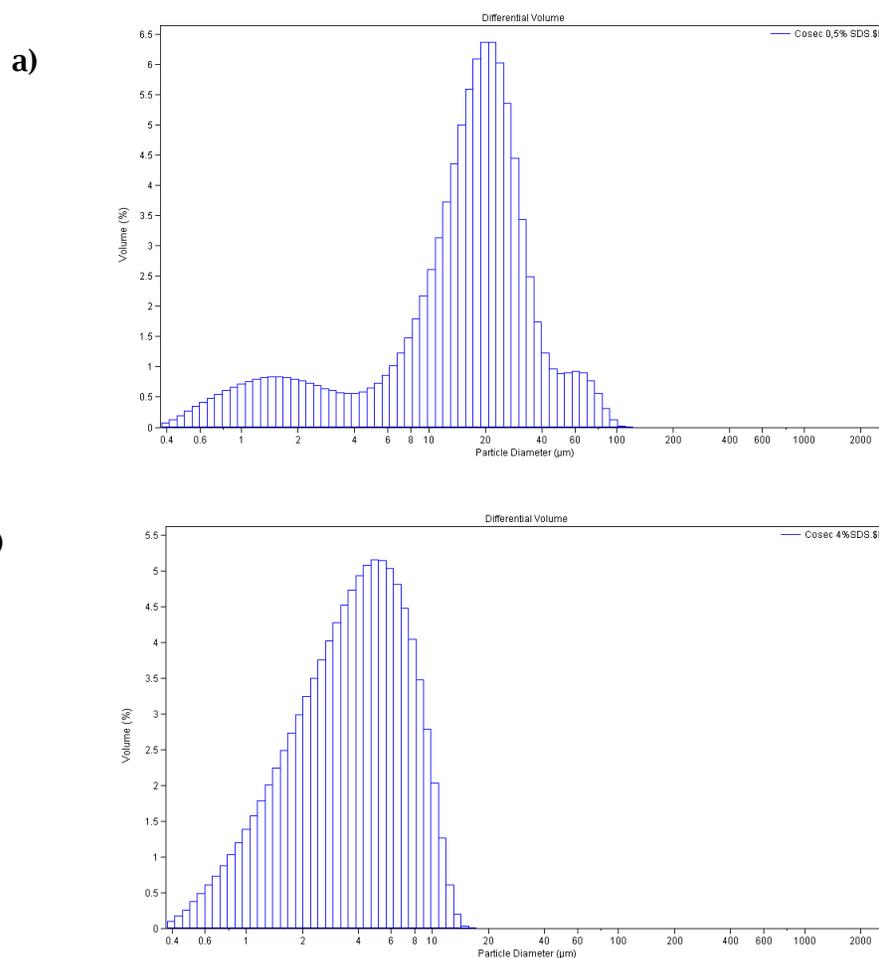


Figura 34: Distribuciones de tamaños de partícula de las emulsiones con CS preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,5 y (b) 4,0 % (p/ p) ST.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Las emulsiones presentaron una distribución prácticamente bi-modal a la menor concentración evaluada, con una población muy importante de una media de aproximadamente 20 μm y otra de menores proporciones de aproximadamente 1,5 μm . Con el incremento de la concentración de sólidos, las distribuciones tomaron características mono-modales.

En la Figura 35 se presenta el D (4,3) versus la concentración de sólidos de CS. Se puede apreciar que el incremento en la concentración produjo en las emulsiones una constante e importante disminución en el tamaño de partícula. Cabe destacar que, para el rango de concentraciones estudiadas, el tamaño de partícula disminuyó con la mayor concentración de CS a un cuarto del tamaño logrado con la menor concentración.

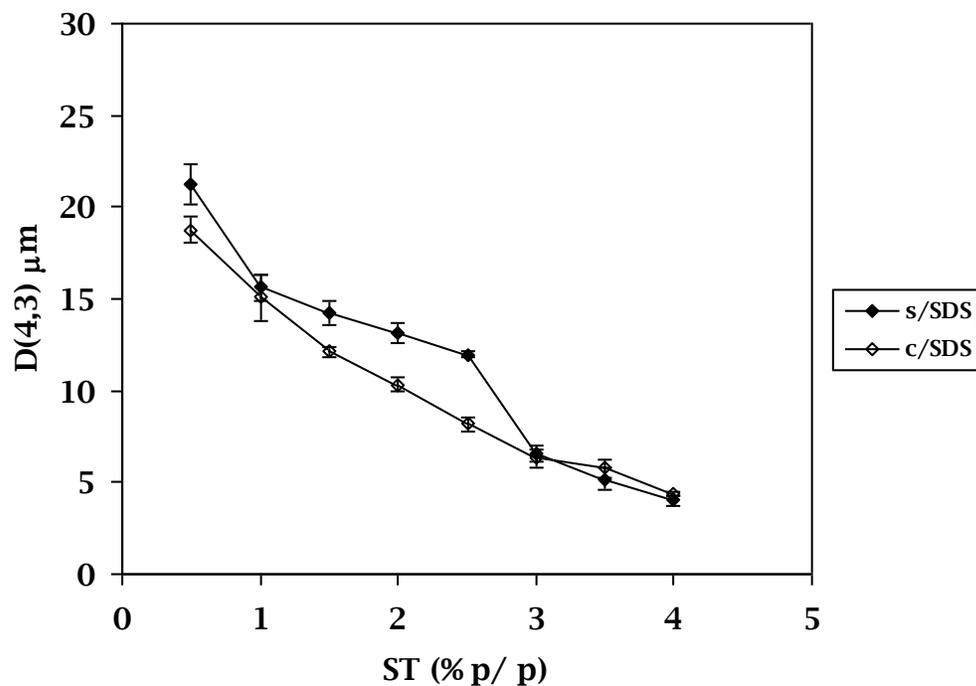


Figura 35: D (4,3) versus concentración de sólidos de las emulsiones con CS preparadas en el UT.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Con el agregado de SDS se observó que, en la mayoría de los casos, las emulsiones aparentemente no estaban floculadas o, en unos pocos (1,5; 2,0 y 2,5 %), ligeramente floculadas (Figura 35).

Al comparar estos resultados con los de las emulsiones sin el hidocoloide (Figura 36) se puede apreciar que para todas las concentraciones de proteína hubo una notable disminución del tamaño de partícula. Se puede observar, además, que el patrón en la reducción de las gotas es muy similar en ambos casos. Hubo inicialmente una notable reducción en el tamaño al incrementar la concentración de 0,37 a 0,76 % (p/ p) de proteína, luego una reducción más paulatina y, al incrementar la concentración de 1,83 a 2,20 % (p/ p) de proteína nuevamente se produjo una notable disminución en el tamaño de las gotas.

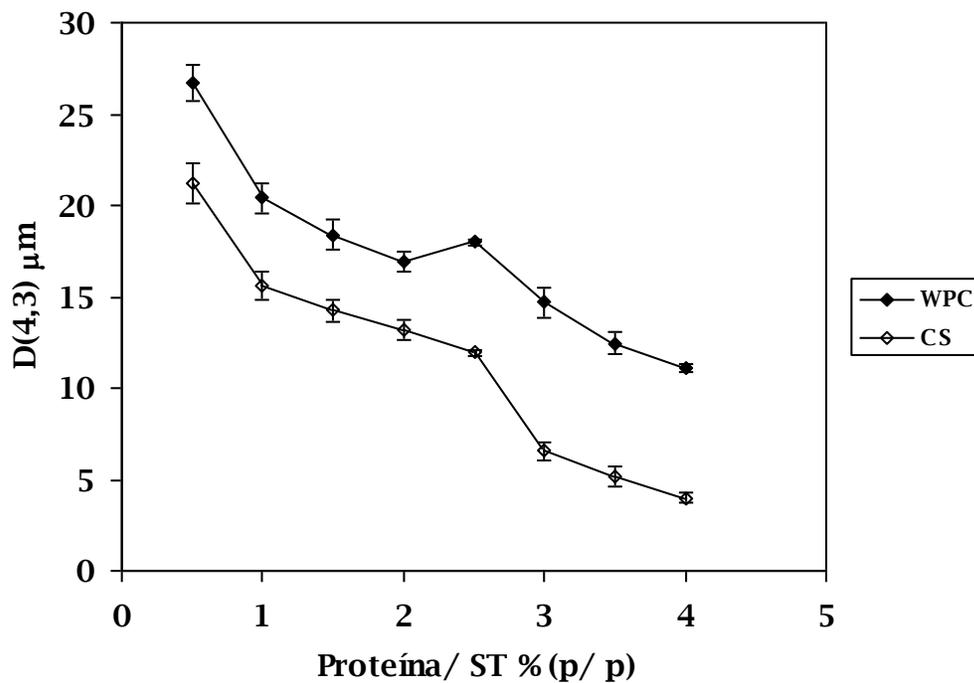
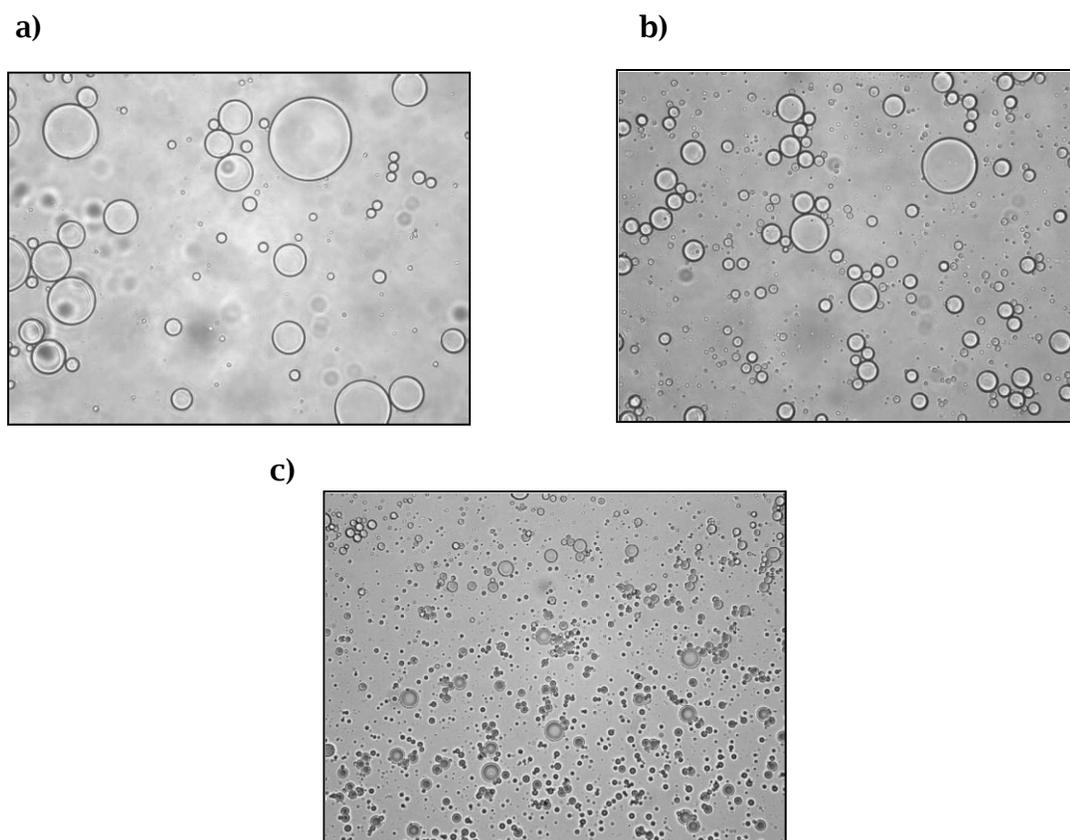


Figura 36: D (4,3) versus concentración de proteína de las emulsiones con WPC y CS preparadas en el UT.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

- Microscopía

En las Figuras 37 se presentan los resultados del estudio de microscopía realizado a emulsiones con CS preparadas en el Ultra Turrax.



Figuras 37: Micrografías de las emulsiones con CS preparadas en el UT de concentraciones (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST.

En las microfotografías de las emulsiones se puede apreciar que la presencia de la *lambda*-carragenina produjo un marcado cambio, tanto en el tamaño como en la distribución de tamaños de las gotas, con relación a las emulsiones sin el

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

hidrocoloide. En las emulsiones con las concentraciones de CS más bajas, las distribuciones de partículas son prácticamente bi-modales hasta una concentración de 3,0 % (p/ p) ST donde la distribución se torna más homogénea. El agregado de *lambda*-carragenina produjo una disminución del tamaño de las gotas en general, siendo este efecto más importante en las partículas de mayor tamaño observadas en las emulsiones sin polímero. A partir de una concentración de 2,5 % (p/ p) ST se incrementaron notablemente las partículas de menor tamaño y, desde 3,0 % (p/ p) ST las gotas más grandes prácticamente desaparecieron. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos al medir el tamaño de partícula de estas emulsiones.

- Viscosidad

En la Figura 38 se presentan los resultados de las mediciones de tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones con CS preparadas con el Ultra Turrax. Además, en la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos correspondientes a la viscosidad (η) y a los parámetros de la ley de potencia: índice de consistencia (K) e índice de fluidez (n), para estas emulsiones.

El comportamiento de las emulsiones hasta una concentración de 1,0 % (p/ p) de sólidos fue prácticamente Newtoniano, incrementándose la viscosidad con la concentración de CS. A partir de una concentración de 1,5 % (p/ p) ST, el comportamiento se tornó pseudo-plástico, presentando además, a partir de 2,5 % (p/ p) ST, una ligera histéresis que se incrementó con la concentración. Como

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

era de esperar, el índice de consistencia aumentó y el índice de fluidez disminuyó con el incremento de la concentración de sólidos. Si se comparan estos resultados con aquellos de las emulsiones preparadas con WPC, se puede apreciar que los valores de los parámetros se incrementaron notablemente y surgieron comportamientos que previamente no fueron observados a igual concentración proteica.

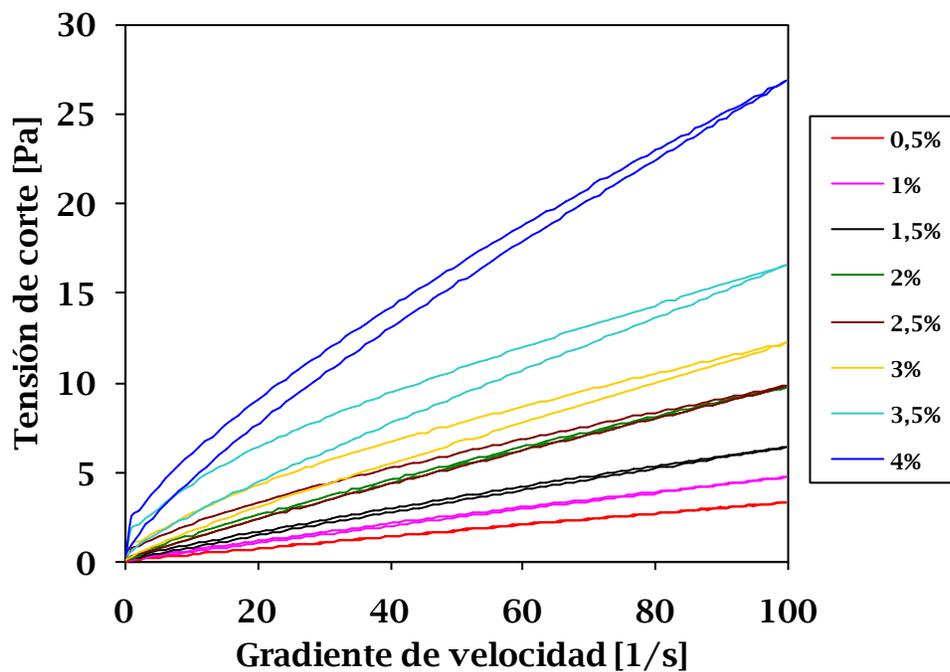


Figura 38: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones con 0,5 a 4,0 % (p/ p) ST de CS preparadas en el UT.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Tabla 7: Valores de η (modelo de Newton) y de los parámetros K y n (modelo de ley de potencia), de las emulsiones con CS preparadas en el UT.

% (p/ p) ST	η (Pa.s)	R^2
0,5	0,0319	0,9996
1,0	0,0465	0,9990

% (p/ p) ST	K(Pa.s ⁿ)	n	R^2
1,5	0,1406	0,8306	0,9999
4,0	1,2420	0,6623	0,9992

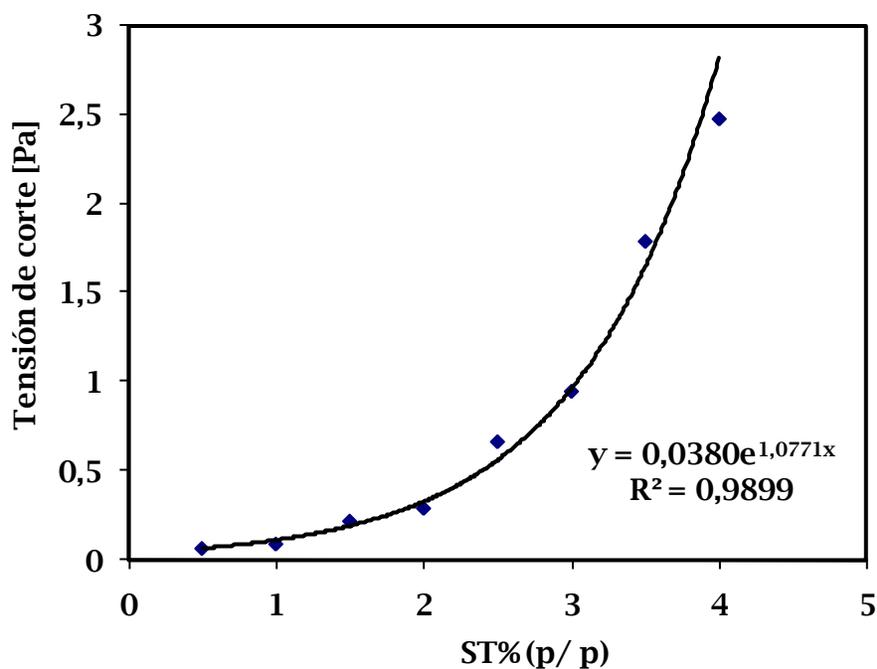


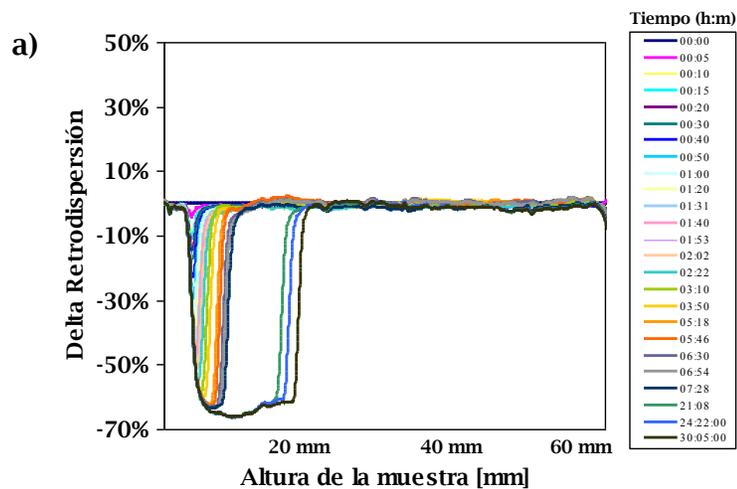
Figura 39: Tensión de corte a bajo gradiente versus concentración de sólidos de CS para las emulsiones preparadas en el UT.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Al graficar la tensión de corte a bajo gradiente (0,1 1/s) versus la concentración de CS (Figura 39) se encontró una relación exponencial entre las mismas ($R^2 = 0,9899$). Esta relación podría estar coincidiendo con un cambio en el régimen de concentración del CS en la fase continua (Figura 20).

- Estabilidad (Quickscan)

En la Figura 40 se muestran ejemplos de los resultados de la caracterización óptica realizada a emulsiones preparadas en el UT con 0,5; 2,0 y 4,0 % (p/ p) ST de CS.



CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

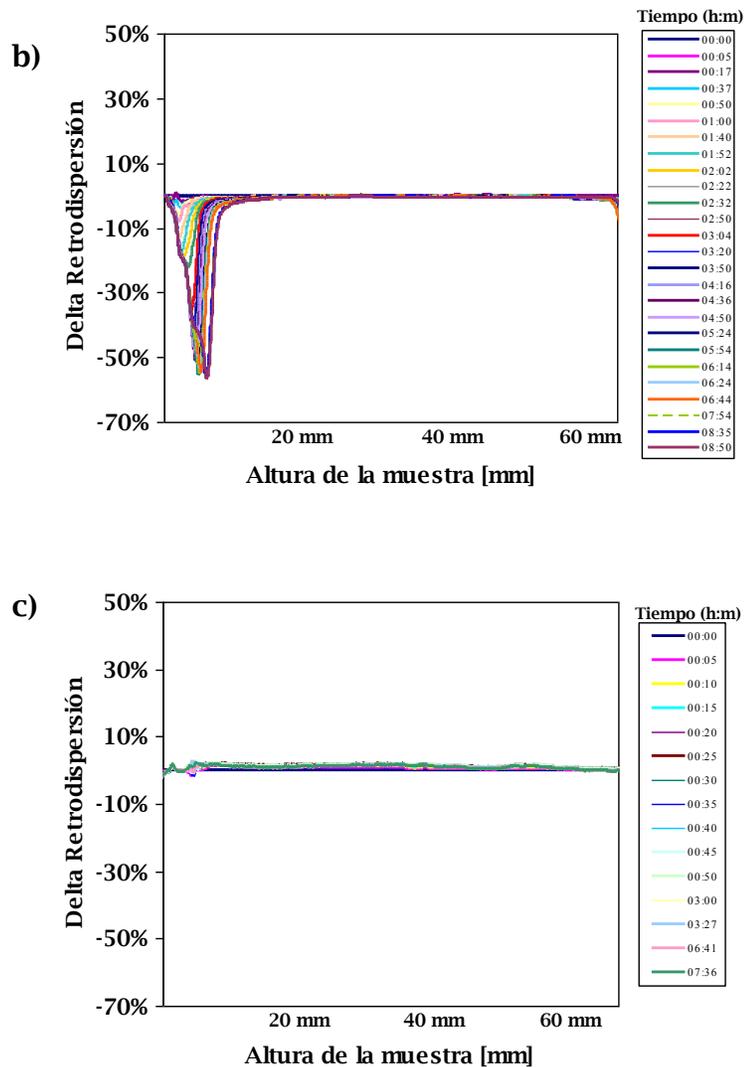


Figura 40: Deltas de retro-dispersión a distintos tiempos de las emulsiones preparadas en el UT con CS de concentraciones: (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST.

En esta clase de emulsiones el proceso de cremado presentó visualmente una separación más nítida entre las fases crema y suero que en las emulsiones sin polímero. Hecho que se corroboraría al mostrar registros de ΔBS más agudos y de mayores porcentajes. A partir de una concentración de 1,5 % (p/ p) ST la

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

separación entre las fases disminuyó notablemente y, desde 3,0 % (p/ p) ST no se registró el fenómeno de cremado durante el tiempo de observación.

En el Figura 41 se muestra la cinética de cremado de estas emulsiones. En este caso no se discriminaron tan claramente dos etapas de cremado como en las emulsiones con WPC solo. Con el incremento de la concentración de la mezcla disminuyó la velocidad de cremado en todos los casos y, se pudo observar que, a partir de una concentración de 1,0 % (p/ p) ST, la emulsión presentó una pequeña etapa de retardo (20 minutos) la cual se prolongó al aumentar la concentración, siendo las emulsiones desde 3,0 % (p/ p) ST estables durante el tiempo de observación.

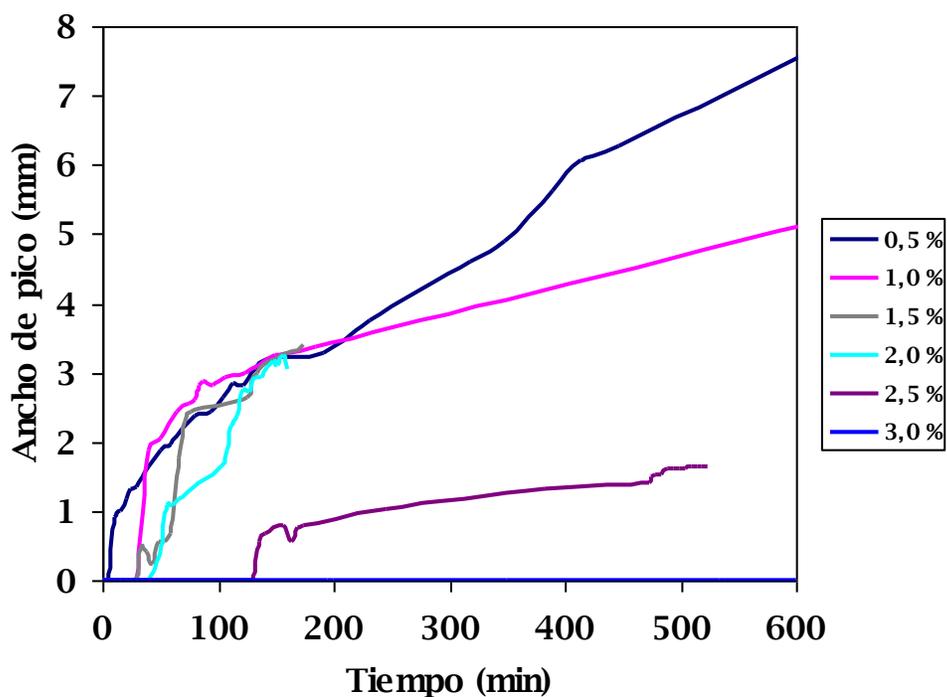


Figura 41: Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el UT con CS.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos a partir las emulsiones preparadas con el CS en el UT se arribó al siguiente análisis. El agregado de la *lambda*-carragenina, al incrementar la viscosidad de la fase continua, estaría contribuyendo a disminuir el tamaño de las gotas. Como se discutió previamente, en el flujo estrictamente turbulento, la viscosidad de las fases no tiene ningún efecto sobre el tamaño de las gotas en el proceso de emulsificación. Sin embargo, estudios realizados en diferentes equipos han mostrados que cuando la viscosidad se incrementa, la media disminuye. Esto implica un mecanismo de disrupción de las gotas que depende tanto de fuerzas inerciales como viscosas. Una mayor viscosidad disminuye el número de Reynolds (Ec. N° 14), lo que conduce a una turbulencia menos isotrópica, y así, a una mayor variedad de velocidades en los remolinos. De acuerdo a Walstra (1983), si la viscosidad se incrementa por la adición de un polímero hidrofílico, el resultado puede ser bastante diferente, al menos cuando la concentración de polímero no es demasiado baja y cuando la relación entre la longitud de elongación de la molécula polimérica, L_{pol} , y el tamaño del remolino, l_0 , esta por arriba de cierto valor. En un homogeneizador, el D (3,2) se incrementa considerablemente y la desviación estándar de la distribución disminuye cuando la viscosidad aumenta. La explicación es que, presuntamente, el polímero disminuye la turbulencia, es decir, elimina los remolinos más pequeños del espectro; esto causaría tanto un incremento en el tamaño promedio como una disminución en

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

el ancho de la distribución. Si la relación $L_{pol}/l_0 < 0,5$, el efecto del polímero es similar al de cualquier otra sustancia que incrementa la viscosidad.

Otro factor a tener en cuenta al analizar la reducción del tamaño de las gotas en las emulsiones estudiadas, es la elevada concentración de las mismas por unidad de volumen. Este hecho podría haber contribuido a incrementar la tensión de corte ejercida por el fluido sobre cada gota y así, a una mayor reducción en su tamaño.

Al analizar el comportamiento frente al SDS, se encontró que, a diferencia de las emulsiones preparadas sólo con el WPC, donde a la menor concentración de proteína evaluada se observó floculación, en este caso no se apreció dicho fenómeno. Este comportamiento podría deberse a la presencia del hidrocoloide en la fase acuosa. Baeza y col. (2005), estudiando las interacciones de los polisacáridos con la beta-lactoglobulina en los films adsorbidos en la interfase aire-agua, encontraron que la *lambda*-carragenina tiene un efecto sinérgico con la beta-lactoglobulina dado que la misma incrementa la cantidad de proteína en la interfase. De acuerdo Baeza y col (2005), este comportamiento podría deberse a la existencia de una limitada compatibilidad termodinámica entre la proteína y el polisacárido en la fase acuosa. Perez y col. (2007) habrían demostrado la existencia de interacciones de tipo electrostáticas atractivas con la formación de complejos entre ambos biopolímeros en la fase acuosa lo cual afectó el comportamiento interfacial de la proteína de suero lácteo. Coincidentemente con los estudios de Perez y col. (2007), a través de la caracterización de la fase continua realizada en este trabajo, también se arribó

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

a la conclusión de la presencia de interacciones electrostáticas atractivas entre el WPC y la *lambda*-carragenina. Este fenómeno también estaría contribuyendo a lograr una mayor reducción en el tamaño de las gotas dado que habría una mayor concentración de proteína en la interfase y por lo tanto disminuiría de la tensión interfacial. Considerando que el aporte de energía ΔE es proporcional al área interfacial creada ΔA y siendo la constante de proporcionalidad, la tensión interfacial (γ); al disminuir esta última, siendo el aporte de energía constante, el área interfacial creada debería ser mayor por lo que el radio de las gotas debería disminuir.

El comportamiento reológico observado en estas emulsiones se debería a varias causas. Por un lado, dado que la fracción en volumen de aceite no se modificó y disminuyó el tamaño de partícula, hubo un incremento en la concentración de gotas por unidad de volumen. De acuerdo a Chanamai & McClements (2000a), cuando estudiaron la dependencia del cremado y de la reología de emulsiones aceite-en-agua mono-dispersas con el tamaño de gota y la concentración, la fracción en volumen efectiva de las gotas es aproximadamente $(1 + \delta_x / r)^3$ veces mayor que su fracción en volumen teórica, donde δ_x es el espesor de la capa que rodea las gotas donde ellas no pueden entrar en contacto y r es el radio de la gota. En sistemas estabilizados electrostáticamente, esta distancia está relacionada a la distancia de Debye. La fracción en volumen efectiva de las gotas más pequeñas debe, por lo tanto, ser mayor que aquella de las gotas más grandes, ya que el factor $(1 + \delta_x / r)^3$ se incrementa con la reducción del radio de la gota, lo cual da cuenta de una mayor viscosidad. Además, la repulsión

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

electrostática juega un importante papel en determinar la reología de emulsiones concentradas. Las gotas eléctricamente cargadas no son capaces de aproximarse entre sí tanto como las gotas no cargadas, y consecuentemente no son capaces de ocupar los espacios vacíos que ocurren en la proximidad de las gotas vecinas. A bajos gradientes de velocidad, las gotas no son capaces de aproximarse unas a otras debido a la repulsión electrostática y por lo tanto, su fracción efectiva en volumen es mayor que la real. Así, la concentración de gotas requerida para lograr un mayor grado de empaquetamiento en la emulsión es menor. Este efecto es menos significativo a altos gradientes de velocidad debido a que las tensiones son lo suficientemente grandes para superar la repulsión electrostática entre las gotas y empujarlas entre sí.

Por otro lado, el comportamiento pseudo-plástico y la histéresis se asocian usualmente a la presencia de estructuras que son total o parcialmente rotas con el incremento del gradiente de velocidad. En el caso de las emulsiones, estos fenómenos se relacionan con estructuras débilmente floculadas que se van rompiendo generando el comportamiento pseudo-plástico (Tadros, 2004).

Dado que las emulsiones con 0,5 y 1,0 % (p/ p) ST de CS presentaron comportamiento Newtoniano y ante el agregado de SDS no mostraron floculación, es probable que no lo estén o sólo ligeramente, debido a la presencia de la *lambda*-carragenina la cual estaría empujando la proteína hacia la interfase (Baeza y col., 2005). Las emulsiones con 1,5; 2,0 y 2,5 % (p/ p) ST de mezcla presentaron una ligera floculación ante el agregado del SDS, un comportamiento pseudo-plástico y una ligera histéresis en la emulsión con 2,5

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

% (p/ p) ST. Por lo tanto, estas emulsiones estarían probablemente floculadas por un mecanismo de floculación por puentes sumado a un mecanismo de floculación por depleción por el agregado del biopolímero. En las emulsiones con 3,0; 3,5 y 4,0 % (p/ p) ST de CS no se observó floculación con el agregado del SDS pero mostraron un marcado comportamiento pseudo-plástico e histéresis. Este último comportamiento coincide con la notable reducción en el tamaño de las gotas al incrementar la concentración de 2,5 a 3,0 % (p/ p) ST. Estas emulsiones estarían probablemente floculadas por un mecanismo de depleción. Como se mostró previamente, las emulsiones estabilizadas con polímeros hidrofílicos de elevado peso molecular tal como la *lambda*-carragenina, conllevan el riesgo de la floculación por un efecto de depleción. Dicho efecto no podría haber sido observado con el agregado del SDS dado que los flóculos formados por este mecanismo se romperían por la simple dilución de la muestra.

En el capítulo anterior, al evaluar la fase continua de las emulsiones, se encontró que las dispersiones de CS presentaron comportamiento Newtoniano hasta una concentración de 3,0 % (p/ p) ST y luego el mismo fue pseudo-plástico sin mostrar histéresis. Dado que la *lambda*-carragenina posee una molécula de un tamaño considerablemente mayor que las proteínas del WPC, un factor a tener en cuenta al analizar la viscosidad de estas emulsiones es el efecto de concentración que sufre la fase continua al incorporar la fase aceite. Este efecto podría estar modificando el comportamiento reológico de la fase acuosa, correspondiendo al de una dispersión de mayor concentración de

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

sólidos, lo cual también estaría contribuyendo al incremento en la viscosidad de la emulsión.

La mayor estabilidad frente al cremado observada en las emulsiones con *lambda*-carragenina se estaría produciendo, probablemente, debido a la disminución en el tamaño de partícula y al incremento en la viscosidad de la fase continua, variables que, analizando la ecuación de Stokes, disminuyen la velocidad de cremado. De acuerdo a los estudios realizados por Robins (2000a), estos resultados concuerdan con aquel de una emulsión de alta fracción en volumen, con una distribución de partículas poli-dispersas y que contienen un polímero en su fase continua. Estas emulsiones pueden presentar inicialmente una fase de retardo debido a la formación de una estructura en red, también llamada gel particulado, generada por la floculación de las gotas por la presencia del polímero. Luego los agregados creman de acuerdo a su tamaño presentando una cinética similar a la de las emulsiones con WPC solo.

En esta clase de emulsiones el límite inferior de separación con el suero es generalmente nítido, claramente visible, dejando por debajo un suero transparente. Su desplazamiento hacia arriba puede tener tres etapas: inicialmente, puede no haber un movimiento visible (fase de retardo) pero luego la estructura sube hasta que alcanza la fase crema. Con el paso del tiempo la crema se va compactando hasta volverse una capa uniforme y su fracción en volumen se va incrementando hasta alcanzar ϕ_m (fracción máxima). Existe un caso especial de emulsión en el cual se forma una estructura de gotas unidas unas a otras que se sostiene a si misma y que se va compactando como

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

una crema. En este tipo de emulsiones puede también haber un período de retardo antes que la compactación comience. Dado que prevenir el cremado es usualmente imposible, la mayoría de las formulaciones se encuentran en este período de retardo el cual se puede diseñar para que dure días, meses o años (Robins y Hibberd, 1998; Manoj y col., 1998; Robins, 2000a; Santiago y col., 2002).

La etapa de compactación mencionada no se apreció en las emulsiones estudiadas lo cual podría deberse a la elevada fracción de aceite de las mismas. Por otra parte, el tiempo de retardo prologado que se apreció partir de una concentración de 3,0 % (p/ p) de ST corroboraría el probable proceso de floculación por depleción propuesto para las emulsiones con las tres mayores concentraciones de CS.

4.2 Emulsiones en homogeneizador a válvula

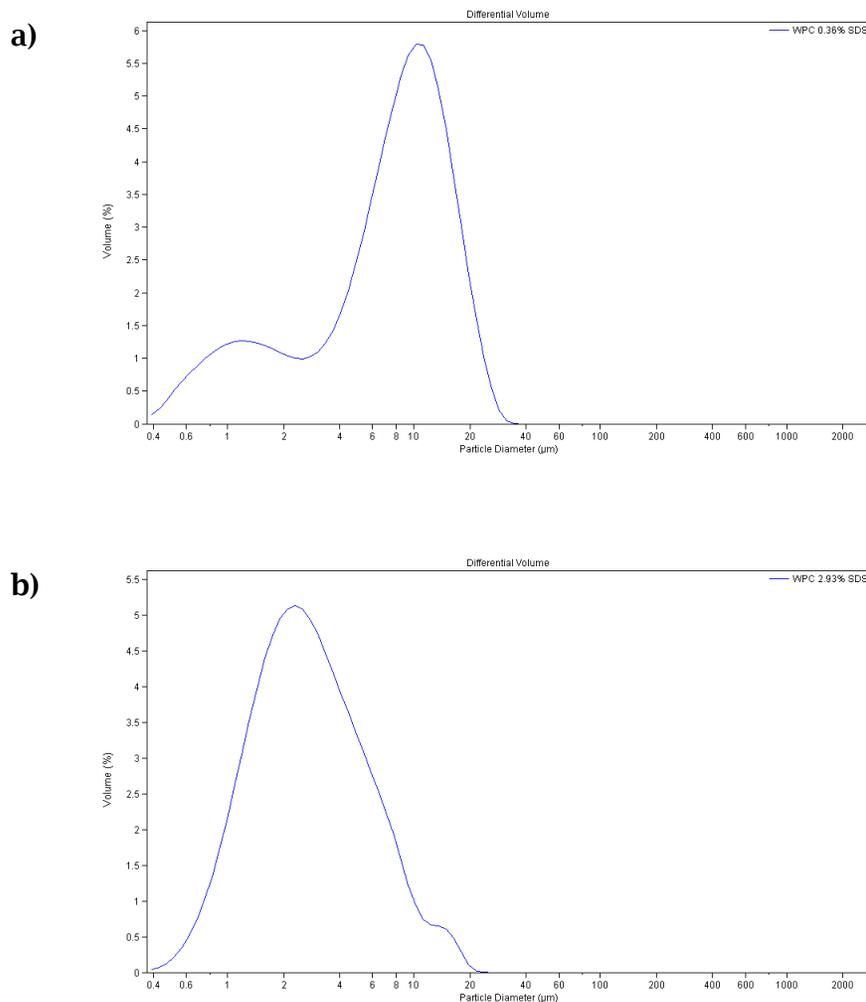
Efecto de la concentración y tipo de biopolímero en la fase continua

4.2.1 Emulsiones con WPC

- Tamaño de partícula

En las Figuras 42 se presentan ejemplos de las distribuciones de tamaños de partículas (D (4,3)) de las emulsiones con WPC preparadas en homogeneizador a válvula para 0,37 y 2,93 % (p/ p) de proteína.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES



Figuras 42: Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37 y (b) 2,93 % (p/ p) de proteína.

En la Figura 43 se muestra el D (4,3) versus la concentración de proteína de WPC, con y sin SDS. En esta última gráfica se puede apreciar que, al igual que en las emulsiones preparadas en el UT, el incremento de la concentración proteína produjo una disminución de la media en volumen.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

A diferencia de las emulsiones preparadas en el UT en las cuales el D (4,3) disminuyó constantemente con la concentración de proteína, en las emulsiones preparadas con el HV, el D (4,3) disminuyó hasta una concentración de 0,73 % (p/ p) y luego la media se mantuvo prácticamente constante, siendo estos valores significativamente menores ($p < 0,05$) que aquellos obtenidos con el UT. A concentraciones de proteína por arriba de 0,73 % (p/ p), la capacidad emulsificante se mantuvo constante y las distribuciones de tamaño fueron prácticamente mono-modales.

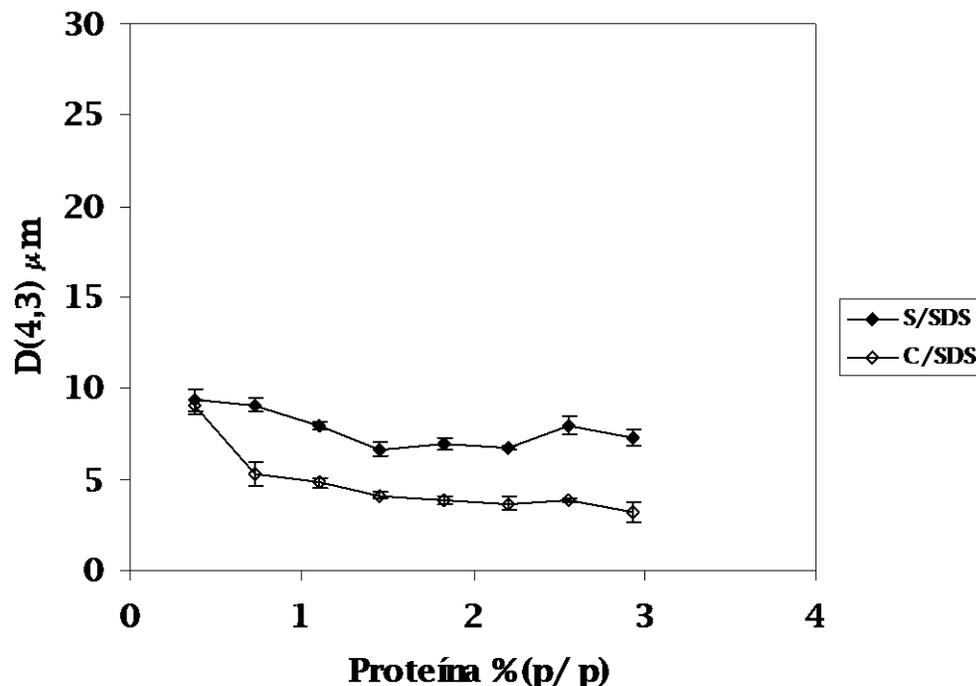


Figura 43: D (4,3) versus concentración de proteína de WPC con y sin SDS de las emulsiones preparadas en el HV.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Al observar las distribuciones de tamaño de partícula se puede apreciar que a concentraciones de proteína por debajo de 0,73 % (p/ p) existen dos poblaciones de partículas las cuales, con el incremento de la concentración, se van juntando hasta formar una sola población.

Si se observan las emulsiones diluidas con SDS se puede apreciar que su agregado no produjo ningún efecto en la emulsión con la menor concentración de proteína (0,37 %), ni en la distribución de tamaños ni en el D (4,3), mientras que, en las otras concentraciones, se observó una disminución del D (4,3).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en las emulsiones preparadas con el UT (Figura 44), se puede apreciar que disminuyó significativamente la media con relación al área ocupada por las gotas ($p < 0,05$).

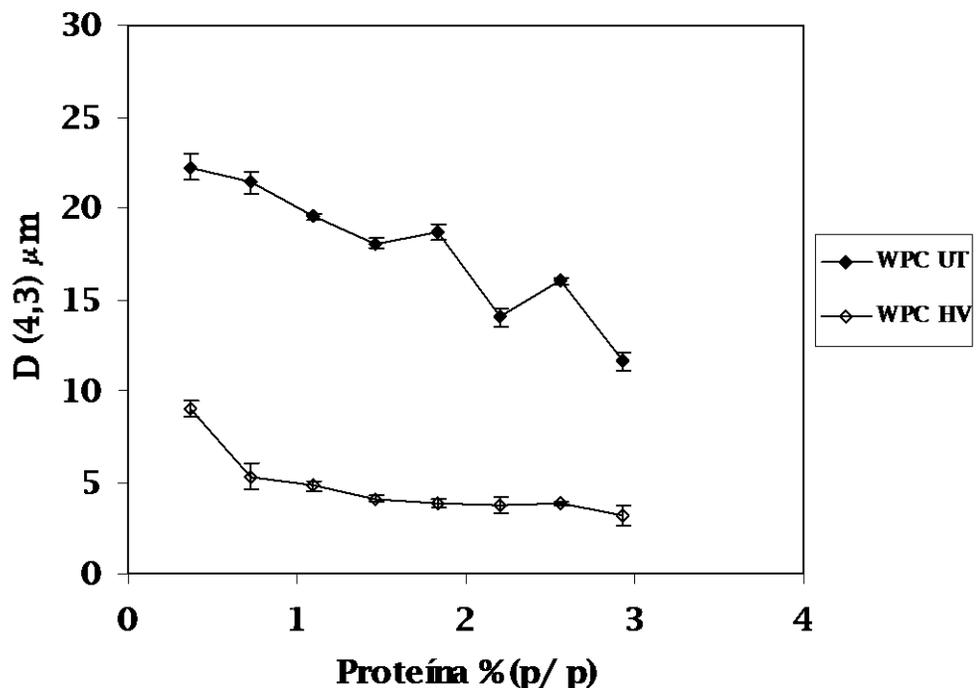
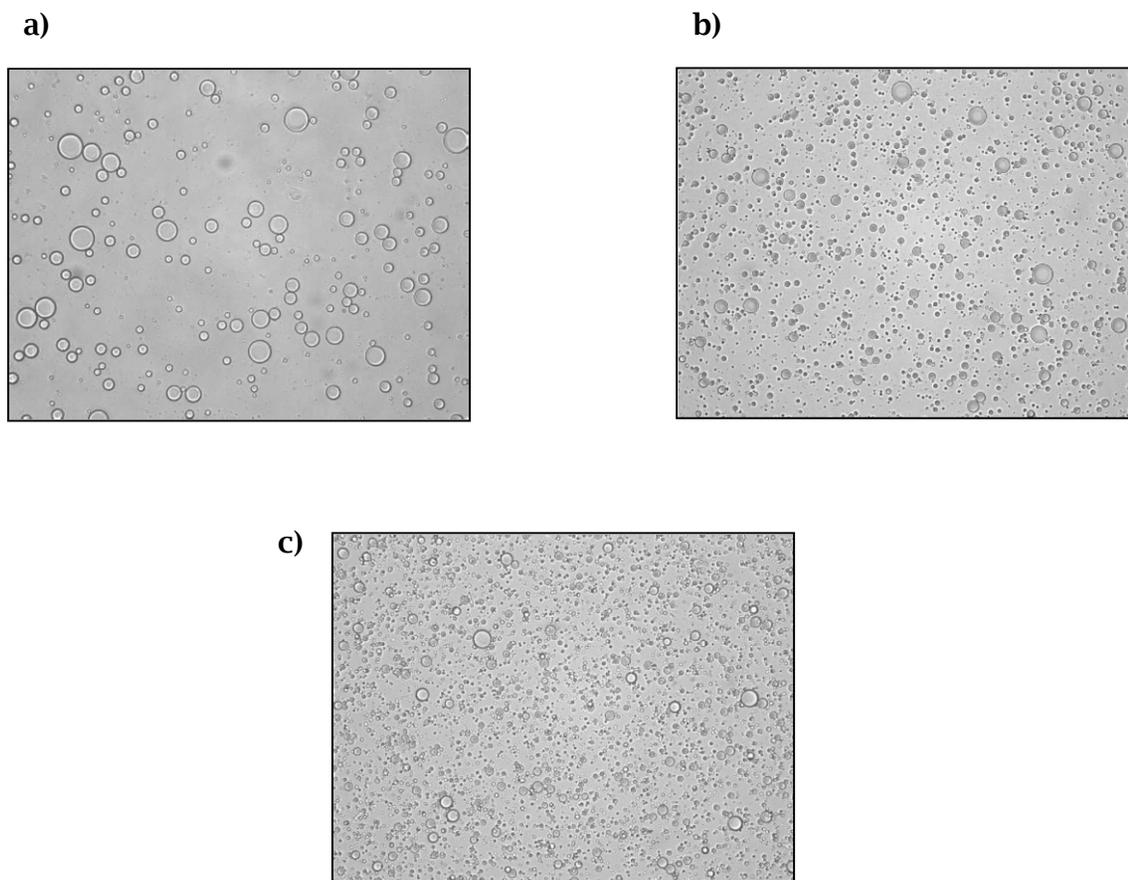


Figura 44: D (4,3) versus concentración de proteína de las emulsiones preparadas con el WPC en el UT y en el HV.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

- Microscopía

En las Figuras 45 (a, b y c) se presentan ejemplos de las microfotografías tomadas a las emulsiones con WPC preparadas en el HV. En las mismas se puede corroborar lo observado en las distribuciones de tamaño de partícula.



Figuras 45: Micrografías de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína.

Se puede apreciar que, por un lado, hay una clara disminución del tamaño de gota para todas las emulsiones con respecto a las preparadas con el UT. Por

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

otra parte, el incremento en la concentración de proteína de WPC produjo una notable disminución de las gotas de mayor tamaño observadas en las tres menores concentraciones y un incremento de las gotas más pequeñas y de tamaño intermedio.

- Viscosidad

El comportamiento reológico asociado a las emulsiones preparadas con diferentes concentraciones de proteína de WPC utilizando el HV se presentan en la Figura 46.

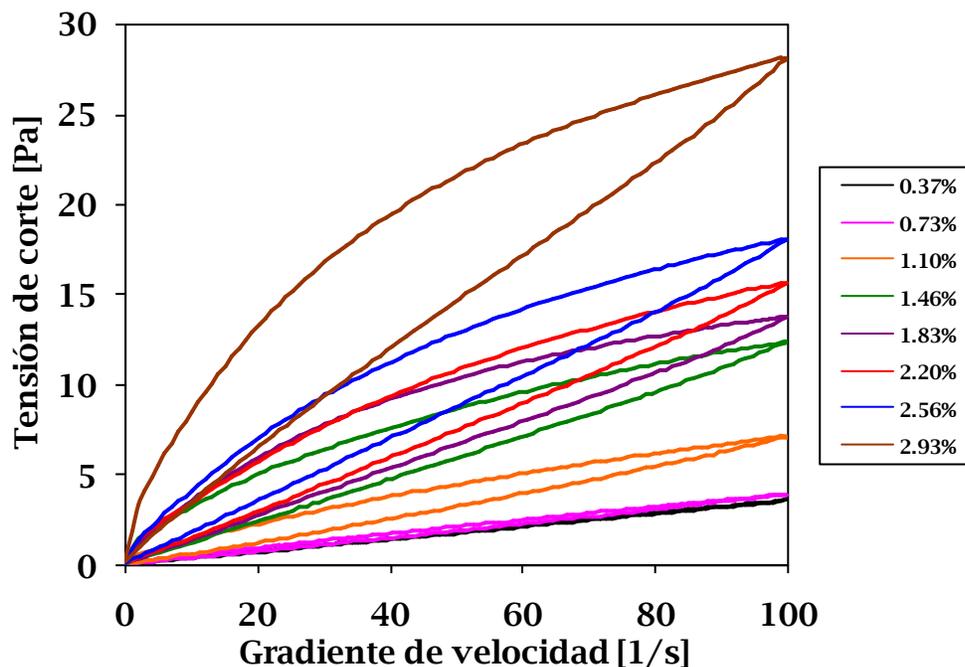


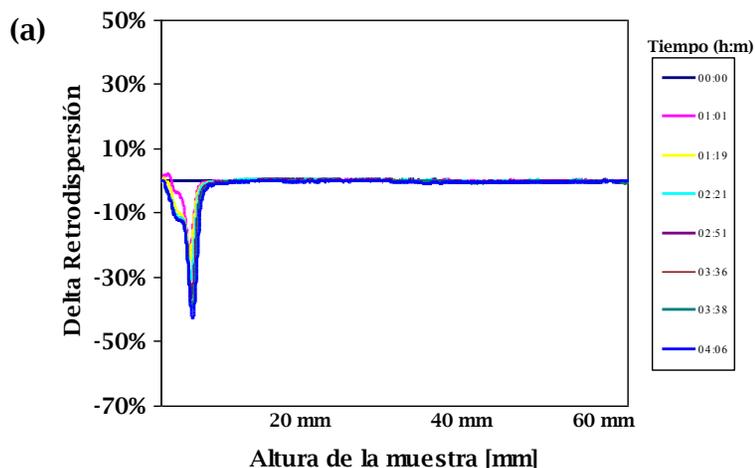
Figura 46: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas en el HV con WPC.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Bajo estas condiciones, la tensión de corte (o la viscosidad) fue notablemente mayor que la de las emulsiones preparadas en el UT. Se puede observar que el comportamiento de las mismas fue prácticamente Newtoniano para la menor concentración evaluada (0,37 %) y, a partir de una concentración de 0,73 % (p/ p), las emulsiones fueron pseudo-plásticas y presentaron histéresis desde 1,10 % (p/ p). El incremento de la concentración de proteína produjo un aumento de la viscosidad aparente a bajos gradientes y, además, un incremento de la pseudo-plasticidad y de la histéresis.

- Estabilidad (Quickscan)

Ejemplos de las mediciones de estabilidad de las emulsiones con 0,37; 1,83 y 2,93 % (p/ p) de proteína de WPC preparadas con el HV se presentan en las Figuras 47 (a, b y c).



CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

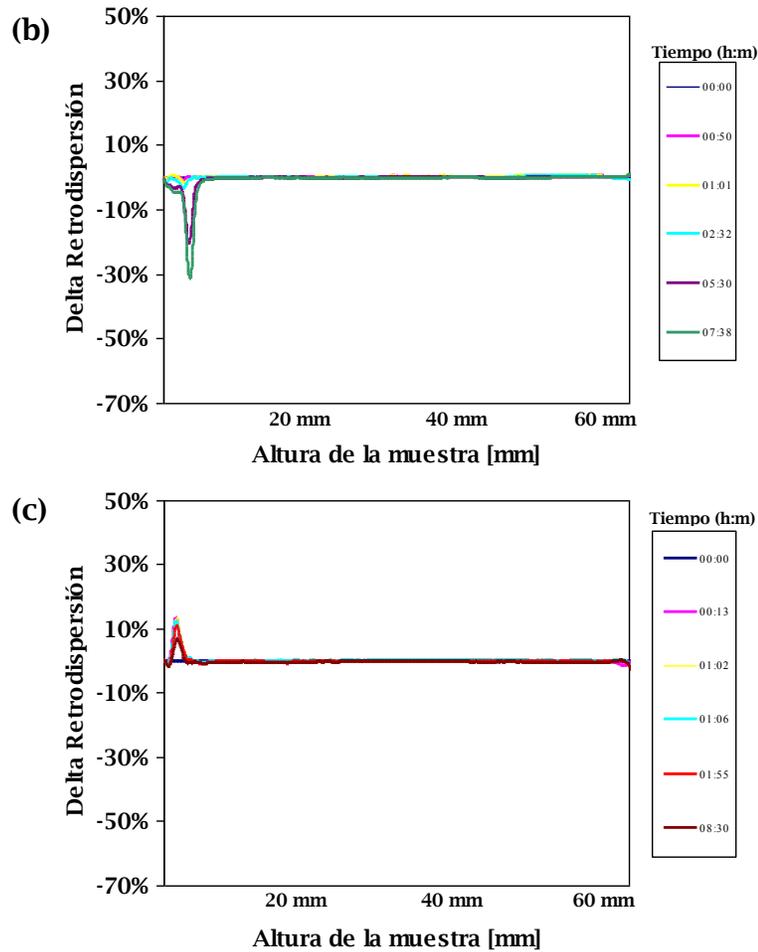


Figura 47: Deltas de retro-dispersión a distintos tiempos de las emulsiones preparadas en el HV con WPC de concentraciones (a) 0,37; (b) 1,83 y (c) 2,93 % (p/ p) de proteína.

Estas emulsiones presentaron, en todas las concentraciones evaluadas, una mayor estabilidad frente al cremado que aquellas preparadas con el UT. Este fenómeno se puede apreciar en el hecho que la altura del tubo donde se presenta el límite entre la fase crema y el suero, a igual tiempo, es menor en este caso.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Por su parte, el aumento de la concentración de proteína de WPC produjo también un incremento en la estabilidad frente al cremado siendo, prácticamente estables durante el tiempo de observación a partir de una concentración de 2,93 % (p/ p) de proteína.

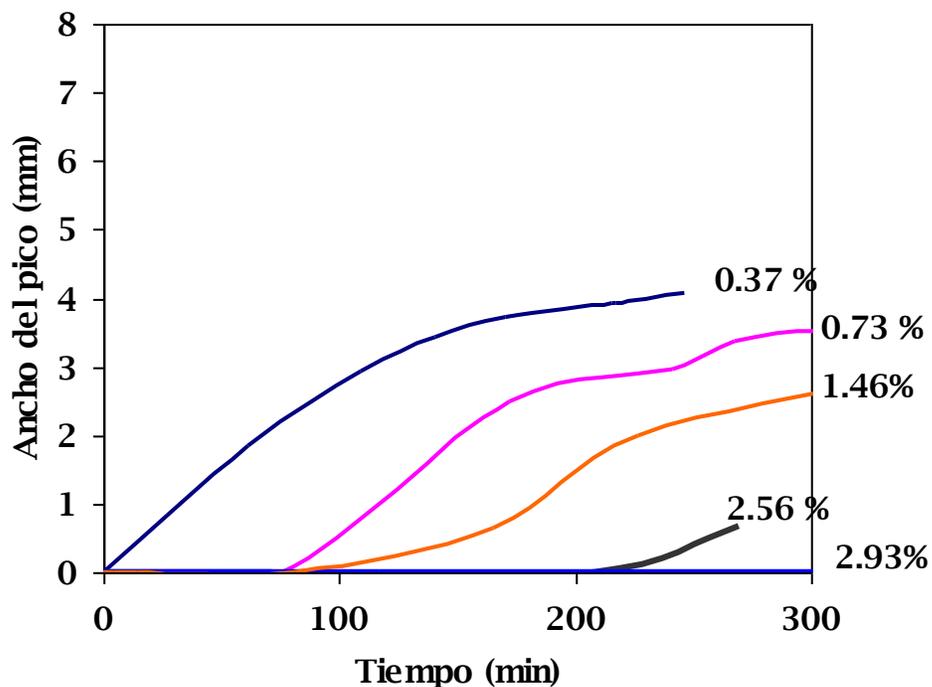


Figura 48: Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el HV y estabilizadas con WPC.

La evolución comparativa de las cinéticas de cremado de estas emulsiones se presenta en la Figura 48. Se puede observar que, una baja concentración de proteína (0,37%) generó un proceso de cremado cuya velocidad inicial y de la segunda fase fueron más bajas que aquella de la misma emulsión preparada

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

con el UT. Estos resultados son consistentes con la naturaleza bi-modal de las distribuciones de tamaño de esta emulsión y el menor tamaño de las gotas observado en las emulsiones preparadas en el HV. Cuando la concentración de proteína de WPC se incrementó a 0,73 %, se pudo apreciar la aparición de un tiempo de retardo, cuya duración se incrementó con la concentración, siendo la emulsión con 2,93 % de proteína totalmente estable durante 300 minutos. Cuando se graficó el tiempo de retardo versus la concentración de proteína de WPC (Figura 49) se encontró una correlación lineal entre ambos ($R^2 = 0,9797$).

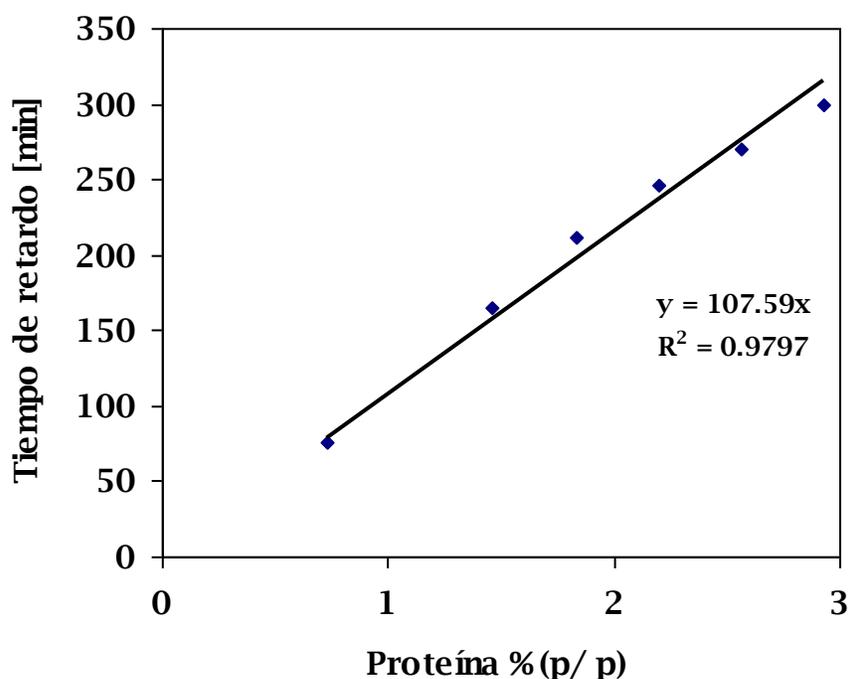


Figura 49: Tiempo de retardo versus concentración de proteína de WPC de las emulsiones preparadas con el HV.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las emulsiones preparadas con WPC en el HV estarían indicando que, bajo estas condiciones, el incremento de la concentración de proteína disminuyó el tamaño de las gotas y existió una concentración crítica de proteína en la fase acuosa (0,73 %) en la cual el D (4,3) fue mínimo y por lo tanto, la capacidad emulsificante fue máxima. De acuerdo a Flourey y col. (2002), cuando estudió el efecto de la homogeneización a alta presión sobre la estructura y las propiedades reológicas de emulsiones estabilizadas con proteínas de soja, y a los conceptos previamente analizados, para la formación de las gotas en un homogeneizador, la distribución de partículas es el resultado de un equilibrio entre las fuerzas disruptivas y viscosas. En el flujo turbulento, el diámetro de gota medio solo es función de la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas superficiales, caracterizada por el número de Weber. Pero para regímenes con flujo laminar y transicional, el diámetro de gota medio es también función de las fuerzas viscosas. Esto quiere decir que el efecto de los parámetros que caracterizan las fuerzas disruptivas, resultan de la influencia relativa de las fuerzas superficiales y viscosas. Por lo tanto, el efecto de la presión de homogeneización depende de condiciones operativas precisas, esto es, del número Reynolds y de las propiedades físicas del producto. Para homogeneizadores pequeños, como el usado en esta tesis, donde el ancho de la apertura puede ser del orden de los micro-metros, el número de Reynolds es bastante chico y el régimen sería laminar.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

En las concentraciones desde 0,73 %, la capacidad emulsificante fue constante y las distribuciones de tamaños fueron prácticamente mono-modales. A partir de esta concentración de proteína de WPC, el film interfacial alrededor de las gotas estaría saturado, como fue indicado por Carrera Sánchez & Rodríguez Patino (2005) estudiando las características interfaciales, espumantes y emulsificantes del caseinato de sodio. El exceso de proteína de WPC podría estar participando de la formación de multi-capas y/ o podría estar presente en la fase acuosa con repercusiones en la estabilidad de la emulsión. A concentraciones menores a 0,73 % de proteína, la emulsión presentó dos poblaciones de gotas y elevado D (4,3). Estos resultados sugerirían que el film interfacial probablemente no estaría saturado y que la emulsión con 0,37 % (p/p) de proteína podría presentar gotas floculadas. De acuerdo a Euston & Hirst (1999), la naturaleza bi-modal a bajas concentraciones proteicas es una característica de las distribuciones de tamaños del WPC que indican dos poblaciones separadas de gotas. Estos autores, citando a Rosenberg y Lee (1993), atribuyen esa característica a grupos de gotas unidas a través de la llamada floculación por puentes.

Del agregado de SDS a las emulsiones en estudio surgió que: i) a concentraciones, por debajo de 0,73 %, la emulsión no estaría floculada o ligeramente; ii) a partir de 0,73 % de proteína, las emulsiones preparadas en el HV estarían altamente floculadas, mientras que las emulsiones preparadas en el UT no estarían floculadas o lo estarían ligeramente.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

De las mediciones de viscosidad de las emulsiones surge que los resultados obtenidos se deberían principalmente a que el tamaño de partícula disminuyó notablemente, y dado que la fracción en volumen de aceite no se modificó, hubo un significativo incremento en la concentración de las gotas como resultado de la homogeneización a alta presión. Como se analizó previamente, la fracción efectiva en volumen de las gotas más chicas sería mayor que la de las más grandes, lo cual contribuiría a una mayor viscosidad. Además, en emulsiones concentradas como las que se están analizando, las interacciones electrostáticas jugarían un rol muy importante. Ya que las gotas eléctricamente cargadas no son capaces de aproximarse entre sí como lo pueden hacer las no cargadas, las primeras no pueden aprovechar los espacios vacíos que se producen en la proximidad de las gotas vecinas. A bajos gradientes, las gotas no se podrían acercar y su volumen efectivo sería mayor que el real. Así, la concentración de gotas requerida para lograr un empaquetamiento de las mismas sería menor. A altos gradientes, este efecto disminuye debido a que la tensión aplicada sería capaz de superar la repulsión entre las gotas y las obligaría a aproximarse (Chanamai y McClements, 2000a).

Por su parte, tanto la histéresis como la pseudoplasticidad observadas en estas emulsiones, son usualmente asociadas a la presencia de cualquier estructura que puede ser total o parcialmente rota con el incremento del gradiente de velocidad. De acuerdo a Tadros (2004), el comportamiento anterior puede ser explicado a partir de considerar la estructura del sistema. Si la emulsión está débilmente floculada, entonces, al aplicar una fuerza al sistema, esta estructura

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

floculada es rota y esta es la causa del comportamiento pseudo-plástico. Las emulsiones débilmente floculadas usualmente muestran histéresis y el cambio de la misma con el tiempo puede ser utilizado como un índice de la fuerza de la floculación.

La viscosidad de una emulsión se ve afectada, además, por la viscosidad de su fase continua pero, como se ha analizado previamente, el comportamiento de la misma fue esencialmente Newtoniano a las concentraciones de proteína de WPC estudiadas y presentó ligeros cambios con la concentración. Por lo tanto, no hubo una contribución significativa por parte de la viscosidad de la fase continua al comportamiento de estas emulsiones. Por otra parte, el incremento de la viscosidad aparente a bajo gradiente con la concentración proteica ha sugerido que el grado de la floculación fue dependiente de la concentración.

De la estabilidad de las emulsiones en estudio se observó una mayor estabilidad con relación a las mismas emulsiones pero preparadas en el UT. Esto último se debería a que las distribuciones de tamaños son más homogéneas y las gotas de menor tamaño en las emulsiones preparadas en el HV.

Dado el incremento en la estabilidad frente al cremado con el aumento de la concentración de proteína de WPC, sugerimos que este fenómeno estaría ocurriendo probablemente debido a que las emulsiones floculadas habrían formado una estructura en red la cual, inicialmente, estaría sostenida de manera inestable y se comportaría como una crema compacta; luego la estructura de gotas se separaría de la fase suero y subiría hasta alcanzar la fase

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

crema. De acuerdo a Robins (2000a), estas emulsiones podrían describirse como un gel de partículas. De acuerdo a Dickinson y col. (1996), aún a concentraciones de proteína por debajo a aquella necesaria para cubrir la superficie creada, existiría proteína no ligada presente en la fase acuosa. Con el incremento total de proteína, habría un constante aumento en la concentración de proteína no ligada que resultaría en el correspondiente incremento del grado de floculación de las gotas, desde la formación inicial de flóculos individuales hasta el desarrollo de una estructura en red de gotas más expandida. En emulsiones concentradas, el movimiento de las gotas o flóculos aislados para formar una capa crema característica estaría extremadamente restringido cuando la floculación es extensa. Esto sería debido a que las gotas en la fase crema están tan densamente organizadas que no podrían moverse en ningún sentido. Además, como se analizó previamente, la interacción electrostática jugaría un rol importante en determinar la velocidad de cremado en este tipo de emulsiones. Las gotas van incrementando su grado de empaquetamiento, lo que causaría que la emulsión se torne más rígida, a menores concentraciones en el caso de las gotas más chicas ya que su fracción efectiva en volumen es mayor (Dickinson, 2000).

Los resultados combinados obtenidos en la investigación de las emulsiones preparadas con el HV, los cuales serían consistentes con un proceso de floculación, podrían ser explicados analizando diferentes mecanismos. El comportamiento pseudo-plástico, la histéresis, el incremento en la viscosidad a bajos gradientes, la re-estabilización o la reducción en el cremado y la

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

dependencia en la concentración de proteína son evidencias típicas de un sistema emulsionado que sufre un proceso de floculación a través de un mecanismo de depleción. La bibliografía analizada ha sugerido que las soluciones de moléculas de proteínas de suero globulares no producen floculación por depleción, lo cual es atribuido a las formas más agregadas de proteína en estas muestras. Esto sería razonable ya que la floculación por depleción es usualmente asociada a macromoléculas que no se adsorben o agregados moleculares compactos (nano-partículas) tales como las micelas de surfactantes, es decir, partículas con características más homogéneas que los constituyentes del WPC. Se ha postulado que las nano-partículas caseínicas son excluidas del espacio intersticial y que causan floculación por depleción de una manera similar a las micelas de surfactantes (Berli y col., 2002, Radford y Dickinson, 2004). Blijdenstein y col. (2004) propusieron un mecanismo de floculación por depleción en emulsiones estabilizadas con β -lactoglobulina inducido por agregados proteicos fibrilares.

Dado que la floculación ha sido observada en las emulsiones con WPC preparadas en el HV pero no en aquellas preparadas en el UT, se consideró el efecto de la alta presión sobre la agregación proteica. Autores como Funtenberger y col. (1995), estudiando la agregación inducida por la alta presión de la β -lactoglobulina en buffer a pH 7, y Dickinson (1995), estudiando el efecto de la alta presión sobre la actividad emulsionante de un concentrado de proteína de suero, hallaron un cambio substancial tanto en el WPC como en la β -lactoglobulina a pH 7 cuando fueron sometidos a un procesamiento a

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

presiones mayores (200 MPa) y tiempos más largos (15 minutos) que los usados en este estudio. Además, el tratamiento a alta presión en emulsiones estabilizadas con WPC (sin tratamiento previo a alta presión) no tuvo efecto o muy poco sobre el tamaño de partícula, concluyendo así que durante la homogeneización, la proteína se desdobra en la interfase y el subsiguiente procesamiento no produce cambios conformacionales en la misma. Consecuentemente, la agregación proteica inducida por el homogeneizador a válvula utilizado en este estudio fue descartada.

El siguiente mecanismo a considerar fue la interacción electrostática. Como se mencionó previamente, este mecanismo juega un importante rol en las emulsiones concentradas. Ya que las proteínas están eléctricamente cargadas, fuerzas repulsivas de largo alcance surgen debido al solapamiento de la doble capa eléctrica que rodea a las gotas cubiertas de proteína. El comportamiento reológico de las emulsiones preparadas en el UT fue esencialmente Newtoniano y sería indicativo de la no interacción entre las partículas, sin embargo, hubo un notable cambio al comportamiento pseudo-plástico en las emulsiones preparadas en el HV lo que indicaría interacciones entre las partículas y una extensa floculación (Floury y col., 2002). Con el incremento de la concentración de WPC habría también un efecto neutralizante de las cargas, dado que al incorporar proteína también estoy incorporando iones, lo que resultaría en un aumento del grado de floculación de las gotas. Dado que la repulsión electrostática sería neutralizada, las fuerzas de van der Waals y de atracción hidrofóbicas podrían dominar entre los grupos laterales no polares de las

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

macromoléculas proteicas, y así, estas fuerzas podrían también contribuir hacia un mecanismo de floculación por puentes. De acuerdo a los resultados obtenidos, es decir, la dependencia de la floculación con la concentración proteica estaría indicando que una reducción en la repulsión electrostática entre las partículas podría estar involucrada en la floculación observada.

La repulsión electrostática estaría probablemente operando tanto en las emulsiones preparadas en el UT como en las preparadas en el HV, la cual habría sido neutralizada al incrementar la concentración WPC. La incapacidad del UT para reducir el tamaño de partícula lo suficiente, sería la principal razón del cremado de estas emulsiones, y el efecto del tamaño de las gotas superaría cualquier repulsión electrostática que podría estar presente.

Otro mecanismo que podría estar ocurriendo en la floculación de las emulsiones sería la floculación por puentes a través de puentes disulfuro formados entre diferentes macromoléculas de proteína ubicadas en la superficie de distintas gotas. Se sabe que las proteínas evaluadas en este trabajo forman multi-capas en las interfases que pueden unirse a una proteína de la fase continua creando un puente entre dos gotas. Los resultados obtenidos en las distribuciones de tamaños con y sin el agregado de SDS han conducido a la conclusión que este mecanismo podría estar involucrado. Si el mecanismo que generó la floculación fuera solamente una reducción en la repulsión electrostática, la dilución en la etapa de medición del tamaño de partícula habría desagregado las gotas y la floculación no habría sido observada. Sin embargo, si el mecanismo de floculación por puentes a través de

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

enlaces covalentes estuviese ocurriendo, el paso de dilución no habría roto los agregados hasta la adición de la solución de SDS. Este agente, mas surfactivo, desplaza competitivamente las macromoléculas proteicas más grandes entre las gotas, rompiendo así cualquier floculo (Floury y col., 2002). De acuerdo a Tornberg y col. (1990), la floculación por puentes puede conducir a la formación de una red extensa (o gel) de gotas con una alta viscosidad o coagulo, de una apariencia menos homogénea pero aun viscosa. Esta floculación sólo ocurre substancialmente en equipos de emulsificación de alta densidad de energía, tales como el homogeneizador a válvula y el sonificador. Esto va a depender del tiempo de formación de las gotas con relación al tiempo de adsorción de la proteína en la interfase, siendo el primero mucho más rápido en estos equipos. Por lo tanto, la adsorción de la proteína es el proceso determinante de la velocidad y así la floculación por puentes puede ocurrir. En equipos como el Ultra-Turrax o los molinos coloidales, la formación de la emulsión es mucho más lenta por lo que la floculación por puentes sería menos probable.

La floculación por puentes debido a una cantidad limitada de emulsificante probablemente no estaría ocurriendo ya que, desde una concentración de 0,73 % (p/ p) de proteína, el tamaño de las gotas se estabilizó y por lo tanto, habría suficiente cantidad de proteína para cubrir el área creada.

De este modo, se propone que la formación de la estructura que influyo en la estabilidad de las emulsiones preparadas en el HV a estas concentraciones de proteína, podría ser atribuida a un mecanismo de floculación por depleción que

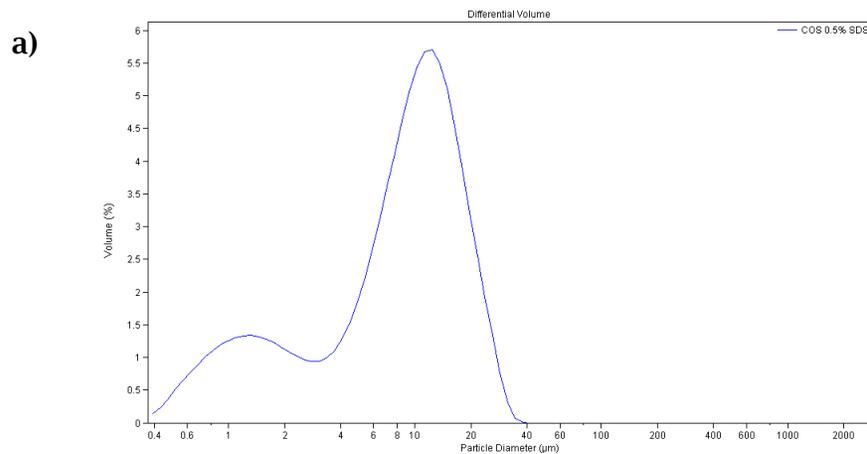
CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

estaría ocurriendo inicialmente, conducido por los agregados de elevado peso molecular observados en el WPC, seguido de una estabilización por puentes o multi-capas entre las proteínas, a medida que la emulsión envejece.

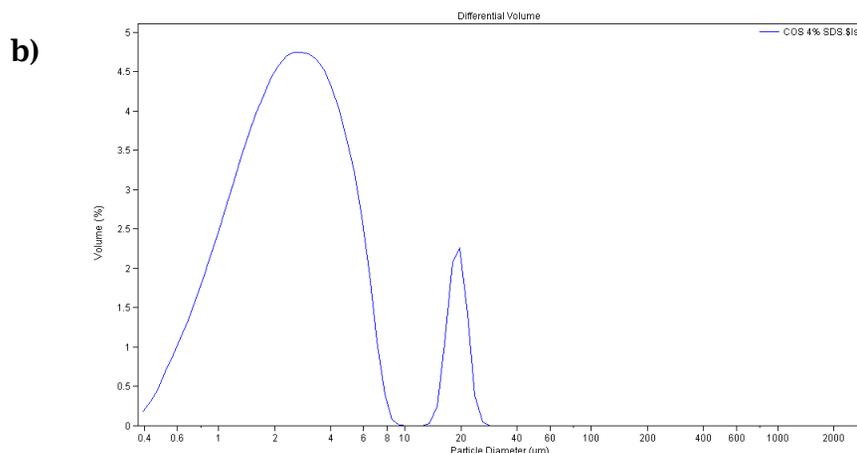
4.2.2 Emulsiones con mezcla co-secada

- *Tamaño de partícula*

En la Figura 50 se muestran ejemplos de las distribuciones de tamaño de partículas (D (4,3)) de las emulsiones con 0,5 y 4,0 % (p/ p) de ST de CS preparadas en el HV y en al Figura 51 se presenta la media en volumen (D (4,3)) versus la concentración de sólidos de CS.



CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES



Figuras 50: Distribuciones de tamaños de partículas de las emulsiones preparadas en el HV con CS de (a) 0,5 y (b) 4,0 % (p/ p) ST.

De observar las distribuciones de tamaño de partícula surge que existieron dos poblaciones en la emulsión con la menor concentración estudiada (0,5 % (p/ p) ST), cuyos tamaños se fueron acercando con el incremento en la concentración de sólidos de CS, lo cual sería debido a que las gotas de mayor tamaño observadas con 0,5 % (p/ p) ST disminuyeron su tamaño incrementándose el volumen ocupado por las gotas más pequeñas. Esta variación se puede ver reflejada al graficar el D (4,3) versus la concentración de sólidos del CS. Se puede apreciar que al incrementar la concentración de ST, disminuyó el D (4,3) y a partir de una concentración de 1,0 % (p/ p) ST el mismo se mantuvo prácticamente constante.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

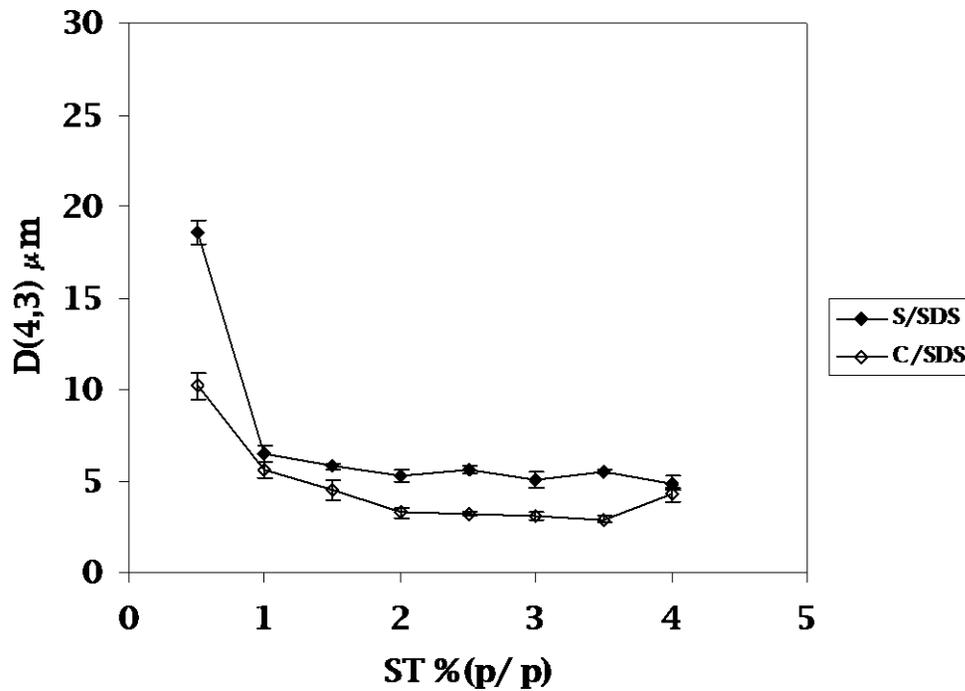


Figure 51: D (4,3) versus concentración de sólidos totales de CS con y sin SDS, de las emulsiones preparadas en el HV.

El agregado de SDS a las emulsiones con CS (Figura 51) produjo, para la menor concentración en estudio (0,5 %), una disminución del D (4,3) lo cual estaría indicando un notable grado de floculación. Para el resto de las concentraciones evaluadas, el agregado del SDS produjo un ligero corrimiento de las distribuciones de tamaño de partículas a valores más pequeños y en consecuencia una variación en la media en volumen, reflejando un menor grado de floculación de las gotas.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

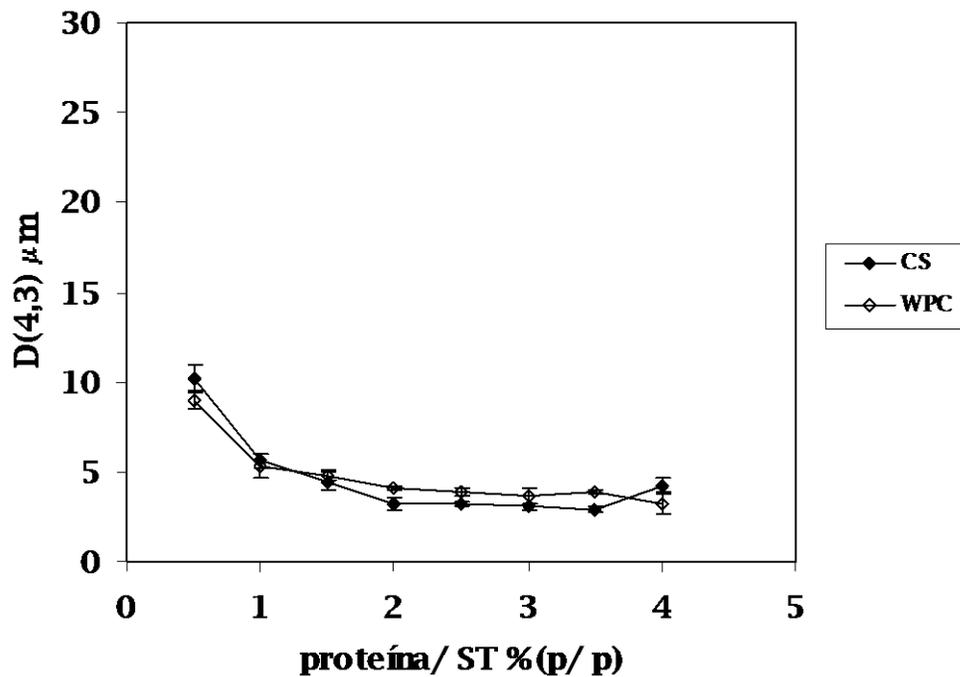


Figura 52: D (4,3) versus la concentración de proteína %/ ST % de las emulsiones preparadas con el WPC/ CS en el HV.

En la Figura 52 se puede apreciar que el D (4,3) de las emulsiones preparadas en el HV, con WPC y con CS, fue muy similar en ambos casos, demostrando este resultado la baja influencia de la viscosidad sobre la capacidad para reducir el tamaño de partícula en este equipo.

Por otro lado, de comparar estos resultados con los de las emulsiones con CS preparadas con Ultra-Turrax (Figura 53), surge que la media en volumen

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

disminuyó notablemente con el HV, excepto en la mayor concentración (4,0 %) donde los valores obtenidos fueron muy similares en ambas técnica.

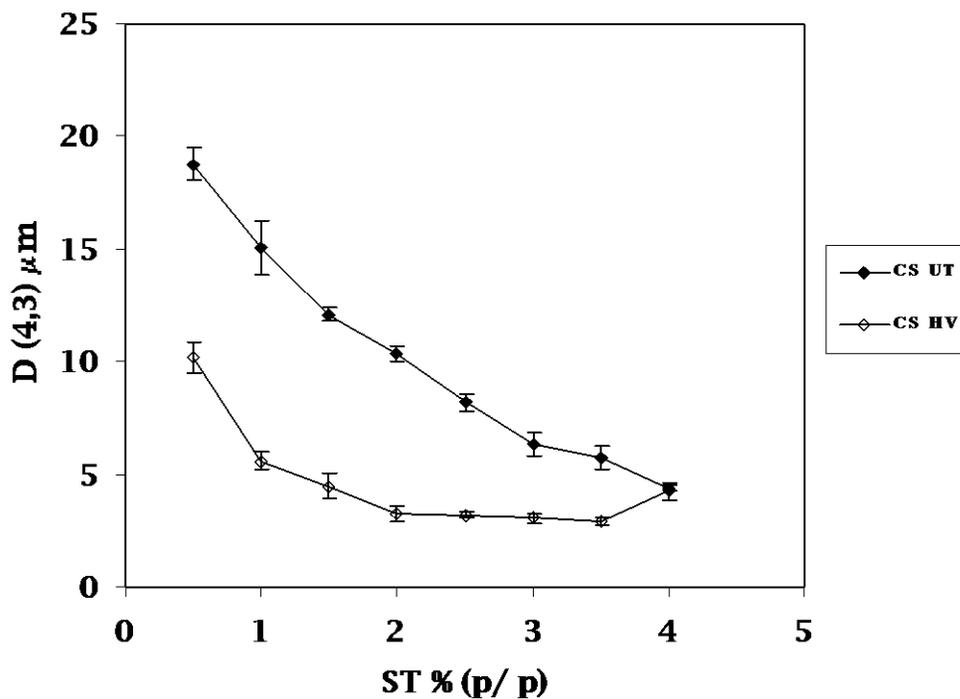


Figura 53: D (4,3) versus concentración de sólidos de las emulsiones preparadas con CS en el UT y en el HV.

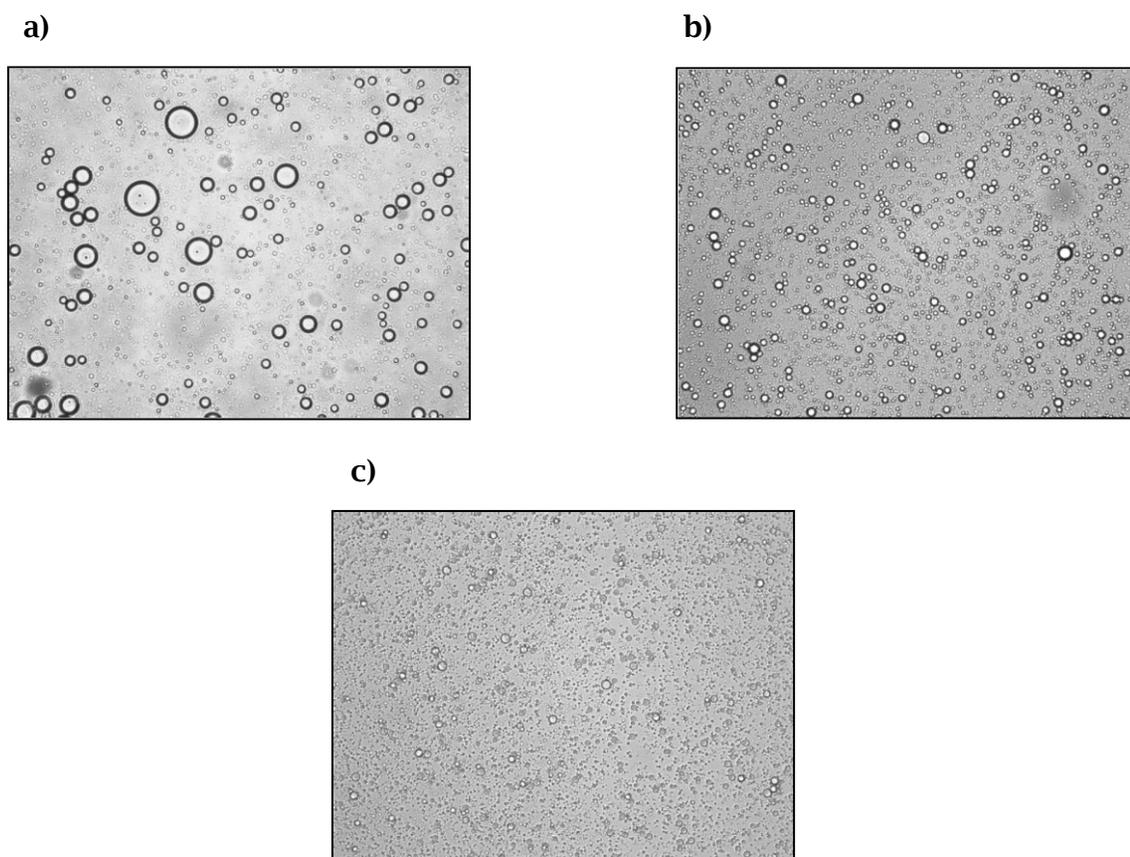
- Microscopía

En las Figuras 54 se presentan las microfotografías tomadas a las emulsiones con CS preparadas con el HV. Se puede apreciar en estas imágenes que, al igual que en las emulsiones preparadas con WPC por la misma metodología, hubo una clara disminución del tamaño de gota en la emulsión con relación a las preparadas en Ultra Turrax. Se observa además que, al incrementar la

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

concentración de CS, el tamaño de partícula disminuyó hasta que el mismo se estabilizó.

De comparar estas imágenes con aquellas de las emulsiones sin la *lambda*-carragenina surge que no hay una diferencia apreciable en el tamaño de las gotas debido a la presencia del biopolímero lo cual coincide con los resultados de las mediciones de tamaño de partícula.



Figuras 54: Micrografías de las emulsiones preparadas en el HV con CS de concentraciones (a) 0,5; (b) 2,5 y (c) 4,0 % (p/ p) ST.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

- Viscosidad

En la Figura 55 se muestra la tensión de corte versus el gradiente de velocidad para las emulsiones preparadas con el CS en el HV.

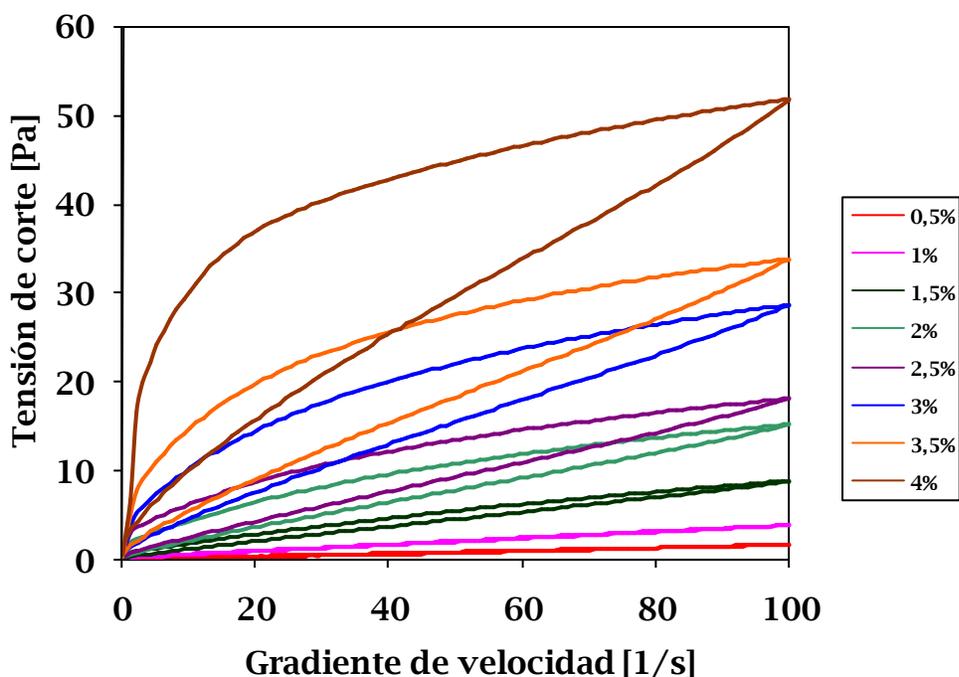


Figura 55: Tensión de corte versus gradiente de velocidad de las emulsiones preparadas en el HV con CS.

Se puede apreciar que la tensión de corte fue mayor que la de las emulsiones con WPC preparadas por la misma metodología y que, la de las emulsiones con CS preparadas en el UT. Con relación a ambas situaciones, los valores de tensión de corte prácticamente se duplicaron y también se incrementaron el comportamiento pseudo-plástico, siendo la emulsión de 0,5 % (p/ p) ST

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

prácticamente Newtoniana en todos los casos, y la histéresis, la cual se verificó desde 1,5 % (p/ p) ST en estas emulsiones.

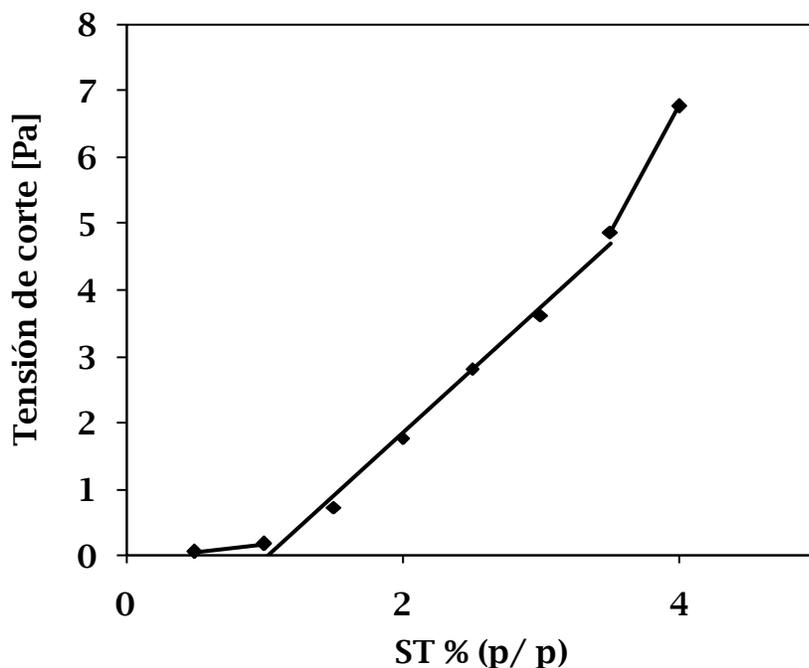


Figura 56: Tensión de corte versus concentración de sólidos totales de CS a bajo gradiente (0,1 1/s) para las emulsiones preparadas en el HV.

En la Figura 56 se muestra la relación entre la tensión de corte y la concentración de sólidos de CS a bajo gradiente (0,1 1/s). Se puede apreciar que existió una relación entre ambos en la cual, al aumentar la concentración de sólidos se incrementó la tensión, y existieron además, tres regímenes donde la relación entre la tensión a bajo gradiente y la concentración de CS cambió. Por

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

debajo de 1,0 % (p/ p) de ST, la relación entre ambos parámetros fué baja, entre 1,0 y 3,5 % (p/ p) de ST el incremento de la tensión a bajo gradiente con la concentración aumentó y, por arriba de 3,5 % (p/ p) de ST, la relación se incrementó aún más.

- Estabilidad (Quickscan)

En las Figuras 57 se muestran ejemplos de la caracterización óptica de las emulsiones preparadas en el HV con 0,5; 2,0 y 4,0 % (p/ p) ST de CS. Los perfiles de delta de retro-dispersión (Δ BS) medidos en función de la altura de la emulsión a distintos tiempos fueron evaluados a distintas concentraciones de sólidos de CS. Además, en la Figura 58 se presenta la cinética de cremado de estas emulsiones.

Se puede apreciar que los perfiles de Δ BS presentan un claro limite de separación entre la fase crema y el suero, y el incremento de la concentración de sólidos del CS produjo un aumento en la estabilidad frente a la separación de las fases dado que disminuyó la altura donde se presentó este límite. Al comparar iguales tiempos de desestabilización con las emulsiones con CS en UT, se observa que la separación entre las dos fases se presentó a menores alturas en las emulsiones preparadas en HV. A partir de una concentración de 2,5 % (p/ p) ST se dejó de observar el fenómeno de cremado en estas emulsiones, durante el tiempo de observación.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

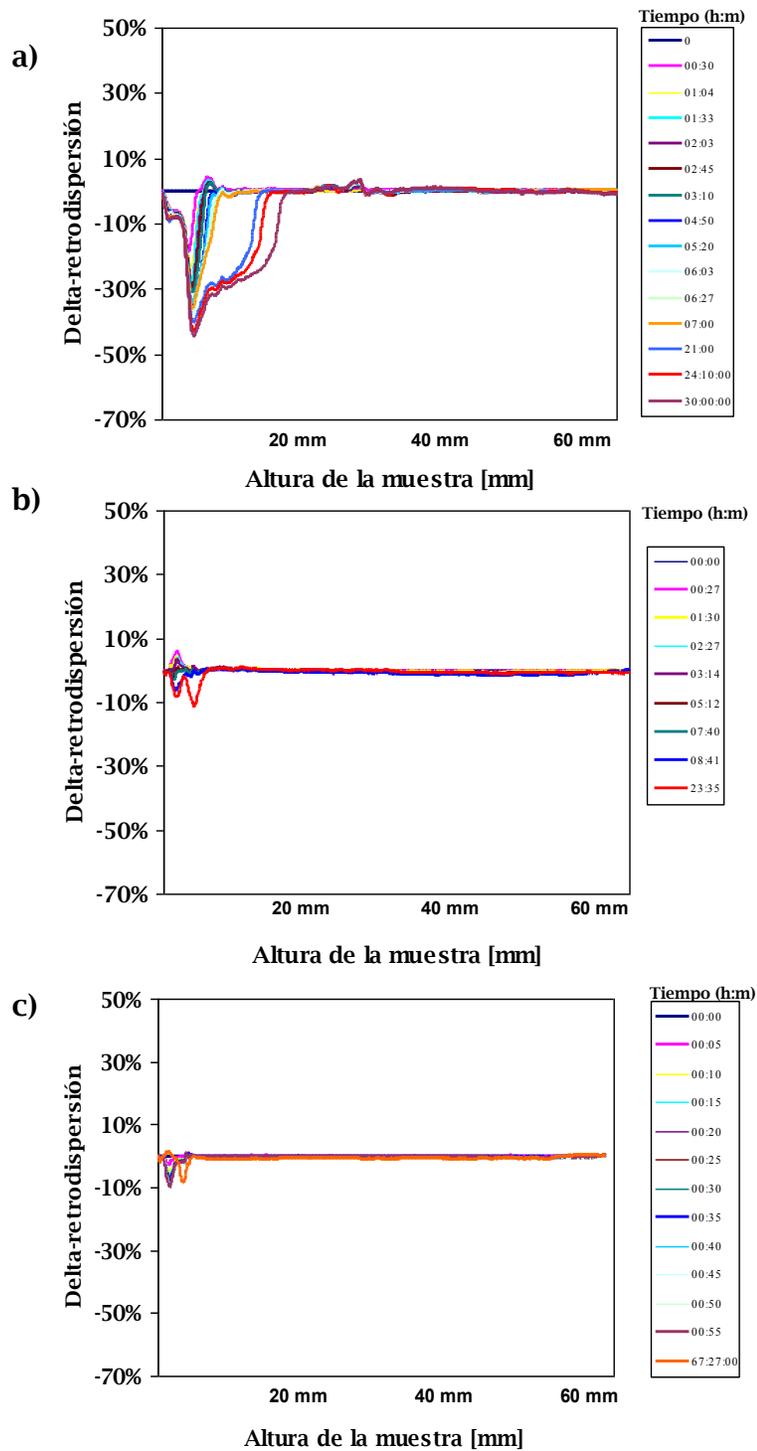


Figura 57: Delta de retro-dispersión versus la altura de la emulsión a distintos tiempos con (a) 0,5; (b) 2,0 y (c) 4,0 % (p/ p) ST de CS para las emulsiones preparadas en el HV.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

Al comparar las cinéticas de cremado se aprecia que, en todas las concentraciones, las pendientes de las curvas fueron menores que las de las emulsiones en UT, lo cual estaría indicando una menor velocidad de cremado. Además, en las emulsiones en HV se registró un tiempo de retardo (115 minutos) a partir de una concentración de 1,5 % (p/ p) de ST el cual, en las emulsiones en UT fue notablemente menor en esa concentración (29 minutos).

Si ahora se comparan estas emulsiones con aquellas preparadas por la misma metodología pero con WPC solo, se puede observar que, a una concentración de 0,5 % (p/ p) ST de CS, la cinética presentó dos etapas cuyas pendientes fueron mayores que las de la misma emulsión sin el polímero lo que estaría indicando una mayor velocidad de desestabilización de la emulsión. A una concentración de 1,0 % (p/ p) ST, la emulsión mostró una primera etapa de cremado muy rápida y luego un período donde prácticamente se estabilizó durante el tiempo de observación. Un comportamiento muy diferente presentó la misma emulsión con WPC solo al mostrar un corto tiempo de retardo y luego un cremado lento. Este resultado estaría indicando que la presencia de la *lambda*-carragenina a esta concentración produciría inicialmente una desestabilización más rápida de la emulsión pero luego contribuiría a estabilizar la misma.

En las emulsiones con CS en el HV, el período de retardo se registró a partir de una concentración de 1,5 % (p/ p) ST y el mismo se incrementó con la concentración de sólidos siendo la emulsión con 2,5 % (p/ p) ST prácticamente estable durante el tiempo de observación. Los tiempos de retardo de estas emulsiones, a pesar de registrarse desde una concentración de proteína mayor

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

(1,5 % ST o 1,10 % (p/ p) proteína) que la de las emulsiones con WPC en HV (0,73 % (p/ p) de proteína), muestran una mayor duración.

A diferencia del comportamiento de la emulsión con 1,0 % (p/ p) ST, en las emulsiones con 1,5 % y 2,0 % (p/ p) ST no se observó una etapa de re-estabilización durante el tiempo de observación.

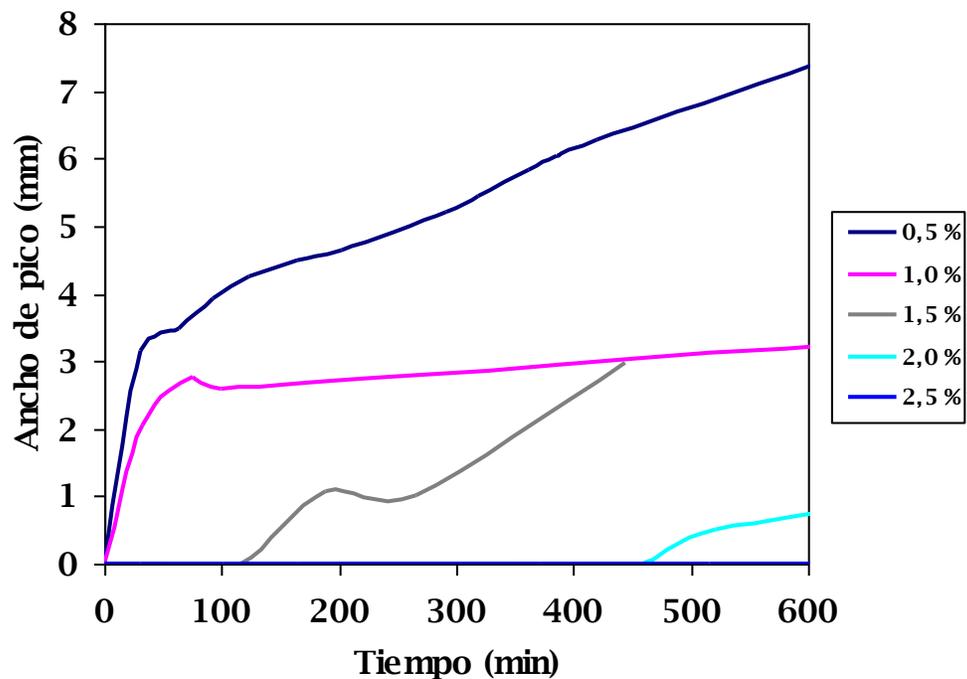


Figura 58: Cinética de cremado de las emulsiones preparadas en el HV a distintas concentraciones de CS.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al analizar los resultados obtenidos con el HV y compararlos con aquellos de las emulsiones con CS preparadas en el UT, surge que para todas las concentraciones, las emulsiones preparadas en el HV presentaron una mayor estabilidad. La notable reducción en el tamaño de partícula sería el principal disparador de diferentes mecanismos que estarían contribuyendo con el comportamiento presentado por estas emulsiones.

En primer lugar, la disminución del tamaño de partícula incrementó la concentración de gotas por unidad de volumen, y por ende, como se analizó previamente, dado que la fracción en volumen efectiva de las gotas más pequeñas sería mayor que la de las más grandes, aumentaría la viscosidad (Chanamai y McClements, 2000). En segundo lugar, a pesar que la viscosidad de la fase continua es la misma en ambas clases de emulsiones y Newtoniana hasta un 3,0 % (p/ p) ST, un efecto ha considerar es la concentración que sufre la fase continua al reducir el tamaño de partícula, lo cual podría estar modificando el comportamiento viscoso de la solución y así contribuyendo con la viscosidad global de la emulsión. En tercer lugar, el incremento del comportamiento pseudo-plástico y de la histéresis, estarían indicando la presencia de estructuras más fuertes que se rompen con el aumento del gradiente de velocidad (Tadros, 2004). En estas emulsiones la presencia de la *lambda*-carragenina estaría produciendo un mayor grado de floculación de las gotas que aquellas en el UT, probablemente debido a que al disminuir el

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

tamaño de las gotas (o incrementar la concentración de gotas por unidad de volumen), el efecto floculante del biopolímero sería más importante.

En la emulsión con 0,5 % (p/ p) ST, dado que el HV crea una mayor superficie a cubrir por la proteína y el proceso de formación de la gota es más rápido que en el UT, es probable que la concentración de proteína no haya sido suficiente para cubrir el área creada y/ o no haya alcanzado a extenderse en la interfase y se hayan formado puentes de proteína entre las gotas que formen flóculos (Carrera Sánchez y Rodríguez Patino, 2005). Como se analizó previamente, el comportamiento de cremado de esta emulsión condice con el comportamiento de una emulsión de alta fracción en volumen, poli-dispersa, floculada, que contiene en su fase continua un polímero (Robins, 2000a).

Para el resto de las concentraciones evaluadas, los resultados obtenidos en el HV concuerdan con un mecanismo de floculación por depleción conducido por la *lambda*-carragenina. El incremento de la viscosidad a bajos gradientes y su relación con la concentración de ST, la ruptura de los flóculos por efecto de la dilución al medir el tamaño de partículas, la rápida desestabilización y posterior re-estabilización de la emulsión con 1,0 % (p/ p) ST y, por último, el tiempo de retardo observado en estas emulsiones serían prueba de dicho proceso de floculación. En menor medida y posterior a ese mecanismo, también se puede haber producido un proceso de floculación por puentes entre las proteínas, indicado por los cambios sufridos por las emulsiones ante el agregado de SDS.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

De comparar las emulsiones con CS con aquellas con WPC solo preparadas por la misma metodología (HV), surge que los resultados obtenidos podrían deberse a diferentes factores. Por un lado, se puede apreciar que los valores de $D(4,3)$ fueron muy similares en ambas clases de emulsiones. Este resultado permitiría concluir que el tamaño de las gotas logrado, en el caso del homogeneizador a válvula, estaría determinado principalmente por el equipo utilizado bajo ciertas condiciones, y estaría afectado en mucha menor medida por la viscosidad de la fase continua y de la emulsión. Por su parte, el agregado del SDS permitió apreciar un mayor grado de floculación en las emulsiones preparadas con el WPC solo, excepto para la menor concentración estudiada (0,37 % proteína o 0,5 % (p/ p) ST de CS) donde el grado de floculación fue más notable cuando se preparó con CS. Esto último estaría indicando, nuevamente, que la concentración de 0,37 % (p/ p) de proteína (0,5 % (p/ p) de ST de CS), sería insuficiente para cubrir el área creada por el HV, y que, por otro lado, la presencia de la *lambda*-carragenina estaría fomentando la formación de puentes entre las gotas a bajas concentraciones de proteína. A concentraciones de proteína desde 0,73 % (p/ p), la presencia de la *lambda*-carragenina habría reducido el número de puentes proteicos entre las gotas, debido probablemente a que el hidrocoloide empujaría la proteína hacia la interfase, permitiendo un reacomodamiento más eficiente de la proteína (Baeza y col., 2005; Perez y col., 2007).

Al considerar los cambios observados en las mediciones de viscosidad en un caso y otro, no hay que dejar de tener en cuenta, en primer lugar, el incremento

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

de la viscosidad de la fase continua por la presencia del polímero. Como se vio previamente al evaluar la viscosidad de las soluciones de CS, el comportamiento reológico de las mismas fue prácticamente Newtoniano hasta una concentración de 3,0 % (p/ p) ST. De acuerdo a este resultado, la contribución de la viscosidad de la fase continua no sería significativa, sin embargo, un factor a tener en cuenta nuevamente es el efecto de concentración que sufre la dispersión de CS al agregar el aceite y, principalmente, al reducir el tamaño de partícula, lo cual esté probablemente modificando el comportamiento reológico de la fase continua y así contribuyendo con la viscosidad de la emulsión.

En segundo lugar, dado que el tamaño de partícula es prácticamente el mismo en ambas clases de emulsiones y la fracción en volumen de aceite también, solo la presencia de la *lambda*-carragenina podría explicar el mayor grado de floculación observado a través del incremento del comportamiento pseudo-plástico y de la histéresis. Dicho grado de floculación, excepto para la menor concentración evaluada (0,5 % (p/ p) ST), no pudo ser apreciado por el agregado de SDS en igual medida, lo cual estaría indicando que parte de los flóculos se habrían roto por efecto de la dilución.

Del análisis de las cinéticas de cremado de las emulsiones con CS y con WPC surge que, a baja concentraciones de proteína (0,37 % (p/ p)), la *lambda*-carragenina incrementó la velocidad de desestabilización de la emulsión favoreciendo la formación de flóculos probablemente a través de un mecanismo de puentes entre las gotas. A una concentración de 0,73 % (p/ p) de

CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

proteína, el hidrocoloide incrementó inicialmente la velocidad de cremado pero luego estabilizó la emulsión durante el tiempo de observación. Las emulsiones con las siguientes concentraciones de CS, mostraron tiempos de retardo y, a partir de una concentración de proteína más baja que en las emulsiones con WPC solo, las emulsiones fueron estables durante el tiempo de observación (1,83 % (p/ p) de proteína o 2,5 % (p/ p) ST de CS). Cabe recordar que en ocasiones se procura una floculación extensiva para conseguir la formación de un entramado estructural viscoelástico que controle la estabilidad de emulsiones concentradas.

Capítulo V

Conclusiones

Conclusiones

Del estudio de la estabilidad de emulsiones concentradas preparadas con una mezcla de concentrado de proteínas de suero (WPC) comercial y *lambda*-carragenina anteriormente presentado, surgieron las siguientes conclusiones.

Caracterización de la fase continua

Con el objetivo de estudiar y caracterizar la fase continua ha utilizar para preparar las emulsiones en estudio, se arribó a las siguientes conclusiones: el WPC de origen comercial utilizado para preparar las emulsiones en este trabajo contendría agregados de elevado peso molecular y su presencia se debería probablemente a un fenómeno de desnaturalización térmica de las proteínas del WPC como consecuencia del proceso de elaboración industrial de las mismas. Dichos agregados serían de naturaleza principalmente hidrofóbica.

La presencia de la *lambda*-carragenina habría desagregado en gran proporción dichos agregados lo cual estaría indicando un cierto grado de interacción entre los biopolímeros. Semejante interacción sería probablemente de naturaleza electrostática dada la nueva aparición de los agregados ante la adición del NaCl. La sal estaría neutralizando las cargas que participarían de la interacción entre las proteínas del WPC y la *lambda*-carragenina, lo cual llevaría nuevamente a una reducción de la repulsión entre las proteínas y a un aumento de la hidrofobicidad.

La elevada solubilidad del WPC mostrada en distintos solventes es una ventaja que permite una rápida y completa dispersión de las moléculas o partículas

Conclusiones

proteicas conduciendo a un sistema coloidal finamente disperso, con una estructura macroscópica homogénea y una textura suave. Además, la elevada solubilidad inicial de las proteínas de suero lácteo facilita su difusión hasta las interfases. Esta propiedad del WPC se vería favorecida notablemente por la presencia de la *lambda*-carragenina mostrando, además, que existirían interacciones del tipo electrostático entre ambos biopolímeros.

La existencia de dichas interacciones habría sido corroborada a partir de los hallazgos en las mediciones de viscosidad: un notable incremento en la viscosidad al mezclar ambas macromoléculas, el corrimiento en los regímenes de concentración a menores valores y la mayor estabilidad frente a la temperatura serían prueba de dichas interacciones. Los resultados obtenidos con DSC estarían corroborando un incremento en la estabilidad térmica de las proteínas del WPC en presencia de la *lambda*-carragenina.

Caracterización de las emulsiones

Del estudio de la estabilidad de emulsiones concentradas (50% aceite-en-agua) preparadas con WPC comercial a distintas concentraciones de proteína, por dos metodologías diferentes (UT y HV) y ante el agregado del biopolímero *lambda*-carragenina, bajo la forma de un ingrediente co-secado WPC/ carragenina surgieron las siguientes conclusiones. Las limitaciones del homogeneizador de relativamente baja potencia, Ultra Turrax, se mostraron claramente en este estudio. Se requirieron crecientes concentraciones de WPC para reducir el tamaño de partícula lo suficiente, y aun así, las emulsiones no fueron estables

Conclusiones

durantes largos tiempos. Se distinguió claramente la capacidad para reducir el tamaño de las gotas entre el Ultra Turrax y el homogeneizador a válvula. Este último fue capaz de crear un área superficial de gotas recién formadas mucho mayor y mostró las limitaciones del WPC como emulsificante cuando se usa un homogeneizador eficiente. Además, se demostró la baja influencia de la viscosidad de la fase continua y de la emulsión sobre la capacidad del HV para reducir el tamaño de las gotas.

Mientras que las emulsiones con WPC en UT estuvieron ligeramente o no floculadas, las emulsiones en HV presentaron floculación y el grado de la floculación dependió de la concentración de proteína. Llamativamente, estas emulsiones también mostraron un tiempo de retardo o re-estabilización el cual se incrementó linealmente con la concentración de WPC, siendo esto último de gran importancia comercial ya que esta etapa de retardo podría ser diseñada para durar meses o años. Proponemos que la formación de la estructura que influyó en la estabilidad de las emulsiones preparadas en el HV a las concentraciones de proteínas evaluadas sería atribuida a un mecanismo de floculación por depleción que sucedería inicialmente, producido por los agregados de elevado peso molecular presentes en el WPC, seguido de un proceso de estabilización de floculación por puentes o multi-capas entre las proteínas a medida que la emulsión envejece.

Las emulsiones con la mezcla co-secada preparadas en UT presentaron tres comportamientos diferentes: a baja concentración de proteína, las emulsiones mostraron un bajo grado de floculación lo cual podría deberse a que la *lambda*-

Conclusiones

carragenina estaría incrementando la concentración de proteína en la interfase de las gotas; a concentraciones intermedias de proteína de WPC las emulsiones presentaron floculación, probablemente por un mecanismo combinado de floculación por puentes o por capas de proteínas adsorbidas y por depleción debido a la presencia de la *lambda*-carragenina; por último, a elevadas concentraciones de proteína, las emulsiones mostraron un mayor grado de floculación que podría ser atribuido a un proceso de depleción por el hidrocoloide.

La presencia de la *lambda* - carragenina en las emulsiones preparadas en el HV produjo un notable proceso de floculación que condujo a una mayor estabilidad de las mismas. Dicho proceso de floculación sería atribuido, en menor medida, a un proceso de floculación por puentes o multi-capas entre las proteínas, y principalmente, a un mecanismo de depleción por la *lambda*-carragenina que llevó a una re-estabilización y tiempos de retardos en las emulsiones que permitirían ser diseñados para perdurar en el tiempo. Como se discutió anteriormente, una estrategia para reducir la velocidad de cremado de una emulsión es incrementar la viscosidad de la fase continua mediante el agregado de un polímero de elevado peso molecular tal como la *lambda*-carragenina. Sin embargo, estos polímeros también actúan reduciendo la estabilidad a la floculación, lo cual conduce a un cremado más rápido.

Una alternativa para diseñar una emulsión lo suficientemente rígida para resistir las fuerzas del cremado es flocular la fase dispersa formando estructuras de gotas. Estas estructuras pueden ser estables por largos períodos

Conclusiones

de tiempo pero están sujetas a colapsar al final de su período de estabilidad. Aunque una ventaja de utilizar estos polímeros es que, aún cuando los mismos no logren generar un producto estable, la floculación es fácilmente revertida por simple agitación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. (1980), Official methods of análisis. Assoc. Official Anal. Chem. Washington, D.C.

A.A.C.C. (1983) Methods of American Association of Cereal Chemist, method 46 - 23. City AACC.

Aguilera, J.M. (1995) Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49 (10), 83 - 89.

Baeza, R. I.; Pilosof, A. M. R. (2002). Calorimetric Studies of Thermal Denaturation of beta-Lactoglobulin in the Presence of Polysaccharides. *Food Science & Technology*, 35, 393 - 399.

Baeza, R.; Carrera Sánchez, C.; Pilosof, A. M. R.; Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19, 239 - 248.

Berli, C.L.A.; Deiber, J.A. (1997). Inelastic rheokinetic model for whey protein suspensions. *Latin America Applied Research*, 27, 219 - 225.

Berli, C.L.A., Quemada, D.; Parker, A. (2002). Modelling the viscosity of depletion flocculated emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 203, 11 - 20.

Blijdenstein, T.B.; Veerman, C.; van der Linden, E. (2004). Depletion-Flocculation in Oil-in-Water Emulsions Using Fibrillar Protein Assemblies. *Langmuir*, 20, 4881 - 4884.

Boulet, M.; Britten, M.; Lamarche, F. (2000). Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effect of concentration, pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 14, 2, 135 - 144.

Boye, J. I.; Alli, I.; Ismail, A. A.; Gibbs, B. F.; Konishi, Y. (1995). Factors Affecting Molecular Characteristics of Whey Protein Gelation. *International Dairy Journal*, 5, 337 - 353.

Bryant, C. M.; McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Food Science & Technology*, 9, 143 - 151.

Carrera Sanchez, C.; Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19, 407 - 416.

Chanamai, R.; McClements, D.J. (2000a). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 172, 1 - 3, 79 - 86.

Chanamai, R.; McClements, D.J. (2000b). Creaming Stability of Flocculated Monodisperse Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 225, 214 - 218.

Cheftel, J.C. (1989). Propiedades fisico-químicas de los aminoácidos y de las proteínas. *Proteínas Alimentarias*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España, 5 - 36.

Cornec, M.; Wilde, P. J.; Gunning, P. A.; Mackie, A. R.; Husband, F. A.; Parker, M. L.; Clark, D. C. (1998). Emulsion Stability as Affected by Competitive Adsorption Between an Oil-Soluble Emulsifier and Milk Proteins at the Interface, *Journal of Food Science*, 63 (1), 39 - 43.

Dalgleish, D.G. (1996). Conformations and structures of milk proteins adsorbed to oil-water interfaces. *Food Research International*, 29 (5-6), 541 - 547.

De Kruif, C.G.; Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15 (4 - 6), 555 - 563.

Demetriades, K.; Coupland, J.N.; McClements, D.J. (1997). Physicochemical Properties of Whey Protein-Stabilized Emulsions as affected by Heating and Ionic Strength, *Journal of Food Science*, 62 (3), 462 - 467.

Dickinson, E.; Golding, M. (1997). Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 11 (1), 13 - 18.

Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Food Science & Technology*, 9, 347 - 354.

Dickinson, E. (1998). Structure, stability and rheology of flocculated emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 633 - 638.

Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20 (3), 197 - 210.

Dickinson, E., Golding, M.; Povey, M.J.W. (1997). Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185, 515 - 529.

Euston, S.R.; Hirst, R.L. (1999). Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk protein. *International Dairy Journal*, 9, 693 - 701.

Euston, S.R.; Finnigan, S.R.; Hirst, R.L. (2000). Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 14, 155 - 161.

Fillery-Travis, A. J.; Gunning, P. A.; Hibberd, D. J.; Robins, M. M. (1993). Coexistent Phases in Concentrated Polydisperse Emulsions Flocculated by Nonadsorbing Polymer. *Journal of Colloids and Interface Science*, 159, 189 - 197.

Floury, J.; Desrumaux, A.; Legrand, J. (2002). Effect of Ultra-high-pressure Homogenization on Structure and on Rheological Properties of Soy Protein-stabilized Emulsions. *Journal of Food Science*, 67 (9), 3388 - 3395.

Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D.; McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (5), 151 - 159.

Funtenberger, S.; Dumay, E.; Cheftel, J.C. (1995). Pressure-induced Aggregation of β -Lactoglobulin in pH 7.0 Buffers. *Food Science and Technology*, 28, 410 - 418.

BIBLIOGRAFÍA

Galazka, V. B.; Ledward, D. A. ; Dickinson, E.; Langley, K. R. (1995). High Pressure Effects on Emulsifying Behavior of Whey Protein Concentrate. *Journal of Food Science*, 60 (6), 1341 - 1343.

Galazka, V. B.; Smith, D.; Ledward, D. A.; Dickinson, E. (1999). Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 13, 81 - 88.

Gallegos, C., Sánchez, M.C.; Franco, J.M. (2005). Emulsiones alimentarias estabilizadas con proteínas vegetales. En Girón-Calle J., Pedroche J., Rodríguez Patino J.M.; Millán, F. (Ed.), *Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial*, Secretariado de Publicaciones, Universidad de Sevilla, Sevilla, España, 265 - 273.

Gu, Y. S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2005). Influence of pH and carrageenan type on properties of β - lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 19, 83 - 91.

Gunning, P.A.; Hibberd, D.J.; Howe, A.M.; Robins, M.M. (1988). Gravitational destabilization of emulsions flocculated by non-adsorbed xanthan, *Food Hydrocolloids*, 2 (2), 119 - 129.

Hibberd, D.; Holmes, A.; Garrood, M.; Fillery-Travis, A.; Robins, M.; Challis, R. (1997). Ultrasonic Monitoring of Oil-in-Water Emulsions Undergoing Depletion Flocculation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 193, 77 - 87.

İbanoğlu, Esra (2002). Rheological behaviour of whey protein stabilized emulsions in the presence of gum arabic. *Journal of Food Engineering*, 52, 273 - 277.

Jauregui, B., Muñoz, M. E.; Santamaría, A. (1995). Rheology of hydroxyethylated starch aqueous systems. Analysis of gel formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17 (1), 49 - 54.

Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B. (1998) Rheological characterisation of polymer gels. *Prog. Polymer Science*, 23, 533 - 562.

Keowmaneechai, E.; McClements, D. J. (2002). Effect of CaCl and KCl on Physiochemical Properties of Model Nutritional Beverages Based on Whey Protein Stabilized Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*, 67 (2), 665 - 671.

Kinghorn, N.M.; Norris, C.S.; Paterson, G.R.; Otter, D.E. (1995). Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *Journal of Chromatography A*, 700, 111 - 123.

BIBLIOGRAFÍA

Kinsella, J.E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. En Fox, P.F.; London, G.G. (Eds.), *Food Proteins*, Applied Science, Barking, Essex, England, 51 - 103.

Kulmyrzaev, A. A.; Schubert, H. (2004). Influence of KCl on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions, *Food Hydrocolloids*, 18, 13 - 19.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A.; De kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/ milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, 273 - 280.

Liu, X., Qian, L., Shu, T.; Ton, Z. (2003). Rheology characterization of sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer*, 44, 407 - 412.

Lizarraga, M.S., De Piante Vicin, D., González, R., Rubiolo, A.; Santiago, L.G. (2006). Rheological behaviour of whey protein concentrate and *lambda*-carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 740 - 748.

Lizarraga, M.S.; Pan, L.G.; Añón, M.C.; Santiago, L.G. (2007). Stability of concentrated emulsions measured by optical and rheological methods. Effect of

processing conditions - I. Whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.04.012 (artículo on-line).

Lucassen - Reynders, E. H. (1993). Interfacial Viscoelasticity in Emulsions and Foams, *Food Structure*, 12, 1 - 12.

Manoj, P., Fillery-Travis, A.J.; Watson, A.D., Hibberd, D.J.; Robins, M.M. (1998). Characterization of depletion-flocculated polydisperse emulsion. I. Creaming behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 283 - 293.

Manoj, P., Watson, A.D., Hibberd, D.J., Fillery-Travis, A.J.; Robins, M.M. (1998). Characterization of depletion-flocculated polydisperse emulsion. II. Steady-state rheological investigations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 294 - 302.

Mothé, C.G.; Rao, M.A. (1999). Rheological behaviour of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. *Food Hydrocolloids*, 13, 501 - 506.

Palazolo, G.G.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19, 595 - 604.

BIBLIOGRAFÍA

Pearce, K. N.; Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Agriculture Food Chemistry*, 26 (3), 716 - 723.

Pelegrine, D. H. G.; Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Food Science and Technology*, 38, 77 - 88.

Phillips, M.C. (1981). Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*, January.

Perez, A.A.; Carrara, C.R.; Carrera-Sánchez, C.; Rodríguez-Patino, J.M.; Santiago, L.G. (2007). Interactions of milk protein and polysaccharide in solution and at the air-water interface. 1. Electrostatic interactions between biopolymers in solution. *Food Hydrocolloids*, trabajo enviado para publicar, Noviembre, 2007.

Quintana, J.M.; Califano, A.N.; Zaritzky, N.E.; Partal, P. (2002). Effect of salt on the rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with polysaccharides. *Food Science and Technology International*, 8 (4), 213 - 221.

Radford, S.J.; Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilized emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nanoparticles?. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 238, 71 - 81.

BIBLIOGRAFÍA

Rao, M. A. (1999). Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and applications. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 153 - 218.

Reiffers - Magnani, C. K. ; Cuq, J. L.; Watzke, H. J. (1999). Composite structure formation in whey protein stabilized O/W emulsions. I. Influence of the dispersed phase on viscoelastic properties, *Food Hydrocolloids*, 13, 303 - 316.

Reiffers-Magnani, C. K.; Cuq, J. L.; Watzke, H. J. (2000). Depletion flocculation and thermodynamic incompatibility in whey protein stabilized O/ W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 14, 521 - 530.

Ren, Y., Ellis, P. R.; Sutherland, I. W.; Ross-Murphy, S. B. (2003). Dilute and semi-dilute solutions properties of an exopolysaccharide from *Escherichia coli* strain S61. *Carbohydrate Polymers*, 52, 189 - 195.

Robbins, M.M.; Hibberd, D.J. (1998). Emulsion flocculation and creaming. In *Modern Aspects of Emulsion Science*. Binks bP Cambridge: Royal Society of Chemistry (Ed.), 4, 115 - 144.

Robins, M.M. (2000a). Emulsions - creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 265 - 272.

BIBLIOGRAFÍA

Robins, M.M. (2000b). Particle Size Analysis in Food. In R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 4130 - 4153.

Rodd, A. B., Davis, C. R., Dunstan, D. E., Forrest, B. A.; Boger, D. V. (2000). Rheological characterisation of “weak gel” carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloids*, 14 (5), 445 - 454.

Rodríguez Patino, J.M., Navarro García, J.M., Rodríguez Niño, M.R. (2001). Protein - lipid interactions at the oil - water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21 (1 - 3), 207 - 216.

Ross-Murphy, S. B. (1984). Rheological methods. Critical reports on applied chemistry. In H. W. S. Chan (Ed.), *Biophysical Methods in Food Research*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, Vol. 5, 138 - 198.

Santiago, L.G., González, R.J., Fillery-Travis A., Robins, M., Bonaldo, A.G.; Carrara, C. (2002). The influence of xanthan and λ -carrageenan on the creaming and flocculation of an oil-in-water emulsion containing soy protein. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (4), 411 - 417.

BIBLIOGRAFÍA

Sharma, S.C. (1981). Gums and Hydrocolloids in Oil-Water Emulsions. *Food Technology*, January, 59 - 67.

Shaw, D. J. (1992). Introduction to Colloid & Surface Chemistry, 4th edition, Butterworth-Heinemann, Jordan Hill, Oxford, Reed Educational and Professional Publishing Ltd.

Shenz, T.W. (1997). Using rheology of weak gels to improved fluid foods. *Food Technology*, 51 (3), 83.

Sliwinski, E.L., Lavrijsen, B.W.M., Vollenbroek, J.M., van der Stege, H.J., van Boekel, M.A.J.S.; Wouters, J.T.M. (2003). Effects of spray drying on physicochemical properties of milk protein - stabilised emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 219 - 229.

Smewing, J. (1999). Hydrocolloid. In Rosenthal, A. (Ed.), *Food Texture Measurement and Perception*, Aspen Publication, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, 282 - 303.

Spahn, G.; Baeza, R.; Santiago, L.G., Pilosof, A.M.R. (2007). Whey Protein Concentrate/ λ - Carrageenan systems: Effect of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*, en prensa, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.10.002 (artículo on-line).

BIBLIOGRAFÍA

Steffe, J. F. (1996). Viscoelasticity. In J. F. Steffe (Ed.), *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Freeman Press, USA, 5, 294 - 349.

Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H. (1998). Polymer Science Concepts in Dairy Systems - An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloids Interaction, *International Dairy Journal*, 8, 179 - 193.

Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloids and Interface Science*, 108-109, 227 - 258.

Thomas, W. R. (1999). Carrageenan. In Alan Imeson (Ed.), *Thickening and Gelling Agents for Foods* (2nd Edition), Aspen Publication, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, 45 - 59.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17 (1), 1 - 23.

Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of protein - polysaccharide mixtures in "Functional Properties of Food Macromolecules (Mitchell, J.R. and Leward, D.A., eds.), Elsevier Applied Science, London, 385 - 415.

BIBLIOGRAFÍA

Tornberg, E.; Hermansson, A.M. (1977). Functional characterization of protein stabilized emulsions: Effect of processing. *Journal of Food Science*, 42 : 468

Tornberg, E.; Lundh, G. (1978). Functional characterization of protein stabilized emulsions: standardized emulsifying procedure. *Journal of Food Science*, 43 (5) 1553 - 1558.

Tornberg, E. (1980). Functional characteristics of protein stabilized emulsions: emulsifying behavior of proteins in a sonifier. *Journal of Food Science*, 45, 1662 - 1668.

Tornberg, E., Olsson, A.; Persson, K. (1997). The Structural and Interfacial Properties of Food Proteins in Relation to Their Function in Emulsions. In K. Larsson (Ed.), *Food Emulsions*. 3rd edition, Friberg and Larsson, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, 7, 279 - 350.

Walstra, P. (1983). Formation of Emulsions. In P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 57 - 127.

Wilde, P.; Mackie, A.; Husband, F.; Gunning, P.; Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*; 108 - 109, 63 - 71.

BIBLIOGRAFÍA

Yamauchi, K.; Shimzu, M.; Kamiya, T. (1980). Emulsifying Properties of Whey Protein, *Journal of Food Science*, 45, 1237 - 1242.

Yamul, D.K. y Lupano, C.E. (2003). Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs, *Food Research International*, 36 (1), 25 - 33.

Ye, A.; Singh, H. (2000). Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate, *Food Hydrocolloids*, 14, 337 - 346.