



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PEDECIBA QUÍMICA



PEDECIBA

Tesis de Doctorado en Química

“Aislamiento y estudio de las propiedades funcionales de las fracciones 11S y 7S de proteínas de semilla de soja”

Ing. Alim. Cecilia Abirached

Directores: Dra. Maria Cristina Añón
Dr. Patrick Moyna
Dr. Luis Alberto Panizzolo

Diciembre 2012

El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Química (PEDECIBA Química) de la Universidad de la República, fue realizado en el Departamento de Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Bajo la dirección de los Doctores Maria Cristina Añón, Patrick Moyna y Luis Alberto Panizzolo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy y guiar mis elecciones siempre en la mejor dirección, por fortalecer mi espíritu e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a todas las personas que han sido soporte y compañía durante toda mi vida y, en particular, durante este trabajo.

A mis padres, Wellington y Blanca, y mis hermanos, Patricia y Alejandro, por alentarme desde pequeña a estudiar y avanzar con la carrera y ayudarme en el camino dándome todo su cariño y apoyo.

A mis dos pequeños, Nicolás y Guillermo por ser la luz de mi vida.

A mi esposo, Ignacio, por todo su apoyo y cariño, en este largo camino que fue el desarrollo de la tesis.

A Alejandra y Pani por haberme recibido, allá por el año 2002, en su grupo de trabajo y por su continuo apoyo, cariño y aliento que me dan día a día desde el comienzo.

Al Dr. Luis Panizzolo, codirector de esta tesis, por el apoyo recibido en todas las instancias del desarrollo de este trabajo, por todas las oportunidades brindadas desde el comienzo y hasta el final del mismo, brindándome continuamente el asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A la Dra. María Cristina Añón, directora de esta tesis, por haberme aceptado como su estudiante de tesis, lo cual fue un gran honor para mí, por haberme abierto las puertas de su laboratorio en La Plata y la puerta de sus profundos conocimientos en ésta línea de investigación.

A la Dr. Patrick Moyna, director de esta tesis, por el apoyo recibido, las oportunidades brindadas en todo momento y poder recurrir a su capacidad y experiencia científica.

A mis compañeros y amigos de la cátedra que de una forma u otra siempre me apoyaron en la realización de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Proteínas y resto de los integrantes del CIDCA-UNLP

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Biológica de Facultad de Ciencias, Udelar

A los integrantes del Laboratorio de Grasas y Aceites, Facultad de Química, Udelar

A los integrantes del área de Tecnología Farmacéutica del Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Udelar

Al Taller de Instrumentos y al Taller de Aparatos de Vidrio por el diseño y construcción de aparatos utilizados en este trabajo.

A la Facultad de Química y a PEDECIBA-Área Química, por el apoyo recibido.

Al PDT por la beca-crédito de postgrado recibida.

Al LATU por la beca recibida a través de su convenio con Facultad de Química.

Y a todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron y me apoyaron en la realización de esta tesis, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La soja	9
1.2 Proteínas de soja	11
1.2.1 Estructuras subcelulares de las semillas	11
1.2.2 Proteínas de almacenamiento	12
1.2.3 Glicinina	14
1.2.4 β -Conglicinina	17
1.3 Efecto de pH y μ en la estructura de glicinina y β -conglucina	19
1.3.1 Glicinina	19
1.3.3 β -Conglicinina	20
1.4 Fraccionamiento de proteínas de almacenamiento de soja	21
1.5 Estabilidad térmica	23
1.6 Propiedades funcionales de proteínas	23
1.6.1 Propiedades funcionales de superficie	27
1.6.1.1 Tensión superficial y área superficial	30
1.6.1.2 Propiedades reológicas superficiales de las proteínas adsorbidas en interfaces	35
1.6.2 Espumas y emulsiones	42
1.6.2.1 Espumas	42
1.6.2.1.1 Formación de espumas	43
1.6.2.1.2 Estabilidad de espumas	44
1.6.2.2 Emulsiones	46
1.6.2.2.1 Formación de emulsiones	47
1.6.2.2.1.1 Homogeneizadores	50
1.6.2.2.2 Estabilidad de emulsiones	52
1.6.3 Hidrofobicidad de las proteínas y su relación con la funcionalidad	59
1.6.4 Viscosidad de soluciones proteicas	60
1.7 Propiedades funcionales de las proteínas de soja	61
1.7.1 Propiedades de emulsificación	62
1.7.2 Propiedades de espumado	63
OBJETIVOS	65
Objetivos generales	65
Objetivos específicos	65
HIPÓTESIS	66
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	68
2.1 Preparación de los buffers utilizados	68
2.1.1 Buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0	68
2.1.2 Solución de fosfato de sodio 10 mM ajustada a pH 2,5	68
2.1.3 Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0	68
2.1.4 Solución de fosfato de sodio 100 mM ajustada a pH 2,5	68
2.2 Obtención de aislado de proteína de soja	68
2.3 Aislamiento de las fracciones 7S y 11S de soja	69
2.4 Tratamiento con pH ácido del aislado proteico de soja y de las fracciones 7S y 11S	69
2.5 Neutralización de proteínas tratadas con pH ácido	70
2.6 Caracterización fisicoquímica-estructural de los compuestos obtenidos	70

2.6.1 Solubilidad.....	70
2.6.3 Identificación de las fracciones por electroforesis.....	71
2.6.4 Hidrofobicidad aromática superficial.....	72
2.7 Determinación de propiedades funcionales.....	74
2.7.1 Tensión superficial e interfacial.....	74
2.7.1.1 Constantes de absorción y reordenamiento de proteína en la interfase y tensión de equilibrio.....	74
2.7.1.2 Parámetros viscoelásticos.....	74
2.7.1.4 Descripción del tensiómetro dinámico.....	77
2.7.1.4.1 Determinación de la tensión utilizando tensiómetro dinámico.....	78
2.8 Determinación de las propiedades espumantes.....	79
2.8.1 Descripción del equipo utilizado.....	80
2.8.2 Determinación de parámetros de formación de espumas.....	81
2.8.3 Determinación de parámetros de estabilidad de espumas.....	82
2.9 Determinación de las propiedades emulsionantes.....	83
2.9.1 Preparación de emulsiones.....	83
2.9.2 Ensayos de caracterización de las emulsiones.....	83
2.9.2.1 Porcentaje de proteína adsorbida y concentración proteica interfacial... 83	
2.9.2.2 Tamaño de partícula de las emulsiones.....	84
2.9.2.2.1 Descripción del equipo utilizado.....	85
2.9.2.3 Microestructura de emulsiones.....	87
2.9.3 Determinación de la estabilidad de las emulsiones.....	88
2.9.3.1 Estabilidad de la emulsión frente al cremado.....	88
2.9.3.2 Medida de la viscosidad aparente de la fase continua de las emulsiones.....	89
2.9.3.3 Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia.....	89
2.9.3.4. Grado de hidratación.....	90
2.9.3.5 Descripción del equipo para determinar la estabilidad en emulsiones por dispersión múltiple de la luz.....	90
2.10. Análisis estadístico.....	94
2.11. Nomenclatura.....	95
3.- CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL.....	97
3.1. Contenido de proteína de las muestras.....	97
3.2 Caracterización de las fracciones proteicas y aislados obtenidos.....	98
3.2.1 Composición polipeptídica mediante electroforesis.....	98
3.2.2 Análisis de propiedades térmicas.....	101
3.2.3 Hidrofobicidad superficial.....	104
3.3. Solubilidad.....	106
3.4 Resumen y conclusiones parciales.....	108
4.- PROPIEDADES ESPUMANTES.....	110
4.1 Determinación de tensión superficial (agua/aire).....	110
4.2 Comportamiento superficial dinámico.....	112
4.3 Propiedades espumantes.....	114
4.3.1 Formación de espumas.....	114
4.3.1.1 Tamaño y forma de las burbujas.....	115
4.3.1.2. Volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y velocidad de pasaje del líquido a la espuma (v_0).....	120
4.3.2. Estabilidad de espumas.....	126
4.3 Resumen y conclusiones parciales.....	134
5.- PROPIEDADES EMULSIONANTES.....	138
5.1 Determinación de tensión interfacial (aceite/agua).....	138

5.2 Comportamiento interfacial dinámico	142
5.3 Emulsiones de proteínas de soja	148
5.3.1 Formación de emulsiones	148
5.3.1.1 Concentración de proteína interfacial	149
5.3.1.2 Distribución de tamaño de partícula	151
5.3.1.3 Floculación de gotas durante la formación de la emulsión.....	159
5.3.2 Estabilidad de emulsión	160
5.3.2.1 Estabilidad frente al cremado	162
5.3.2.1.1 Viscosidad de la fase continua de las emulsiones.....	172
5.3.2.1.2 Desviaciones de la ley de Stokes	175
5.3.2.2 Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia.....	181
5.3.2.3 Cinética de desestabilización en la fase crema	182
5.3.3. Análisis de Imagen.....	185
5.4 Resumen y Conclusiones Parciales.....	188
6.- CONCLUSIONES FINALES	191
7.-BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXO 1: DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS	225
A1.1 Publicaciones en revistas arbitradas.....	225
A1.2 Trabajos presentados en congresos.....	225
A1.3 Proyectos realizados derivados de la tesis	226
ANEXO 2: SÍMBOLOS, TERMINOLOGÍA Y ABREVIACIONES	227

RESUMEN

Muchas proteínas son moléculas con actividad superficial que pueden ser utilizadas como agentes emulsificantes o espumantes por tener la habilidad de facilitar la formación, mejorar la estabilidad y producir propiedades fisicoquímicas deseadas en las emulsiones aceite en agua y espumas. El estudio de proteínas vegetales, como las proteínas de soja, resulta de interés tecnológico debido a que las mismas podrían ser utilizadas como sustitutos de proteínas de origen animal para su uso en emulsiones alimentarias debido a su menor costo.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia del tratamiento a pH ácido tiene sobre las muestras nativas del aislado proteico y las fracciones 7S y 11S de soja. Relacionar y comparar las propiedades espumantes, emulsificantes e interfaciales de las muestras nativas y tratadas a pH ácido. Para esto se obtuvieron el aislado proteico de soja y las fracciones 7S y 11S de las proteínas de soja nativas a partir de harina de soja desgrasada por precipitación isoelectrica y luego se realizó un tratamiento a pH ácido sobre una porción de las muestras nativas. Las muestras nativas y tratadas a pH ácido se caracterizaron desde el punto de vista estructural y fisicoquímico realizando análisis de calorimetría diferencial de barrido, electroforesis desnaturizante, y determinaciones de hidrofobicidad superficial y solubilidad. Se analizó además la capacidad de las muestras nativas y tratadas a pH ácido para formar y estabilizar espumas y emulsiones y se relacionó dicha capacidad con las propiedades interfaciales y estructurales y fisicoquímicas de las mismas. Se concluyó que en términos generales, el tratamiento a pH ácido mejoró las propiedades espumantes y emulsificantes del aislado y las fracciones 11S y 7S de soja.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La soja

La soja, junto con el trigo, maíz, sorgo, papa, avena, mandioca, batata y remolacha azucarera, son los principales vegetales que sirven de alimento para los seres humanos. La palabra soja viene de la palabra japonesa *shoyu* y apareció por primera vez en un diccionario japonés publicado en 1597 (Hymowitz, 2008). En diversos países del Oriente, como China y Japón, la soja ha representado desde hace varios miles de años, un ingrediente fundamental en la dieta de un gran sector de la población (Badui, 2006a). En Occidente, los dos principales productos de la soja son el aceite de semilla y la harina proteica, las semillas de soja contienen 18-23% de aceite y 38-44% de proteína en base seca (Hymowitz, 2008).

Debido a sus propiedades nutritivas, atribuida principalmente a las proteínas, en las últimas décadas ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico para el aprovechamiento integral de la soja. La producción de proteínas de soja representa una alternativa muy importante para la deficiencia que existe de las proteínas convencionales, como las de la leche, la carne y el huevo (Badui, 2006a). Las proteínas de soja han cobrado especial importancia por poseer diversos efectos fisiológicos, como la capacidad de reducir el colesterol sanguíneo y la grasa corporal; inclusive la FDA ha aprobado la reivindicación de que su consumo previene enfermedades coronarias. Una de las herramientas disponibles para generar nuevos productos de soja es la proteólisis selectiva, empleando proteasas vegetales como la papaína y enzimas microbianas, y enriqueciendo las fracciones en alguna de las globulinas: β -conglucina o glicina para mejorar la capacidad de gelificación, emulsificación y espumado (Gálvez Mariscal et al., 2006).

Las proteínas de soja se emplean ampliamente en la elaboración de diversos derivados cárnicos (salchichas, mortadelas, albóndigas, jamones, hamburguesas, entre otros), ya que ayudan a formar emulsiones estables, pues cuando gelifican producen una estructura firme; en la panificación (pasteles, galletas, etc.); en la industria láctea (sustitutos de leche de vaca, quesos procesados y frescos, etc.); en complementos alimenticios; en dulces y confitería; en líquidos viscosos (cremas, sopas); debido a que

producen espumas estables, se usan como sustituto de clara de huevo en helados y merengues (Badui, 2006a).

Según datos de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DIEA-MGAP), en Uruguay el área sembrada y la producción de soja han tenido un crecimiento vertiginoso (Figura 1.1).

A pesar de esto las importaciones en Uruguay de harinas, expellers y otros derivados de la molienda oleaginosa avanzan a ritmo intenso. Para atender el compromiso de mezcla de biodiesel en el gasoil establecido en el marco de la Ley 18.195 y decreto reglamentario 523/008 se requieren más de 17 mil toneladas anuales de aceite, lo que genera grandes volúmenes de harinas oleaginosas (Souto, 2009). Se estima que se producen unas 25.000 toneladas por año de harinas proteicas de girasol y soja, que serán destinadas al mercado interno, sustituyendo importaciones que actualmente el país se ve obligado a realizar.

Estas harinas son principalmente utilizadas para la alimentación animal. La industria alimentaria necesita como ingredientes productos con características más específicas como ser agentes espumantes, emulsionantes, espesantes, con alta capacidad de retención de agua, etc.; por lo que si se logra un ingrediente con estas propiedades mejoradas, se le estará dando un mayor valor agregado a un subproducto industrial, lo cual será beneficioso para el país.

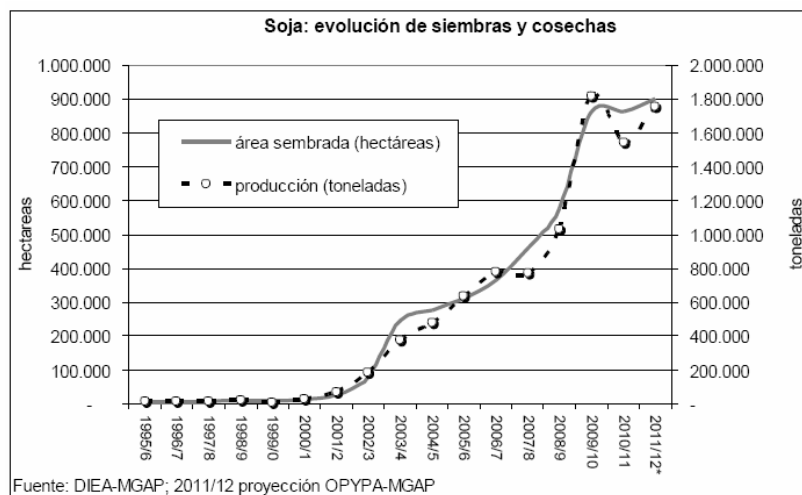


Figura 1.1 Evolución de área sembrada y producción de soja en Uruguay. Tomado del Anuario 2011 de la Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

Para extraer el aceite de soja, tradicionalmente las semillas se limpian y se descascaran, se trituran y luego el aceite se extrae con solvente orgánico, el residuo de

esta extracción es la harina desgrasada que se utiliza para alimentación animal y derivados proteínicos para consumo humano tales como harinas, concentrados y aislados proteicos (Baduí, 2006b).

Las propiedades funcionales de las distintas formas comerciales de la soja varían de acuerdo con su composición química y su método de obtención, y en consecuencia, su empleo se limita a ciertos productos alimenticios en donde se desarrollan y se aprovechan verdaderamente dichas propiedades. Las propiedades funcionales incluyen su capacidad como agente emulsionante, espesante, hidratante, gelificante, espumante, formador de películas, promotor de viscosidad, etc. (Badui, 2006a).

1.2 Proteínas de soja

La soja contiene una variedad de proteínas con propiedades únicas para las semillas en germinación. Las proteínas son utilizadas como alimentos de consumo humano antes de 2800 AC, cuando la soja fue domesticada en China. Las características de los alimentos de soja son atribuibles en parte a las proteínas. La mayor proporción de las proteínas de la semilla son las proteínas de almacenamiento, glicinina y β -conglucina, que no tienen otra actividad más que el almacenamiento de nitrógeno aminoacídico para la germinación de las semillas. Las estructuras de estas dos proteínas están relativamente conservadas a través de muchas especies de leguminosas y otras plantas relacionadas en familias de genes importantes de las leguminas y vicilinas. Las proteínas de la semilla representan entre el 30 y el 50% de la masa de esta siendo las proteínas de almacenamiento el 65-80% del total de proteína. Las proteínas de soja desde el punto de vista nutricional tienen excelentes perfiles de aminoácidos para los seres humanos, aunque son deficientes en aminoácidos azufrados para el ganado y roedores (Murphy, 2008).

1.2.1 Estructuras subcelulares de las semillas

Las proteínas de soja se empaquetan en estructuras subcelulares discretas esféricas llamadas cuerpos proteicos en las células de tipo empalizada de los cotiledones de soja (Figura 1.1). Las estructuras de almacenamiento de las proteínas de soja para glicinina y β -conglucina aparentemente están muy conservadas y maximizan el

almacenaje de las proteínas en los cuerpos proteicos. Los diámetros promedio de los cuerpos proteicos son de 8 a 10 micrómetros, pero pueden variar de 2 a 20 micrómetros. En los cotiledones de soja crudos o tratados mínimamente por calor, las proteínas de soja son fácilmente solubles en agua a pH neutro (Murphy, 2008).

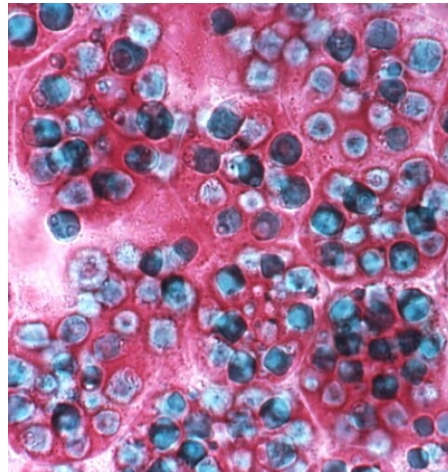


Figura 1.1 Micrografía de cotiledones de soja donde en azul se observan los cuerpos proteicos. Tomado de:
<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT410/anatweb/pages/default.htm>

1.2.2 Proteínas de almacenamiento.

Las proteínas de soja de almacenamiento son miembros de grandes familias de proteínas relacionadas, las leguminas y las vicilinas.

El extracto acuoso a pH 7-8 de proteínas de soja, puede ser fraccionado por distintos métodos, entre otros: cromatografía de exclusión molecular, precipitación fraccionada (isoelectrica, crioprecipitación, con sulfato de amonio, con solventes orgánicos), extracción fraccionada, ultracentrifugación y métodos inmunológicos. El análisis por ultracentrifugación basado en los coeficientes de sedimentación de las globulinas de soja en disoluciones de pH 7,6 y fuerza iónica 0,5 M, permite la separación en cuatro fracciones mayoritarias 2S (15%), 7S (34%), 11S (41,9%) y 15S (9,1%) (Wolf y Briggs, 1956; Koshiyama, 1969), siendo cada fracción una mezcla compleja de proteínas (Wolf, 1972). En tanto que por métodos inmunológicos han sido clasificadas como α , β y γ conglicina y glicina (Catsimpoolas y Ekenstain, 1969) (Tabla 1.1).

La Tabla 1.1 muestra los componentes de las proteínas mayoritarias del poroto de soja. La fracción 2S está formada por los inhibidores de la tripsina Bowman-Birk y de Kunitz, citocromo C y α -conglucina (Catsimpoolas y Ekenstam, 1969; Wolf, 1970). La fracción 7S es muy heterogénea, el componente mayoritario es β -conglucina, encontrándose también γ -conglucina, globulina 7S básica, lipoxigenasas, α -amilasas y hemaglutininas (o lectinas) (Nielsen, 1985; Hirano et al., 1987). Mientras que la globulina 11S está formada por glicina (Yamauchi et al., 1984) y la fracción 15S, por un dímero de glicina, estable a fuerza iónica superior a 0,5 (Wolf, 1970, Wolf y Nielsen, 1996).

La acidificación a pH 4,5 – 4,8 del extracto acuoso obtenido en medio alcalino a partir de harina de soja (Fukushima, 1991b) provoca la precipitación isoeléctrica del 75% de las proteínas presentes (Puppo, 1997), básicamente globulinas 7S y 11S. El sobrenadante obtenido de la precipitación isoeléctrica contiene, principalmente la fracción 2S y componentes de la fracción 7S, denominadas proteínas del suero; mientras si la extracción de las proteínas se realiza con solución salina, uno de los componentes del suero es la globulina 7S básica (pI = 9,05-9,26).

Tabla 1.1. Cantidades aproximadas y componentes de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación de las proteínas de soja extraídas en agua.

Fracción	Proteína (%)	Componentes	Peso molecular (kDa)
2S	22	inhibidores de tripsina	8 - 21,5
		citocromo C	12
		α -conglucina	18-33
7S	37	β -conglucina,	150 - 200
		γ -conglucina,	105-150
		globulina 7S básica	168
		lipoxigenasas	102
		β -amilasas	62
		hemaglutininas	110
11S	31	glicina	300 - 350
15S	11	dímero de glicina	600 - 720

(Wolf, 1970; Fukushima, 1991b)

De todas estas fracciones de globulinas la glicinina y la β -conglucina son las proteínas mayoritarias (Yamauchi et al., 1984; Añón, 2004) y a su vez las de mayor importancia (Renkema, 2001). La glicinina, es el miembro de la familia de legumina y la β -conglucina de la familia vicilina (Murphy, 2008).

1.2.3 Glicinina

Las globulinas tipo 11S son las proteínas de reserva más ampliamente distribuidas en semillas, no solamente presentes en leguminosas sino también en arroz, avena, sésamo, colza, calabaza y otras (Fukushima, 1991a). Generalmente son proteínas no glicosiladas de alta masa molecular, 300 a 400 kDa (Staswick et al., 1981).

La glicinina de soja está compuesta por un polipéptido ácido, A, de masa molecular 31-45 kDa (Brooks y Morr, 1985; Hermansson, 1986) y pI 4,8-5,5 (Staswick et al., 1981; Hermansson, 1986; Lei y Reeck, 1987) y un polipéptido básico, B, de masa molecular 18-20 kDa y pI 6,5-8,5 (Staswick et al., 1981; Hermansson, 1986; Lei y Reeck, 1987), unidos por un puente disulfuro.

Utilizando microscopía electrónica y difracción de rayos X de pequeño ángulo en globulinas de distinto origen, por ejemplo glicinina de soja (Badley et al., 1975), legumina de arveja (Tulloch y Blagrove, 1985), heliantina de girasol (Reichelt et al., 1980; Plietz et al. 1983b) y otras, se logró conocer la forma y las dimensiones de las moléculas. A partir de estos datos se elaboraron diversos modelos para la estructura tridimensional, compuestos por dos trímeros. Uno de los más difundidos (Badley et al., 1975) es el modelo de dos hexágonos paralelos, superpuestos, cada uno con tres subunidades AB. Esta disposición da por resultado un cilindro, más ancho que alto, de $11 \times 11 \times 7,5$ nm, con un orificio central. El modelo de Badley et al. (1975), sin embargo, no está en total acuerdo con las observaciones de Lakemond et al. (2000 a,b), quienes encontraron que las subunidades básicas B hidrofóbicas están ubicadas predominante en el interior de la molécula mientras que las subunidades A, ácidas, más hidrofílicas permanecen en el exterior de la misma. Otro modelo algo más complejo y también ampliamente aceptado es el modelo del antiprisma trigonal (Plietz et al., 1983b).

Las fuerzas de interacción entre los trímeros son electrostáticas y por puentes de hidrógeno (Badley et al., 1975; Peng et al., 1984; Utsumi et al., 1997) y entre los pares AB dentro del hexágono son de naturaleza hidrofóbica (Badley et al., 1975; Reichelt et al., 1980). Las dos cadenas de polipéptidos A y B de las subunidades están unidas por

enlaces disulfuro y tienen diferentes funciones en la estabilización de la estructura globular. Las interacciones hidrofóbicas no específicas de las subunidades B son las que permiten que se ensamblen en una estructura cuaternaria tipo legumina, incluso subunidades de varias globulinas 11S (Plietz et al., 1987). Mientras que las regiones N-terminales de los polipéptidos A y B tienen una secuencia constante, formando dos dominios estructurales, la región hidrofóbica C-terminal de las cadenas B muestra cierta variabilidad secuencial y se supone que causa las interacciones no específicas entre subunidades (Plietz et al., 1987; Lakemond et al., 2000 a, b). Por el contrario, la región fuertemente hidrofílica C-terminal de la cadena A, que está localizada en la superficie de la molécula proteica protege a los dominios del solvente (Plietz et al., 1987, Lakemond et al., 2000 a, b).

En ambos casos los datos experimentales no concuerdan exactamente con los que arrojan los modelos y esto se debe a que, los modelos propuestos, asumen que todas las subunidades son esferas de igual tamaño (l'Anson et al., 1987) y también a la composición frecuentemente variable de las subunidades surgidas de diferentes genes y a algunas regiones hipervariables, las cuales podrían adaptarse a una estructura secundaria definida (Lawrence, 1999).

En la Figura 1.2 se muestra una representación esquemática de la glicinina.

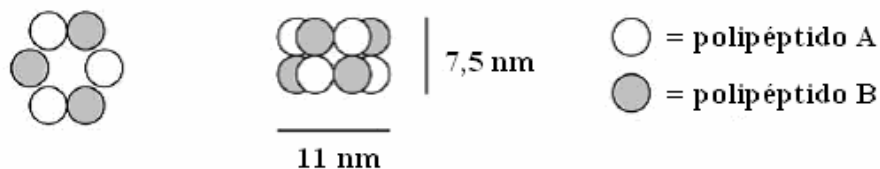


Figure 1.2 Representación esquemática de la molécula de glicinina de acuerdo con Badley et al., (1975) (Tomado de Martin et al., 2002).

Argos et al. (1985) predijeron la estructura secundaria de la glicinina y la β -conglucina a partir de los datos de la secuencia aminoacídica. Ambas globulinas tienen características estructurales comunes. El conocimiento de la secuencia aminoacídica completa de las globulinas ha permitido predecir su estructura secundaria. Ambas globulinas tienen contenidos similares de α -hélice (25%), hoja β (25%), hoja β plegada (42%) y de estructura desordenada (8%) (Figura 1.4A) (Añón, 2004).

Los péptidos ácido-base son los productos de al menos cinco familias de genes: GY1 productores de $A_{1a}B_{1b}$; GY2 productores de A_2B_{1a} ; GY3 productores de $A_{1b}B_{1b}$;

GY4 productores de A₅A₄B₃, y GY5 productores de A₃B₄ (Nielsen, 1985). El grupo de trabajo del Dr. Utsumi ha identificado los pares ácido-básicos como; Gly I = A_{1a}B_{1b}; Gly 2= A₂B_{1b}; Gly3 = A_{1b}B₂; Gly4 = A₄A₅B₃, y Gly5 = A₃B₄ (Utsumi et al., 1997). Los pares de glicinina, según Staswick et al. (1981) y Utsumi et al. (1997), se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Contenido de amino ácidos azufrados de las subunidades de glicinina (modificada de Staswick et al., 1981 y Utsumi et al., 1997)

Ácido	#M	#C	Básico	#M	#C	Complejo-AB	Total C	Total S
Staswick et al., 1981								
A _{1a}	4	3	B ₂	3	1	A _{1a} B ₂	4	11
A _{1b}	4	6	B _{1b}	2	1	A _{1b} B _{1b}	7	13
A ₂	6	6	B _{1a}	2	2	A ₂ B _{1a}	8	16
A ₃	2	3	B _{1a}	1	1	A ₃ B ₄	4	7
A ₄ A ₅	2	2	B ₄	0	1	A ₄ A ₅ B ₃	3	5
A ₆	?		B ₃					
Utsumi et al., 1997								
A _{1a}	3	6	B _{1b}	3	2	A _{1a} B ₂	8	14
A _{1b}	3	6	B ₂	2	2	A _{1b} B _{1b}	8	13
A ₂	5	6	B _{1a}	2	2	A ₂ B _{1a}	8	15
A ₃	2	4	B ₄	2	2	A ₃ B ₄	6	10
A ₄ A ₅	2	4	B ₃	0	2	A ₄ A ₅ B ₃	6	8

M=metionina, C=cisteína, tomado de Murphy (2008)

Además del único disulfuro de cisteína entre cada par no aleatorio de péptidos ácido-base, los péptidos glicinina contienen residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro internos, y metionina principalmente entre los péptidos ácidos. Los residuos de cisteína también pueden seguir estando reducidos en la glicinina madura. La distribución de los aminoácidos azufrados entre los pares de péptidos ácido-básicos no es uniforme (Murphy, 2008).

1.2.4 β -Conglicinina

La β -conglucina representa entre el 30 y el 50% de las proteínas totales de la semilla. Pertenece, tal como se ha indicado previamente, a una clase de proteínas que se encuentra presente en otras plantas, en general leguminosas, con el nombre genérico de vicilinas. Las más estudiadas junto a la β -conglucina de soja son la convicilina de arveja y la vicilina del poroto alubia (Gueguén y Cerletti, 1994; Derbyshire et al., 1976; Fukushima, 1991a). La β -conglucina es una glicoproteína globular trimérica (7S) (Figura 1.3) de masa molecular 140-200 kDa (Thanh y Shibasaki, 1977; Fukushima, 1991b) y punto isoeléctrico 4,6 (Koshiyama, 1983), constituida por tres tipos de subunidades: α (57-76 kDa), α' (57-72 kDa) y β (42-53 kDa) (Thanh y Shibasaki, 1977; Nielsen, 1985; Shattuck-Eidens y Beachy, 1985; Yamauchi et al., 1991; Ogawa et al., 1995), cuyos puntos isoeléctricos son 4,9, 5,2 y 5,7-6,0 respectivamente (Thanh y Shibasaki, 1977; Yamauchi et al., 1981).

Esta estructura cuaternaria trimérica, estabilizada a fuerza iónica superior a 0,5, presenta heterogeneidad, encontrándose constituida por siete combinaciones diversas de oligómeros: (B_0 - B_6) : B_1 ($\alpha'\beta_2$), B_2 ($\alpha\beta_2$), B_3 ($\alpha\alpha'\beta$), B_4 ($\alpha_2\beta$), B_5 ($\alpha_2\alpha'$), B_6 (α_3) (Thanh y Shibasaki, 1976a, 1977; Sykes y Gayler, 1981; Nielsen, 1985) y B_0 (β_3) (Yamauchi et al., 1981). Las subunidades presentan gran homología en la secuencia aminoacídica, no obstante las subunidades α' y α poseen un residuo de cisteína cada uno localizado cerca del extremo N-terminal, mientras que la subunidad β no posee ninguno por lo que no se forman uniones disulfuro entre las subunidades, estando asociadas por interacciones hidrofóbicas y puente de hidrógeno (Thanh y Shibasaki, 1976a; Thanh y Shibasaki, 1978a). Los trímeros contienen cinco metioninas, una en α y cuatro en α' (Utsumi et al., 1997). El contenido de triptófano también es muy bajo (α' :2, α :1, β :0 residuos). Los tres péptidos de β -conglucina están glicosilados a través de residuos de asparagina. α y α' tienen dos sitios de glicosilación, mientras que β tiene sólo uno. Las subunidades de β -conglucina están glicosiladas en: α (Asn 199 y Asn 455) y α' (Asn 215 y Asn 471) ambas tienen dos cadenas de carbohidrato con dos moles de glucosamina y tres moles de manosa por cadena de carbohidrato, y β (Asn 328) tiene una cadena de carbohidrato con una contribución total de 3-5% al peso molecular (Thanh y Shibasaki, 1976a; Maruyama et al., 2002). Las subunidades α y α' presentan mayor carácter hidrofílico debido al mayor grado de glicosilación y a la inserción de un dominio hidrofílico α

hélice que no está presente en la subunidad β y que les confiere un mayor peso molecular.

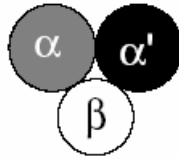


Figura 1.3 Representación esquemática de la molécula de β -conglicina (tipo $\alpha\alpha'\beta$) (tomado de Renkema, 2001)

Se han encontrado múltiples formas de β -conglicina que surgen de diferentes combinaciones de las subunidades constitutivas (Thanh y Shibasaki, 1976a, Morita et al., 1996). El modelo estructural aceptado para las vicilinas indica que presentan la forma de discos planos de 8,5 nm de diámetro y 3,5 nm de espesor (Plietz et al., 1983a; Tuloch y Blagrove, 1985). Mediante cristalografía de rayos X se determinaron las estructuras cristalinas de homotrimeros nativos y recombinantes de β -conglicina (Maruyama et al., 2001) y de proteínas semejantes como faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Lawrence et al., 1990). Esos estudios han indicado que cada polipéptido está compuesto por dos módulos estructurales similares y cada módulo consiste en un barril β y tres hélices α . El módulo que corresponde al extremo N-terminal se conecta al barril β del extremo C-terminal a través de una cuarta hélice α que se encuentra a continuación del dominio α -hélice N-terminal (Figura 1.4B). La estructura completa trimérica se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas entre el dominio α -hélice del C-terminal de una subunidad y el dominio α -hélice N-terminal de la otra.

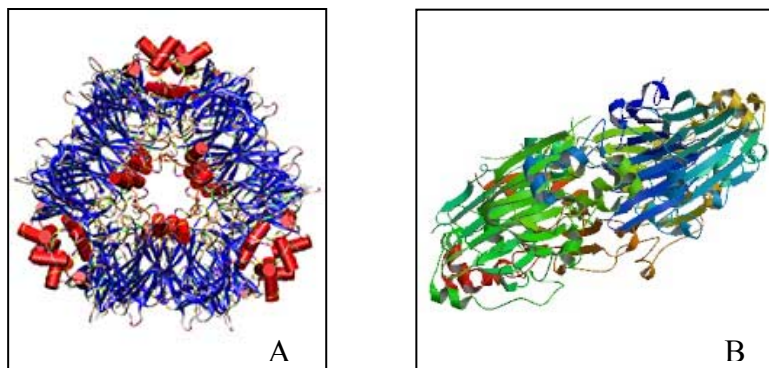


Figura 1.4 Representación de la estructura de la glicinina (A) y de la β -conglicina (B).

1.3 Efecto de pH y μ en la estructura de glicinina y β -conglucina

El pH y la fuerza iónica determinan la estructura cuaternaria de la β -conglucina (Brook y Morr, 1985; Thanh y Shibasaki, 1979; Iwabuchi et al., 1991) y de la glicinina (Hermansson, 1986; Lakemond et al., 2000a.; van Vliet et al., 2002).

1.3.1 Glicinina

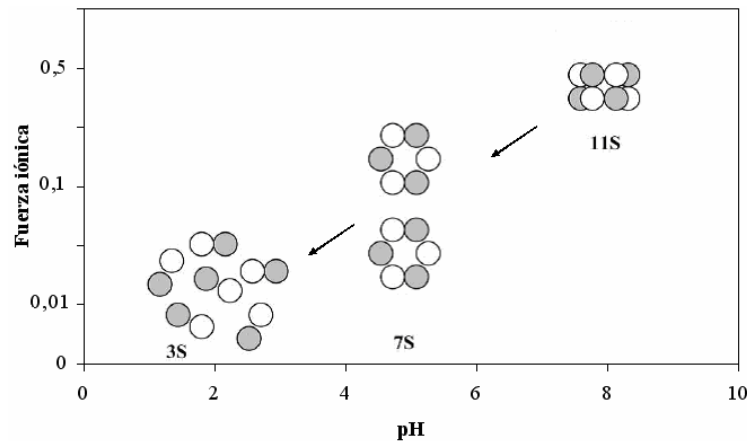


Figura 1.5 Representación esquemática de la disociación de la molécula de glicinina de su forma de hexámero (11S) en sus formas trímica (7S) y subunidades AB (3S) en distintas condiciones de pH y fuerza iónica (adaptación de Martin et al., 2002).

A pH 7,6 y fuerza iónica 0,5 la glicinina está presente principalmente en la forma hexamérica de 360 kDa con un coeficiente de sedimentación de 11S (Badley et al., 1975). Distintas investigaciones demuestran que la estructura cuaternaria de la glicinina está regulada por la fuerza iónica (μ) y, con más eficacia, por el pH. En la Figura 1.5 se representa esquemáticamente la disociación de la molécula de glicinina en distintas condiciones de pH y fuerza iónica. La disminución de la fuerza iónica de 0,5 a 0,1 induce la disociación de la glicinina 11S en glicinina 7S (trímeros (AB)₃) y 3S (subunidades AB), mientras que a alta fuerza iónica ($\mu \geq 0,5$) la molécula se asocia parcial y reversiblemente a formas 15S (dímeros de 11S) (Lakemond et al., 2000a). Indicios de tal disociación-asociación han sido divulgados previamente (Wolf y Briggs, 1958; Wolf et al., 1958; Brook y Morr, 1985; Utsumi et al., 1987 y 1997; Wolf, 1993; Wolf y Nielsen, 1996). Wolf et al., (1958) encontraron que a pH 2,2-3,8 el complejo de la glicinina está presente en la forma 7S y/o 3S. Entonces diversas cantidades de las formas 3S, 7S y 11S están presentes a distintos pH y μ . Wolf y Briggs (1958) encontraron que a pH 6,7 y $\mu = 0,5$ la glicinina está en las formas 3S, 7S, 11S y 15S en

proporciones de 0, 3, 57 y 30% respectivamente, mientras a pH 3 y $\mu = 0,01$ las proporciones de las formas 3S, 7S y 11S son 70, 27 y 0%, respectivamente.

La disociación-asociación de las distintas formas de la glicinina es debida principalmente a la repulsión electrostática (Martin et al., 2002). La disociación de 11S en 7S también parece estar correlacionada con cambios significativos en el nivel de desdoblamiento secundario y en un grado inferior, con el del terciario (Lakemond et al., 2000a). También se ha divulgado que a valores de pH bajos (< 3) existe desplegamiento terciario (Catsimpoolas et al., 1969; Koshiyama, 1972) y secundario (Koshiyama, 1972), donde predomina la presencia de la forma 3S (subunidad AB).

1.3.3 β -Conglicinina

En la Figura 1.6 están representados esquemáticamente los cambios conformacionales de β -conglucina en distintas condiciones de pH y fuerza iónica.

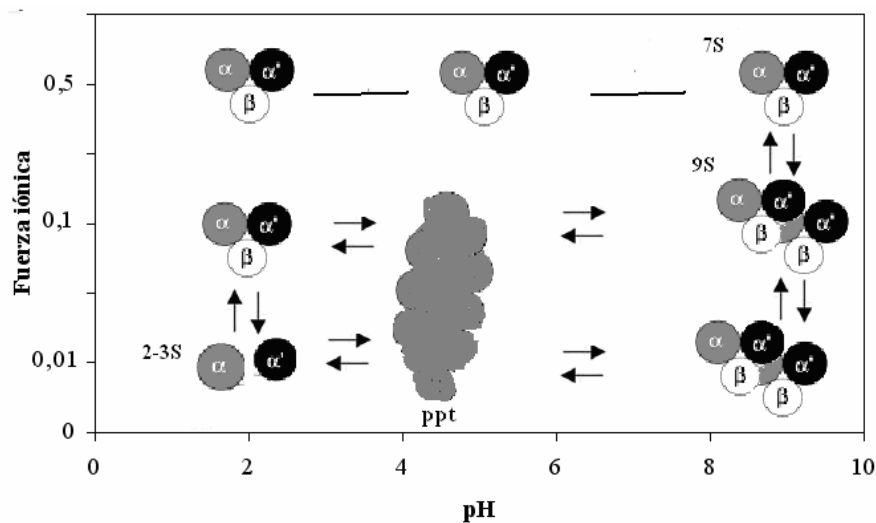


Figura 1.6 Representación esquemática de los cambios conformacionales de β -conglucina en distintas condiciones de pH y fuerza iónica; (ppt) precipitación isoelectrica (adaptado de Thanh y Shibasaki, 1979)

En el intervalo pH 2-10 y fuerza iónica mayor de 0,1 la β -conglucina es una glicoproteína trimérica (una globulina 7S) (Koshiyama, 1968, 1983; Thanh y Shibasaki, 1979). A fuerza iónica menor de 0,1 y a $\text{pH} \geq 5$, la β -conglucina se dimeriza obteniéndose la forma hexamérica (9S), (Koshiyama, 1968, 1983; Thanh y Shibasaki, 1979), con la excepción de los oligómeros B₀ y B₆ (Brook y Morr, 1985). En la región

intermedia de fuerza iónica están presentes distintas cantidades de β -conglucina 7S y 9S (Koshiyama, 1968).

En el intervalo de pH 2-5 y a fuerza iónica menor de 0,1 la β -conglucina se disocia reversiblemente (Thanh y Shibasaki, 1979) en fracciones 2-3S y 5-6S (Wolf, 1972; Koshiyama, 1983).

Las subunidades α y α' , con mayor contenido de glúcidos que la subunidad β , son de naturaleza hidrofílica mientras que la subunidad β se caracteriza por ser más hidrofóbica (Thanh y Shibasaki, 1978 a y b), por lo que a fuerzas iónicas bajas ($\mu < 0,01$ M) y a valores de pH menores de 5 y mayores de 10, independientemente de la fuerza iónica, las subunidades α y α' se disocian del protómero mayor (Thanh y Shibasaki, 1978 a y b, Thanh y Shibasaki, 1979; Iwabuchi et al., 1991).

1.4 Fraccionamiento de proteínas de almacenamiento de soja

Thanh y Shibasaki (1976b) reportaron el primer método reproducible para aislar glicina y β -conglucina que se considera el estándar de oro en el fraccionamiento de la proteína de soja mediante el aprovechamiento de la solubilidad diferencial con el pH de las dos proteínas de almacenamiento en buffer tris (trihidroxiaminometano) con β -mercaptoetanol como agente reductor. El método completo de Thanh y Shibasaki requiere además purificar por tamaño, utilizando cromatografía de exclusión con Sepharose 6B y cromatografía de afinidad con Con-A Sepharose 4B que se une preferentemente a la glicoproteína, β -conglucina, la cual luego se eluye con metil-D-manósido. El resultado del fraccionamiento isoeléctrico seguido por cromatografía de afinidad y exclusión molecular es una glicina y β -conglucina bastante puras, sin embargo, este es un proceso largo. La precipitación isoeléctrica sola, resulta en una fracción glicina de 79% de pureza con una contaminación de β -conglucina del 6% y una fracción β -conglucina de 52% de pureza con contaminación glicina del 3% (Wu et al., 1999). O'Keefe et al. (1991) añadieron un paso intermedio de pH al fraccionamiento descrito por Thanh y Shibasaki, resultando en mayores purezas de β -conglucina, pero a expensas del rendimiento. Claramente, los intentos de mejorar la pureza de glicina y β -conglucina fue posible a escala de laboratorio en el orden de mg, pero las grandes cantidades necesarias para la evaluación de la funcionalidad y el trabajo en planta piloto necesita un enfoque diferente a la cromatografía de proteínas tradicional.

Nagano et al. (1992) desarrollaron un método de fraccionamiento de proteínas de soja que podría ser escalado. Estos autores modificaron la etapa del método precipitación isoelectrica de Thanh y Shibasaki mediante la extracción de las proteínas de soja en agua a pH 7,5, utilizando bisulfito de sodio como agente reductor y produjeron tres fracciones por precipitación isoelectrica a pH 6,5, 5,0 y 4,8. La fracción de pH 4,8 corresponde a β -conglucina con más de un 90% de pureza. A pH 5,0 se obtiene una mezcla de ambas proteínas de almacenamiento, y a pH 6,5 se extrae la glicina pura. Murphy (2008) asevera que con el método de Nagano et al. se obtiene una pureza de glicina de aproximadamente 96% mientras que la pureza de β -conglucina no supera el 78%. A pesar de que esta última fracción contiene impurezas significativas, según Murphy (2008) este último método es mejor que el simple fraccionamiento isoelectrico de Thanh y Shibasaki (1976b). El escalado del proceso a planta piloto con 15 kg de material de partida dió lugar a algunas reducciones de las puras de glicina y β -conglucina, 84% y 72%, respectivamente. Sin embargo, la producción de cantidades en el orden de los kg de las dos fracciones de proteína fue viable. El refinamiento adicional de escala planta piloto del fraccionamiento de glicina y β -conglucina dió como resultado mayores rendimientos de ambas proteínas, pero a expensas de la pureza de β -conglucina mediante la eliminación de la fracción de proteína intermedia (Wu et al., 2000) o la optimización de la temperatura de la extracción (Rickert et al., 2004). Wu et al. (1999) y Rickert et al. (2004) muestran claramente que las proteínas de soja necesitan la menor desnaturalización por calor posible en la preparación de las hojuelas desgrasadas para obtener un fraccionamiento eficaz de estas dos proteínas. La fracción intermedia, en estos procesos, está constituida por glicina y β -conglucina desnaturalizadas. La baja solubilidad proteica de los materiales de partida resulta en grandes fracciones intermedias y bajos rendimientos de glicina y β -conglucina.

Cada una de las modificaciones antedichas han dado lugar a fracciones enriquecidas de glicina y β -conglucina pero no puras. El efecto de la interacción entre las subunidades de las dos proteínas de almacenamiento en las evaluaciones de la funcionalidad es importante en la determinación de relaciones estructura-funcionalidad (Murphy, 2008).

1.5 Estabilidad térmica

Según Pernollet y Mosse (1983), las leguminas tienen mayores temperaturas de desnaturalización que las vicilinas. La glicinina tiene una temperatura de desnaturalización aparente de 90°C, mientras que la β -conglucina se desnaturaliza a 75°C (Hermansson, 1979a). El mecanismo de desnaturalización es controlado por la composición de las subunidades, las interacciones entre las mismas, la fuerza iónica y los agentes reductores y puede conducir a la eventual agregación y reacciones de polimerización (Wolf y Nielsen, 1996; Nakamura et al, 1984; Utsumi et al, 1997). Hermansson (1979b) mostró por medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que la β -conglucina tiene diferentes temperaturas de transición térmica, desde 67°C a fuerza iónica cero y hasta 87°C en una μ de 0,1 M. La glicinina mostró un patrón similar con temperaturas máximas de deflexión de 80°C y 103°C, respectivamente. Sin embargo, Hashizume y Watanabe (1979) mostraron que mientras que la glicinina se estabiliza con el aumento de μ , la β -conglucina se vuelve más sensible a la temperatura (Murphy, 2008).

1.6 Propiedades funcionales de proteínas

Las preferencias de los consumidores por unos u otros alimentos están basadas primordialmente en atributos sensoriales como la textura, el color, el sabor y el aspecto. Estos atributos sensoriales son consecuencia del efecto neto de interacciones complejas entre diversos componentes mayoritarios y minoritarios del mismo (Cheftel et al., 1993).

Generalmente las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales de los alimentos (Damodaran, 1996).

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden definir como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de estas macromoléculas en los sistemas alimenticios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo. (Kinsella, 1976; Visser y Thomas, 1987). Dentro de las propiedades funcionales de las proteínas que determinan la funcionalidad de un alimento, se encuentran la solubilidad, la viscosidad, la textura, la adsorción de agua y grasa y la capacidad de emulsificación, espumado y gelificación (Kinsella, 1979; Hermansson, 1979a; Phillips et al., 1994), (ver Tabla 1.3). Adicionalmente, interactúan

con otros componentes y mejoran los atributos de calidad de los alimentos. Las propiedades funcionales están vinculadas a las interacciones de las proteínas con el agua, lípidos, glúcidos, hidrocoloides, entre moléculas de la misma proteína y entre distintas proteínas (Phillips et al., 1994).

Tabla 1.3 Propiedades funcionales de proteínas

Propiedad General	Criterio funcional
Organoléptica	Color, aroma, sabor
Kinestésica	Textura, suavidad, arenosidad, turbidez, palatabilidad
Hidratación	Solubilidad, adsorción de agua, viscosidad, retención de agua, humectabilidad, gelificación, sinéresis
Superficial	Emulsificación, espumado, formación de películas
Fijación	Fijación de lípidos, fijación de aromas
Reológica/estructural	Elasticidad, cohesividad, dureza, masticabilidad, adhesividad, formación de redes, agregación, formación de masa, texturizabilidad, extrudabilidad

(Phillips et al., 1994)

Cheftel et al. (1993), clasifican las propiedades funcionales de las proteínas en tres grupos: *propiedades de interacción proteína-agua o hidratación* (solubilidad, absorción y retención de agua, viscosidad), *las propiedades de interacción proteína-proteína* (gelificación, texturización, formación de películas, entre otras) y *propiedades de superficie*, las cuales dependen de la interacción de la proteína con dos fases inmiscibles como aire/agua o aceite/agua. Dentro de estas últimas propiedades funcionales se encuentran el espumado y la emulsificación. Estos grupos están interrelacionados entre sí, ya que algunas propiedades funcionales pueden implicar más de un tipo de interacción, como por ejemplo la gelificación que depende tanto de la interacción proteína-proteína como de la interacción proteína-agua. La clasificación de las propiedades funcionales según el tipo de interacción no significa que dicha interacción sea la que exclusivamente se establezca, sino la que predomina. Incluso, en algunos casos, por ejemplo la viscosidad, tanto las interacciones macromolécula-solvente, como las que se establecen entre las macromoléculas son del mismo nivel de

importancia para la propiedad funcional y lo mismo sucede con el fenómeno de gelificación (Cheftel et al., 1993).

Cabe destacar que el concepto de propiedad funcional puede aplicarse a otros componentes normalmente presentes en los alimentos, como los hidratos de carbono y los lípidos.

Las propiedades funcionales de una proteína están determinadas fundamentalmente por sus propiedades físicas, químicas y estructurales. Estas propiedades incluyen tamaño, forma, composición y secuencia aminoacídica, cociente hidrofiliicidad/hidrofobicidad, carga neta y su distribución, contenido y distribución de estructura secundaria (α -hélice, hoja β , etc.), arreglos de estructura terciaria y cuaternaria de segmentos polipeptídicos, entrecruzamientos inter e intracatenarios por uniones disulfuro, grado de flexibilidad-rigidez de la proteína en respuesta a cambios externos y la capacidad de interaccionar con, o repeler, otros componentes (Damodaran, 1989, 1996).

El método de obtención, las condiciones de procesamiento (acidez, fuerza iónica y particularmente tiempo y temperatura), naturaleza del medio (acuoso u oleoso), la composición y las características del medio al cual se aplican (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) y la interacción con otros componentes modifican las propiedades funcionales de las proteínas (Damodaran, 1989; Tolstoguzov, 1993). Estas modificaciones son simplemente una consecuencia de los cambios estructurales y conformacionales acaecidos en la proteína debido a variaciones en factores ambientales (Damodaran, 1989).

El mejor conocimiento de la funcionalidad de una proteína puede obtenerse cuando el constituyente proteico del sistema modelo a ensayar es una proteína única, purificada y de estructura nativa conocida (Cheftel et al., 1989). Se han establecido unas cuantas correlaciones empíricas entre propiedades moleculares y ciertas propiedades funcionales en sistemas modelo. Sin embargo la mayor parte de los ingredientes proteicos disponibles para uso industrial son mezclas de proteínas que contienen apreciables cantidades de glúcidos, lípidos, sales minerales, polifenoles, etc. y además esos mismos compuestos son componentes de los alimentos reales, con los cuales las proteínas interaccionan. Aunque los aislados proteicos contienen menos constituyentes no proteicos, como fueron expuestos a ciertos tratamientos, a menudo drásticos, su estructura inicial y funcionalidad pueden resultar afectadas (Cheftel et al., 1989; Damodaran, 1996). Por otra parte durante la fabricación de los alimentos es factible que

ocurra desnaturalización de proteínas (Damodaran, 1996). Todos esos fenómenos modifican el comportamiento funcional de las proteínas, por consiguiente la funcionalidad asociada con las características estructurales de cierta proteína no necesariamente evidenciará las propiedades del sistema alimentario (Arteaga et al., 1993a; Arteaga y Nakai, 1993b).

Carp (2001), propuso tres niveles de evaluación de la funcionalidad de una proteína:

- a) análisis a nivel molecular donde se estudia la estructura molecular, tipos de enlace, características eléctricas, características térmicas, etc.;
- b) en sistemas modelo, donde se utilizan pequeñas cantidades de muestra y la composición del sistema no es compleja.
- c) en sistemas reales donde se formula el alimento y se requieren mayores cantidades de muestra y el sistema es múltiple y complejo.

Todas estas estrategias tienen ventajas y desventajas. La evaluación en sistemas reales permite evaluar la contribución funcional de la proteína en el producto final, es indispensable en etapas de optimización y definición de la tecnología industrial de producción, pero los ensayos de utilización son costosos, exigen mucho tiempo y solo se tiene una información empírica del proceso. En los estudios con sistemas modelo se puede realizar una evaluación rápida y comparativa de proteínas de distinto origen o distintas tecnologías de obtención y es factible realizar ciertas correlaciones entre propiedades físicas y químicas de las proteínas y la funcionalidad estudiada, pero como las proteínas poseen multitud de propiedades físicas y químicas, es difícil delimitar el papel que cada una de ellas juega en una determinada propiedad funcional. (Damodaran, 1996). Además, el comportamiento en los sistemas modelo no siempre es el mismo que en los alimentos reales. El análisis a nivel molecular permite conocer las causas moleculares de la funcionalidad, esto es importante ya que permite proyectar las mejores técnicas de procesamiento, tanto en la obtención del ingrediente proteico como en la elaboración del propio alimento, para conservar o mejorar la funcionalidad. También, permite desarrollar estrategias para modificar las características conformacionales y estructurales de las proteínas alimentarias y así lograr la funcionalidad específica deseada (Scilingo, 2000). Cabe sin embargo señalar que predecir fiablemente las propiedades funcionales a partir de sus propiedades moleculares hasta el momento es dificultoso.

En la Tabla 1.4 se muestran las relaciones existentes entre las propiedades moleculares, funcionales y estructurales de las proteínas.

A nivel empírico, las diversas propiedades funcionales de las proteínas pueden considerarse como una manifestación de dos aspectos moleculares de las mismas: a) las

Tabla 1.4. Relación entre las propiedades funcionales, moleculares y estructurales de las proteínas. (Damodaran, 1989)

Propiedades moleculares	Propiedades funcionales	Propiedades estructurales
Hidrodinámicas	Viscosidad, Gelificación	Forma, tamaño
Superficie	Solubilidad	Composición aminoacídica
	Espumado	Distribución aminoacídica
	Emulsificación	Flexibilidad molecular
	Retención de lípidos	

propiedades hidrodinámicas, b) las propiedades relacionadas con la superficie (Damodaran, 1996). Algunas propiedades funcionales como la viscosidad, la gelificación y la texturización, están relacionadas con las propiedades hidrodinámicas de las proteínas que dependen del tamaño, la forma y la flexibilidad molecular. Otras como la humectabilidad, la dispersabilidad, la solubilidad, las propiedades espumantes, emulsionantes y de fijación de saborizantes están relacionadas con las propiedades químicas y topográficas de la superficie de las proteínas.

1.6.1. Propiedades funcionales de superficie

El principal objetivo de la industria alimentaria es la de elaborar productos que tengan un impacto en el consumidor. Entre éstos, las dispersiones o coloides alimentarios (espumas y emulsiones), que incluyen a alimentos tradicionales y a nuevas formulaciones de alimentos, ocupan un lugar destacado. La producción y estabilización de estas dispersiones requieren el concurso de sustancias conocidas como agentes emulsionantes o espumantes (proteínas, lípidos, fosfolípidos, tensioactivos, polisacáridos, etc.), cuya función es la de situarse en las interfases fluidas que separan las partículas de la fase dispersa (Rodríguez Patino et al., 2009).

Muchos alimentos naturales o procesados son dispersiones o han sido una dispersión durante alguna de las etapas de su producción. Además, la mayoría de estas dispersiones son emulsiones y espumas (Dickinson, 1992a; McClements, 2005). Estas dispersiones incluyen formulaciones tradicionales de alimentos, tales como productos de panadería, bollería, pastelería, productos cárnicos, helados, postres, etc., o a nuevas formulaciones, entre las que destacan los alimentos con bajo contenido de grasas e instantáneos, las formulaciones con bajo o elevado contenido de alcohol, alimentos funcionales (alimentos infantiles, formulaciones enterales o parenterales, alimentos con valores nutricionales específicos, etc.), etc. Por lo tanto, el análisis de las dispersiones o coloides alimentarios es de importancia práctica (Rodríguez Patino et al., 2009).

Las dispersiones son termodinámicamente inestables. Sin embargo, desde un punto de vista práctico es posible producir una dispersión cinéticamente estable (o metaestable) por un periodo de tiempo, que es el que exige el consumidor para cada producto en cuestión. Para ello se han de incluir en la formulación determinadas sustancias conocidas como agentes espumantes o emulsionantes (Dickinson, 1992a; McClements, 2005).

El análisis de las características interfaciales de estos agentes emulsionantes o espumantes sobre interfases fluidas es de importancia práctica, porque constituyen modelos bien definidos para el análisis de las dispersiones alimentarias a niveles microscópicos y nanoscópicos, con numerosas ventajas para realizar estudios fundamentales (Horne y Rodríguez Patino, 2003; Rodríguez Patino et al., 2003 y 2007; Miller et al., 2004; Wilde et al., 2004; Mackie y Wilde, 2005; Akensenko et al., 2006). En efecto: (i) se necesitan concentraciones muy pequeñas de agente emulsionante o espumante. La cantidad de muestras que se maneja es también pequeña. (ii) Es posible obtener información acerca de la formación y estabilidad de la película interfacial. (iii) Y por estas razones su análisis tiene aplicación directa en la producción de dispersiones alimentarias.

En estos estudios debemos tener siempre presente que el principal objetivo de la industria alimentaria es la de elaborar productos que tengan un impacto en el consumidor. A una escala macroscópica, muchos de estos productos son emulsiones o espumas, como anteriormente se ha indicado. A esta escala macroscópica las propiedades físicas, tales como la estabilidad, las propiedades reológicas y la textura del alimento son de gran importancia. Como entidades estructurales de las dispersiones alimentarias a una escala microscópica cabe destacar a las gotitas de agua o de aceite de

la fase dispersa en las emulsiones y a las burbujas de gas en las espumas. Finalmente, a un nivel molecular, la forma en la que los emulsionantes interactúan entre sí en la propia interfase tiene una gran influencia sobre la formación y estabilidad de las partículas individuales y de la interacción entre ellas (McClements, 2005). El fenómeno clave de esta aproximación nanoscópica es la auto-asociación molecular sobre las interfaces fluidas.

La formación, estabilidad y propiedades mecánicas de las dispersiones alimentarias dependen de las características físico-químicas interfaciales de estos emulsionantes alimentarios (Rodríguez Patino et al., 2008). Esta es la forma mediante la cual las características microscópicas de una dispersión alimentaria pueden ser controladas o promovidas a través de las propiedades microscópicas o nanoscópicas de los emulsionantes empleados para su producción y que constituyen los fundamentos de la ingeniería de producto o de la formulación (Rodríguez Patino et al., 2009).

Uno de los problemas que se presentan para la formación de dispersiones (emulsiones y espumas) cuando se utilizan proteínas en general y, especialmente, con el uso de proteínas vegetales, es que su funcionalidad se encuentra muy afectada por el pH (por su efecto sobre la solubilidad de la proteína) y fuerza iónica del medio (por su efecto sobre la agregación de la proteína). Por lo tanto es de suma importancia el estudio de la ingeniería de la formulación (analizando los efectos del cambio del pH o fuerza iónica del medio, la adición de polisacáridos, sacarosa o de un tensioactivo) sobre las características interfaciales y emulsionantes de las proteínas en general (Rodríguez Patino et al., 2009).

Las proteínas son moléculas anfífilas y migran espontáneamente a la interfase aire-agua o aceite-agua. Esa migración espontánea de las proteínas desde la fase líquida a la interfase indica que la energía libre de las proteínas es menor en la interfase que en la fase acuosa. Por lo tanto, cuando se establece el equilibrio, la concentración de proteína en la región interfacial es siempre superior a la que tiene en la fase acuosa. A diferencia de los agentes tensoactivos de bajo peso molecular, las proteínas forman una película muy viscoelástica en la interfase. Esta película resiste los choques mecánicos durante el almacenamiento y la manipulación y por esta razón las espumas y las emulsiones estabilizadas por proteínas son más estables que las preparadas con agentes tensoactivos de bajo peso molecular, por eso son muy usadas con estos fines (Damodaran, 1996).

1.6.1.1. Tensión superficial y área superficial.

Durante la formación de emulsiones y espumas hay un aumento de área interfacial o superficial con el consecuente incremento de la energía libre del sistema, de lo cual resulta que, las espumas y las emulsiones son termodinámicamente muy inestables (Walstra, 1989). En la interfase entre un líquido y un gas se genera una tensión denominada tensión superficial γ , comúnmente expresada en mN/m o dinas/cm y que es una consecuencia del desequilibrio de fuerzas sobre las moléculas situadas en una superficie. Si se considera un sistema aire-agua, las moléculas de agua situadas en la interfase son muy diferentes de las situadas dentro de la masa de la disolución, experimentando distintos efectos de las fuerzas intermoleculares (Figura 1.7). Las moléculas tienden a moverse hacia el interior de la masa acuosa, puesto que una molécula de agua en esta posición tiene una energía potencial menor que en la interfase. Esta fuerza que impulsa a la molécula de agua situada en la superficie a moverse hacia el interior se denomina tensión superficial (Wong, 1989).

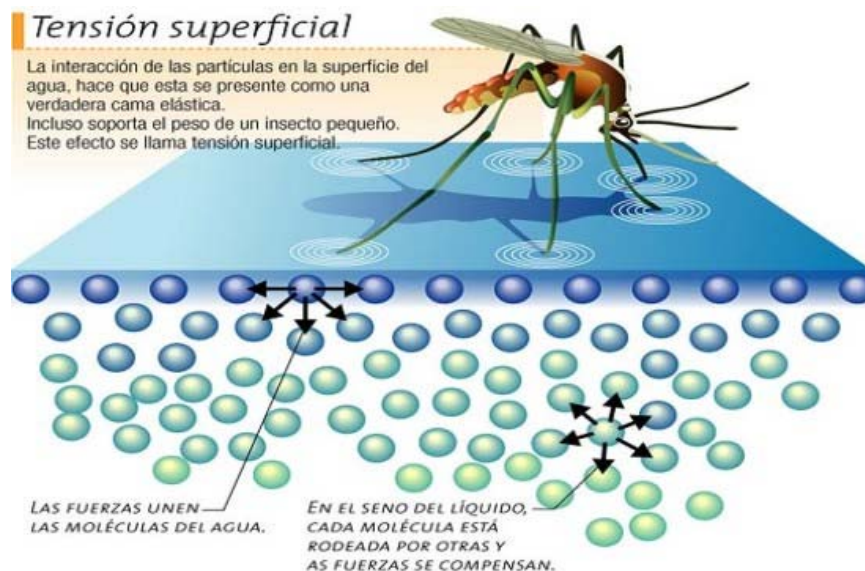


Figura 1.7 Moléculas de agua en una interfase aire-agua. Tomado de: <http://encarnigonzalezledesma.blogspot.com/2010/06/la-tension-superficial-en-fisica-se.html>

De la misma manera, en la interfase entre dos líquidos inmiscibles (A y B) se produce una tensión interfacial γ_{iAB}

$$\gamma_{iAB} = \gamma_A - \gamma_B \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde γ_A y γ_B son las tensiones interfaciales de los líquidos A y B, respectivamente, y γ_{iAB} es la tensión interfacial entre A y B.

La variación de la energía libre (ΔG) del sistema esta dada por:

$$\Delta G = \gamma_i \Delta A \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde ΔA es el área superficial o interfacial.

1.6.1.2. Adsorción de proteínas en las interfases

La disolución de una sustancia en agua puede aumentar (sales) o disminuir (surfactante) la tensión superficial o interfacial. Las sustancias tensioactivas son aquellas que por su naturaleza anfifílica se adsorben en la interfase agua-aceite o agua-aire y reducen la tensión de la misma. Las proteínas, por tener en sus moléculas tanto dominios hidrofóbicos como hidrofílicos, son sustancias que exhiben propiedades superficiales (Walstra, 1989).

La disminución de tensión interfacial por las proteínas también se puede expresar mediante el concepto de presión superficial o interfacial (π), la cual se define como:

$$\pi \text{ (mN/m)} = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

donde γ_0 es la tensión interfacial de las fases puras, es decir, la tensión superficial de un líquido en equilibrio con su vapor (interfase líquido-aire) o la tensión interfacial de un líquido en contacto con agua (en un sistema líquido-líquido), y γ es la tensión superficial o interfacial en presencia de proteína (McClements, 1999).

Las proteínas experimentan cambios conformacionales significativos en las interfases. Este hecho es previsible pues la conformación de las proteínas es una manifestación de su interacción intramolecular y con el medio. Esto puede involucrar un descenso neto en su energía libre comparada con la que tienen en el seno de la fase.

Desde que la conformación secundaria y terciaria de una proteína en una interfase es dificultosa de descifrar, esas configuraciones son comúnmente descritas en términos de “trenes“, “bucles” y “colas” (Figura 1.8).

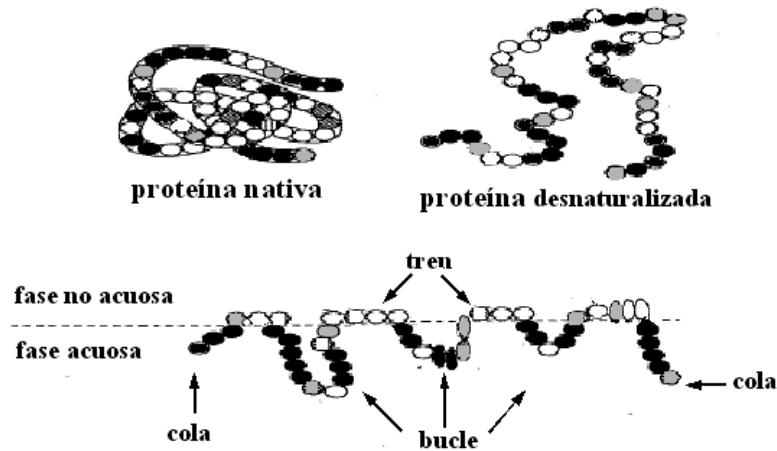


Figura 1.8 Representación esquemática de la conformación de una proteína en una interfase. Residuos de aminoácidos polares (●), no polares (○) y neutros (◐). (Adaptado de Phillips, 1977)

Los “trenes” son los segmentos hidrofóbicos que yacen planos sobre la interfase, haciendo contacto con las fases acuosa y no acuosa (aire o aceite). Los “bucles” son los segmentos de polipéptidos entre los “trenes” y las “colas” son los segmentos N y C terminal, ambos invariablemente situados dentro de la fase acuosa. La distribución relativa de “trenes”, “bucles” y “colas” en la molécula adsorbida determina las propiedades de las emulsiones y espumas. Si los “trenes” son la conformación predominante, entonces, la proteína ejercerá una alta presión superficial (π). Para que esto ocurra la proteína deberá ser altamente flexible e hidrofóbica. La estabilidad de las emulsiones de este tipo de proteínas, sin embargo puede no ser mejor que la de aquellas que forman más bucles como las proteínas globulares (Damodaran, 1997).

La acumulación de proteína en la interfase debido al proceso conocido como adsorción interfacial se caracteriza por medio de la concentración superficial o interfacial (Γ):

$$\Gamma \left(\frac{\text{mg proteína}}{\text{m}^2} \right) = \frac{m}{A} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

donde m es la cantidad de proteína presente en la interfase y A el área total interfacial.

La cinética de adsorción de una proteína en la interfase se evalúa mediante la variación de la tensión o presión interfacial en el tiempo.

El proceso de adsorción de proteínas en las interfases líquidas generalmente es un proceso muy complejo. Sin embargo, se asume en la literatura que la adsorción se ocurre en tres pasos desde un punto de vista cinético (Beverung et al., 1999; Tripp et al., 1995; Segumpta et al., 1999; Miller et al., 2000). En primer lugar, la proteína difunde desde la solución a la capa subsuperficial (capa inmediatamente adyacente a la interfase líquido). Este período se denomina "período de inducción" y durante el mismo la presión interfacial permanece por debajo de 1 mJ/m^2 (Miller et al., 2000). Esta etapa es fuertemente dependiente de las propiedades estructurales de la proteína. El tamaño de la proteína, la carga superficial y la hidrofobicidad superficial son factores clave para este primer paso del proceso de adsorción (Beverung et al., 1999; Segumpta et al., 1999; Bos et al., 2003). La segunda etapa comienza una vez que se alcanza un mínimo de cobertura en la interfase. La presión interfacial aumenta de una manera muy pronunciada, debido a las moléculas que se adsorben en la interfase y por el proceso de desplegamiento llevado a cabo por dichas moléculas al entrar en contacto con la interfase. La estabilidad de la estructura nativa de la proteína, y una vez más, su hidrofobicidad superficial, la carga y el tamaño son factores determinantes de esta etapa (Beverung et al., 1999). En este caso, se llega a una situación donde todo el espacio disponible en la interfase se satura formando una monocapa, que da lugar al film interfacial (McClements, 1999). Por último, una vez que la interfase está saturada con la proteína, más proteína se adsorbe formando multicapas. Esto no contribuye significativamente al aumento de la presión interfacial, que alcanza una meseta (la presión interfacial aumenta hasta llegar a un valor máximo, la presión interfacial de equilibrio (π_e)). Sin embargo, los procesos interfaciales tales como el desplegamiento, la desnaturalización y la gelificación de la proteína todavía disminuyen un poco la presión interfacial, incluso después de 20 horas (Santiago et al., 2008).

Por estudios de espectroscopia infrarroja y dicroísmo circular, se demostró que los cambios conformacionales más importantes durante la adsorción interfacial de una proteína se dan a nivel de la estructura terciaria y cuaternaria (van Aken, 2003). La estabilización de la monocapa o multicapas tiene lugar por interacciones de tipo no covalente, pero si en la secuencia aminoacídica existen grupos tioles libres pueden ocurrir reacciones de intercambio disulfuro-tiol en la interfase, formando un film

interfacial resistente y de alta viscoelasticidad que contribuye a la estabilidad (Damodaran, 2005).

Por lo expresado anteriormente, para ser considerados buenos agentes interfaciales, las proteínas deben poseer otras propiedades: flexibilidad molecular, solubilidad e hidrofobicidad superficial. La flexibilidad molecular es la capacidad que tiene la proteína de sufrir cambios conformacionales rápidos cuando es transferida de un medio a otro medio diferente. Durante la preparación de una emulsión o una espuma, el transporte de la proteína a la interfase se realiza por convección más que por difusión (Walstra, 1993b). Por tal motivo, los cambios conformacionales rápidos en la interfase son esenciales para que las proteínas orienten sus residuos aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos hacia la fase acuosa y dispersa, respectivamente. La solubilidad es otro requisito fundamental para que una proteína sea un buen agente superficial. Las proteínas poco solubles quedan dispersas en forma de agregados en la fase acuosa y pierden totalmente la flexibilidad estructural, lo cual afecta notablemente su capacidad de adsorción interfacial. Por lo tanto, las condiciones en las cuales las proteínas pueden perder solubilidad, como la cercanía del punto isoeléctrico, no son adecuadas para la preparación de emulsiones o espumas. Por último, la hidrofobicidad superficial es otra propiedad importante: los residuos aminoácidos hidrofóbicos de una proteína generalmente se ubican en el interior de la estructura globular, pero muchos también pueden estar en contacto con el medio acuoso. La cantidad de “parches” hidrofóbicos en la superficie de la molécula de la proteína juega un rol sumamente importante en el anclaje inicial de la misma en la interfase aceite/agua, es decir en la fase de penetración durante la adsorción (Kato y Nakai, 1980).

La afinidad de un agente emulsificante por la interfase se define mediante los conceptos de eficiencia de adsorción y actividad superficial. La eficiencia de adsorción es una medida de la mínima cantidad de agente emulsificante requerida para la saturación de la interfase, mientras que la actividad superficial es el valor de presión superficial que se alcanza cuando la interfase se satura. Estos parámetros dependen marcadamente de la estructura molecular de los agentes emulsificantes y de las condiciones del entorno (pH, fuerza iónica). A la misma concentración molar, las proteínas tienen mayor eficiencia de adsorción que los agentes surfactantes de bajo peso molecular, porque en su estructura molecular hay varios sitios hidrofóbicos que interaccionan favorablemente con la fase lipídica, de manera que se requiere menor concentración molar para que se produzca la saturación de la interfase (McClements,

1999). Por otro lado, a concentraciones donde se produce la saturación de la interfase, los agentes surfactantes de bajo peso molecular producen un incremento de la presión superficial más elevado que las proteínas y por lo tanto tienen mayor actividad superficial. Esto se atribuye a su empaquetamiento más eficiente en la interfase debido a su estructura molecular más simple (McClements, 1999; Damodaran, 2005).

Cuando una proteína y un agente emulsificante no proteico (u otra proteína diferente) se adicionan al sistema antes de la preparación de una emulsión, pueden competir por la adsorción en la interfase. Este hecho se denomina *adsorción competitiva*, tiene lugar en muchas emulsiones alimentarias y no siempre conduce a sistemas más estables. Si a una emulsión formulada con proteínas se adiciona un agente emulsificante no proteico, como resultado de la adsorción competitiva, puede producirse el desplazamiento total de las proteínas en la interfase. Esto sucede cuando el dodecil sulfato de sodio (SDS) se adiciona a una emulsión, siempre que la relación SDS/proteína sea elevada. El empaquetamiento de una proteína en la interfase no es homogéneo debido principalmente a su complejidad estructural, por lo tanto, en la interfase existen espacios vacíos. Cuando las moléculas de SDS se adicionan a la fase continua, inicialmente se adsorben en estos espacios vacíos debido a su bajo peso molecular y a medida que pasa el tiempo estos dominios interfaciales ricos en moléculas de surfactante crecen en el tiempo y comprimen el film proteico. A presiones interfaciales suficientemente elevadas (debido a la adsorción de moléculas de surfactante), el film proteico pierde su integridad y se produce la desorción de la proteína (Mackie et al., 2003). Este mecanismo, llamado mecanismo orogénico de desplazamiento (“orogenic displacement mechanism”) también puede aplicarse a otros agentes surfactantes de bajo peso molecular (Damodaran, 2005). Este mecanismo constituye la base de algunas técnicas de caracterización de emulsiones que se aplicarán a lo largo de este trabajo.

1.6.1.2 Propiedades reológicas superficiales de las proteínas adsorbidas en interfases

Como ya se trató en el ítem anterior, las moléculas con actividad superficial tienden a adsorberse en las interfases con el efecto de bajar la tensión superficial. La composición y estructura de estas capas adsorbidas determinan el comportamiento de las espumas y emulsiones. En particular, estas películas interfaciales también deben ser

capaces de disminuir las perturbaciones externas para prevenir la ruptura de la película. Esta capacidad se refleja en la viscoelasticidad dilatacional interfacial de la capa interfacial (Maldonado-Valderrama et al., 2008).

En la formación de espumas y emulsiones, la capacidad de respuesta de la interfase a una perturbación o la manera en la que se alcanza un nuevo estado de equilibrio son en general, más importantes que el estado de equilibrio mismo.

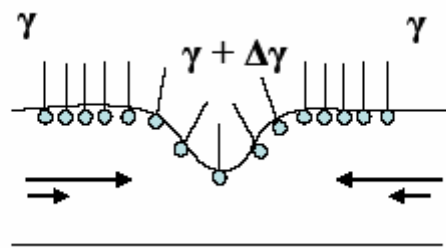


Figura 1.9 Respuesta de una interfase a una perturbación. Las flechas indican la dirección del líquido interfacial y del seno de la disolución.

La respuesta de una interfase a una perturbación de su estado de equilibrio se describe de manera esquemática en la Figura 1.9. En esta se observa como un incremento del área interfacial tiende a producir una zona en la que la densidad interfacial es menor y por ello, la tensión interfacial también aumenta localmente ($\Delta\gamma \geq 0$). Las áreas de alta tensión interfacial tienden a contraerse a expensas de las áreas de menor tensión interfacial con el fin de reducir el exceso de la energía interfacial del sistema. Por tanto, el gradiente de tensión interfacial produce movimiento de la interfase y el seno de la disolución se mueve para contrarrestar la perturbación. En general, los efectos mecánicos producidos por un gradiente de tensión interfacial en una interfase reciben el nombre de “Efectos de Marangoni”. El primer paso hacia la interpretación cuantitativa de estos fenómenos lo constituye la definición de Gibbs de la elasticidad superficial como el cambio en la tensión superficial por unidad de cambio relativo de área interfacial:

$$E\left(\frac{mN}{m}\right) = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

donde E es la elasticidad límite de Gibbs y γ es la tensión superficial.

Gibbs definió este parámetro inicialmente para la superficie de un líquido estabilizado por una película de jabón, pero ha resultado ser adecuado para expresar

gradientes de tensión interfacial en cualquier interfase líquido-fluido (Lucassen-Reynders, 1993). Este parámetro E se denomina “elasticidad de Gibbs” o “elasticidad límite de Gibbs”. El término “módulo dilatacional interfacial” se utiliza para el caso más general en el cual la interfase tiene un comportamiento viscoso además de elástico ante una deformación. La componente viscosa refleja la existencia de procesos de relajación en, o cerca de, la interfase. Así, el módulo E es una medida de la resistencia que opone una interfase a la creación de regiones de alta tensión interfacial y de la velocidad a la que los gradientes de tensión interfacial desaparecen una vez que cesa la perturbación sobre la interfase (Lucassen-Reynders y Kuijpers, 1992)

En un caso general en el que se somete una interfase a una perturbación pequeña de área ΔA , la respuesta en tensión interfacial originada, $\Delta\gamma$, se puede escribir como la suma de la contribución elástica y viscosa:

$$\Delta\gamma = E_d \Delta \ln A + E_v \Delta \ln A \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

donde E_d es la elasticidad dilatacional interfacial y E_v es la viscosidad dilatacional interfacial.

Si la deformación es suficientemente pequeña y lenta, los coeficientes E_d y E_v serán constantes. En este caso, comparando las ecuaciones 1.5 y 1.6 se obtiene la expresión general del operador matemático, módulo dilatacional

$$E = E_d + E_v \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

Esta condición se consigue usualmente en experimentos en los que se imponen oscilaciones de tensión y densidad interfacial al sistema alrededor de sus valores en condiciones de equilibrio. En estos experimentos, la amplitud y la velocidad de la oscilación pueden ser controladas fácilmente. Así pues, en un experimento oscilatorio, el operador d/dt operaría sobre un desplazamiento interfacial dado por una función de onda:

$$\Delta \ln A \propto \exp(i\omega t) \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

donde ω es la frecuencia angular de la oscilación. El módulo dilatacional interfacial para el caso de oscilaciones periódicas es una magnitud compleja dada por la siguiente expresión:

$$E = E_d + i\omega E_v \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

En esta expresión, la parte real, también llamada módulo de almacenamiento, coincide con la elasticidad interfacial dilatacional mientras que la parte imaginaria, que también se denomina módulo de pérdida, es proporcional a la viscosidad interfacial dilatacional. El carácter complejo de esta magnitud, se refleja experimentalmente en una diferencia de fase que aparece entre el cambio en tensión interfacial, $\Delta\gamma$, y el cambio en área interfacial, ΔA , dada por φ , de tal forma que los componentes elástico y viscoso el módulo dilatacional, se pueden expresar también en función de este desfase.

$$E_d = |E| \cos \varphi \quad (\text{Ecuación 1.10})$$

$$E_v = |E| \sen \varphi \quad (\text{Ecuación 1.11})$$

En la bibliografía existen multitud de dispositivos experimentales que permiten medir el módulo dilatacional interfacial de capas de proteínas o surfactantes adsorbidas en interfases líquido-fluido. En función de las características del dispositivo, la frecuencia de oscilación puede variar en varios órdenes de magnitud (Benjamins y Lucassen–Reynders, 1998).

Entonces, el módulo de dilatación interfacial puede ser expresado como una cantidad compleja que describe la respuesta lineal de una película a una deformación sinusoidal a una frecuencia dada ($2\pi\omega$). La elasticidad interfacial (E_d) refleja la capacidad de la película para restaurar su tensión interfacial después de un estrés. Por lo tanto, mide la capacidad de la capa de resistir una deformación. A la inversa, la viscosidad interfacial (E_v) es una medida de la velocidad de los procesos de relajación que restauran el equilibrio después de la perturbación. Por lo tanto, se mide la capacidad de la capa a adaptarse a una deformación. Estos parámetros dependen fuertemente de la frecuencia de la oscilación y de la concentración de moléculas (Maldonado-Valderrama et al., 2008).

En la Figura 1.10 se comparan los módulos de dilatación en las interfases aire-agua y aceite de girasol-agua para diversas proteínas. Para las interfases aire-agua los módulos son mayores que para las correspondientes interfases aceite-agua. Además se puede observar que las pendientes de las curvas de la interfase aceite-agua son menos pronunciadas que para la interfase aire-agua. Esto indica que en la interfase aceite-agua

existe un menor número de interacciones moleculares entre las moléculas de proteína adsorbidas. Esto implica que el desplegamiento, y de este modo la flexibilidad interna de la proteína es menos importante para el comportamiento de dilatación en la interfase aceite-agua que en la aire-agua (Bos y van Vliet, 2001).

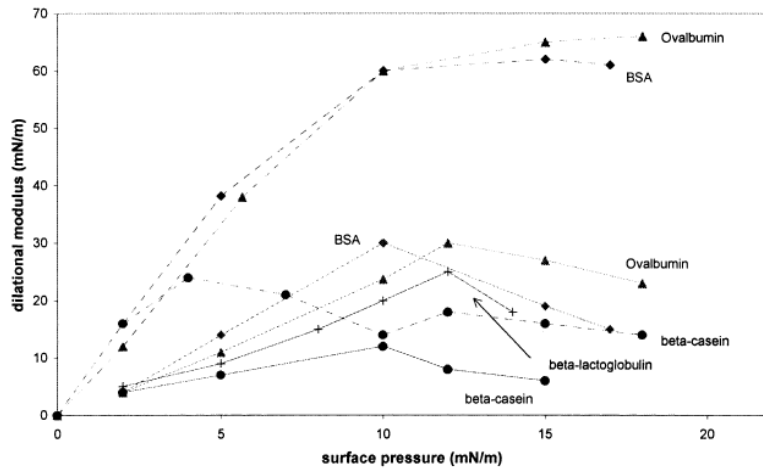


Figura 1.10 Módulos interfaciales de dilatación de varias proteínas como función de la presión interfacial determinados con un tensiómetro dinámico de gota. Las líneas de puntos son de la interfase aire-agua y las líneas llenas son de la interfase aceite de girasol-agua. La frecuencia fue de $0,1 \text{ rad s}^{-1}$. Tomado de Bos y van Vliet (2001).

Todas las curvas para las interfaces de aceite-agua pasan a través de un máximo, a altas presiones superficiales el módulo interfacial disminuye más fuertemente que en la interfase aire-agua, indicando que probablemente fenómenos tipo colapso, reconformaciones lentas o intercambio con multicapas juegan un papel importante (Bos y van Vliet, 2001).

Existen dos casos límite, accesibles experimentalmente y que facilitan la interpretación de los resultados correspondientes a los de una película interfacial que tiene un comportamiento dilatacional puramente elástico (Lucassen-Reynders, 1993).

- 1- Monocapa insoluble: En el caso de una monocapa insoluble se supone que no existe intercambio difusivo entre la capa interfacial y el seno de la disolución. Además, en este caso, la oscilación se realiza lo suficientemente lenta, de forma que la escala temporal en la que tiene lugar cualquier proceso de relajación en la interfase es mucho menor que el período de la oscilación. Así, la capa interfacial cumple que $\Gamma.A = \text{cte}$ y la interfase se encuentra siempre en condiciones de equilibrio pues se adapta de manera inmediata a la deformación. En este caso, la elasticidad interfacial toma un valor límite dado por:

$$E_0 = \frac{d\gamma}{d \ln \Gamma} \quad (\text{Ecuación 1.12})$$

- 2- Capa adsorbida puramente elástica. En este caso puede existir un intercambio difusivo de moléculas, entre la capa interfacial adsorbida y las moléculas en el seno de la disolución, al producirse la deformación de la interfase. Una manera de evitar que se produzca este intercambio es realizar la perturbación lo suficientemente rápida como para que la interfase no tenga tiempo de responder a la perturbación impuesta. Por ello, en este caso límite, no hay tiempo de que se produzcan procesos de relajación en la interfase y la viscosidad superficial que presenta el sistema en estas condiciones es despreciable. Así, la capa interfacial adsorbida se comporta una vez más como insoluble y la elasticidad interfacial se puede relacionar con las propiedades en equilibrio de la capa interfacial, haciendo uso de la Ecuación 1.12

Las propiedades dilatacionales de las películas de proteínas adsorbidas ó de surfactantes de bajo peso molecular son muy diferentes. En términos generales, los surfactantes de baja masa molecular (MM) difunden rápidamente a la interfase y forman películas, denominadas móviles, en las que una interfase libre es rápidamente ocupada por una molécula de surfactante. Por el contrario, las proteínas son moléculas grandes, que difunden lentamente y que forman películas interfaciales, denominadas inmóviles, pero muy resistentes debido a la gran interacción intermolecular existente entre las proteínas adsorbidas en la capa interfacial (Wilde, 2000). Por ello, la interpretación de las curvas experimentales de los parámetros dilatacionales de las películas de proteína adsorbida en interfases líquido-fluido es más compleja que la de los surfactantes de baja MM.

Las proteínas están comúnmente presentes en emulsiones y espumas alimentarias y presentan un comportamiento interfacial complejo. La interrelación entre las propiedades interfaciales de las proteínas y su capacidad emulsionante/espumante o la estabilidad de la espuma/emulsión formada es uno de los principales desafíos presentes de la tecnología de los alimentos. En este sentido, existe un creciente interés en la literatura hacia la comprensión de dicha relación, y recientemente algunos trabajos experimentales han abordado este tema. Puesto que los tiempos de relajación de las proteínas son muy largos, incluso a frecuencias de oscilación lentas, ofrecen escalas de

tiempo convenientes para una comparación fiable entre el comportamiento dilatacional y de dispersión. De acuerdo con diferentes trabajos, la estabilidad de las espumas y/o emulsiones de proteínas parece estar vinculado a la adsorción de proteínas y el desplegamiento interfacial (Martin et al., 2002; Bos et al., 2003), al aumento simultáneo de la elasticidad y la disminución de la viscosidad (Davis y Foegeding, 2007), a la compresibilidad de las capas proteína adsorbida (Yarranton et al., 2007), a la formación de un gel interfacial bidimensional (Dicharry et al., 2006) o al aumento del módulo de dilatación (Langevin, 2000; Wilde, 2000; Carrera-Sánchez y Rodríguez - Patino, 2005; Foegeding et al., 2006). Por lo tanto, todavía no parece haberse alcanzado un consenso en la posible interconexión de las propiedades interfaciales y de dispersión (Maldonado-Valderrama et al., 2008).

La interpretación de los datos de dilatación interfaciales de las proteínas depende de la escala de tiempo, es decir, de las tasas de deformación o frecuencias a las que las mediciones se realizan. Para escalas de tiempo cortas (cuando son aplicadas altas tasas de deformación o frecuencias a la interfase), el desdoblamiento de la proteína no afectará las mediciones de dilatación interfacial porque esto requiere de más tiempo (Bos y van Vliet, 2001).

Para proteínas alimentarias con poca estructura interna, se puede observar un cambio marcado en la reología de dilatación interfacial como una función del tiempo y/o la presión interfacial, como se desprende de los trabajos de Graham y Philips (1980a, 1980b), Gau et al. (1994) y Benjamins et al. (1998). En los trabajos citados se observó un aumento marcado en E_d y θ con el tiempo envejecimiento y/o la presión interfacial. Según Benjamins et al. (1998) esto podría explicarse por una transición desde un comportamiento totalmente elástico a un comportamiento viscoelástico de la capa de proteína adsorbida con el tiempo y la creciente presión interfacial. Cuando la interfase se comporta de una manera viscoelástica, la parte elástica da cuenta de la energía recuperable almacenada en la interfase y la parte viscosa refleja la pérdida de energía a través de procesos de relajación (Bos y van Vliet, 2001).

Murray (1997) y Benjamins et al. (1998) mostraron que para escalas de tiempo de entre 1 y 1000 s, la viscosidad de dilatación no puede ser explicada por relajación difusional. Otros procesos posibles, que pueden desempeñar un papel para las capas de proteína adsorbidas en escalas de tiempo entre 10^2 y 10^3 s, son: i. retraso de adsorción por una "barrera"; ii. re-orientación lenta de las moléculas después de la adsorción; iii. la formación de complejos; iv. transiciones de fase en la superficie; v. formación o

destrucción de estructuras tridimensionales en la interfase o procesos lentos reconfomacionales internos de estas estructuras. Las escalas de tiempo de reordenamientos moleculares puede variar desde menos de 1 s para las interfases ligeramente empaquetadas a más de 100 s para las interfases que muestran fuerte comportamiento viscoelástico. Una proteína requiere una determinada área mínima para cambiar su conformación, lo que puede mostrarse como un proceso de relajación. Este proceso es más difícil en una capa de proteína de empaquetamiento compacto, resultando en una capa de proteína adsorbida que muestra un carácter más insoluble durante una deformación. Las interacciones inter e intramoleculares en escalas de tiempo de 10^2 - 10^5 s están relacionadas con este tipo de interfase (Bos y van Vliet, 2001).

Cuando una proteína contiene grupos tiol y disulfuro, los cambios conformacionales de la proteína en la interfase podrían promover la polimerización a través de la reacción de intercambio tiol-disulfuro (Dickinson y Matsumura, 1991; Monahan y et al., 1993; Damodaran y Anand, 1997). Estas interacciones, además de hacer que la proteína sea adsorbida irreversiblemente a la interfase, proporcionan una película altamente viscoelástica que resiste la coalescencia (Dickinson 1998, 1999, 2001). Los segmentos de la proteína que permanecen suspendidos en la fase acuosa en forma de bucles proporcionan estabilidad estérica contra la floculación y la coalescencia de las gotitas de aceite (Damoradan, 2005).

1.6.2 Espumas y emulsiones

En términos generales, las emulsiones y las espumas son dispersiones que presentan numerosas analogías entre ellas. A continuación se va a realizar una descripción general de cada una de ellas por separado.

1.6.2.1 Espumas

Una espuma es una dispersión de burbujas de gas en un líquido. Si se la analiza en forma comparativa con una emulsión, se puede ver que en la espuma el volumen de

una burbuja de gas es cinco órdenes de magnitud mayor que el correspondiente a las gotas de aceite de una emulsión (diámetro de burbuja: 0,1-3 mm; diámetro de gota de aceite: 0,1-100 μm). La tensión superficial γ_{e_s} en una burbuja de espuma generalmente es mayor que 30 mN/m, mientras que en una gota de emulsión la tensión interfacial γ_{e_i} puede llegar a valores tan bajos como 0,1 mN/m. Además, la diferencia de densidad entre fase continua y fase dispersa es 10^3 kg/m^3 para la espuma, comparada con 10^2 kg/m^3 como máximo para la emulsión. Estas características de la espuma la hacen mucho más inestable que una emulsión (Halling, 1981).

Las características finales de una espuma están íntimamente relacionadas con las propiedades de las películas líquidas que la forman así como con las propiedades dilatacionales de las películas de moléculas adsorbidas en la superficie. El proceso de formación de una espuma (o capacidad espumante) y la estabilidad de la misma son dos fenómenos que no se pueden evaluar de manera independiente puesto que paralelamente a la formación de una espuma tienen lugar mecanismos de desestabilización de la misma que la van destruyendo (Langevin, 2000). Sin embargo, para facilitar la comprensión, veamos estos dos fenómenos separadamente.

1.6.2.1.1 Formación de espumas

El proceso de formación de espuma consiste en incorporar gas a una solución proteica con creación de una nueva área interfacial o sea formar burbujas rodeadas por una película proteica. Tres factores fundamentales afectan este fenómeno: la cantidad de moléculas en el medio, la velocidad de adsorción de las moléculas sobre la superficie y las propiedades dilatacionales de la capa de moléculas adsorbida. Veamos esto en detalle.

En primer lugar, es evidente que la capacidad espumante de una disolución aumenta con el número de moléculas anfifílicas accesibles en el medio ya que la concentración superficial se incrementa con la concentración de partículas en el seno de la disolución (Carrera- Sánchez y Rodríguez-Patino, 2005).

En segundo lugar, la dinámica de adsorción de las moléculas juega un papel importantísimo en la capacidad espumante de las mismas. Cuando se crea una superficie, la velocidad con la cual las moléculas se sitúan en ella es un factor determinante en la formación de una espuma. Las proteínas pequeñas, flexibles y

desordenadas poseen una mayor capacidad espumante que las proteínas grandes y globulares debido a su difusión más rápida a la superficie (Damodaran, 1990).

Finalmente, para una correcta formación de la espuma, es necesario que cuando la superficie se expande, la nueva superficie creada sea rápidamente ocupada por moléculas. Este fenómeno está directamente relacionado con la viscosidad superficial de la capa de moléculas adsorbida puesto que este parámetro mide precisamente la habilidad de la película para responder a un cambio en área (Durand et al., 1999; Langevin, 2000). Una viscosidad superficial muy alta implica que el sistema se opone a la deformación inducida en la capa superficial y por tanto la creación de área superficial se ve favorecida y con ello la formación de una espuma.

Una espuma se puede obtener por diferentes métodos. Por sobresaturación de un líquido con gas, por disolución de gas bajo presión y liberando después el gas por descenso de la presión o por formación de gas in situ. Por medios mecánicos como la inyección de gas a través de un orificio estrecho (burbujeo) o por batido o agitación con cantidad ilimitada de gas (Wagner, 2000).

1.6.2.1.2 Estabilidad de espumas

El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un área superficial mínima (mínima energía libre). A este proceso se opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayores son su viscoelasticidad y su rigidez (Wagner, 2000).

Los mecanismos de desestabilización de una espuma están gobernados principalmente por:

- Drenado de líquido. En primera instancia esto ocurre por simple acción de la gravedad sobre el líquido que se encuentra en las burbujas. Luego por fenómenos más complejos debido a la diferencia de curvatura entre los bordes de Plateau y la parte plana de las películas, que producen un gradiente de presión que se puede expresar según la ley de Laplace como:

$$\Delta P \propto \gamma \left(\frac{1}{Ra} - \frac{1}{Rb} \right) \quad (\text{Ecuación 1.13})$$

donde R_a y R_b son los radios de curvatura del borde Plateau y de la lamela, respectivamente (Figura 1.11 y 1.12). Esta diferencia de presión (ΔP) es la fuerza motriz que desplaza el líquido de la lamela interburbuja hacia los bordes de Plateau, mediante un mecanismo que es llamado succión capilar, el líquido seguidamente es drenado por acción de la gravedad desde los bordes de Plateau hacia la parte inferior de la espuma.

Este tipo de inestabilidades implican una deformación de la película, de manera que la resistencia de la película a la deformación inducida por el drenaje es clave en la estabilidad de la misma. Al contrario que en el caso de la formación de una espuma, la estabilidad de la misma está determinada por la elasticidad superficial de la película. Este parámetro cuantifica la resistencia a la deformación de manera que películas muy elásticas serían capaces de resistir el drenaje de líquido.

- Colapso de la espuma por ruptura de lamelas ocurre al debilitarse las mismas por disminución de su espesor (por drenado o evaporación de líquido), o por presencia de partículas.
- Desproporción o maduración de Ostwald, este fenómeno ocurre cuando las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, debido a la diferencia de presión entre ellas (que surge también de la aplicación de la ecuación 1.13 donde ahora R_a y R_b son los radios de curvatura de las burbujas pequeña y grande respectivamente). En consecuencia, este mecanismo se encuentra favorecido en el caso de sistemas muy polidispersos. Esto conduce además a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras siendo las hexagonales más estables. Otro factor importante que afecta a la maduración de Ostwald es la solubilidad del gas en la fase líquida. Si el gas utilizado en la formación de una espuma es muy soluble en la fase acuosa, como el caso del dióxido de carbono (CO_2), la difusión del gas entre burbujas se ve claramente favorecida. La utilización de gases menos solubles en agua como el nitrógeno (N_2) en la formación de espumas, aumenta significativamente la estabilidad de la misma. Todos estos mecanismos de desestabilización ocurren simultánea y sinérgicamente (Halling, 1981; Walstra, 1989; Langevin, 2000).

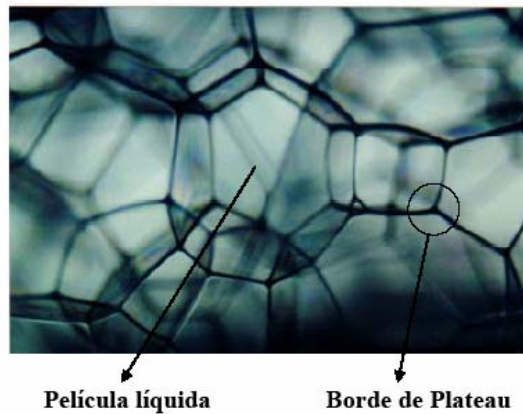


Figura 1.11 Imagen de espuma real. Tomada de: <http://www.itt.edu/wasan/fdes.html>

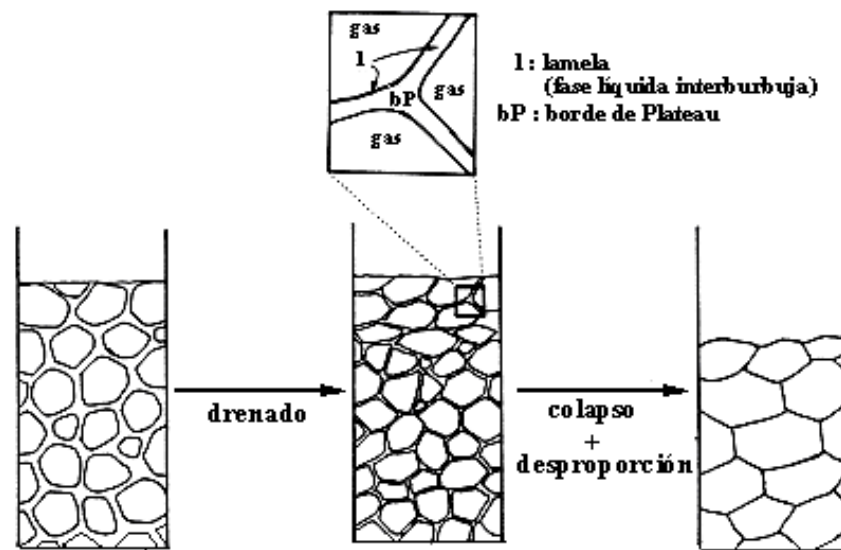


Figura 1.12 Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma y vista ampliada de la película interburbujas (Wagner, 2000).

1.6.2.2 Emulsiones

Una emulsión es una dispersión de gotas de un líquido en otro que se denomina fase continua. Los mecanismos de formación y estabilidad de una emulsión son similares a los descritos en el caso de una espuma, sección 1.6.2.1, pese a la diferencia estructural entre ambos sistemas. Veremos a continuación los principales aspectos que caracterizan a este tipo de dispersiones.

1.6.2.2.1 Formación de emulsiones

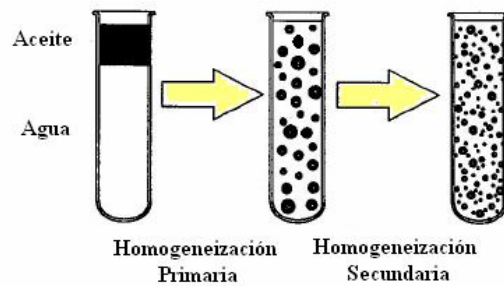


Figura 1.13 Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (o/w). Adaptado de Mc Clements (1999).

La formación de una emulsión puede incluir un solo paso o un número de pasos consecutivos, dependiendo de la naturaleza del material de partida y el método utilizado para crearla. Antes de convertir las fases separadas de aceite y agua en una emulsión, normalmente es necesario dispersar los distintos ingredientes en la fase en la que son más solubles. El proceso de conversión de dos líquidos inmiscibles en una emulsión se conoce como *homogeneización*, y el dispositivo mecánico diseñado para llevar a cabo este proceso se denomina *homogeneizador* (Mc Clements, 1999). Para realizar una distinción según la naturaleza de los materiales de partida es conveniente clasificar la homogeneización en dos categorías. La creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas se denomina homogeneización primaria, mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión ya existente o pre-emulsión se denomina homogeneización secundaria. (Figura 1.13). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la que es suministrada por el homogeneizador. Durante la formación de las gotas a partir de la interfase entre dos líquidos el área interfacial (A) aumenta considerablemente, de manera que la energía libre superficial del sistema se incrementa en una cantidad $\gamma \cdot \Delta A$, donde γ es la tensión interfacial. Sin embargo la formación de gotas no es el único proceso que tiene lugar durante la preparación de una emulsión. Se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 1999).

Durante el proceso de homogeneización primaria, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal grado que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial.

La fuerza interfacial responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace:

$$\Delta P_L = \frac{4 \cdot \gamma}{D} \quad (\text{Ecuación 1.14})$$

donde ΔP_L es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota, γ es la tensión interfacial y D es el diámetro de la gota. Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior que es mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y menor la tensión interfacial.

El agente emulsificante es necesario para la formación de la emulsión y para ello debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la tensión interfacial. Este proceso disminuye la presión de Laplace (ecuación 1.14), lo cual facilita la deformación y en consecuencia, la ruptura en gotas de menor tamaño. Además, la formación del film interfacial desfavorece la coalescencia de las gotas recién formadas (Figura 1.13).

Para formar una emulsión que es cinéticamente estable durante un período razonable de tiempo, se debe evitar que las gotitas se fusionen después de que se han formado (Walstra 1983, 1993b). Esto se consigue con una concentración suficientemente elevada de emulsionante presente durante el proceso de homogeneización. El emulsionante se adsorbe a la superficie de las gotitas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que impide que se acerquen lo suficiente como para coalescer. El tamaño de las gotitas producidas durante la homogeneización depende de dos procesos: (1) la generación inicial de gotitas de tamaño pequeño y (2) la rápida estabilización de estas gotas contra la coalescencia una vez que se formen. El tamaño de las gotitas producidas por un homogeneizador depende de un equilibrio entre dos procesos físicos opuestos: la ruptura y coalescencia de las gotitas (Figura 1.14). Estos procesos a su vez dependen del balance entre el tiempo que necesita un emulgente para adsorberse en la superficie de la gota ($\tau_{\text{adsorción}}$) (generación de la gota) y el tiempo de colisión entre dos gotas ($\tau_{\text{colisión}}$) que permite la coalescencia de las gotas si no existe una buena estabilización (Mc Clements, 1999).

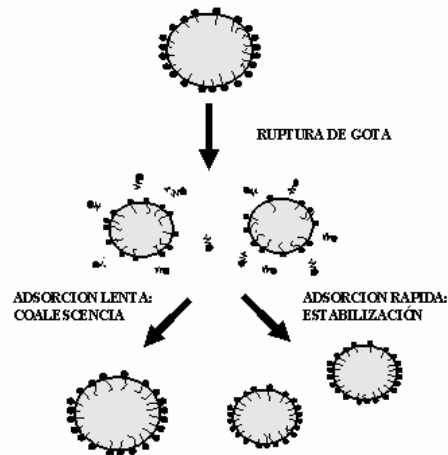


Figura 1.14 El tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización depende del balance entre el tiempo para que un emulgente se adsorba en la superficie de la gota ($\tau_{\text{adsorción}}$) (generación de la gota) y el tiempo de colisión entre dos gotas ($\tau_{\text{colisión}}$). (Tomado de Mc Clements, 1999).

La naturaleza precisa de los procesos físicos que ocurren durante la formación de la emulsión depende del tipo de homogeneizador usado. Sin embargo, existen algunos aspectos comunes de la ruptura de gotas que se pueden aplicar a la mayoría de los homogeneizadores. El estado inicial de la homogeneización incluye la ruptura e incorporación de las fases oleosa y acuosa a través de gotas bastante grandes de un líquido dentro del otro líquido. La última etapa de la homogeneización incluye la ruptura de las gotas grandes en otras más pequeñas. Es entonces importante entender la naturaleza de las fuerzas responsables de la ruptura de gotas durante la homogeneización. La existencia o no de ruptura de gotas está determinada por el balance entre fuerzas interfaciales, las cuales tienden a mantener las gotas íntegras, y las fuerzas de ruptura generadas por el homogeneizador, las cuales tienden a romperlas (Walstra, 1983, 1993b). Los emulsificantes tienen una función importante en la ruptura de gotas. La facilidad con la cual una gota puede ser rota durante la homogeneización se incrementa cuanto más bajo es el valor de la tensión interfacial. Inmediatamente después de la formación de las gotas, éstas tienen una baja concentración de emulgente adsorbido en su superficie, lo cual dificulta la ruptura porque la tensión interfacial es relativamente alta. Con el tiempo una mayor cantidad de emulgente se acumula en la superficie lo cual disminuye la tensión interfacial y facilita la ruptura de las gotas. Por ello, cuanto más rápidamente se adsorba el emulgente sobre la superficie de las gotas durante la homogeneización menor será el tamaño de las gotas producidas.

Las emulsiones son sistemas altamente dinámicos en los cuales las gotas se mueven continuamente y frecuentemente colisionan entre sí. La colisión entre gotas es particularmente rápida durante la homogeneización debido a la intensa agitación mecánica de la emulsión. Si las gotas no están bien protegidas por una membrana de emulgente suficientemente fuerte tienden a coalescer durante la colisión (Walstra, 1993b). Inmediatamente después de la ruptura de la gota de una emulsión existe una cantidad de emulsificante insuficiente para cubrir completamente la nueva superficie formada y entonces las nuevas gotas probablemente coalescan con sus vecinas (Mc Clements, 1999).

La importancia de la cinética de adsorción del emulgente sobre el tamaño de gotas producido durante la homogeneización ha sido demostrado experimentalmente (Schubert y Armbruster, 1992). Bajo las mismas condiciones de homogeneización se ha demostrado que emulgentes que se adsorben rápidamente producen tamaño de gotas más pequeños que otros que se adsorben más lentamente. Muchos emulgentes alimentarios no se adsorben con suficiente rapidez para prevenir completamente la coalescencia de gotas y entonces el tamaño de gota obtenido durante la homogeneización es grande con respecto al que teóricamente podría ser obtenido. La tendencia de las gotas a coalescer durante la homogeneización depende además de la efectividad de la membrana interfacial a resistir la coalescencia durante la colisión de gotas. Esta resistencia depende de la concentración de moléculas de emulgente presente así como de su estructura y propiedades fisicoquímicas (dimensión, carga eléctrica, empaquetado, interacciones) (Mc Clements, 1999).

La solubilidad en la fase acuosa es un requisito previo para que una proteína sea un buen emulsionante. Proteínas poco solubles o altamente hidrófobas pueden precipitar en la interfase de aceite-agua y por lo tanto causar inestabilidad en las emulsiones. La hidrofobicidad superficial juega un papel importante en el anclaje inicial de una proteína a la interfase aceite-agua (Kato y Nakai, 1980). Cuanto mayor sea el número de parches hidrófobos en la superficie de una proteína, mayor es la probabilidad de su adsorción y retención en la interfase (Damoradan, 2005).

1.6.2.2.1.1 Homogeneizadores

En el mercado existen muchos tipos de homogeneizadores. La elección de un homogeneizador particular depende del volumen de emulsión que se desea preparar, la

naturaleza de los materiales de partida, el tamaño de gota deseado y el costo (McClements, 1999).

Entre los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio encontramos los homogeneizadores de baja (≈ 3000 rpm.) y de alta velocidad (hasta 25000 rpm.), que son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas. El mecanismo de ruptura es un efecto combinado de fuerzas viscosas bajo un régimen de flujo laminar y turbulento. Al tener estos equipos baja densidad de energía (ϵ) producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Los homogeneizadores que tienen diseño rotor/estator de alta velocidad (Ultraturrax® – Polytron®) son más efectivos que los de diseño a cuchilla. Debido al número elevado de revoluciones del rotor, las fases líquidas a procesar se aspiran axialmente y se presionan a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. El movimiento de alta velocidad a través de las ranuras produce el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas.

Los molinos coloidales son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator igual que los homogeneizadores de alta velocidad. La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular variando la distancia entre el rotor y el estator. Aunque se pueden homogeneizar fases inicialmente separadas, son más eficientes para la reducción del tamaño de gota.

Los homogeneizadores a válvula de alta presión son sólo eficaces en reducir el tamaño de gota de una emulsión preexistente y por ende, realizan una homogeneización secundaria. A través de una bomba, la pre-emulsión es forzada a pasar a través de una válvula a presión elevada (entre 10 y 50 MPa). Las gotas de gran tamaño se rompen por un efecto combinado de flujo turbulento y cavitación. En muchos equipos, la presencia de una segunda válvula regulada a una presión más baja, favorece la obtención de emulsiones de gota de distribución de tamaño de gota monomodal.

En los homogeneizadores ultrasónicos, la fuente convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (hasta 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. El colapso de estas cavidades genera ondas de choque que producen deformación y ruptura de las gotas. La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta, la presión, superior a 500 atmósferas. Sin embargo los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La

alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas. Hay distintos diseños para uso de laboratorio (piezoeléctricos, puntas sonicadoras) e industrial (generación de campo ultrasónico por aguja vibrante) (McClements, 1999).

En los homogeneizadores de membrana la fase dispersa se hace pasar forzosamente a través de una membrana porosa de vidrio o cerámica. El pasaje forzado a través de los pequeños orificios de la membrana produce el esfuerzo de corte necesario mientras el agente emulsificante disperso en la fase acuosa se adsorbe en la superficie de las gotas generadas. El tamaño de gotas producido depende de la rapidez con la que el agente emulsificante se adsorbe en la interfase. La principal característica de la homogeneización con membranas es la formación de emulsiones de distribución de tamaño monomodal.

1.6.2.2.2 Estabilidad de emulsiones

Desde el momento que se forma una emulsión, inmediatamente después de la homogeneización, y a veces durante, comienza el proceso de desestabilización el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existen distintos mecanismos que contribuyen simultánea y sinérgicamente a la desestabilización de la emulsión y son la consecuencia de distintos fenómenos físicos los cuales se relacionan con la diferencia de densidad de las fases continua y dispersa, las interacciones coloidales entre las gotas y la estructura y viscoelasticidad del film interfacial (McClements, 1999).

Los mecanismos que afectan la estabilidad de una emulsión están esquematizados en la Figura 1.15 y se denominan: maduración de Ostwald, sedimentación/cremado, floculación y coalescencia.

El cremado y la sedimentación se conocen conjuntamente como fenómenos de separación gravitacional. El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a la menor densidad de la fase dispersa respecto a la de la fase continua, mientras que la sedimentación describe el movimiento de las gotas en sentido contrario, precisamente también por un efecto de diferencia de densidad. En general, aunque no de manera exclusiva, el cremado es más común en emulsiones o/w y la sedimentación en emulsiones w/o. Durante el proceso de cremado se forma una fase inferior o suero, la

cual está empobrecida en gotas y una fase superior enriquecida en gotas, la fase crema (Figura 1.15).

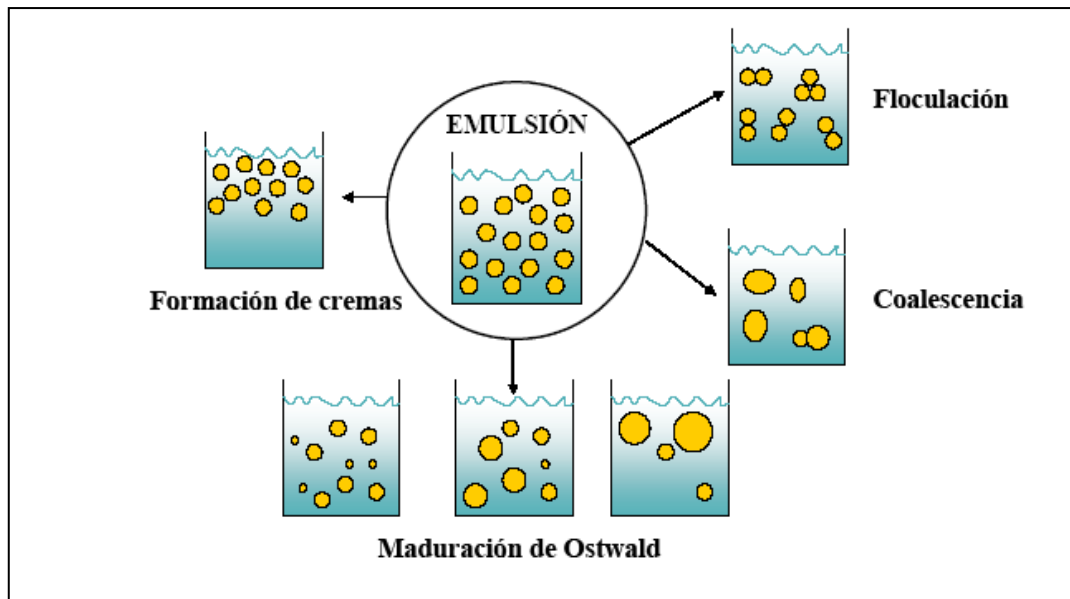


Figura 1.15 Mecanismos de desestabilización de una emulsión.

La importancia del cremado en la industria alimentaria es muy alta y se estima que el 40 % del costo de desarrollo de nuevas emulsiones alimentarias se atribuye a la realización de ensayos de estabilidad frente a este mecanismo, porque da el primer indicio visual de la desestabilización (Robins, 2000). La velocidad de cremado de una emulsión (v) puede evaluarse a través de la ley de Stokes:

$$v = \frac{2 \cdot R^2 \cdot \Delta\delta \cdot g}{9 \cdot \eta} \quad (\text{Ecuación 1.15})$$

donde R es el radio de las gotas, $\Delta\delta$ es la diferencia de densidad entre la fase continua y dispersa y η es la viscosidad del medio. Según la ley de Stokes, la velocidad es directamente proporcional al cuadrado del radio de las gotas, a la diferencia de densidad e inversamente proporcional a la viscosidad del sistema. Sin embargo, esta ley tiene muchas limitaciones para describir el comportamiento de las emulsiones. Las más importantes se describen a continuación:

- 1- En primer lugar las emulsiones son siempre polidispersas (en el mejor de los casos, tienen una distribución de tamaño de gota monomodal, lo cual no implica un único tamaño de gotas, por lo tanto, hay diferentes “poblaciones” de gotas de distinto tamaño y por ende, con una velocidad de cremado diferente. La velocidad de cremado de las gotas más pequeñas podría frenar el movimiento de las gotas de mayor tamaño, especialmente en emulsiones de alta fracción volumétrica (ϕ).
- 2- La ecuación 1.15 no tiene en cuenta el movimiento browniano, debido a la agitación térmica ($E = kT$). Por un efecto entrópico, este movimiento tiende a distribuir las gotas de manera uniforme en el seno de la emulsión, lo que se opone al movimiento ascendente de las gotas (McClements, 1999).
- 3- Dado que la ley de Stokes predice la velocidad de cremado “a dilución infinita” no tiene en cuenta el efecto de un aumento en ϕ ni las interacciones coloidales entre las gotas en la emulsión. La magnitud con la que se dan estas interacciones puede determinar la formación de flóculos, por lo que la velocidad de cremado se puede dar en mayor o menor grado de lo que podría predecir la ecuación 1.15.
- 4- El film interfacial está altamente hidratado, debido a la interacción de las moléculas de agua con los restos aminoacídicos polares de las proteínas en la interfase. El efecto es particularmente importante en gotas de menor tamaño, en la que la magnitud de espesor del film interfacial es importante respecto al diámetro de la gota. En ese caso, la densidad de las gotas es más cercana a la de la fase continua circundante, efecto que retarda la velocidad de cremado.
- 5- La velocidad de cremado podría disminuir drásticamente durante el almacenamiento estacionario si la fase continua tiene un comportamiento no-newtoniano, con una alta viscosidad o con un umbral de fluencia (la emulsión se comporta como sólido en reposo y como fluido por la aplicación de un esfuerzo de corte), aún cuando el diámetro de las gotas no sea demasiado pequeño. Esto sucede normalmente en emulsiones alimentarias como la mayonesa y aderezos.

En una emulsión o/w el cremado, se puede estudiar por distintos métodos. Según su naturaleza, estos métodos pueden ser destructivos o no destructivos.

En los métodos destructivos, se producen modificaciones permanentes en la emulsión, de manera que la misma no puede volver a utilizarse para una nueva medición. Los métodos no destructivos son más adecuados para evaluar la cinética de cremado. Los métodos no destructivos pueden clasificarse en métodos mono-dato y multi-datos (Robins, 2000). En los métodos mono-dato se obtiene un solo parámetro a un determinado tiempo, mientras que los métodos multi-dato permiten obtener un perfil de datos originado a partir de un barrido o “scanning” de la muestra. En muchos casos, el proceso de floculación puede darse de manera simultánea al de cremado, por lo que estos métodos evalúan la cinética de cremado-floculación.

La floculación es la aproximación e interacción de las gotas entre sí, que conduce a la formación de agregados o flóculos. En este agregado, cada gota mantiene su forma e identidad. La formación de un agregado estable ocurre cuando las fuerzas atractivas entre las gotas son mayores que las repulsivas. La velocidad de este proceso depende entonces de la naturaleza de los grupos constitutivos de la película interfacial. Las interacciones atractivas proceden de interacciones de van der Waals e hidrofóbicas y las de repulsión de interacciones electrostáticas repulsivas y repulsión estérica entre las capas adsorbidas (Damodaran, 1997; McClements, 1999; Wagner, 2000).

En emulsiones preparadas con proteínas como agentes emulsificantes puede producirse la floculación por un mecanismo de puenteo (“bridging flocculation”). Cuando una proteína se adsorbe en la interfase toma configuraciones de “trenes”, “bucles” y “colas” (Israelachvili, 1992). La floculación se da cuando las “colas” de una molécula de proteína adsorbida en la interfase de una gota interaccionan con la interfase de otra gota (Tornberg et al., 1997). La concentración interfacial de proteína es el factor dominante que gobierna este mecanismo. Sin embargo, también depende de las propiedades de la proteína: peso molecular, grado de disociación, flexibilidad molecular e hidrofobicidad superficial (Tornberg et al., 1997). Para una proteína dada hay una concentración proteica interfacial donde la floculación es máxima. Por debajo de esa concentración, la homogeneización es ineficiente debido al predominio de la coalescencia, obteniéndose emulsiones de tamaño de gota elevado. A concentraciones altas de proteína la floculación por puenteo es inhibida (Dickinson et al., 1997). Durante el proceso de homogeneización, el transporte de las moléculas de proteína a la interfase es por convección (Walstra, 1983b); si la proteína no se adsorbe suficientemente rápido en relación a la creación de área interfacial, también puede darse la floculación. Hay que destacar que la floculación por puenteo es irreversible en condiciones de dilución y no

tiene lugar en emulsiones estabilizadas por agentes surfactantes no proteicos debido a que su estructura no es tan compleja como la de las proteínas (Tornberg et al., 1997).

El mecanismo de floculación por puenteo también puede darse en emulsiones en donde las proteínas cubren eficientemente el área interfacial creada. Sucede cuando las proteínas tienen una afinidad elevada por ciertos tipos de cationes (por ejemplo, Ca^{2+}), los mismos pueden servir de “puente” para la interacción entre las gotas. Los iones producen el apantallamiento (“screening”) de las interacciones de repulsión electrostática entre las moléculas de proteína adsorbidas, favoreciendo la agregación (Ye y Singh, 2001). La floculación por puenteo puede favorecerse también por efecto de un hidrocoloide sin o con muy poca actividad interfacial. La adición de polisacáridos en las emulsiones tiene por objeto aumentar la viscosidad de la fase continua, con lo cual se logra controlar el cremado. Sin embargo, con algunos polisacáridos este efecto sólo es logrado a altas concentraciones (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005). A concentraciones relativamente bajas las moléculas de polisacárido pueden interaccionar fuertemente con las de proteína, favoreciendo la floculación (Dickinson et al., 1989).

Cuando la floculación por puenteo es irreversible en condiciones de dilución, puede estudiarse por técnicas como la microscopía óptica y confocal (Tornberg y Ediriweera, 1988; Mc Clements, 1999), la turbidimetría y determinación de la distribución de tamaño de gota en ausencia y presencia de SDS (Ye y Singh, 2001; Anton et al., 2002; Relkin y Sourdet, 2005). En este último caso, las condiciones de alta dilución y agitación provocan la ruptura de los flóculos inestables, dejando sólo aquellos que resisten dichas condiciones. En muchos casos, las técnicas de dispersión de luz no dan el verdadero tamaño de los flóculos (Mc Clements, 1999). A pesar de estas limitaciones y de que los diámetros promedio obtenidos no sean valores absolutamente fidedignos, este método se utiliza en gran extensión (Ye y Singh, 2001; Antón et al., 2002; Relkin y Sourdet, 2005). Como conclusión, hay que destacar que los flóculos que se determinan son aquellos estables en las condiciones de medición.

Existe un segundo mecanismo de floculación conocido como floculación por depleción o por agotamiento (“depletion flocculation”) que también fue propuesto para el caso de emulsiones con polisacáridos (McClements, 1999). La adición de un polisacárido a las emulsiones induce la floculación por agotamiento por un efecto de volumen de exclusión. Cuando el espacio entre gotas adyacentes es más pequeño que el volumen hidrodinámico termodinámicamente más estable del polisacárido, el polímero es excluido del espacio entre las gotas. Esto establece un gradiente de concentración

local y por ende, un gradiente de presión osmótica que induce la floculación (Damodaran, 2005).

La coalescencia es el proceso por el cual dos gotas se encuentran y se produce la ruptura de la película interfacial de manera que forman una gota más grande. En consecuencia, este proceso es irreversible y viene determinado por la elasticidad de la película interfacial adsorbida que se opone a la deformación/ruptura de la misma (Carrera –Sánchez y Rodríguez Patino, 2005; Langevin, 2000; Wilde, 2000). Para que este proceso ocurra, las gotas deben estar lo suficientemente cercanas entre sí. Este hecho es más probable que se dé en emulsiones que presentan un alto grado de floculación o cuando se ha formado la fase crema (Damodaran, 2005).

Cuando dos gotas se acercan hay una capa delgada de fase continua (o lamela) que tiene un determinado espesor. Cuando este espesor disminuye por debajo de un valor crítico se produce la coalescencia. Por lo tanto, la estabilidad frente a la coalescencia en una emulsión será mayor cuanto más elevado sea el espesor de la lamela que separa a las gotas. La magnitud de este espesor está gobernada por dos fuerzas de carácter opuesto. En primer lugar, la presión dentro de una gota de la fase dispersa es superior a la de la fase continua en una magnitud que está dada por la ecuación de Laplace (ecuación 1.14). La otra fuerza es la presión de desprendimiento o de separación (“disjoining pressure”). Cuando dos gotas están desprovistas de agente emulsificante, por ejemplo agua y aceite, la presión de separación es despreciable y las gotas coalescen fácilmente por colapso del film interfacial cuando se acercan debido a la presión de Laplace. Sin embargo, cuando las mismas están cubiertas con un agente emulsificante, las interacciones coloidales entre las moléculas adsorbidas crean una presión de separación que tiende a incrementar el espesor de la lamela. Por lo tanto, la magnitud y naturaleza de las interacciones coloidales son de importancia fundamental para determinar si una emulsión es estable o no frente a la coalescencia.

En los casos en que una emulsión es sometida a esfuerzos de corte (por ejemplo un trabajo mecánico como es la agitación) la viscoelasticidad del film es de suma importancia para impedir la coalescencia. En una emulsión en reposo, las gotas también están en continuo movimiento y colisionan unas con otras, sin embargo, bajo condiciones de trabajo mecánico, la frecuencia y eficiencia de colisión entre las gotas puede aumentar considerablemente. El esfuerzo de corte puede producir deformación en el film interfacial el cual genera hoyos y posterior ruptura en el mismo, dando lugar a la coalescencia (Lucassen-Reynders, 1993; Damodaran, 2005). En general los films

interfaciales estabilizados por proteínas son más resistentes a los esfuerzos de corte que los estabilizados por agentes emulsificantes no proteicos, aún cuando éstos tienen mayor actividad superficial (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005).

Por otra parte, cuando la fase dispersa cristaliza parcialmente, el esfuerzo de corte acelera el proceso de coalescencia parcial. Esto es deseable en la elaboración de emulsiones alimentarias derivadas de la leche, como son las cremas heladas, la crema de leche o la manteca. Dado que en estas emulsiones los films interfaciales son muy resistentes por estar estabilizados por proteínas, fundamentalmente por caseína, a fin de lograr una desestabilización controlada se adicionan agentes emulsificantes no proteicos conocidos como demulsificantes, los cuales disminuyen la viscoelasticidad del film interfacial induciendo la coalescencia parcial durante el batido o agitación.

La coalescencia puede evaluarse por los mismos métodos utilizados para el estudio de la floculación, porque en ambos procesos hay un aumento del tamaño de partícula. Sin embargo, al ser un mecanismo de desestabilización más lento, se recurre a los métodos acelerados: centrifugación, efectos combinados de almacenamiento y centrifugación, y fuerzas mecánicas.

La desproporción de Ostwald es causada por un transporte por difusión de fase dispersa desde las gotas más pequeñas a las más grandes en una emulsión. El efecto es el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. En la práctica, es muy difícil distinguir este proceso del de coalescencia. Sin embargo, la insolubilidad del aceite en la fase acuosa impide el transporte difusional por lo que este mecanismo es más importantes en otros sistemas dispersos, como las espumas donde el gas de las burbujas puede difundir a través de la fase acuosa. La presencia de sustancias hidrosolubles en la fase oleosa dispersa (alcoholes, ácidos grasos de cadena corta) puede inducir en las emulsiones un cierto grado de desproporción (Friberg, 1997; McClements, 1999).

Los mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada. Una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, el tipo de agente emulsificante empleado y su concentración inicial en la fase acuosa (u oleosa), la magnitud de ϕ (o ϕ_m), la adición de componentes (sales, azúcares), el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como ser trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación. En este caso, no se han incluido los mecanismos químicos de desestabilización, producto de procesos tales como la oxidación lipídica o alteración por crecimiento microbiano. Los

cambios químicos en algunos componentes de la emulsión pueden favorecer la desestabilización de una emulsión por mecanismos físicos (McClements, 1999).

1.6.3 Hidrofobicidad de las proteínas y su relación con la funcionalidad.

Desde hace aproximadamente 40 años se han realizado intentos para relacionar el contenido de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos con las propiedades físicas de las proteínas (Waugh, 1954; Bigelow, 1967; Schwenke, 1975; Graham y Phillips, 1979; Kato y Nakai, 1980; Shimada y Matsushita, 1980; Voutsinas et al., 1983a; Townsend y Nakai, 1983; Nakai et al., 1986; Oakenfull, 1997; Schwenke et al., 1998). La hidrofobicidad promedio y la frecuencia de carga fueron propuestos por Bigelow (1967) como las características moleculares más importantes y que más influyen en las propiedades físicas, como la solubilidad de las proteínas. Dado que la solubilidad de una proteína bajo ciertas condiciones de la solución se puede entender como la manifestación de un equilibrio entre interacciones proteína-solvente (hidrofílico) y proteína-proteína (hidrofóbico), proteínas con un promedio menor de hidrofobicidad y mayor frecuencia de carga tendrían según Bigelow, (1967) una mayor solubilidad. Esta relación empírica se ha confirmado para la mayoría de las proteínas. Sin embargo, no explica las características de solubilidad de un número de proteínas. De hecho, es la hidrofobicidad y la distribución de carga de la superficie proteica y no el promedio de hidrofobicidad o frecuencia de carga de la molécula como un todo, lo que es críticamente importante para su funcionalidad. La hidrofobicidad promedio según Bigelow, (1967) puede, sin embargo, servir como un indicador de estabilidad estructural de una proteína globular.

La hidrofobicidad promedio de la mayoría de las proteínas globulares incluyendo las proteínas 11S de almacenamiento en la semilla se encuentra en un intervalo entre 3768 y 4187 J/resto (Bigelow, 1967; Schwenke, 1981). Dado que una parte considerable de los residuos aminoácidos hidrofóbicos sirven para estabilizar la parte interna de las proteínas, se encontraron grandes discrepancias entre la hidrofobicidad promedio según Bigelow y la hidrofobicidad superficial (H_o) determinada por técnicas con marcadores fluorescentes (Kato y Nakai, 1980; Voutsinas et al., 1983).

La hidrofobicidad superficial H_o , determinada experimentalmente para un gran número de proteínas de origen vegetal y animal, se relaciona con el índice de actividad

emulsificante (IAE) y el índice de estabilidad emulsificante (IEE) (Townsend y Nakai, 1983), mientras que la capacidad de espuma (CE) y la estabilidad de espuma (EE) muestran una mejor correlación con la “hidrofobicidad potencialmente expuesta” H_e , (Voutsinas et al., 1983a y b; Townsend y Nakai, 1983). Estos resultados indican un desenrollamiento más extensivo de las moléculas de proteína en una interfase agua-aceite que en una interfase aceite-agua como fue descrito por Graham y Phillips, (1979). Como podría esperarse, H_e está más estrechamente relacionada con las propiedades térmicas (coagulación por calor, espesamiento y gelación) que H_o (Voutsinas et al., 1983a; Nakai et al., 1986). En estos casos, la hidrofobicidad promedio de acuerdo con Bigelow puede dar una cantidad definida físicamente para la predicción de la funcionalidad.

1.6.4 Viscosidad de soluciones proteicas

En una disolución ideal, el esfuerzo de cizalla, fuerza por unidad de área, F/A , es directamente proporcional a la velocidad de deformación, dv/dr . Dicha relación se expresa como:

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr} \quad (\text{Ecuación 1.16})$$

La constante de proporcionalidad η se denomina coeficiente de viscosidad. Los fluidos que obedecen esta expresión se denominan fluidos newtonianos.

El comportamiento de flujo de las disoluciones se ve muy influido por el tipo de soluto. Los solutos poliméricos de elevado peso molecular suelen aumentar mucho la viscosidad, incluso a concentraciones muy bajas. Dicho comportamiento de flujo depende, además, de varias propiedades moleculares como el tamaño, la forma, la flexibilidad y la hidratación. Las disoluciones de macromoléculas enrolladas al azar tienen mayor viscosidad que las de macromoléculas compactas del mismo peso molecular.

La mayor parte de las disoluciones macromoleculares, incluidas las disoluciones proteicas, no ofrecen un comportamiento newtoniano, especialmente a concentraciones elevadas. En estos sistemas, el coeficiente de viscosidad disminuye cuando aumenta la velocidad de deformación. A este comportamiento se le denomina pseudoplástico o reodiluyente y responde a la ecuación:

$$\frac{F}{A} = m \left(\frac{dv}{dr} \right)^n \quad (\text{Ecuación 1.17})$$

donde m es el coeficiente de consistencia y n un exponente conocido como “índice de comportamiento de flujo”. El comportamiento pseudoplástico de las disoluciones de proteína se debe a la tendencia de estas moléculas a orientarse con su eje mayor en la dirección del flujo (Damoradan, 1996).

El factor principal que influye en el comportamiento viscosimétrico de los fluidos proteicos, es el diámetro aparente de las moléculas o partículas dispersas. Este diámetro depende de los siguientes parámetros (Cheftel y Lorient, 1989):

- 1) *Características intrínsecas* de la molécula proteica, tales como la masa, tamaño, volumen, estructura, asimetría molecular, cargas eléctricas, facilidad de deformación, cargas eléctricas, facilidad de deformación (algunos factores ambientales tales como el pH, fuerza iónica o la temperatura pueden modificar las características debido al desdoblamiento de la molécula).
- 2) *Las interacciones proteína-disolvente*, que influyen en la hinchazón, solubilidad y esfera de hidratación hidrodinámica que rodea la molécula.
- 3) *Las interacciones proteína-proteína* que determinan el tamaño de los agregados.

1.7 Propiedades funcionales de las proteínas de soja

Las proteínas de semillas de leguminosas ocupan un lugar importante en el campo de la tecnología de los alimentos en relación al comportamiento funcional (Hall, 1996). Las proteínas de soja presentan un amplio espectro de propiedades funcionales que las hacen adecuadas para ser utilizadas en diversos alimentos. En la Tabla 1.5 se pueden apreciar los distintos tipos de alimentos en los que intervienen y las propiedades funcionales relacionadas (Kinsella, 1979).

Algunos autores han encontrado una relación entre la solubilidad y las propiedades emulsificantes de las proteínas de soja. Esto resulta relevante en sistemas alimentarios que sean emulsiones de baja viscosidad, como por ejemplo los aderezos para ensaladas. En emulsiones cárnicas en cambio, productos de soja con baja

solubilidad cercana al 50% aseguran una adecuada capacidad emulsificante y además la suficiente estabilidad térmica que evita la separación de grasa por tratamientos térmicos posteriores (Visser y Thomas, 1987). Si bien existe una relación entre solubilidad y capacidad emulsificante, según Kato y Nakai, 1980, el parámetro fisicoquímico que mejor predice el comportamiento de las proteínas como agentes emulsificantes es la hidrofobicidad superficial

Tabla 1.5 Propiedades funcionales de proteínas de soja en diferentes alimentos

Propiedad funcional	Sistema alimentario	Producto proteico de soja
Solubilidad	Bebidas	Harina, concentrado, aislado, hidrolizado
Adsorción de agua	Productos cárnicos, salsas, productos panificados	Harina, concentrado
Viscosidad	Sopas	Harina, concentrado, aislado
Gelificación	Quesos, productos cárnicos	Concentrado, aislado
Adhesión-cohesión	Carnes, salsas, pastas, panes	Harina, concentrado, aislado
Elasticidad	Productos cárnicos y panificados	Aislado
Emulsificación	Sopas, tortas, salsas	Harina, concentrado, aislado
Espumado	Coberturas batidas, tortas, panes	Aislado, hidrolizado
Control de color	Panes	Harina

(Kinsella, 1979)

1.7.1. Propiedades de emulsificación

Las proteínas de soja purificadas se utilizan como un surfactante macromolecular para estabilizar emulsiones aceite en agua en productos alimenticios como sopas, crema para café y salsas. A pesar de su importancia comercial, el conocimiento fundamental acerca de las propiedades emulsificantes de las proteínas de soja es escaso en comparación con las propiedades gelificantes (Utsumi et al., 1997).

Tornberg (1978) demostró que aislados de proteínas de soja tuvieron una actividad emulsificante mejor que concentrados proteínas de suero lácteo y caseinato de sodio. Kato et al. (1983) también mostraron que la actividad emulsificante de β -conglucina era mucho mejor que la de la ovoalbúmina, la cual es frecuentemente usada como una proteína de referencia; ellos también informaron que la actividad emulsificante de β -conglucina era menor que las de κ -caseína, β -lactoglobulina y albúmina de suero bovino.

1.7.2. Propiedades de espumado

Se ha indicado que las proteínas de soja son agentes espumantes pobres, principalmente por la estructura compacta que resiste la absorción y el desplegamiento en la interfase, previniendo una adecuada formación de la película (German et al., 1985). Las proteínas de soja difunden a menor velocidad que otras proteínas, lo cual puede deberse a la gran masa molecular de las moléculas que migran, probablemente con la estructura cuaternaria intacta, que se desnaturaliza al adsorberse en la interfase (Tornberg, 1979).

La β -conglucina presenta una mejor habilidad para disminuir la tensión interfacial, independientemente del pH, por su mayor hidrofobicidad (Hayakawa y Nakai, 1985) y menor masa molecular. En el estado nativo, la glicina presenta una conformación globular compacta, baja flexibilidad y gran tamaño molecular y no posee un alto grado de hidrofobicidad superficial, ni un número significativo de sitios para uniones hidrofóbicas (German et al., 1985; Kim et al., 1987). Sin embargo, la glicina presenta una mayor capacidad de espumado y mayor estabilidad en espumas que la β -conglucina (Yu y Damodaran, 1991b), aún cuando esta última, por ser una glicoproteína exhibe mayor viscosidad y capacidad de adsorción de agua en solución (Rao et al., 1986) indicando que otros factores son primordiales para determinar el comportamiento en la formación y estabilidad de espumas. En las condiciones ensayadas, pH 7, la β -conglucina es más electronegativa e hidrofílica, siendo mayor la barrera energética para su adsorción en la interfase e impidiendo la formación de una red cohesiva proteica por una alta repulsión electrostática. La glicina 11S, con menor carga, presentaría una barrera energética menor y a su vez menores repulsiones, formándose una red proteica en multicapas que retardaría el drenado de las lamelas.

Hace relativamente pocos años, se ha divulgado que la velocidad de adsorción y de reducción de la tensión superficial en la interfase aire-agua de glicinina de soja es mayor a pH 3 que a pH 6,7 (Martin et al., 2002). Esto fue atribuido a la disociación del oligómero de glicinina de la forma 11S a subunidades de la forma 3S. Se ha informado también que la viscosidad superficial de la película de glicinina en la interfase aire-agua después de 2 horas de formada fue más alta a pH 3 que a pH 6,7; sin embargo, la viscosidad fue igual para ambas películas después de 24 horas (Martin et al., 2002), sugiriendo este hecho que la forma 11S de la glicinina se puede disociar lentamente en subunidades en la interfase. Las propiedades de formación de espuma de la glicinina fueron mejores a pH 3 que a pH 6,7, confirmando una correlación directa entre el estado conformacional de la proteína, características reológicas de la película de proteína y las propiedades de formar espuma.

1.7.3 Modificación de proteínas de soja para mejorar sus propiedades funcionales

Sorgentini et al. (1995) realizaron estudios sobre los efectos del tratamiento térmico en aislados proteicos de soja. Una mejora de las propiedades funcionales se observa bajo tratamientos ácidos moderados de aislados proteicos de soja, avena y girasol, en la proteína de soja 11S o en el gluten. Muchos de estos tratamientos incluyen calentamiento, que introduce una modificación adicional como es la hidrólisis y desamidación. El medio ácido sin calentamiento no es herramienta muy explotada para modificar las proteínas de soja para propósitos específicos.

En 1996, Wagner et al., realizaron un trabajo sobre los cambios en la estructura y propiedades funcionales de aislados proteicos de soja causados por tratamientos ácidos moderados a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos muestran que hay una desnaturalización selectiva de la proteína 11S lo que conduce a una mayor hidrofobicidad superficial. La desnaturalización y disociación de la proteína 11S lleva a que los aislados modificados tengan una mejor capacidad de formación y estabilización de espumas. Estos antecedentes hacen que sea interesante investigar más sobre como afecta el tratamiento ácido a las propiedades funcionales de las proteínas de soja y en particular a las globulinas 11S y 7S.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- ◆ Aislar, fraccionar y caracterizar las proteínas de soja 11S y 7S y un aislado proteico de soja (APS). Estudiar la influencia del tratamiento a pH ácido sobre las muestras nativas. Relacionar y comparar las propiedades espumantes, emulsificantes e interfaciales de las muestras nativas y tratadas a pH ácido.

Objetivos específicos

- ◆ Obtener un aislado proteico de soja y aislar las fracciones 7S y 11S de las proteínas de soja nativas a partir de harina de soja desgrasada. Realizar un tratamiento a pH ácido sobre una porción de las muestras nativas.
- ◆ Caracterizar desde el punto de vista estructural y fisicoquímico APS, 11S y 7S nativas y tratadas a pH ácido
- ◆ Analizar la capacidad para formar y estabilizar espumas y emulsiones de las muestras nativas y tratadas a pH ácido y la influencia del tratamiento ácido sobre estas propiedades.
- ◆ Analizar las propiedades interfaciales de las muestras nativas y tratadas a pH ácido y relacionarlas con las propiedades espumantes y emulsionantes.
- ◆ Relacionar las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las diferentes proteínas ensayadas con las propiedades espumantes, emulsionantes e interfaciales.

HIPÓTESIS

En este trabajo se pretende aislar las fracciones 7S y 11S de proteínas de soja y someterlas a un tratamiento ácido, con el fin de poder utilizarlas como ingredientes funcionales en alimentación. En base a lo expuesto precedentemente en la Introducción se espera que las proteínas tratadas a pH ácido presenten propiedades funcionales mejoradas respecto a las correspondientes proteínas nativas.

La acción del pH ácido provocará una desnaturalización de la proteína por lo que ésta expondrá más grupos hidrofóbicos. Estos cambios estructurales se reflejarán en un mejor reacomodo de la molécula en las interfases agua-aceite y agua-aire lo que conduciría a una mejora en la estabilidad de las espumas y emulsiones formadas.

Las propiedades funcionales de las proteínas de soja ha sido estudiada previamente en proteínas nativas o tratadas térmicamente, pero hay pocos antecedentes de estudios con proteínas tratadas a pH ácido. Este trabajo pretende diferenciarse de otros trabajos realizados ya que se determinarán las velocidad con la que ocurren los diferentes procesos de desestabilización de espumas y emulsiones, como puede ser el drenado gravitacional y la desproporción en espumas y la velocidad con la que creman las gotas de aceite de diferentes tamaños en una emulsión.

Por otro lado el empleo de nuevas y mejores formas de análisis y evaluación de resultados obtenidos con nuevos equipos, permitirán obtener nuevos conocimientos que contribuyan al saber de las propiedades funcionales de proteínas de soja.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de los buffers utilizados

2.1.1 Buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0

Se agregaron en un matraz aforado de 200,0 ml, 39,0 ml de una solución acuosa 0,02 M de NaH_2PO_4 y 61,0 ml de una solución acuosa 0,02 M de Na_2HPO_4 y se llevó a volumen con agua destilada. Fuerza iónica del buffer 0,02.

2.1.2 Solución de fosfato de sodio 10 mM ajustada a pH 2,5

Se agregaron en un matraz aforado de 200,0 ml, 39,0 ml de una solución acuosa 0,02 M de NaH_2PO_4 y 61,0 ml de una solución acuosa 0,02 M de Na_2HPO_4 . Se llevó a pH 2,5 por agregado de HCl 6 N y se ajustó la fuerza iónica a 0,02 con NaCl y luego se llevó a volumen con agua destilada.

2.1.3 Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0

Se agregaron en un matraz aforado de 200,0 ml, 5,3 ml de una solución acuosa 0,2 M de NaH_2PO_4 y 94,7 ml de una solución acuosa 0,2 M de Na_2HPO_4 y se llevó a volumen con agua destilada. Fuerza iónica del buffer es 0,28.

2.1.4 Solución de fosfato de sodio 100 mM ajustada a pH 2,5

Se agregaron en un matraz aforado de 200,0 ml, 5,3 ml de una solución acuosa 0,2 M de NaH_2PO_4 y 94,7 ml de una solución acuosa 0,2 M de Na_2HPO_4 . Se llevó a pH 2,5 por agregado de HCl 6 N y se ajustó la fuerza iónica a 0,28 con NaCl y luego se llevó a volumen con agua destilada.

2.2 Obtención de aislado de proteína de soja

El aislado proteico de soja en estado nativo (APSn) se obtuvo por solubilización acuosa de harina de soja desengrasada en medio alcalino (pH 8,0) y posterior

precipitación isoelectrica (pH 4,5), dispersión del precipitado en medio alcalino (pH 8,0) y secado por liofilización (liofilizador Christ Alpha 1-4, European model LOC-1M) (Petruccelli y Añón, 1994).

El contenido de proteínas del aislado se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

2.3 Aislamiento de las fracciones 7S y 11S de soja

Se realizó el aislamiento de las fracciones nativas de las proteínas 7S (β -conglucina) (7Sn) y 11S (glicina) (11Sn) a partir de harina de soja desengrasada según la técnica descrita por Nagano et al. (1992), luego se dispersaron en medio alcalino (pH 8,0) y se secaron por liofilización (liofilizador Christ Alpha 1-4, European model LOC-1M).

El contenido de proteínas correspondiente a cada fracción se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

El método de Nagano et al. (1992) se basa en la separación de la globulina 7S a pH 5,0, 4°C y una concentración de NaCl 0,25 M en el medio. El NaCl se utilizó para el “salting in” de las proteínas y luego con agua se llevó a cabo la precipitación. Para obtener una buena pureza de la globulina 11S y un alto rendimiento de globulina 7S se requiere de un agente reductor en el paso de precipitación isoelectrica. Otros métodos utilizaban con este fin el 2-mercaptoetanol (Nash et al., 1974; Iwabushi and Yumauchi, 1987), en tanto que Nagano et al. utilizan bisulfito de sodio (Deak et al., 2007).

2.4 Tratamiento con pH ácido del aislado proteico de soja y de las fracciones 7S y 11S

Se tomó una porción de las proteínas nativas, se preparó una dispersión de 15 mg/ml en buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según lo detallado en 2.1.1), se ajustó a pH 2,0 con HCl 6,0 N durante 1 hora, se congelaron las muestras y se liofilizaron en un liofilizador Christ Alpha 1-4, European model LOC-1M. Las muestras tratadas a pH ácido se denominan: APSt, 7St, 11St.

Se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

2.5 Neutralización de proteínas tratadas con pH ácido

Una porción de las proteínas tratadas a pH ácido, se dispersaron en buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según lo detallado en el ítem 2.1.1) en una concentración de 15 mg/ml, se ajustó el pH de la solución proteica a 8,0 mediante el agregado de pequeñas cantidades de NaOH 2,0 N con agitación continua, se congelaron y liofilizaron (liofilizador Christ Alpha 1-4, European model LOC-1M). Las muestras que recibieron este tratamiento se denominan: APSr, 7Sr, 11Sr.

Estas muestras sólo se utilizaron para realizar los ensayos de calorimetría diferencial de barrido.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

2.6 Caracterización fisicoquímica-estructural de los compuestos obtenidos

Las dispersiones de las muestras a ser utilizadas en los ensayos de caracterización, se prepararon a una concentración de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según 2.1.1). En todos los casos las distintas muestras fueron agitadas, haciendo uso de agitadores magnéticos a 700 rpm, durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.6.1 Solubilidad

La solubilidad de las diferentes muestras se determinó dispersándolas en solución de buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según 2.1.1) a una concentración de 1 mg/ml durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La solubilidad se expresó como índice de solubilidad (IS) según la ecuación 2.1, determinándose la proteína total por el método de Lowry.

$$IS = \left(\frac{\text{Proteína soluble (g)}}{\text{Proteína total (g)}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

De la misma forma se determinó la solubilidad de APSt, 11St y 7St en solución fosfato de sodio 10 mM ajustada a pH 2,5 (preparado según 2.1.2) a una concentración de 1 mg/ml.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.6.3 Identificación de las fracciones por electroforesis

Las corridas electroforéticas de las soluciones conteniendo APSn, APSt, 11Sn, 11St, 7Sn y 7St se realizaron en un equipo BIO-RAD MINI PROTEIN II CELL. Se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante con SDS en gradiente 7–15 % de acrilamida con solución reguladora de pH para el gel de corrida de Tris-HCl 0,375 M, SDS 1 % (p/v), pH 8,8 para el gel de corrida. La solución reguladora de pH de tratamiento de la muestra usada fue Tris-HCl 0,125 M, glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), azul de bromofenol 0,2 % (p/v), pH 6,8. Algunas muestras fueron tratadas con β -mercaptoetanol y calentadas en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos, con el fin de poder identificar si existen puentes disulfuro entre los polipéptidos constituyentes de las proteínas estudiadas. La solución reguladora de pH de la corrida electroforética fue Tris-HCl 0,025 M, glicinina 0,192 M, SDS 0,1 % (p/v), pH 8,3. La corrida fue hecha a un voltaje constante de 90 V para dos geles de 1,0 mm de espesor. Se utilizó una unidad de electroforesis SE 640 Hoefer Scientific Instruments. Los geles fueron fijados y coloreados por tratamiento con solución 0,2 % de Coomassie Blue R-250 en agua:metanol:ácido acético (5:5:2) por 12 horas. Los mismos fueron desteñidos con solución decolorante de agua:metanol:ácido acético (6,5:2,5:1). El peso molecular de las proteínas fue estimado mediante un patrón de pesos moleculares LMW Pharmacia consistente en 6 proteínas de peso molecular 14,4, 20,1, 30,0, 45,0, 66,0 y 97,0 kDa, respectivamente.

La densitometría de las imágenes digitalizadas producidas se realizó con el programa IMAGE J 1.44. Los resultados SDS-PAGE se calcularon según Deak et al.

(2007), como % de composición donde: la proteína total de almacenamiento en una fracción dada es = [(Suma de las bandas de la subunidad de la proteína de almacenamiento) / (suma de todas las bandas)] x 100, la pureza de la fracción = [(suma de las bandas de la subunidad) / (suma de las bandas de la proteína de almacenamiento)] x 100, y la composición de una subunidad específica de una proteína = [(subunidad banda) / (suma de las subunidades de la proteína específica)] x 100.

2.6.4 Hidrofobicidad aromática superficial

Los valores de hidrofobicidad superficial (H_o) de cada muestra fueron determinados por unión de la sonda fluorescente ANS (ácido 1-anilino 8 naftalen-sulfónico) a los restos aromáticos de las proteínas de acuerdo al método de Hayakawa y Nakai (1985). Las dispersiones proteicas (1 mg/ml) fueron preparadas en buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según 2.1.1) y agitadas durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

El sobrenadante fue diluido en forma seriada con el mismo buffer, hasta obtener concentraciones de proteína en el rango de 1 a 0,05 mg/ml. A 1 ml de cada dilución se agregó 15 μ L de ANS (8,0 mM en buffer fosfato de sodio pH 7,0 10 mM (preparado según 2.1.1)). La intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de emisión de 475 nm y una de excitación de 363 nm en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2 Luminescence spectrometer. La intensidad de fluorescencia relativa se ajustó a un 80% de la escala usando 5 μ l de ANS 8 mM en 1 ml de metanol absoluto. Según Kato y Nakai (1980) el índice de hidrofobicidad superficial (H_o) corresponde a la pendiente inicial de la curva de intensidad de fluorescencia relativa versus la concentración de proteína. La fluorescencia relativa se determinó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia neta (IFN) y la intensidad de fluorescencia máxima, leída para el ANS en metanol (IFANSm). La IFN se determinó restando a la intensidad de fluorescencia emitida por el conjugado proteína-ANS (IFe) la intensidad de fluorescencia del blanco (IFb):

$$IFN = IFe - IFb \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

$$IF = \left(\frac{IFN}{IFANSm} \right) \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

2.6.5 Estabilidad térmica y grado de conformación nativa mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC):

Se determinó la temperatura, entalpía de desnaturalización y grado de desnaturalización utilizando un Calorímetro Diferencial de Barrido - DSC Serie Q100 TA Instruments con software Universal Analysis 2000. La calibración del equipo se realizó mediante ensayos con indio, ácido láurico y ácido esteárico (pa) como estándares a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las muestras analizadas fueron dispersiones de APSn, APSt, APSr, 11Sn, 11St, 11Sr, 7Sn, 7St y 7Sr previamente descritos, al 20% p/v en agua destilada. Se utilizaron cápsulas de aluminio herméticas en las que se colocaron aproximadamente 20 mg de muestra. Como referencia se utilizó una cápsula con muestra, previamente sometida al ensayo calorimétrico. Las muestras se calentaron a una velocidad de 10 °C/min en un intervalo de temperatura entre 20 y 120 °C. Una vez realizado el ensayo de DSC se determinó el contenido de materia seca de las muestras en estufa por calentamiento a 105 °C con perforación previa de las cápsulas hasta peso constante.

El grado de desnaturalización fue calculado según la expresión (Petruccelli y Añón, 1996):

$$GD = \frac{\Delta Hd_n - \Delta Hd_t}{\Delta Hd_n} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Y el grado de recuperación de la estructura nativa se calculó según:

$$GRN = \frac{\Delta Hd_m - \Delta Hd_t}{\Delta Hd_n} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Siendo

GD: grado de desnaturalización

GRN: grado de recuperación de la estructura nativa

ΔH_{d_n} : entalpía de desnaturalización de la proteína nativa

ΔH_{d_t} : entalpía de desnaturalización de la proteína tratada a pH ácido

ΔH_{d_m} : entalpía de desnaturalización de la proteína tratada a pH ácido y luego llevada a pH 8,0

2.7 Determinación de propiedades funcionales

2.7.1 Tensión superficial e interfacial

2.7.1.1 Constantes de absorción y reordenamiento de proteína en la interfase y tensión de equilibrio

Para seguir el proceso de modificación de la tensión superficial en el tiempo y dado que los procesos de adsorción, desenrollamiento y reordenamiento de la molécula de proteína en la interfase ocurren en forma simultánea, se utilizó como modelo cinético una ecuación de primer orden con dos componentes exponenciales según lo propuesto por Panizzolo (2005)

$$\gamma_t = A_a e^{-k_a t} + A_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

donde k_a y k_r son constantes de velocidad de primer orden para los procesos de adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interfase aire-agua respectivamente, A_a , A_r y γ_e : son los parámetros de amplitud de la tensión superficial en los distintos estados conformacionales de adsorción, reordenamiento y equilibrio de la proteína en la interfase.

Estos parámetros se estimaron mediante regresión de cuadrados mínimos. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.7.1.2 Parámetros viscoelásticos.

Los parámetros viscoelásticos, módulo dilatacional superficial, E , y sus componentes elástica, E_d , y viscosa, E_v , se midieron una vez alcanzada la tensión de equilibrio, manteniendo constante la amplitud de la deformación ($\Delta A/A$) en 10% y la frecuencia de la oscilación (ω) en 200 mHz.

En el método empleado la gota se somete a una compresión-expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas. El módulo dilatacional superficial se determina a través del cambio de tensión interfacial, γ , (ecuación 2.7), que resulta de un pequeño cambio de la superficie de la gota, A , (ecuación 2.8), según la ecuación 2.9 (Lucassen-Reynders, 1993).

$$\gamma = \gamma_0 \times \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

$$A = A_0 \times \text{sen}(\omega t) \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

$$E = \frac{d\gamma}{\frac{dA}{A}} = \frac{d\pi}{d \ln A} \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

donde γ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación, respectivamente, Φ : es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, $\Pi = \gamma_0 - \gamma$: es la presión superficial, y γ_0 : es la tensión interfacial del solvente en ausencia de proteína.

El módulo dilatacional superficial es una cantidad compleja que se compone de una parte real y otra imaginaria (ecuación 2.10). La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional superficial, $E_d = |E|\cos \varphi$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial, $E_v = |E|\text{sen} \varphi$.

La relación (γ_0/A_0) es el valor absoluto del módulo $|E|$, una medida de la resistencia del material a una deformación dilatacional (elástica + viscosa).

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\varphi = 0$) y el término imaginario del módulo es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, φ es igual a 90 y la parte real del módulo es cero. La tangente del ángulo de pérdida se define mediante la ecuación 2.11. Si la película es puramente elástica, la tangente del ángulo de pérdida es cero.

$$E = \left(\frac{\gamma_0}{A_0} \right) \times (\cos \varphi + i \text{sen} \varphi) = E_d + iE_v \quad (\text{Ecuación 2.10})$$

$$\tan \varphi = \frac{E_v}{E_d} \quad (\text{Ecuación 2.11})$$

El valor de densidad del aceite utilizado se determinó mediante determinaciones picnométricas a $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$. La densidad del aceite (δ_a), se calculó a partir de la siguiente expresión

$$\delta_a = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \cdot \delta_{\text{agua}} \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

donde m_1 : masa del picnómetro vacío (en gramos), m_2 : masa del picnómetro lleno de agua (en gramos), m_3 : masa del picnómetro lleno de aceite, (en gramos), δ_{agua} = densidad del agua a 20°C

2.7.1.3 Tensión superficial e interfacial con tensiómetro dinámico de gota

Las mediciones de tensión superficial (agua/aire) e interfacial (agua/aceite) de equilibrio y las propiedades reológicas superficiales de las películas adsorbidas sobre la interfase (aceite/agua) y (aire/agua) de todas las muestras dispersadas a una concentración de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio pH 7,0 y pH 2,5 10 mM (preparado según 2.1.1 y 2.1.2) para el sistema aceite/agua y buffer fosfato de sodio pH 8,0 y pH 2,5 100 mM (preparado según 2.1.3 y 2.1.4) para el sistema aire/agua, se llevaron a cabo en un tensiómetro dinámico de gota (Tracker, IT-Concept, Saint-Clement Places, France). Las experiencias se realizaron a temperatura ambiente. La disolución de proteína se colocó en la cubeta del tensiómetro, y el aire o el aceite en la jeringa desde la que se forma la gota. Una vez formada la gota se evaluaron los cambios de tensión interfacial o superficial en función del tiempo. Cada medición se realizó al menos por triplicado.

Las determinaciones se realizaron, durante 3600 segundos para el sistema aceite/agua y 7200 segundos para el sistema aire/agua, sin someter a la gota a ningún tipo de variación.

2.7.1.4 Descripción del tensiómetro dinámico

El diseño esquemático del equipo Tracker y su fotografía se muestran en la Figura 2.1. En el extremo de la aguja se forma una gota mediante el movimiento del émbolo de la jeringa (3) controlado por un motor (4). El proceso de formación de la gota y sus variaciones en la tensión superficial, es seguido por una cámara (5) que enfoca a la

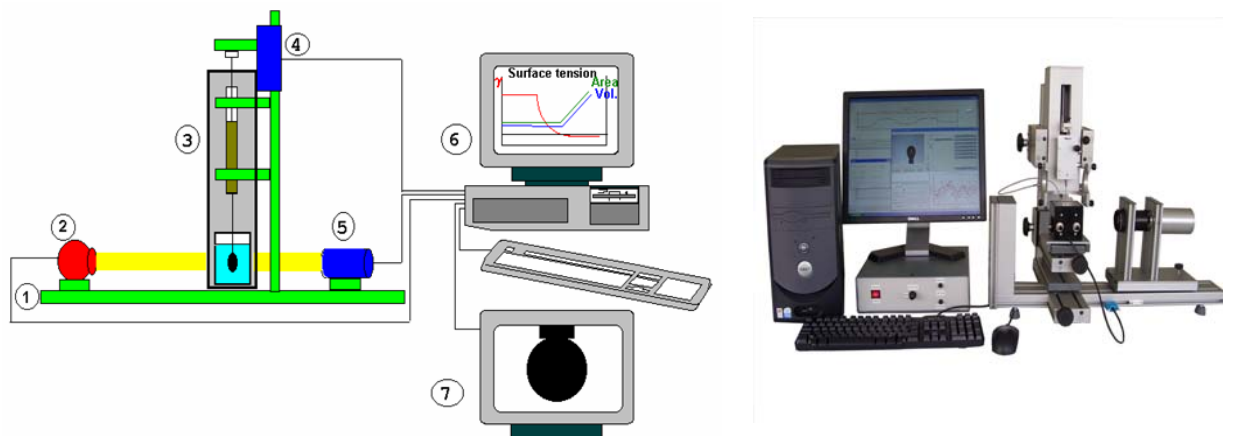


Figura 2.1 Representación esquemática y fotografía del tensiómetro dinámico de gota (Tracker). 1: base de fibra óptica 2: Fuente luminosa 3: jeringa 4: Motor 5: Cámara 6: Computadora 7: monitor de vídeo. (Tomado de Alain CAGNA, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France, 2008)

iluminada por una fuente luminosa (2). El proceso se visualiza en el monitor de video (7) y se registra la información recolectada en la computadora (6), la que mediante su software permite seleccionar las distintas condiciones de medida y realizar el análisis de los datos recolectados. En la operación el software captura una imagen de la gota y le asigna valores según el protocolo de análisis elegido por el usuario, los compara con valores teóricos obtenidos según ecuación 2.13, 2.14 y 2.15 utilizando valores estimados de ω y γ , luego se van ajustando estos parámetros por sucesivas estimaciones entre los valores teóricos y experimentales.

2.7.1.4.1 Determinación de la tensión utilizando tensiómetro dinámico

¿Como se determina la tensión superficial de la gota utilizando el Tracker?

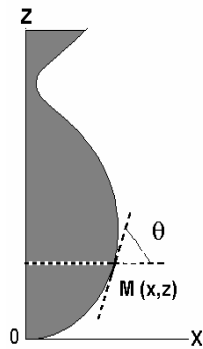


Figura 2.4. Perfil de la gota formada

El software del Tracker utiliza dos ecuaciones para obtener la tensión interfacial:

1) Ecuación de Laplace -Young

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right) \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

donde ΔP : es la diferencia de presión dentro y fuera de la gota en un punto M de la interfase Ver figura 2.4, γ : es la tensión interfacial, R y R' son los radios de curvatura en el punto M de la interfase. Siendo R y R' ortogonales.

2) Ecuación de equilibrio hidrostático en un plano que pasa por el punto M

$$2\pi x \gamma \sin \theta = V (\rho_h + \rho_l)g + \pi x^2 \Delta P \quad (\text{Ecuación 2.14})$$

donde ΔP : es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota en el punto M en la interfase, g: es la aceleración de la gravedad, γ : es la tensión interfacial, V: es el volumen por debajo de un plano que pasa por el punto M, ρ_h y ρ_l son densidades de las fases

Ecuación de la gota en el punto M

No es posible sustituir simplemente la expresión de ΔP de Young-Laplace en la ecuación 2.14, ya que la primera ecuación se encuentra en coordenadas de superficie y la ecuación 2.14 en coordenadas cartesianas. Ambas ecuaciones deben expresarse en el mismo sistema de coordenadas con el fin de combinarlas y obtener una solución para la tensión superficial (γ). Dicha solución se obtiene por sucesivas aproximaciones. La ecuación se puede simplificar de manera que la forma sólo dependa de un parámetro número de enlace (ω)

$$\omega = \frac{g\Delta\rho}{\gamma b^2} \quad (\text{Ecuación 2.15})$$

donde $\Delta\rho$: es la diferencia de densidad entre las dos fases., g : es la aceleración de la gravedad; b : es $1/r$, donde r es el radio de caída en su ápice. Se debe tener en cuenta que los radios de curvatura en el vértice de caída son iguales, $R=R'$

2.8 Determinación de las propiedades espumantes

El estudio de formación y estabilidad de espuma se realizó mediante el método conductimétrico desarrollado por Loisel et al., 1993, con pequeñas modificaciones. La espuma fue generada por burbujeo de aire a través de una placa de vidrio sinterizado, tipo G2 con un caudal de 100 ml/min hasta generar un volumen de espuma preestablecido de 60 ml. El ensayo se realizó utilizando 10 ml de dispersión de las distintas muestras en una concentración de proteína de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio pH 8,0 y pH 2,5 100 mM (preparado según 2.1.3 y 2.1.4). La fuerza iónica se mantuvo constante en 0,28 mediante el agregado de NaCl como ya se mencionó en 2.1.4.

El estudio de la formación de espuma se abordó desde dos aspectos uno cuantitativo considerando dos parámetros vinculados a la formación de espuma v_o y V_{LEmax} y otro cualitativo como lo es el tamaño de las burbujas.

La cinética de desestabilización se analizó basándose en los parámetros k_g , k_d , V_g y V_d que surgen de la aplicación del modelo cinético desarrollado por Panizzolo et al. (2012) (Ecuación 2.18).

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.8.1 Descripción del equipo utilizado

El equipo de análisis de propiedades de espumado TIAV 2002 fue construido en base al modelo desarrollado por Loisel et al. (1993). Es un equipo de espumado por burbujeo, que permite analizar la formación y estabilidad de la espuma por medida conductimétrica sobre la solución espumada y simultáneamente seguir la variación de volumen de espuma por detección visual. El equipo consiste en un tubo de acrílico transparente graduado en volumen, de 3 cm de diámetro y 30 cm de altura, equipado

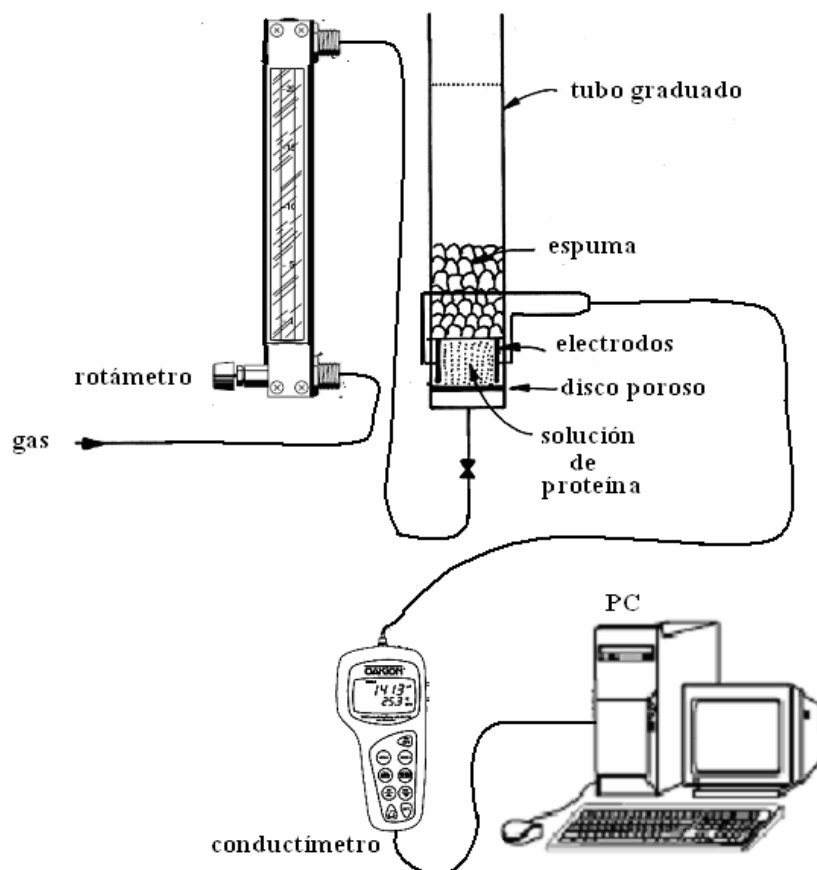


Figura 2.2. Representación esquemática del equipo TIAV 2002.

con un par de electrodos verticales localizados en su base y con un disco poroso de vidrio (G2). La solución o dispersión de proteínas es introducida dentro del tubo hasta cubrir los electrodos (10 ml). La espuma se genera por pasaje de aire a un caudal constante regulado mediante un rotámetro y por medio de un conductímetro se determina la conductividad de la solución de proteína y los datos son transferidos a una PC para su posterior análisis. Simultáneamente se registra el volumen de espuma durante su formación por observación visual y el tiempo en forma directa en la PC utilizando una tecla como función de cronómetro controlando el reloj interno (Figura 2.2).

2.8.2 Determinación de parámetros de formación de espumas

La medida conductimétrica de la fase líquida permite determinar el volumen de líquido en la espuma (V_{LE}) en función del tiempo:

$$V_{LE}(t)(ml) = V_{Li} \times \left(\frac{C_i(\mu S) - C_t(\mu S)}{C_i(\mu S)} \right) \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

donde $V_{LE}(t)$: volumen de líquido en la espuma a un tiempo t , V_{Li} : volumen de solución de proteína inicial, C_i : conductividad inicial (correspondiente al V_{Li}), C_t : conductividad a tiempo t .

A partir de V_{LE} se pueden calcular varios parámetros de formación de espuma (Figura 2.3). El volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad de pasaje del líquido a la espuma (v_o), dada por la pendiente inicial de la curva

V_{LE} vs t parámetro propuesto por Wagner et al. (1996):

$$v_o (mL / s) = \left(\frac{\Delta V_{LE}}{\Delta t} \right)_i \quad (\text{Ecuación 2.17})$$

Este parámetro da información del comportamiento superficial de la proteína en la etapa inicial de formación de la espuma, en la cual los procesos de desestabilización son incipientes (Wagner et al., 1996).

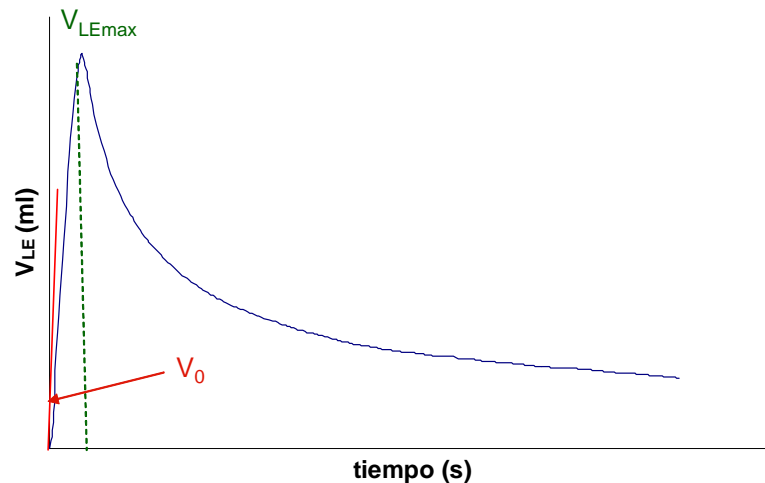


Figura 2.3. Curva experimental de V_{LE} en función del tiempo. V_{LEmax} volumen máximo de líquido retenido en la espuma y v_0 velocidad de pasaje del líquido a la espuma.

El tamaño y forma de las burbujas se determinaron a partir de fotografías tomadas con una cámara digital Kodak EasyShare Z1275. Estas imágenes fueron obtenidas cuando el volumen de espuma llegó a 10 ml (correspondiente a un período de burbujeo de aproximadamente 5 segundos), a 60 ml (volumen de espuma al momento de finalizar el burbujeo) y luego de haber estado 10 minutos en reposo (relacionada con la estabilidad de la espuma).

2.8.3 Determinación de parámetros de estabilidad de espumas

Para el proceso de desestabilización de la espuma han sido sugeridos diversos procesos cinéticos y a su vez distintos criterios de determinación de los parámetros correspondientes a las diferentes ecuaciones planteadas (Monsalve y Schechter, 1984; Wright y Hemmant, 1987; Kim y Kinsella, 1985; Elizalde et al., 1991; Yu y Damodaran, 1991a; Wagner et al., 1996).

En este trabajo se utiliza el modelo de segundo orden con dos términos propuesto por Panizzolo et al. (2012).

$$V(t) = \frac{V_g^2 k_g t}{(V_g k_g t + 1)} + \frac{V_d^2 k_d t}{(V_d k_d t + 1)} \quad (\text{Ecuación 2.18})$$

donde k_g ($\text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$): es la constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio, k_d ($\text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$): es la constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción, V_g y V_d (ml): son los parámetros de amplitud correspondiente al proceso de drenado gravitatorio y al proceso de difusión de gas o desproporción.

2.9 Determinación de las propiedades emulsionantes

2.9.1 Preparación de emulsiones

Se prepararon emulsiones aceite en agua 25:75 (v/v) utilizando las distintas muestras a una concentración de proteína de 1,0 mg/ml en buffer disolución de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 y 2,5 (preparada según lo descrito en 2.1.1 y 2.1.2, respectivamente), manteniendo la fuerza iónica en 0,02 por agregado de NaCl. Las emulsiones fueron preparadas a temperatura ambiente con un homogenizador Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania). La velocidad del rotor (S25N-10G, GmbH & Co., Staufen, Alemania) se ajustó en 20.000 rpm y el tiempo de homogeneización fue de 1 minuto.

El aceite comercial refinado utilizado estaba compuesto en un 95% de aceite de girasol y un 5% de aceite de maíz. La composición en ácidos grasos de dicho aceite determinada por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos fue la siguiente: 6,2% de 16:0, 0,1% de 16:1 n-7, 3,3% de 18:0, 36,0 % de 18:1 n-9, 52,0% de 18:2 c n-6, 0,2% de 20:0, 0,6% de 18:3 n-3 y 0,1% de 20:1 n-9.

2.9.2 Ensayos de caracterización de las emulsiones

2.9.2.1 Porcentaje de proteína adsorbida y concentración proteica interfacial

La concentración de proteína en la interfase (Γ) de la emulsión se determinó según el método descrito por Puppo et al. (2005). 2 ml de emulsión recién preparada fueron diluidos en 2 ml de solución de sacarosa (500 g/l en la misma solución buffer de preparación de emulsiones). 2 ml de esa mezcla fueron depositados delicadamente en el fondo de un tubo de centrifuga conteniendo 10 ml de solución reguladora de pH cuyas

propiedades fisicoquímicas son idénticas a las de la muestra de dispersión de la proteína utilizada en la preparación de las emulsiones. Los tubos fueron centrifugados a 3.000 x g durante 2 horas a 10 °C. Después de la centrifugación los tubos se congelaron a -20 °C y fueron cortados a la altura de los 4,5 ml obteniéndose dos volúmenes. Las proteínas absorbidas en la interfase fueron desorbidas mezclando el volumen superior con 20 ml de solución de SDS 1%, la mezcla fue centrifugada a 3.000 x g durante 1 hora a 10 °C obteniéndose dos fases. La fase acuosa inferior, que contenía la proteína desorbida, fue extraída mediante una jeringa. La concentración de proteína adsorbida y no adsorbida fue determinada por el método de Markwell et al. (1978). La concentración de proteína en interfase fue calculada según la expresión:

$$\Gamma\left(\frac{mg}{m^2}\right) = \left(\frac{Pa\left(\frac{mg}{mL\ emulsión}\right)}{Sv\left(\frac{m^2}{mL\ emulsión}\right)} \right) \quad (\text{Ecuación 2.19})$$

donde Γ es la concentración de proteína en interfase, [Pa] es la concentración de proteína adsorbida en la emulsión y Sv es el área interfacial. Siendo Sv calculado según: $Sv=6\Phi/D_{3,2}$, donde Φ es la fracción volumétrica de aceite y $D_{3,2}$ el determinado según se describe en el punto 2.9.2.2 en presencia de SDS.

Las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

2.9.2.2 Tamaño de partícula de las emulsiones

La distribución de tamaño de partícula de las diferentes emulsiones se determinó por difracción de luz láser y dispersión de luz polarizada utilizando un analizador de partículas Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.) Combinando ambas tecnologías se puede obtener la distribución de tamaño de partículas en un rango de 0,04 μm hasta 2000 μm .

El análisis se realizó sobre las emulsiones preparadas según lo descrito en el ítem 2.7.1 con y sin tratamiento con buffer Tris/HCl 50 mM, pH 8,0 SDS 1 % en proporción 1:1 para asegurar la completa eliminación de flóculos de la emulsión (Anton et al., 2002).

A partir de la distribución de tamaño de partícula expresada como % volumen (% V) o como % superficie (% S) se obtuvieron los diferentes diámetros promedio: $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$. Los diámetros promedio describen los diferentes tamaños que presentan un conjunto de partículas. En el caso del diámetro de la esfera de área superficial equivalente $D_{3,2}$, también denominado diámetro medio de Sauter se expresa

$$D_{3,2} = \frac{\sum D_i^3}{\sum D_i^2} \quad (\text{Ecuación 2.20})$$

y el diámetro de la esfera de volumen equivalente $D_{4,3}$, también denominado diámetro medio de De Broucker:

$$D_{4,3} = \frac{\sum D_i^4}{\sum D_i^3} \quad (\text{Ecuación 2.21})$$

En ambas expresiones el número de partículas no aparece ni en el numerador ni en el denominador de la ecuación, por lo que técnicas como la de difracción Láser, que miden una distribución proporcional a D^3 no necesitan conocer el número de partículas para llegar a determinar el resultado medio.

A partir de los valores de $D_{4,3}$ se calculó el grado de floculación (GF %) como:

$$GF = \frac{D - D_{SDS}}{D_{SDS}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.22})$$

Aunque estos parámetros podrían calcularse también a partir del diámetro promedio de Sauter $D_{3,2}$, es más conveniente utilizar $D_{4,3}$ debido a que los cambios producidos en las emulsiones son detectados con mayor sensibilidad (Relkin y Sourdet, 2005). La diferencia de valores de diámetro promedio obtenidos en ausencia y presencia de la solución conteniendo SDS, se tomó como una medida de formación de flóculos o agregados en la emulsión (Anton et al., 2002). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.9.2.2.1 Descripción del equipo utilizado

El Coulter Counter Multisizer, consiste en un láser de He - Ne como fuente de luz intensa coherente con una longitud de onda fija ($\lambda = 0,63 \mu\text{m}$) que ilumina las

partículas dispersas en la zona de medida. Este, luego es enfocado por lentes de Fourier hacia un detector que consiste en un gran número de elementos fotosensibles colocados radialmente. El detector normalmente es una lámina de silicio fotosensible, que dispone de varios detectores que son capaces de producir simultáneamente medidas basadas en el volumen de las partículas a una velocidad de 500 detecciones/segundo. En el intervalo entre 1 nm y 1 μm , aproximadamente, es utilizada la técnica de espectroscopia de correlación fotónica, pero la intensidad de luz dispersada es tan baja que es necesaria la incorporación de un tubo fotomultiplicador junto con un dispositivo que correlaciona la señal para hacer significativa la información. Las partículas en suspensión son medidas con la ayuda de un sistema de recirculación que las hace pasar al interior de la celda de medida por donde pasa el haz del láser.

La intensidad de la luz desviada se mide por la aplicación de un modelo óptico que permite calcular el patrón de dispersión. La distribución volumétrica del tamaño de partícula que se ajusta mejor con el patrón medido es calculada por el programa del equipo haciendo uso de la teoría de Fraunhofer que asume las siguientes suposiciones:

- Las partículas son mucho más grandes que la longitud de onda empleada. La norma ISO13320 establece que esto se cumple cuando el tamaño de la partícula es mayor de 40λ , por ejemplo 25 μm cuando sea utilizado un equipo que disponga de un láser de He-Ne ($\lambda = 0,63 \mu\text{m}$).
- Todos los tamaños de partícula dispersan luz con la misma eficiencia.
- La partícula es opaca y no transmite luz.

Mediante el programa del equipo la información es procesada y se genera directamente una distribución de volumen, o también de área o del número de partículas, en función del tamaño de partícula (Figura 2.4), como así también una tabla de parámetros descriptores de la distribución de tamaño de partícula de la muestra analizada, entre ellos $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Figura 2.5). El sistema de recirculación que proporciona una alta reproducibilidad, permite además, la incorporación de aditivos, dispersantes y surfactantes como SDS que ayudan a determinar el tamaño correcto de partícula.

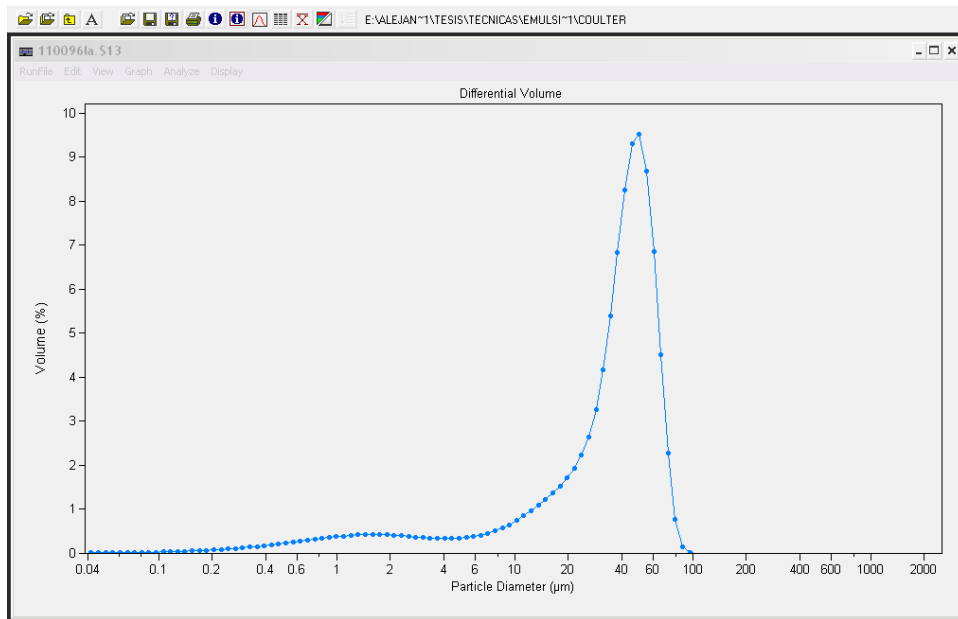


Figura 2.4. Distribución de volumen en función del tamaño de partícula tal como la proporciona el programa del equipo Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.)

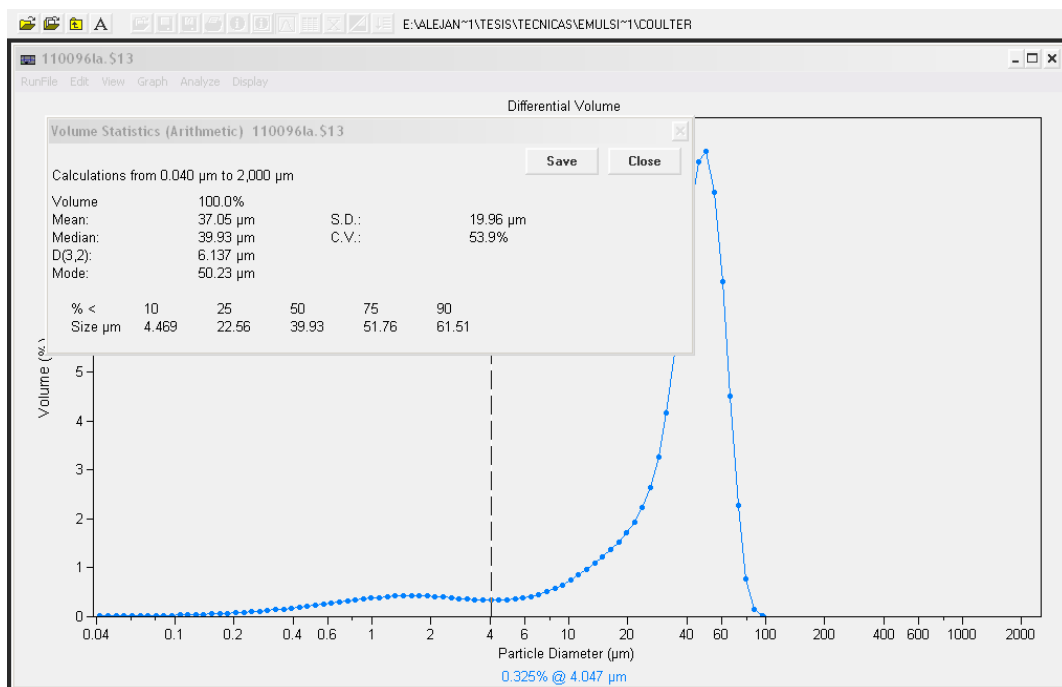


Figura 2.5. Tabla de parámetros descriptores de la distribución de tamaño de partícula de la muestra analizada tal como la proporciona el programa del equipo Coulter Counter Multisizer (Coulter Electronics Ltd.)

2.9.2.3 Microestructura de emulsiones

La microestructura de las emulsiones se evaluó colocando alícuotas de 10 µL de emulsión (sin o con dilución previa) sobre un portaobjetos. El cubreobjetos (22 × 22

mm) se colocó cuidadosamente y sin deslizamiento para no inducir la coalescencia de las gotas de aceite. Las emulsiones se observaron con un microscopio óptico Leica DLMB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con una cámara digital adaptada (Leica DC100, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), operando con un aumento de 100 y 200 x

2.9.3 Determinación de la estabilidad de las emulsiones

La estabilidad global de las emulsiones se analizó usando un analizador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000, Formulaction, Toulouse, France). Las emulsiones recientemente preparadas se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio (80 mm) para registrar los perfiles de transmitancia (T %) y retrodispersión (RD %), en función de la altura en la celda. Se realizó el estudio de las cinéticas de cremado y desestabilización de las emulsiones mediante la medida de retrodispersión cada minuto durante un período de 60 minutos y una posterior y única medida a las 24 horas.

2.9.3.1 Estabilidad de la emulsión frente al cremado

La estabilidad frente al cremado se estudió a través de la disminución de los valores promedio de la retrodispersión en la parte inferior a una altura de 10 mm (RD_{10}) del tubo de medida en función del tiempo.

Los datos de RD_{10} se ajustaron a una ecuación de segundo orden bifásica desarrollada por Panizzolo (2005) (Ecuación 2.23).

$$RD(t) = \frac{RD_1}{(RD_1 k_1 t + 1)} + \frac{RD_2}{(RD_2 k_2 t + 1)} \quad (\text{Ecuación 2.23})$$

Siendo k_1 y k_2 las constantes de velocidad de desestabilización por cremado y RD_1 y RD_2 son los parámetros de amplitud correspondientes a cada una de las cinéticas, tales que $RD_1 + RD_2 = RD_i$, RD_i : es el valor de RD inicial. k_1 y RD_1 corresponden a las gotas de mayor tamaño que son las que creman más rápido y k_2 y RD_2 corresponden a las gotas más pequeñas que son las que creman más lentamente, según lo predicho por la ley de Stokes.

Los valores de k_1 , k_2 , RD_1 y RD_2 fueron estimados mediante regresión por cuadrados mínimos

2.9.3.2 Medida de la viscosidad aparente de la fase continua de las emulsiones

Para la medida de la viscosidad de la fase continua se prepararon las emulsiones con todas las proteínas y condiciones de estudio, según lo descrito en el ítem 2.8.1. Luego se separó la fase continua para realizar las medidas de viscosidad por centrifugación a 1860 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Hermle Labortechnik GmbH Z200A.

Las curvas de flujo de las muestras se determinaron en un reómetro Anton Paar Physica MCR 301 con un sistema de medida de cilindros concéntricos de doble área que se utiliza para fluidos de baja viscosidad, sonda DG26.7/Q1, a temperatura ambiente. Las curvas de flujo se realizaron en un rango de velocidad de cizallamiento de 50 a 100 s⁻¹.

A partir de las curvas de flujo se determinó el comportamiento reológico del fluido y la viscosidad aparente.

2.9.3.3 Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia

La desestabilización global de las emulsiones se estudió mediante el cambio de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD_{p50-53}) en función del tiempo y el cálculo de D (%) (Palazolo et al., 2005) según la expresión:

$$D(\%) = \frac{(RD_{p\max} - RD_{p24})}{RD_{p\max}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.24})$$

Donde D (%): grado de desestabilización global, $RD_{p\max}$: promedio del máximo valor de retrodispersión en el tiempo en un intervalo determinado y RD_{p24} : promedio del valor de retrodispersión a 24 horas en un intervalo determinado.

Los valores de D (%) (Ecuación 2.24) fueron obtenidos de los perfiles de RD , este parámetro permitió cuantificar la desestabilización global de la fase crema desde su formación hasta el final de su almacenamiento (24 horas). Puesto que es un índice de la disminución de RD_p , asociada a un número más bajo de partículas, este puede ser relacionado con la coalescencia y/o floculación.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.9.3.4. Grado de hidratación

El grado de hidratación de la fase crema se estimó a partir del volumen relativo de fase crema (V_r) calculado de los perfiles de RD % correspondiente a las 24 horas de almacenamiento y mediante la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ).

$$\text{Grado de hidratación} = \frac{\phi}{V_r} \quad (\text{Ecuación 2.25})$$

El volumen relativo de la fase crema (V_r) se determinó a partir del perfil de RD a las 24 horas de almacenamiento como:

$$V_r = \frac{\text{longitud de la fase crema (mm)}}{\text{longitud total (fase crema + suero) (mm)}} \quad (\text{Ecuación 2.26})$$

La sección transversal del tubo es constante y por ende la relación de longitudes se relacionó de manera directa a la relación de volúmenes.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.9.3.5 Descripción del equipo para determinar la estabilidad en emulsiones por dispersión múltiple de la luz.

El equipo Turbiscan Classic MA 2000 Formulation (Toulouse, France) permite el análisis de la desestabilización física de dispersiones líquidas concentradas (emulsiones y suspensiones). El principio de funcionamiento de este instrumento se basa en la dispersión múltiple de la luz. Es un analizador óptico de exploración vertical cuya representación esquemática se muestra en la Figura 2.6. Consta de un cabezal de detección que se mueve de arriba hacia abajo a lo largo de una celda de vidrio cilíndrica. El cabezal de detección está compuesto por una fuente de luz en el infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$) y dos detectores sincrónicos. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra, 180° del haz de luz incidente, mientras que el detector lateral recibe la luz desviada por la muestra a 45° del haz de luz incidente Figura 2.7

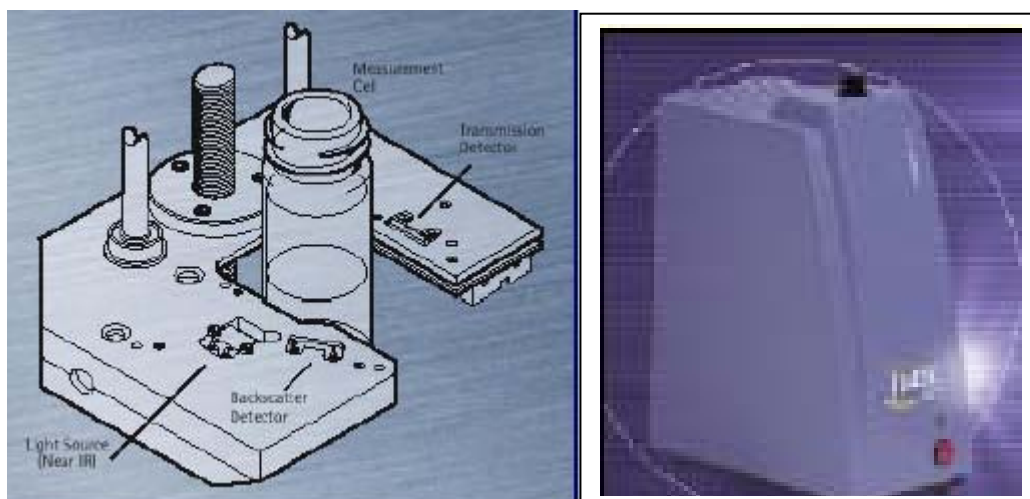


Figura 2.6 Representación esquemática, simplificada y fotografía del analizador óptico de exploración vertical (Manual-Turbiscan Classic MA2000, Formulacion, Toulouse, France)

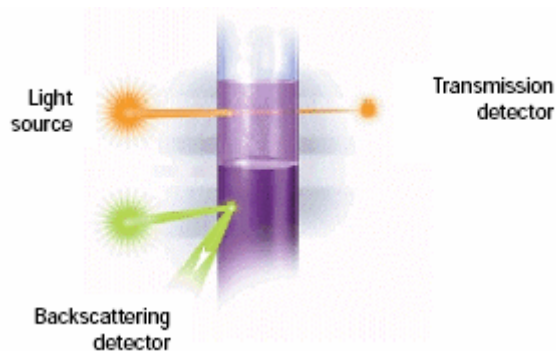


Figura 2.7 Principio de medida del turbiscan (Manual- Turbiscan Classic MA2000, Formulacion, Toulouse, France)

El cabezal de detección explora la longitud total de la muestra (aproximadamente 60 mm), adquiriendo datos de transmisión y retrodispersión cada 40 μm (1625 adquisiciones de transmisión y retrodispersión por exploración).

Los flujos de medida se calibran con un estándar de reflectancia que no adsorbe (perlas de látex de poliestireno) y un estándar de transmitancia (aceite de silicona). La señal primero es tratada por un convertidor de corriente a voltaje. Un microprocesador integrado maneja la adquisición de datos, la conversión analógica a digital, el almacenamiento de datos, el control del motor y la intercomunicación con la computadora. Los resultados son representados en la pantalla de la computadora en curvas que presentan el porcentaje de luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra Figura 2.8 y 2.9.

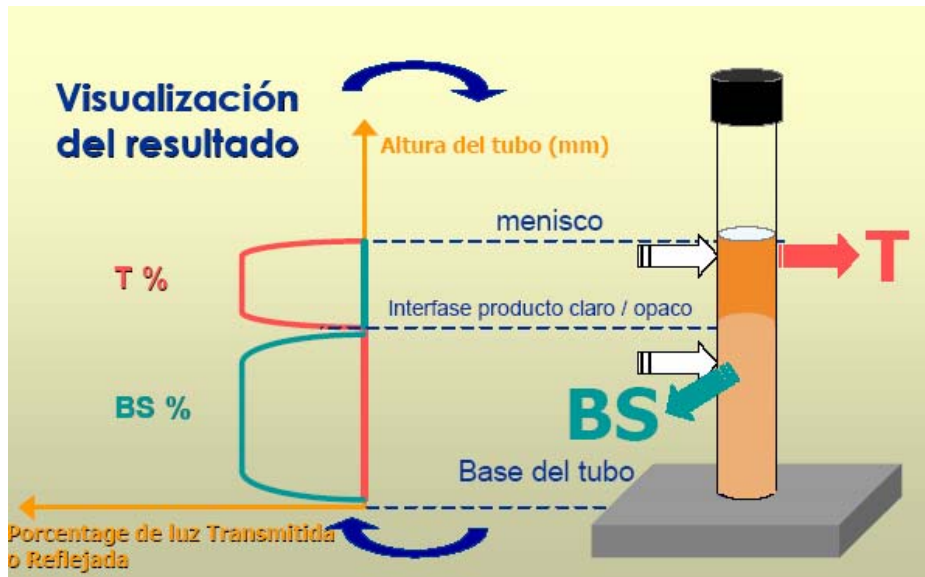


Figura 2.8 Forma de visualizar luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra

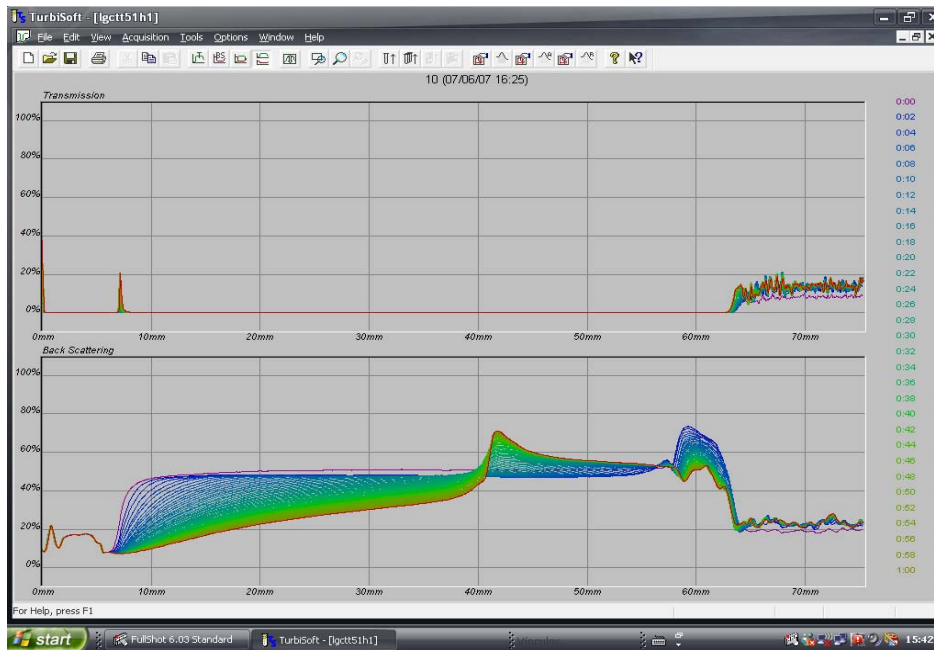


Figura 2.9 Curvas que presentan el porcentaje de luz transmitida y retrodispersada en función de la longitud del tubo de medida de la muestra, tal como son presentados por el programa del equipo Turbiscan.

El análisis puede repetirse con una frecuencia programable y los resultados se van acumulando en el gráfico en función del tiempo. La estabilidad o la inestabilidad del producto pueden entonces ser determinada analizando estos datos.

La inestabilidad de las dispersiones resulta frecuentemente ser debida a dos procesos físicos distintos: un aumento del tamaño de partícula debido a la coalescencia o a la floculación y a la migración de la partícula dentro de las muestras que dan lugar al

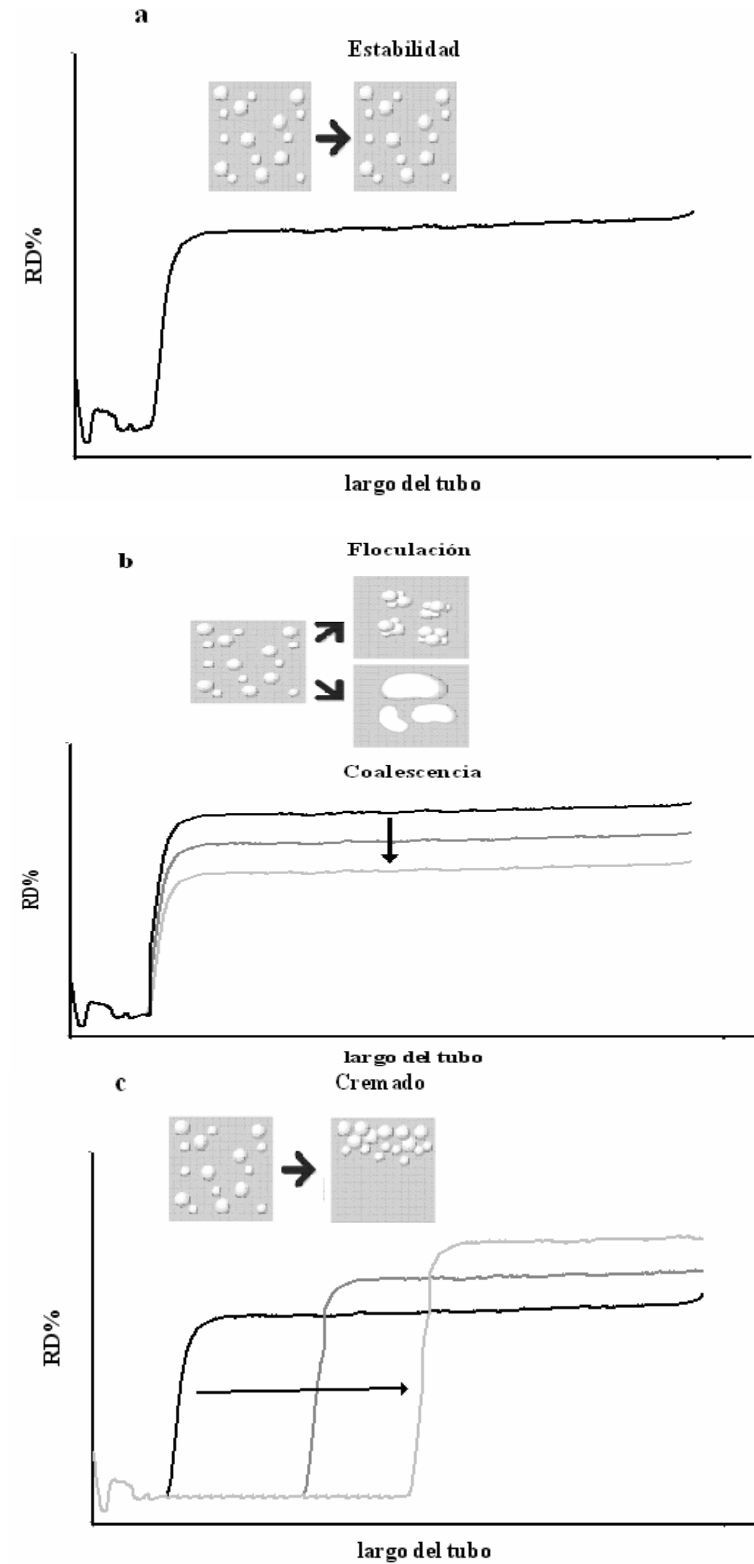


Figura 2.10 Representación esquemática de los cambios ocurridos en los procesos de a) estabilidad, b) floculación y/o coalescencia y c) cremado y sus efectos en los perfiles de retrodispersión.

cremado. Cuando no existen cambios de la fracción del tamaño o del volumen de la partícula los valores de retrodispersión (RD) y de transmisión (T) siguen siendo

constantes y todas las exploraciones correspondientes a distintos tiempo de medida se sobreponen (Figura 2.10a). Si ocurriera un aumento del tamaño de partícula (floculación o coalescencia) a lo largo de toda la muestra, RD y T varían en las exploraciones correspondientes a distintos tiempos de medida, presentando RD una disminución de los valores en las sucesivas exploraciones (Figura 2.10b). Cuando se produce un fenómeno de cremado de las partículas se inducen cambios de la fracción del volumen de partículas a lo largo de la muestra, disminuye en la parte inferior y aumenta en la parte superior, por lo tanto RD y T también varían, presentando RD una disminución de los valores en la zona inferior, progresivamente a lo largo de la muestra y a su vez un aumento progresivo en la zona superior en las sucesivas exploraciones (Figura 2.10c). A su vez los procesos de aumento de tamaño y migración de partícula pueden ocurrir simultáneamente.

2.10. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó en todos los casos mediante análisis de la varianza (ANOVA) con $\alpha = 0,05$ y la comparación de medias por la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con $\alpha = 0,05$, utilizando los programas Statgraphics plus 7.0 e Infostat Versión 2011e.

2.11. Nomenclatura

Tabla 2.1 Nomenclatura utilizada para las distintas muestras

Nomenclatura	Muestra
APSn	Aislado proteico de soja nativo (descrito en 2.2)
APSt	Aislado proteico de soja tratado a pH ácido (descrito en 2.4)
APSt-8,0	Aislado proteico de soja tratado a pH ácido y dispersado en solución de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0
APSt-7,0	Aislado proteico de soja tratado a pH ácido y dispersado en solución de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0
APSt-2,5	Aislado proteico de soja tratado a pH ácido y dispersado en solución de fosfato de sodio 10 o 100 mM ajustada a pH 2,5
APSr	Aislado proteico de soja tratado a pH ácido y neutralizado a pH 8,0 y liofilizada (descrito en 2.5)
11Sn	Glicinina nativa (descrito en 2.3)
11St	Glicinina tratada a pH ácido (descrito en 2.4)
11St-8,0	Glicinina tratada a pH ácido y dispersada en solución de buffer fosfato fosfato 100 mM pH 8,0
11St-7,0	Glicinina tratada a pH ácido y dispersada en solución de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0
11St-2,5	Glicinina tratada a pH ácido y dispersada en solución de fosfato de sodio 10 o 100 mM ajustada a pH 2,5
11Sr	Glicinina tratada a pH ácido y neutralizada a pH 8,0 y liofilizada (descrito en 2.5)
7Sn	β -conglucina nativa (descrito en 2.3)
7St	β -conglucina tratada a pH ácido (descrito en 2.4)
7St-8,0	β -conglucina tratada a pH ácido y dispersada en solución de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0
7St-7,0	β -conglucina tratada a pH ácido y dispersada en solución de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0
7St-2,5	β -conglucina tratada a pH ácido y dispersada en solución de fosfato de sodio 10 o 100 mM ajustada a pH 2,5
7Sr	β -conglucina tratada a pH ácido y neutralizada a pH 8,0 y liofilizada (descrito en 2.5)

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica-estructural

3.- CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL

Para abordar el estudio de las propiedades funcionales de APSn, APSt, 11Sn, 11St, 7Sn y 7St, fue necesario previamente analizar su composición y propiedades fisicoquímicas. Para ello se determinó la composición polipeptídica mediante electroforesis, el estudio de las propiedades térmicas mediante técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la determinación de la hidrofobicidad superficial. Además se determinó la solubilidad a pH 8,0 y 2,5.

3.1. Contenido de proteína de las muestras

El contenido de proteína de las muestras utilizadas en los estudios se muestra a continuación (Tabla 3.1):

Tabla 3.1 Contenido de proteína de las muestras en base húmeda

Muestra	Proteína total (g de proteína en 100g de muestra)
7Sn	96,5±0,6
7St	78±2
11Sn	97±4
11St	85±4
APSn	96±5
APSt	84±5

Las muestras nativas (7Sn, 11Sn y APSn) tienen un contenido proteico mayor al 90%. En cambio las tratadas a pH ácido tienen un contenido proteico menor, esto es debido a que el tratamiento ácido conlleva el agregado de HCl lo que hace aumentar el contenido de cenizas de la fracción y por lo tanto disminuir la proporción de proteína en la fracción.

Nagano et al. (1992) determinaron que el contenido de proteína de la fracción 7S fue de 92% por el método de Kjeldahl (Nx6,25) (Nagano y col, 1992). Wu et al. (1999) diseñaron un fraccionamiento de glicinina y β -conglucina de soja en planta piloto escalando el método de Nagano et al. (1992). La fracción enriquecida en β -conglucina obtenida por estos autores tenía un contenido muy alto de cenizas debido a las concentraciones de sales usadas (Deak et al., 2007). En el trabajo realizado por Deak et

al. (2007) utilizando el método desarrollado por Wu et al. (1999) obtuvieron contenidos de proteína en base seca de las fracciones de 96,7 y 92,2 para glicinina y β -conglucina, respectivamente. Según Deak et al. (2007) estos valores son mayores a los reportados por Nagano et al. (1992). El contenido de proteína de las fracciones que se obtuvo en la presente tesis, 97% para 11Sn y 96,5% para 7Sn, son similares a los obtenidos por Wu et al. (1999), 96,7 y 92,2 para 11S y 7S, respectivamente.

3.2 Caracterización de las fracciones proteicas y aislados obtenidos

3.2.1 Composición polipeptídica mediante electroforesis

En las Figuras 3.1 y 3.2 se muestra el diagrama electroforético SDS-PAGE de APSn, 11Sn, 7Sn, APSt, 11St y 7St, con y sin agregado de β -mercaptoetanol. En ambas figuras se pueden observar los polipéptidos característicos de la globulinas de almacenamiento de soja: α , α' y β subunidades de β -conglucina y la subunidad AB de

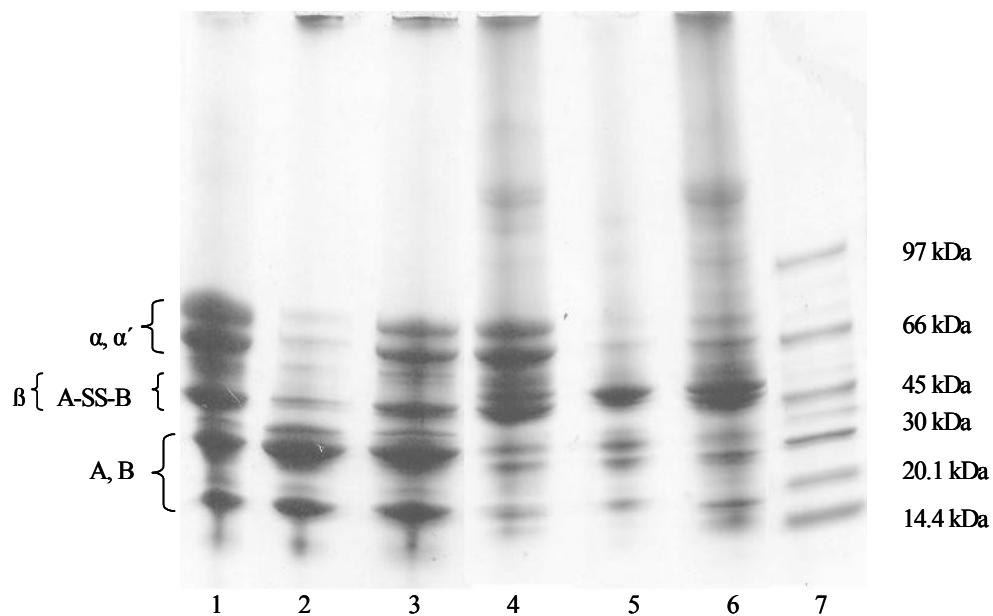


Figura 3.1. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras nativas y estándares de peso molecular de proteínas (PM). Las calles 1, 2 y 3: corresponden a 7Sn, 11Sn y APSn en presencia de β -mercaptoetanol respectivamente. Las calles 4, 5 y 6 corresponden a 7Sn, 11Sn y APSn en ausencia de β -mercaptoetanol respectivamente. Los patrones de PM están ubicados en la calle 7.

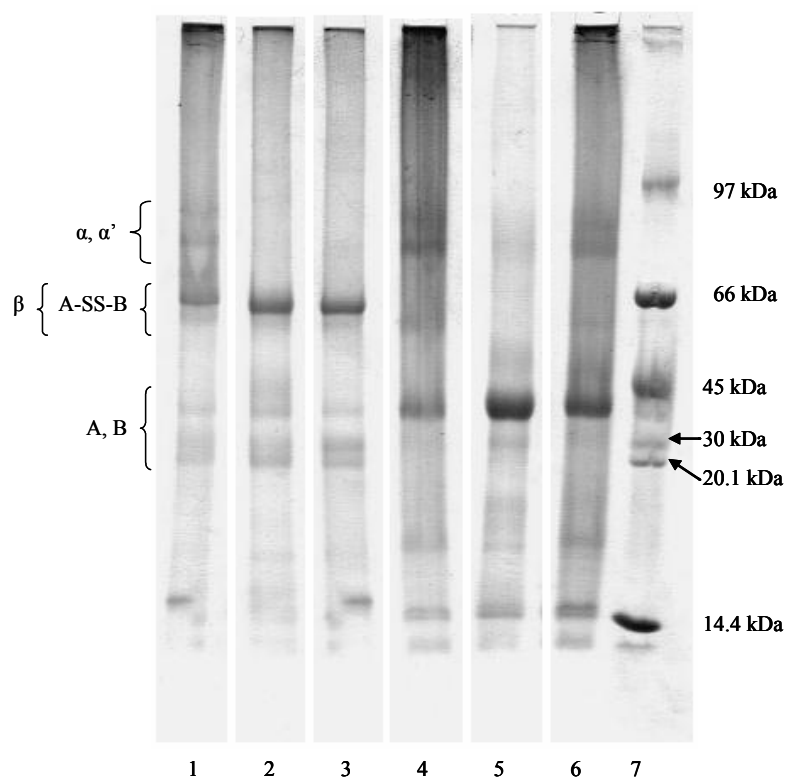


Figura 3.2. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras tratadas con pH ácido y estándares de peso molecular de proteínas (PM). Las calles 1, 2 y 3: corresponden a 7St, 11St y APSt en ausencia de β-mercaptoetanol respectivamente. Las calles 4, 5 y 6 corresponden a 7St, 11St y APSt en presencia de β-mercaptoetanol respectivamente. Los patrones de PM están ubicados en la calle 7.

glicinina. También se pueden apreciar las bandas correspondientes a los polipéptidos A y B de glicinina. La presencia de estos últimos en aislados proteicos sin reducir fue descrita por Wolf (1993), quien especuló sobre la posibilidad de que una cierta cantidad de polipéptidos A y B se encuentren naturalmente libres en preparaciones de proteínas de soja nativa. En todos los casos también se observa una banda en torno a 14,4 kDa. También se observan agregados, que se tratarán posteriormente en este ítem y en el ítem 3.3.

La proteína 11S en ausencia de β-mercaptoetanol presenta 1 fracción a 50 kDa (dímeros A-SS-B) y el resto entre 20-30 kDa (subunidades A, B) y en presencia de β-mercaptoetanol la fracción de 50 kDa desaparece quedando la fracción de 20-30 kDa. La proteína 7S tanto con y sin β-mercaptoetanol presenta 3 fracciones entre 60-90 kDa. La fracción 7S esta enriquecida pero no es pura, de hecho esta contaminada con polipéptidos correspondientes a 11S. (Figuras 3.1 y 3.2). La muestra 7Sn fue analizada por densitometría para determinar en qué proporción se encontraba cada proteína. La fracción 7Sn tenía un 65% de pureza, siendo por lo tanto del 35% la contaminación con

polipéptidos de 11S; en tanto que la fracción 11Sn presentó un 84,8% de pureza. En el caso de Nagano et al. (1992), la pureza de cada fracción medida por densitometría fue mayor al 90%, valor superior al obtenido en este trabajo. En cambio Deak et al. (2007) obtuvieron, también por densitometría, purezas de 83.7% para la glicinina y de 83,8% para la β -conglucina. Wu et al. (1999) obtuvieron un valor de pureza para la glicinina mayor que para la de β -conglucina, siendo éstos de 95,7% y 77,6%, respectivamente. Cabe destacar que los valores de pureza obtenidos son aproximados ya que para tener valores fiables se debería haber determinado previamente la adsorción de cada proteína al coomassie blue (colorante usado en la tinción).

Para las muestras nativas se observaron agregados por encima de 97 kDa (Figura 3.1). Estos agregados están estabilizados por uniones SS, al menos en parte, en el caso del aislado y de la fracción 7S, ya que al tratar con β -mercaptoetanol desaparecen. La fracción 11S puede tener agregados más grandes no solubles que no fueron sembrados y/o no entraron al gel. Si bien los polipéptidos que forman parte de 7S poseen un número reducido de residuos SH, estos son capaces de formar agregados.

Según lo que observaron Petruccelli y Añón (1994, 1995), los agregados de más alto peso molecular pueden estar constituidos por dímeros o trímeros de las subunidades α y α' de la β -conglucina o por subunidades α y α' de la β -conglucina y el polipéptido A de la glicinina. De acuerdo a estos mismos autores los agregados formados por subunidades α y α' (192-179 kDa) están unidos por enlaces disulfuro e interacciones iónicas. Estos agregados desaparecen con el agregado de β -mercaptoetanol y al mismo tiempo aumenta la cantidad de α y α' . Los agregados formados con α y α' de 7S y A de 11S están unidos mediante puentes disulfuro, evidenciado por el ensanchamiento de éstas bandas tras el agregado de β -mercaptoetanol. Por último, Petruccelli y Añón (1994, 1995) indicaron la formación de agregados por β -7S/B-11S que también podrían estar presentes en nuestro caso acorde al ensanchamiento de las bandas correspondientes a éstos en presencia de β -mercaptoetanol y del agregado de AB-11S (que tal vez no entró en la electroforesis).

Las muestras tratadas a pH ácido no presentaron bandas por encima de los 97 kDa (Figura 3.2), probablemente porque los agregados detectados en las muestras nativas hayan sido insolubilizados durante el tratamiento a pH ácido y por lo tanto no entraron en el gel. Esta insolubilización es observada posteriormente cuando se analizan los datos de solubilidad de las muestras en el ítem 3.3. También pudo haber ocurrido la

disociación de dichos agregados, razón por la cual no se observaron bandas por encima de 97 kDa en el gel.

3.2.2 Análisis de propiedades térmicas

En la Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 se muestran los termogramas correspondientes a las distintas muestras estudiadas.

En los termogramas correspondientes a APS (Figura 3.3), se observaron dos picos endotérmicos característicos a la desnaturalización térmica de aislados de proteína de soja; uno de menor valor de Td correspondiente a β -conglucina y otro de mayor Td correspondiente a glicinina (Hermansson, 1978, 1986; Wagner y Añón, 1990; Puppo y Añón, 1999). En el termograma de APSt el pico correspondiente a la glicinina desaparece y el primer pico se corre a temperaturas más bajas y disminuye la entalpía de desnaturalización (ΔH_d) (Figuras 3.3 y 3.4).

A efectos de analizar si la desnaturalización era reversible, APSt fue neutralizado a pH 8,0 (APSr) y analizado nuevamente mediante Calorimetría Diferencial de Barrido. Luego de este tratamiento se observó solo el pico correspondiente a la β -conglucina con un ΔH_{d_m} mayor al encontrado para APSt (ΔH_d) y corrido hacia temperaturas más altas debido probablemente al mayor contenido salino de la muestra (Figuras 3.3 y 3.4).

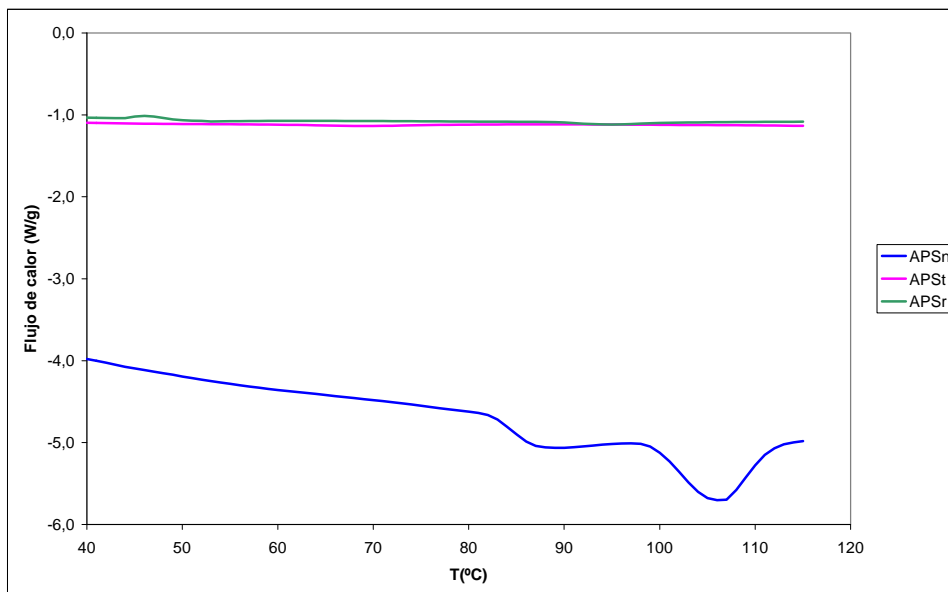


Figura 3.3 Termograma DSC de APSn, APSt y APSr

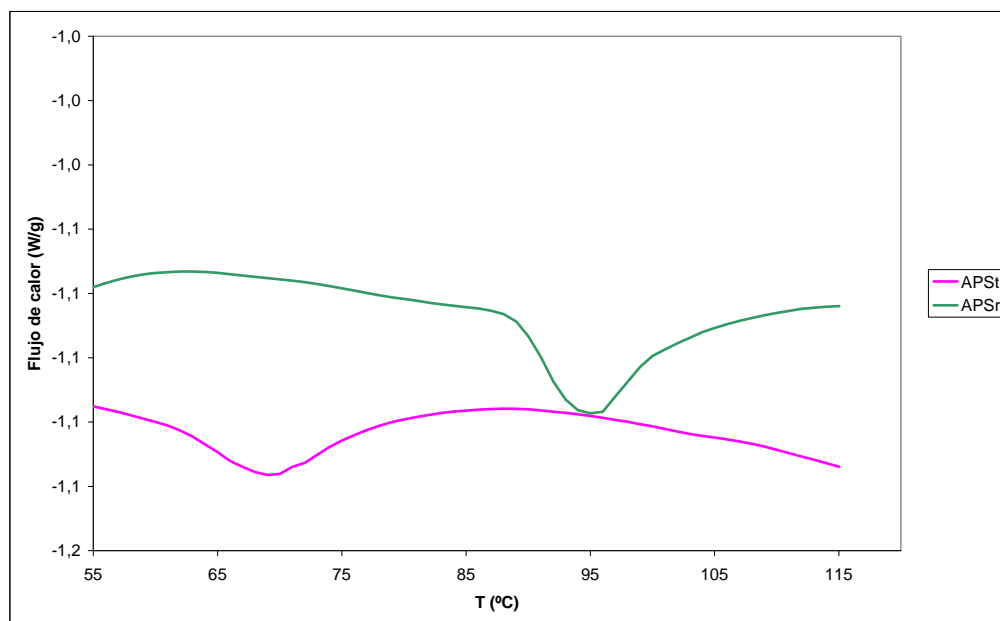


Figura 3.4 Termograma DSC de APSt y APSr

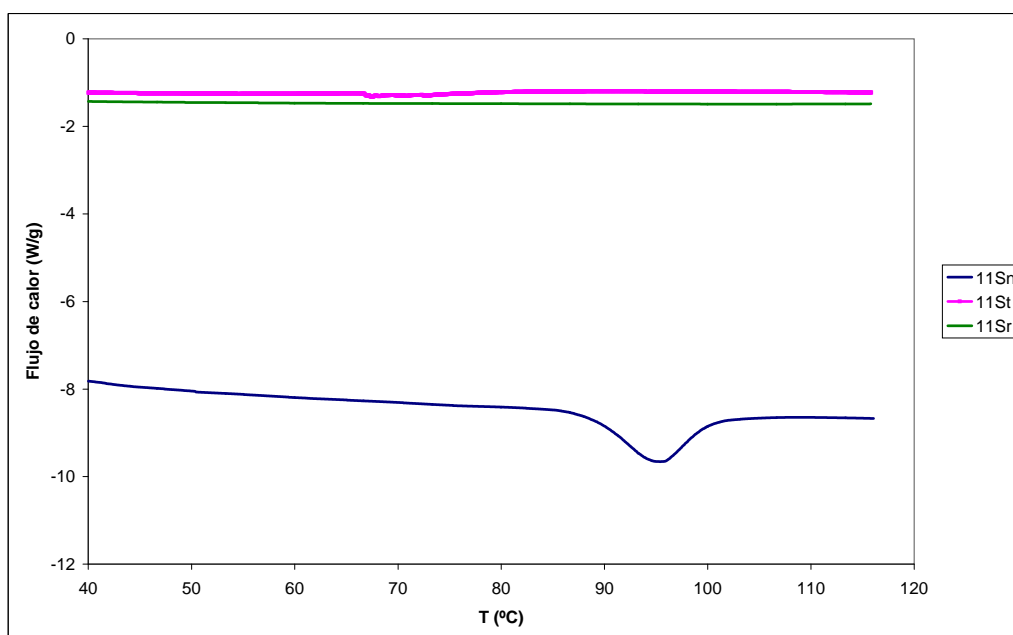


Figura 3.5 Termograma DSC de 11Sn, 11St y 11Sr

En la Figura 3.5 se muestra el termograma de 11Sn el cual presentó sólo un pico endotérmico correspondiente a la glicinina, lo que indica que esta fracción es pura tal como se reveló mediante el análisis por electroforesis. El termograma de 11St no presentó picos, indicando la completa desnaturalización proteica de la glicinina por

tratamiento ácido. Esta desnaturalización es irreversible tal como lo indica la ausencia de picos en el termograma correspondiente a la neutralizada (11Sr) (Figura 3.5).

La fracción 7Sn mostró un termograma con dos picos endotérmicos (Figura 3.6), uno correspondiente a β -conglucina y otro a la glicina que se encuentra como contaminante. Cuando esta fracción es tratada en medio ácido, 7St, al igual que en el caso de APSt, desaparece la endoterma atribuida a la contaminación con 11S y la otra endoterma se desplaza hacia temperaturas inferiores y su ΔH_d disminuye (ΔH_{dt}). Este comportamiento puede ser atribuido a la disociación del trímero de β -conglucina discutido en la Introducción (sección 1.3.3). Al neutralizar 7St, muestra 7Sr, la endoterma anteriormente detectada se desplaza hacia temperaturas mayores; siendo el ΔH_{dm} mayor que ΔH_{dt} pero menor que ΔH_{dn} .

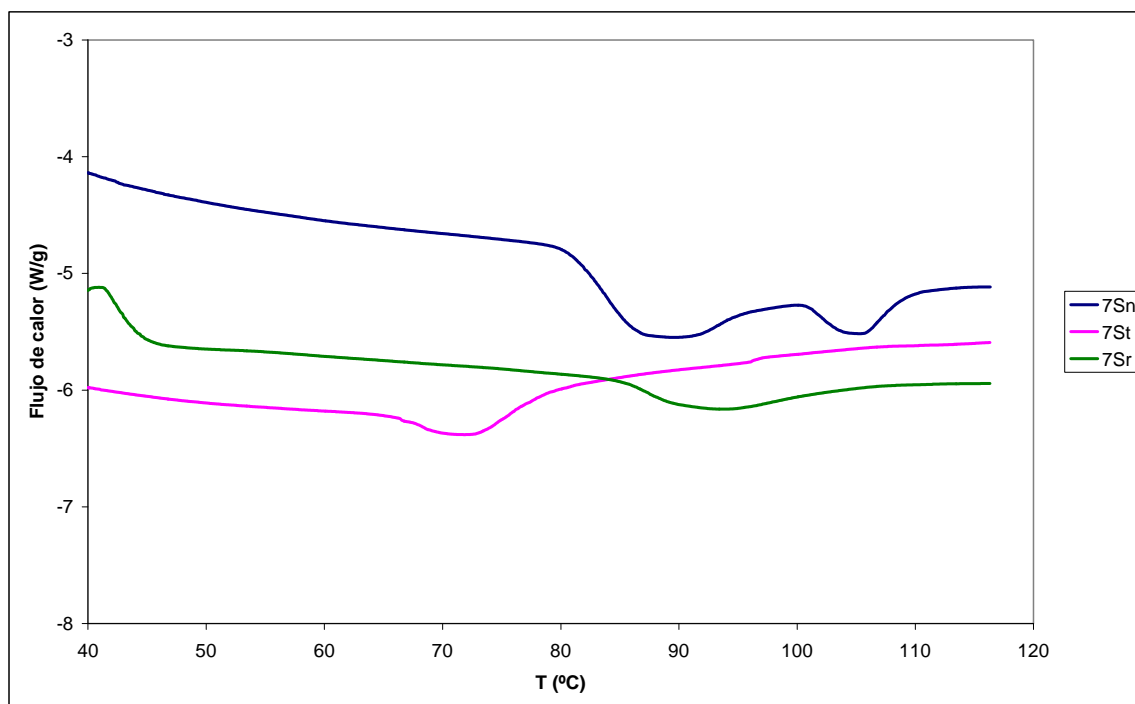


Figura 3.6 Termograma DSC de 7Sn, 7St y 7Sr

En el caso de APSr y 7Sr, las temperaturas de desnaturalización son mayores que las correspondientes a APSt y 7St. Tal aumento de la estabilidad térmica en las proteínas neutralizadas se debe a la mayor cantidad de NaCl agregado (Hermanson, 1978; Damoradan y Kinsella, 1982; Sorgentini et al., 1991; Wagner et al., 1996).

Los resultados discutidos indican que los cambios conformacionales resultantes de la exposición de la β -conglucina a pHs extremos son parcialmente irreversibles.

Con el objeto de determinar la incidencia del tratamiento a pH ácido en la desnaturalización de las proteínas presentes en las muestras nativas y la reversibilidad de la desnaturalización se calculó el grado de desnaturalización (GD) y de recuperación de parte de la conformación nativa (GRN), como fue indicado en Materiales y Métodos (sección 2.6.5). En la Tabla 3.2 se presentan los resultados obtenidos para APS, 11S y 7S.

Tabla 3.2. Grado de desnaturalización y recuperación de la fracción nativa de APS, 11S y 7S.

Muestra	GD(%)		GRN(%)	
	β -conglucina	glicina	β -conglucina	Glicina
APS	60	100	34	0
11S	-----	100	-----	0
7S	65	100	38	0

El fenómeno de recuperación de parte de la fracción nativa, sugerido por los ensayos de calorimetría diferencial de barrido, pudo deberse a la formación de una estructura diferente de la nativa (esto se demostró por la diferencia de ΔH_d) o la recuperación de un porcentaje de la estructura nativa. Por lo tanto, la β -conglucina es más resistente que la glicina a la desnaturalización por tratamiento ácido (Puppo, 1997).

3.2.3 Hidrofobicidad superficial

Wagner et al. (1996) observaron que el efecto de desnaturalización debido al medio ácido también se refleja en cambios en la hidrofobicidad superficial. A medida que el pH disminuye, se produce un aumento de la hidrofobicidad superficial (Wagner et al., 1996).

En la Tabla 3.3 se presentan los valores de hidrofobicidad superficial, H_0 , determinados en las distintas muestras. Tal como había sido previamente observado por Wagner et al. (1996), 11St y APSt presentaron valores de H_0 superiores que sus pares nativas. El aumento de H_0 detectado en las muestras tratadas a pH ácido podría ser atribuido a los cambios conformacionales sufridos por glicina y β -conglucina como consecuencia de su exposición a medios fuertemente ácidos. En la glicina (11S) los

grupos hidrofóbicos se encuentran orientados hacia el interior de la molécula en estado nativo (Cheftel et al, 1989), lo que explica el aumento de casi el doble de la hidrofobicidad luego del tratamiento con pH ácido.

Tabla 3.3 Hidrofobicidad superficial para las distintas muestras.

Muestra	H_o
7Sn	14 ± 6 a
7St	16 ± 7 a
11Sn	17 ± 2 a
11St	30 ± 3 b
APSn	26 ± 3 c
APSt	31 ± 3 b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

El área de superficie hipotética accesible de una subunidad AB de glicinina, que no existe en estado nativo en forma libre pero si luego de la disociación por el tratamiento a pH ácido, suma 170 nm² y aumenta a 864 nm² luego de la disociación y del desplegamiento de la molécula (Shimada y Matsushita, 1980), por otra parte la interacción entre los pares AB dentro del hexágono es de naturaleza hidrofóbica (Badley et al., 1975; Reichelt et al., 1980). También ha sido señalado que en la estructura trimérica de la β -conglucina existen interacciones hidrofóbicas (Thanh y Shibasaki, 1978; Lawrence et al., 1990) y esas zonas quedarían expuestas por la disociación causada por el tratamiento ácido. Sin embargo, para la fracción 7S no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre la muestra tratada a pH ácido y la nativa. Entonces la disociación y desplegamiento de la proteína 11S debido al tratamiento a pH ácido conlleva a una mayor exposición de zonas hidrófobas en las proteínas con el consiguiente aumento de la hidrofobicidad superficial, esto se ve reflejado también en APS (Panizzolo, 2005).

Debido al aumento observado de H_o, se espera que las muestras modificadas con pH ácido mejoren su calidad como agentes de superficie. (Wagner y Guéguen, 1995; Kim, 1985; Kato y Nakai, 1980; Wagner et al., 1996).

3.3. Solubilidad

La solubilidad es una propiedad muy importante dado que afecta a la mayoría de las propiedades funcionales que exhibe una proteína (Damodaran, 1996). En general es conveniente que las proteínas que se utilizan como ingredientes alimentarios presenten una solubilidad considerable, de forma que puedan actuar como buenos agentes emulsificantes, espumantes o gelificantes (Vojdani, 1996). El comportamiento de la solubilidad frente a diversas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura, etc. proporciona un buen índice de las posibles aplicaciones de los ingredientes proteicos, ya que la disminución de la solubilidad es una medida práctica para estimar el grado de desnaturalización y agregación de las proteínas. Las proteínas que se hallan inicialmente en un estado desnaturalizado, parcialmente agregado, suelen ser poco eficaces en los procesos de gelificación, emulsificación o formación de espuma (Cheftel, 1989). Por todo ello, la solubilidad proteica a pH neutro, o en el punto isoeléctrico, es con frecuencia la primera de las propiedades funcionales que se mide en cada una de las etapas de la preparación y procesado de un ingrediente proteico (Cheftel, 1989).

Wagner et al. (1996) estudiaron la solubilidad de aislados proteicos de soja tratados a pH 1, 2 y 3,5, los cuales mostraron porcentajes de solubilidad de 62,0, 71,5 y 82,0, respectivamente. Las solubilidades inferiores que se encuentran en la zona más ácida serían debido a la mayor agregación de proteínas causada por un aumento gradual en la desnaturalización de 11S además de la agregación inducida por el aumento de la concentración salina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por estos autores a partir del análisis de SDS-PAGE de la fracción soluble de los aislados, donde se muestra la existencia de un alto porcentaje de agregados de elevada masa molecular (de 140 a 200 kDa) en los aislados nativos y que disminuye en los aislados modificados a pH ácido. Esto indica el paso de parte de los agregados solubles a la fracción insoluble y/o a la formación de grandes agregados, que son incapaces de entrar en el gel. (Wagner et al, 1996). Nuestros resultados concuerdan con los antes discutidos (Tabla 3.4).

Las muestras APS y 7S mostraron un comportamiento similar, su solubilidad disminuyó luego del tratamiento ácido y posterior neutralización (muestras APSt-7,0 y 7St-7,0) debido a la formación de agregados insolubles. Estos agregados son los detectados en los perfiles electroforéticos ya discutidos (Sección 3.2.1). En las proteínas nativas los agregados poseen una masa molecular superior a 97 kDa (Figura 3.1). En los

perfiles electroforéticos correspondientes a las muestras tratadas a pH ácido y posteriormente neutralizadas estos agregados no fueron detectados (Figura 3.2) probablemente por insolubilización debida al aumento de tamaño inducida por la acción del pH ácido y la posterior neutralización.

Tabla 3.4 Solubilidad de las distintas muestras con una concentración de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 0,01M pH 7,0 y 2,5, expresada como g de proteína soluble en 100g de proteína.

Proteína	Índice de Solubilidad (IS)
APSn-7,0	93±6 e, f
APSt-7,0	71±3 b
APSt-2,5	95±4 f
11Sn-7,0	89±5 d, e
11St-7,0	83±4 c
11St-2,5	83±4 c
7Sn-7,0	88±1 c, d, e
7St-7,0	55±1 a
7St-2,5	85±3 c, d

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

Por otra parte no se detectaron diferencias significativas entre la solubilidad de APSn-7,0 y APSt-2,5 y la de 7Sn-7,0 y 7St-2,5, esta diferencia con las muestras de APSt-7,0 y 7St-7,0 puede deberse a los fenómenos de disociación previamente discutidos, que sufren tanto la glicinina como la β -conglucina a pHs ácidos extremos (Thanh y Shibasaki, 1979).

De acuerdo al trabajo realizado por Wagner et al. (1996), quienes sometieron aislados proteicos de soja a diferentes pHs ácidos (de 1 a 3,5) y posteriormente neutralizaron los mismos en una o dos etapas, la solubilidad es dependiente del procedimiento de neutralización. En nuestro caso, los aislados tratados a pH ácido fueron liofilizados al pH del tratamiento y luego se dispersaron a pH 2,5 o pH 7,0. Por consiguiente aquellas muestras mantenidas a pH 2,5 nunca pasaron por el PI, lo cual favorecería según Wagner et al. (1996) la formación de agregados insolubles.

La solubilidad de 11Sn-7,0 fue mayor que la de 11St-7,0 y 11St-2,5 probablemente debido a la formación de agregados insolubles luego del tratamiento a

pH ácido los cuales no sufren cambios durante el proceso de neutralización, dado el grado de desnaturalización alcanzado por 11S (punto 3.2.2).

3.4 Resumen y conclusiones parciales

Este Capítulo se ha dedicado al estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas de soja y los cambios sufridos por las mismas cuando son tratadas a pH ácido. Con el fin de comprender dichos cambios el tema ha sido abordado desde diferentes ángulos lo que ha permitido obtener una serie de resultados que se complementan entre sí. Los conocimientos alcanzados en esta parte del trabajo proporcionan la información requerida para comprender el comportamiento de 7Sn, 7St, 11Sn, 11St, APSn, APSt en sistemas coloidales como emulsiones y espumas.

A continuación se describen de manera resumida las conclusiones parciales extraídas del presente estudio.

- ✓ El tratamiento a pH ácido provocaría una desnaturalización parcial de la β -conglucina la cual es parcialmente reversible a pH 8,0. Sin embargo, produce una desnaturalización total de la glicina la cual es irreversible a pH 8,0. Esta desnaturalización disminuye la solubilidad de las fracciones en las condiciones ensayadas.

- ✓ Luego del tratamiento a pH ácido se produce un aumento significativo en la hidrofobicidad superficial, lo cual se puede atribuir a la exposición de residuos hidrofóbicos por la desnaturalización.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades espumantes

4.- PROPIEDADES ESPUMANTES

4.1 Determinación de tensión superficial (agua/aire)

Para seguir el proceso de modificación de la tensión superficial en el tiempo se obtuvieron datos con el tensiómetro dinámico de gota (Tracker, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France). A partir de ellos y haciendo uso del modelo cinético propuesto por Panizzolo (2005) se obtuvieron las constantes de velocidad para los procesos de adsorción y reordenamiento. La ecuación empleada fue:

$$\gamma_t = A_a e^{-k_a t} + A_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

donde:

k_a y k_r : son constantes de velocidad de primer orden para los procesos de adsorción y reordenamiento de las proteínas en la interfase aire-agua respectivamente

A_a , A_r : son los parámetros de amplitud.

γ_e : tensión superficial de equilibrio

En la Tabla 4.1 se presentan los valores correspondientes a A_a , A_r , γ_e , k_a y k_r para las soluciones ensayadas.

Tabla 4.1 Constante de velocidad de adsorción (k_a), constante de velocidad de reordenamiento (k_r) y tensión superficial de equilibrio (γ_e) para las distintas muestras. Concentración de muestra: 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 8,0 y 2,5.

	A_a (mN/m)	$k_a \times 10$ (s ⁻¹)	A_r (mN/m)	$k_r \times 10^2$ (s ⁻¹)	γ_e (mN/m)
APSn-8,0	9±2 a, b, c	1,01±0,08 c	10±1 a, b, c	0,61±0,08 b	42±4 b
APSt-8,0	9±1 a, b, c	0,9±0,2 b,c	10±1 a, b, c	0,67±0,06 b, c	41±3 b
APSt-2,5	5,9±0,7 a	0,8±0,1 a, b	9±1 a, b	0,60±0,08 a, b	39,7±0,6 a, b
11Sn-8,0	13,5±0,5 c	0,69±0,05 a	11,1±0,8 b, c	0,7±0,2 b, c	40,1±0,5 a, b
11St-8,0	7,0±0,9 a, b	0,97±0,06 b, c	8±1 a	0,76±0,01 c	41±3 b
11St-2,5	5±2 a	1,3±0,2 d	8±3 a	0,67±0,08 b, c	40,3±0,3 a, b
7Sn-8,0	11±2 b, c	0,9±0,2 b, c	13 ± 1 c	0,61±0,06 b	40±2 a, b
7St-8,0	10±4 a, b, c	1,57±0,05 e	10 ± 3 a, b, c	0,9±0,1 d	39±2 a, b
7St-2,5	6±3 a, b, c	1,9±0,2 f	14±1 c	0,47±0,04 a	40±2 a

Letras iguales en la misma columna significa que no existe diferencia significativa entre las muestras ($\alpha \leq 0.05$).

El valor de tensión superficial en el equilibrio (γ_e) del agua fue 72 mN/m a temperatura ambiente y disminuyó debido a la presencia de proteínas. Según Tornberg

et al. (1982), la velocidad de disminución de la tensión superficial debido a las proteínas puede ser evaluada a través de tres etapas consecutivas: 1) la difusión de las moléculas proteicas, 2) la adsorción a la interfase y 3) el desplegamiento de las moléculas ya adsorbidas. Por esto es apropiado analizar no solo la tensión superficial de equilibrio sino también la velocidad de adsorción y el reordenamiento de las proteínas en la interfase.

Los resultados obtenidos indican que la principal diferencia entre las proteínas nativas y tratadas a pH ácido, con respecto a la cinética de modificación de la tensión superficial, no radica en el valor en el equilibrio alcanzado sino en la velocidad con que se experimenta el cambio de la misma, ya que los resultados de tensión superficial de equilibrio correspondientes a las proteínas nativas y las tratadas a pH ácido en las condiciones estudiadas no presentaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre sí. Tampoco presentaron diferencias significativas los valores de la constante de velocidad para el proceso de reordenamiento (k_r) de las proteínas nativas y tratadas a pH ácido para APS y 11S, en cambio sí se observaron diferencias para 7S, probablemente debido a los diferentes estados conformacionales observados por DSC (punto 3.2.2). Además la β -conglucina, presenta una mejor habilidad para disminuir la tensión interfacial, por su menor masa molecular (Hayakawa y Nakai, 1985).

APS no mostró diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en los valores de k_a , en cambio para 7S y 11S se encontró un aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) de la constante de velocidad del proceso de adsorción (k_a) debido al tratamiento a pH ácido. Este aumento encontrado estaría relacionado con:

- el aumento en la hidrofobicidad superficial detectada en el caso de 11S, dado que la cantidad de zonas hidrofóbicas en la superficie de la molécula de la proteína está directamente relacionada con la fase de penetración de la misma a la interfase durante la adsorción (Sección 3.2.3)

- la glicina preponderantemente encontrada bajo la forma 3S, tiene una adsorción más rápida en la interfase. Martin et al. (2002) informaron que en aquellas condiciones en las que la glicina se encuentra mayoritariamente en la forma 3S, esta se despliega y reordena más fácil y rápidamente debido a que esta forma es más flexible como consecuencia de la mayor repulsión electrostática en el interior de la molécula. Además la forma 3S, presenta diferencias a nivel de las estructuras secundaria y terciaria (Lakemond, 2000). Como la desnaturalización de la glicina debida al

tratamiento ácido fue irreversible, esta se encontraría mayoritariamente bajo la forma 3S desnaturalizada, tanto a pH 2,5 como luego del proceso de renaturalización a 8,0.

- la formación de estructuras diferentes a la nativa en las distintas condiciones de ensayo en el caso de 7S, ya indicadas en la sección 3.2.2., estarían provocando un menor impedimento en el caso de 7St-8,0 y un mayor impedimento en el caso de 7St-2,5 en el momento de la adsorción de la proteína en la interfase.

En APS no se reflejó el comportamiento de 7S y 11S debido probablemente a que existe una competencia de éstas proteínas por adsorberse en la interfase.

4.2 Comportamiento superficial dinámico

La tangente del ángulo de pérdida presenta un valor comprendido entre 0,10 y 0,33 lo que indica que la película formada en la interfase por las diferentes proteínas analizadas, nativas y tratadas, a pH ácido tiene un comportamiento predominantemente elástico (Tabla 4.2). Este comportamiento está regulado por las condiciones de frecuencia utilizadas en el ensayo experimental, el cual en este caso fue de 200mHz, (Benjamins et al. (1996); Freer et al. (2004)). Según estos autores el valor de $\tan \phi$ está relacionado con el comportamiento complementario entre el módulo elástico y el módulo viscoso, E_d aumenta conforme aumenta la frecuencia de oscilación mientras que E_v disminuye al aumentar la frecuencia. A frecuencias bajas la proteína tiene tiempo suficiente para responder a la variación de área, produciendo fenómenos de relajación en la capa superficial, de esta forma el comportamiento viscoso se hace notorio. Por el contrario, un aumento de la frecuencia de la oscilación disminuye el tiempo que tiene la proteína localizada en la interfase para adaptarse a la deformación, así el comportamiento elástico de la capa interfacial aumenta en detrimento de su comportamiento viscoso. Finalmente, a frecuencias suficientemente altas, la viscosidad de la capa interfacial se hace despreciable, y, por encima de una frecuencia de 100mHz, se considera que la capa interfacial presenta un comportamiento puramente elástico.

En cuanto al módulo dilatacional (E) no se detectaron diferencias significativas entre APSn y APSt a pH 8,0, siendo éstos menores que para APSt a pH 2,5, esto indicaría que en este caso se produce una película más resistente (Tabla 4.2). Cuando se analizan los componentes dilatacional elástico y viscoso de APSn y APSt a pH 8,0 se observan diferencias entre ellos ya que el módulo dilatacional viscoso es mayor para APSt, por lo que las películas formadas por APSt-8,0 presentarían una mayor

resistencia. La viscosidad superficial disminuye las distorsiones mecánicas que de otro modo podrían causar una ruptura de las películas (Koelsch y Motschmann, 2005).

Tabla 4.2 E, E_d, E_v, para todas las muestras en todas las condiciones.

Muestra	E (mN/m)	E _d (mN/m)	E _v (mN/m)	tg φ
APSn-8,0	27 ± 3 b, c	27 ± 4 b	4 ± 3 a, b	0,2 ± 0,2 a
APSt - 8,0	24 ± 1 a, b	22,6 ± 0,8 a	7,4 ± 0,8 c	0,33 ± 0,03 b
APSt-2,5	41 ± 1 e	41 ± 1 d	4,3 ± 0,4 a, b	0,11 ± 0,01 a
11Sn-8,0	21 ± 2 c, d	21 ± 2 b, c	2,2 ± 0,3 a	0,2 ± 0,2 a
11St-8,0	33 ± 1 d	32 ± 1 c	6,7 ± 0,2 b, c	0,21 ± 0,02 a
11St-2,5	50 ± 3 f	50 ± 4 e	5,2 ± 0,8 a, b, c	0,10 ± 0,02 a
7Sn- 8,0	21 ± 1 a	21 ± 2 a	3 ± 2 a	0,17 ± 0,09 a
7St- 8,0	32 ± 3 d	31 ± 3 c	6 ± 1 a, b, c	0,19 ± 0,03 a
7St-2,5	41 ± 2 e	41 ± 9 d	3 ± 1 a, b, c	0,13 ± 0,01 a

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Para APSt a pH 2,5 se observa un aumento de casi el doble de la componente elástica con respecto a las correspondientes a APSn y APSt a pH 8,0. Esto indica una mayor resistencia del film ya que para tener una película estable se requiere también superficies elásticas para amortiguar las perturbaciones externas y, por tanto, para evitar la ruptura de la película (Stubenrauch y Miller, 2004). En conclusión en APSt a pH 8,0 la responsable de la estabilización es la componente viscosa en cambio en APSt a pH 2,5 la responsable de la estabilización de la película es la componente elástica. El mismo comportamiento se observa para la fracción 11S, que presenta una marcada mejora en la estabilidad de las espumas (sección 5.3.2) debido al tratamiento a pH ácido, estabilidad reflejada en el módulo dilatacional. El mayor aumento de este módulo se observa a pH 2,5 (más del doble del valor del módulo de la proteína nativa) donde no sólo aumenta el módulo elástico sino que también lo hace notablemente el módulo viscoso. Esto puede deberse a que a pH 8,0 la glicinina se encuentra como hexámero y a pH 2,5 como dímeros según el modelo planteado por Martin et al (2002), quienes determinaron que tanto las formas 3S (dímero) como 11S (hexámero) son capaces de formar una red, siendo la red de 11S menos fuerte. La diferencia en la fuerza de la red reside en la estructura más compacta de la forma 11S y la ocurrencia de otros tipos de

interacciones dentro de las moléculas. La forma 3S es más flexible debido a la alta repulsión electrostática dentro de la molécula. La forma 11S al ser de mayor tamaño favorece la componente viscosa.

La película formada por la fracción 7S presenta un comportamiento similar a la película correspondiente a la fracción 11S en todas las condiciones a lo que a E y E_d se refiere. Este comportamiento podría en un principio ser atribuido a la contaminación de la fracción 7S con proteína 11S.

4.3 Propiedades espumantes

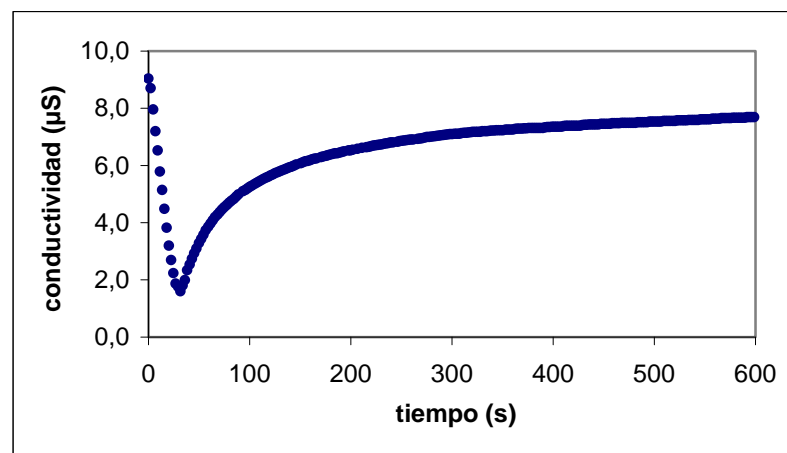


Figura 4.1 Conductividad en función del tiempo para una espuma elaborada con APSn-8, [proteína] = 1 mg/ml, pH 8,0.

Las espumas se formaron por el método de burbujeo el cual permite analizar el proceso de formación y desestabilización de las espumas a través de medidas conductimétricas (Loisel et al., 1993). Los datos colectados (conductividad en función del tiempo) fueron graficados para analizar la formación y la estabilidad de la espuma (Figura 4.1).

4.3.1 Formación de espumas

El estudio de la formación de espuma se abordó desde dos puntos de vista, uno cuantitativo, considerando dos parámetros vinculados a la formación de espuma: volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad inicial de pasaje del líquido a la espuma (v_o), y otro cualitativo: tamaño y forma de las burbujas.

4.3.1.1 Tamaño y forma de las burbujas.

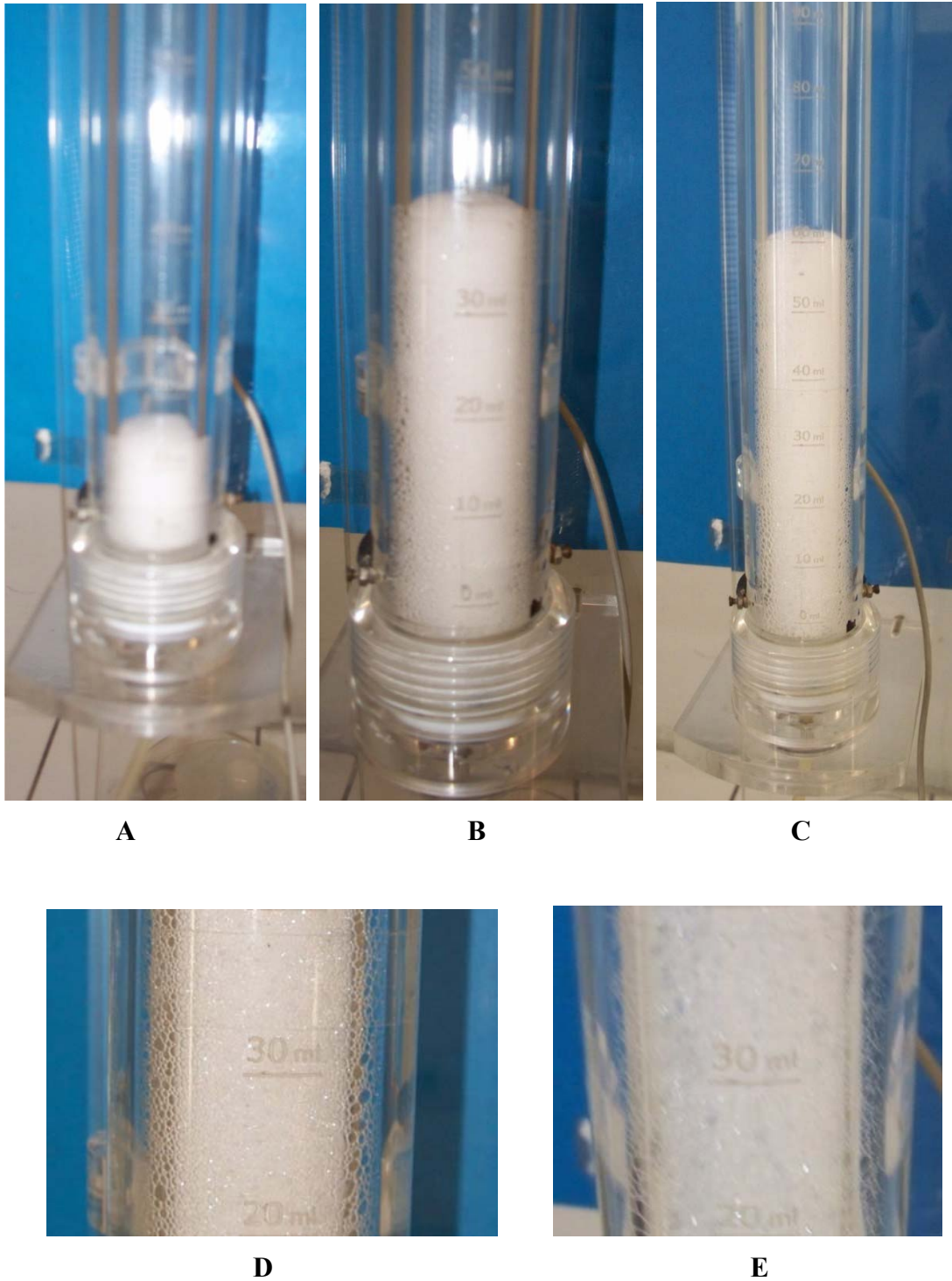


Figura 4.2 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con APSn, [proteína] = 1 mg/ml, pH 8,0. A) Volumen de espuma formado: 20 ml B) volumen de espuma formado: 40 ml C) volumen de espuma formado: 60 ml D) Volumen de espuma de 60 ml recién formada E) Volumen de espuma de 60 ml después de 10 min. de formada



A



B



C

Figura 4.3 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con APSt, [proteína] = 1 mg/ml, pH 8,0. A) Volumen de espuma formado: 20 ml B) volumen de espuma formado: 60 ml C) Volumen de espuma de 60 ml recién formada

Si bien no se determinó cuantitativamente el tamaño medio de las burbujas formadas, las imágenes mostradas en las Figuras 4.2 a 4.4 permiten apreciar el tamaño de las mismas en las espumas elaboradas con APSn-8, APSt-8 y APSt-2,5. En el caso de la espuma formulada con APSn-8 (Figura 4.2 D) el tamaño de burbuja fue mucho mayor que el correspondiente a las espumas obtenidas con APSt-8 y APSt-2,5 (Figuras 4.3 C y 4.4 C). Las imágenes se obtuvieron cuando el volumen de espuma llegó a 20 ml (Figuras 4.2 A, 4.3 A y 4.4 A) y a 60 ml (volumen de espuma al momento de finalizar el burbujeo, Figuras 4.2 B, 4.3 B y 4.4 B), respectivamente.



A



B



C

Figura 4.4 Imágenes correspondientes a distintas etapas de la formación de una espuma elaborada con APSt, [proteína] = 1 mg/ml, pH 2,5. A) Volumen de espuma formado: 20 ml B) volumen de espuma formado: 60 ml C) Volumen de espuma de 60 ml recién formada

Los atributos esenciales que una proteína debe poseer para presentar mejor espumabilidad son ser capaz de adsorberse rápidamente en la interfase aire-agua durante el burbujeo o batido, experimentar cambios conformacionales y reordenamientos rápidos en la interfase y reducir velozmente la tensión superficial (Damodaran, 1997).

Prins (1988) indica que en el espumado por burbujeo el radio de la burbuja (R) en el momento de escapar del orificio se puede representar por la expresión:

$$R = \left(\frac{3\gamma r}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde:

γ es la tensión superficial,

r es el radio del orificio de la placa porosa,

ρ es la densidad de la solución y

g es la aceleración de la gravedad.

La Ecuación 4.1 se puede reordenar como

$$R = \left(\frac{3r}{2\rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \times (\gamma)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Para un caso particular con r constante, R variará sólo con la raíz cúbica de γ , entonces la relación de tamaño inicial de burbujas preparadas con distintas soluciones de proteína estará dada por:

$$\frac{R_1}{R_2} = \left(\frac{\gamma_1}{\gamma_2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

De esta manera la relación de tamaño inicial de las burbujas presentes en espumas preparadas con distintas soluciones de proteína dependerá de la raíz cúbica del cociente de las tensiones superficiales que se alcancen durante la formación de la espuma. Al variar la disminución de tensión superficial en el tiempo la diferencia máxima entre los valores de γ de APSn-8 y APSt-2,5 fue de 42 y 40 mN/m respectivamente, entonces la máxima relación entre los radios de las burbujas de APSn-8 y APSt-2,5 sería de $(42/40)^{1/3}$, o sea de aproximadamente 1,02. Como ya se mostró, el radio de las burbujas de la espuma de APSn-8 fue ostensiblemente mayor que el de las burbujas de APSt-8 y APSt-2,5, por lo tanto es razonable pensar que otro u otros factores estarían afectando el tamaño de las burbujas de la espuma recién preparada.

Durante el espumado luego que las burbujas se forman, ellas se separan debido a las diferencias de densidad con la fase líquida. Estas burbujas se acumulan unas sobre otras y en este proceso se forman películas entre las burbujas. La formación de una espuma incluye procesos que corresponden a la etapa de desestabilización (Halling, 1981). Cuando una película se forma entre dos burbujas y las burbujas se acercan a menudo estas se aplastan, la película está expuesta a un esfuerzo de estiramiento frecuentemente complejo, en que el área superficial gas-líquido aumenta rápidamente (Salager et al, 2003). Aquí se pondría en juego el mecanismo de Gibbs-Marangoni pero si la resistencia de la película formada no es suficiente esta se rompe y da origen a otras burbujas de mayor tamaño. También es factible que el aumento del tamaño de la burbujas se pueda dar a través del mecanismo de desproporción de Ostwald (Walstra, 1996b; Wagner, 2000).

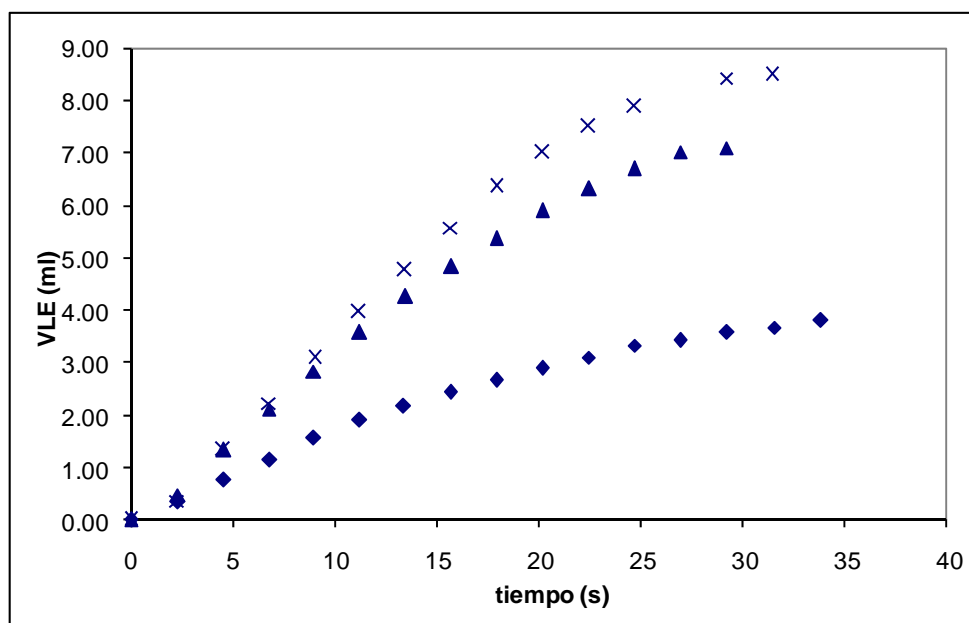


Figura 4.5 Volumen de líquido incorporado en la espuma en función del tiempo de un ensayo con volumen de espuma formada máximo de 60 ml (preparada con: APSn-8 (◆), APSt-8 (▲) y APSt-2,5(x)).

En la Figura 4.2 se puede observar que la espuma elaborada con APSn-8 al comienzo del espumado (Figura 4.2 A) presenta mayor densidad y menor tamaño de burbujas que al final del burbujeo (Figura 4.2 C). En cambio las imágenes de las espumas formuladas con APSt-8 (Figura 4.3 A y B) como APSt-2,5 (Figura 4.4 A y B), no muestran diferencias en el aspecto de la espuma y tamaño de las burbujas entre el

comienzo y el final del proceso de burbujeo. En la Figura 4.5 se muestra la variación de volumen de líquido incorporado en función del tiempo para espumas preparadas con APSn-8, APSt-8 y APSt-2,5 hasta un volumen de espuma de 60 ml, condición de los ensayos realizados. En dicha figura se puede apreciar que en las espumas elaboradas con APSn-8 fue incorporada una menor cantidad de líquido y a su vez con menor velocidad, considerada esta como $\Delta V/\Delta t$. Todo esto evidencia que los procesos de desestabilización durante la etapa de formación fueron ostensibles en las espumas elaboradas con APSn-8.

Para la fracción 11S no se tienen fotografías de las espumas, pero se observó el mismo comportamiento que APS. Las espumas elaboradas con 11Sn-8 presentaron burbujas abiertas y grandes observándose desestabilización durante la formación de las mismas. En los siguientes 10 minutos después de formada la espuma se observa desproporción. El diámetro de las burbujas fue mayor que para el resto de las muestras. Mientras que en las espumas elaboradas con 11St-8 y 11St-2,5 fue apreciable la disminución del diámetro de burbuja con respecto a 11Sn-8.

Aunque las formas 3S y 11S de glicinina pueden formar una red en la interfase, la correspondiente a 11S es menos rígida debido a su estructura más compacta (Martin et al., 2002). Asimismo debido al proceso de desnaturalización previo de las proteínas de APSt y 11St, la glicinina con predominio de la forma 3S, además de reordenarse más rápidamente y fácilmente en la interfase, tienen la posibilidad de formar interacciones intermoleculares físicas y covalentes en la película interfacial (Martin et al., 2002). Eso, entonces, le hubo de conferir a la película formada por las proteínas de APSt y 11St una mayor resistencia frente a los procesos de desestabilización, permitiendo así que las burbujas formadas fueran de menor tamaño.

Para 7Sn-8, 7St-2,5 y 7St-8 se observó el mismo comportamiento que en el caso de APS y 11S.

4.3.1.2. Volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y velocidad de pasaje del líquido a la espuma (v_0)

La medida conductimétrica de la fase líquida de una espuma permite determinar el volumen de líquido incorporado a la espuma (V_{LE}) en función del tiempo:

$$V_{LE}(t)(mL) = \left(\frac{C_t}{C_i} \right) \times V_{Li} \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

donde:

$V_{LE}(t)$: volumen de líquido en la espuma a un tiempo t

V_{Li} : volumen de solución de proteína inicial

C_i : conductividad inicial (correspondiente al V_{Li})

C_t : conductividad a tiempo t .

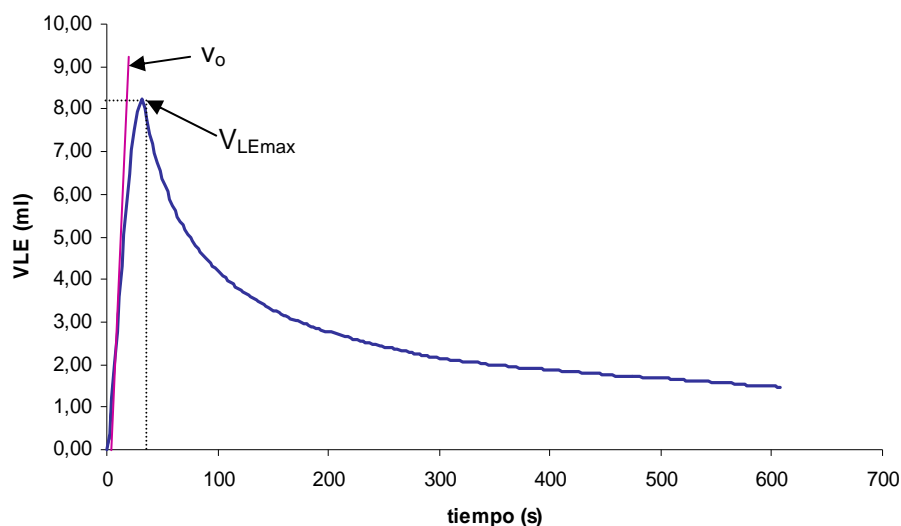


Figura 4.6 Curva experimental de V_{LE} en función del tiempo. V_{LEmax} volumen máximo de líquido retenido en la espuma y v_o velocidad de pasaje del líquido a la espuma.

A partir de V_{LE} se pueden calcular varios parámetros relacionados con la formación de espuma (Figura 4.6) entre ellos el volumen máximo de líquido retenido en la espuma (V_{LEmax}) y la velocidad de pasaje del líquido a la espuma (v_o), dada por la pendiente inicial de la curva V_{LE} vs t , parámetro propuesto por Wagner et al. (1996).

En general se observó, analizando los parámetros V_{LEmax} y v_o , que la espumabilidad del aislado y de las fracciones mejoró con el tratamiento ácido. A pH 8,0 la fracción 7S nativa presentó una mejor espumabilidad que la 11S nativa. La fracción que presenta la mayor mejora en la espumabilidad luego del tratamiento a pH ácido es la 11S.

Comparando las muestras tratadas a pH 2,5 (APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5) con aquellas tratadas a pH ácido y posteriormente llevadas a pH 8,0 (APSt-8, 11St-8 y 7St-8) se observó que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en los valores de v_o y V_{LEmax} , salvo en el caso de APSt-8 y APSt-2,5 para V_{LEmax} .

Tabla 4.3 VLE_{máx} y v_o para todas las muestras en distintas condiciones.

	V _{LEmáx} (ml)	V _o (ml/s)
APSn-8,0	3,5±0,3 a	0,15±0,01 a
APSt-8,0	7,0±0,3 d	0,30±0,03 d, e
APSt-2,5	8,4±0,2 e, f	0,32±0,04 e, f
11Sn-8,0	4,3±0,3 b	0,22±0,03 b
11St-8,0	8,1±0,4 c	0,32±0,07 e, f
11St-2,5	8,61±0,01 f	0,36±0,02 f
7Sn-8,0	6,3±0,4 c	0,30±0,02 b, c
7St-8,0	8,3±0,3 e	0,360±0,009 c, d
7St-2,5	8,4±0,1 e, f	0,36±0,02 d, e

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Graham y Phillips (1979) demostraron que el factor más importante para la espumabilidad de una solución de proteína es la velocidad a la cual la proteína puede reducir la tensión superficial, pues una nueva área superficial está siendo creada continuamente durante el burbujeo o batido. Las proteínas que se adsorben rápidamente y rápidamente experimentan cambios conformacionales en la interfase aire-líquido formada durante el burbujeo, frecuentemente exhiben mejor espumabilidad que aquellas que se adsorben lentamente y resisten el desplegamiento en la interfase (Damodaran, 1996). De acuerdo a Kitabatake y Doi (1988) la espumabilidad de las proteínas no está relacionada con su tensión superficial de equilibrio, pero sí con la velocidad de disminución de la tensión superficial. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los valores de γ_e de las diferentes muestras, si bien hay diferencias en los parámetros de espumabilidad v_o y V_{LEmáx}. Estos resultados ya habían sido observados por Medrano (2009) y Panizzolo (2005) previamente.

No existieron diferencias entre APSn y APSt en cuanto a velocidad de disminución de la tensión superficial como consecuencia de la adsorción (k_a) y el reordenamiento molecular (k_r) de las proteínas en la interfase, por lo que no se encontró ninguna relación entre la variación de los parámetros de espumabilidad estudiados, v_o y V_{LEmáx}, y la cinética de modificación de la tensión superficial.

Al igual que cuando se discutió la diferencia de tamaño de burbuja sería apropiado plantear que deben existir otras causas responsables de las diferencias observadas en los parámetros v_o y V_{LEmáx} de las espumas obtenidas con las distintas proteínas estudiadas. Según Wagner y Guéguen (1999a), el parámetro v_o da información del comportamiento de la proteína en la etapa inicial de formación de la espuma, en la

que los procesos de desestabilización, como la ruptura de la película, la desproporción de Ostwald y el drenado gravitatorio de líquido, son incipientes. La desproporción de Ostwald (Wagner, 2000) consiste en el crecimiento de las burbujas grandes a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, ya que la diferencia de radio entre las burbujas grandes y las pequeñas produce un gradiente de presión que según la ley de Laplace es igual a:

$$\Delta P = \left[\left(\frac{1}{R_g} \right) - \left(\frac{1}{R_p} \right) \right] \gamma \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

donde R_g y R_p son los radios de las burbujas grandes y pequeñas respectivamente. El mecanismo de desestabilización por drenado de líquido es (Wagner, 2000; Salager et al. 2003) hacia abajo, en primera instancia por simple acción de la gravedad sobre el líquido que se encuentra en las burbujas, luego por fenómenos más complejos ya que la diferencia de curvatura entre los bordes de Plateau y la parte plana de las películas produce un gradiente de presión según la ley de Laplace que ahora se puede expresar como:

$$\Delta P = \left[\left(\frac{1}{R_l} \right) - \left(\frac{1}{R_{bp}} \right) \right] \gamma \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

donde R_l y R_{bp} son los radios de curvatura de la lamela y del borde de Plateau respectivamente. Esta diferencia de presión (ΔP) es la fuerza motriz que desplaza el líquido de la lamela interburbuja hacia los bordes de Plateau, mediante el mecanismo llamado succión capilar. El líquido es luego drenado por acción de la gravedad desde los bordes de Plateau hacia la parte inferior de la espuma. El tamaño de burbuja es uno de los parámetros que influye en la cantidad de líquido drenado y cuanto mayor es el radio de la burbuja, mayor será R_l y por tanto menor será ΔP y el drenado de líquido.

La desproporción de Ostwald, el efecto de borde de Plateau y el drenado gravitatorio de líquido, llevan al drenado de líquido de la espuma, que en el proceso de formación incipiente, debido a su mayor crecimiento conduciría a una menor velocidad inicial de incorporación de líquido y a su vez a una menor incorporación de volumen de líquido en la espuma. La tensión superficial también influye en el valor de ΔP , pues a

menor γ menor ΔP y por tanto menor fuerza impulsora de los procesos de desproporción de Ostwald y de drenado gravitatorio de líquido (Panizzolo 2005).

Suponiendo en primera instancia iguales valores R_g , R_p , R_l y R_{bP} para las distintas muestras ensayadas, la relación de ΔP de las burbujas de espumas preparadas con distintas soluciones de proteína, tanto para la desproporción de Ostwald como para el drenado o escurrido gravitatorio de líquido, se puede expresar como:

$$\frac{\Delta P 1}{\Delta P 2} = \frac{\gamma 1}{\gamma 2} \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

Por lo tanto, la relación de ΔP dependería del cociente de tensiones superficiales que se alcancen durante la formación de la espuma. Como ya se indicó no existe diferencia significativa entre los valores de γ de las distintas muestras analizadas. En consecuencia es evidente que las diferencias de ΔP , y por tanto de v_o y V_{LEmax} , no se deben a diferencias en los valores de γ alcanzados.

En las espumas que, durante su formación, logren menores tamaños de burbuja mayor sera el ΔP , es decir que se generará una mayor fuerza impulsora de drenado y desproporción. Si se mantiene esta línea argumentativa y se asocia el menor tamaño de la burbujas de las muestras tratadas a pH ácido con el hecho de resistir mejor los procesos incipientes de desestabilización de la espuma, la mayor velocidad de incorporación de líquido se podría correlacionar con el menor tamaño de burbujas formadas a partir de las soluciones de proteínas tratadas a pH ácido. Estas resistieron mucho mejor los procesos incipientes de desestabilización de la espuma, como ser la ruptura de la película, la desproporción de Ostwald y el drenado gravitatorio de líquido. Esto también explicaría el hecho, ya señalado, que las espumas de proteínas nativas hayan presentado un menor valor de V_{LEmax} . Como ya se discutió en el punto 4.2, las películas interfaciales formadas por APSt-8 y APSt-2,5 son más resistentes a la ruptura. El hecho que APSt-8 posea un mayor E_v y APSt-2,5 un mayor E_d que APSn-8, explicaría la mejora de v_o y V_{LEmax} para APSt.

Para 11S la diferencia principal entre las muestras nativas y tratadas a pH ácido radicó en la menor velocidad de disminución de la tensión superficial debida a la adsorción de las proteínas en la interfase, por lo que la única correlación que se puede plantear entre la variación de los parámetros de espumabilidad estudiados, v_o y V_{LEmax} , con la cinética de modificación de la tensión superficial es a través de los valores de k_a

discutidos con anterioridad (Punto 4.1). El coeficiente de correlación lineal obtenido para 11S fue de 0,97 para v_o y de 0,88 para V_{LEmax} .

La adsorción inicial de la molécula de proteína en la interfase involucra el anclaje de las zonas hidrofóbicas de la superficie de la proteína en la interfase, esto permitiría suponer la existencia de una correlación entre la hidrofobicidad superficial y la espumabilidad de las proteínas. Esta correlación directa no ha sido encontrada, tal como lo señalan Kato et al. (1983) y Townsed y Nakai (1983). Estos últimos autores indicaron que la espumabilidad de las proteínas si muestra una correlación positiva con la hidrofobicidad promedio de las mismas. Damodaran (1997) mostró que una vez que la proteína es adsorbida en la interfase la velocidad de la reducción de la tensión superficial y la expansión del área interfacial durante el espumado depende de su hidrofobicidad promedio y de la capacidad para exponer todos los residuos hidrofóbicos en la interfase y no por el número de zonas hidrofóbicas en la superficie de la proteína. 11S presentó distinta hidrofobicidad superficial en su estado nativo y luego del tratamiento ácido. Mientras que una muestra en estado nativo y otra tratada a pH ácido tiene la misma hidrofobicidad promedio. Los parámetros de espumabilidad v_o y V_{LEmax} de 11S nativa y tratada a pH ácido fueron diferentes, por lo tanto presentaron una correlación positiva con los valores de hidrofobicidad superficial no con la hidrofobicidad promedio. Estos resultados son aparentemente contradictorios con lo señalado por Kato et al. (1983), Townsed y Nakai (1983) y Damodaran (1997). Sin embargo cabe recordar que las proteínas que se adsorben rápidamente y rápidamente experimentan cambios conformacionales en la nueva interfase aire-líquido formada durante el burbujeo frecuentemente exhiben mejor espumabilidad que aquellas que se adsorben lentamente y resisten el desplegamiento en la interfase (Xu y Damodaran, 1993; Anand y Damodaran, 1995 y Damodaran y Xu, 1996). Las proteínas presentes en las muestras tratadas a pH ácido presentaron un mayor valor de H_o debido a la desnaturalización sufrida a causa del mismo, como ya se discutió en el punto 3.2.3. Esa desnaturalización previa es lo que a su vez condujo a un comportamiento distinto en el proceso de adsorción y descenso de la tensión superficial, la misma les permitió lograr en la interfase una conformación y disposición tal que le confirieron mejores propiedades a la película interfacial formada con respecto a la espumabilidad. Lo que se observó al analizar los valores de E_d y E_v (punto 4.2). Ello explica la correlación positiva hallada de v_o y V_{LEmax} con H_o y el distinto comportamiento interfacial

mostrado por 11S con y sin tratamiento ácido a pesar de presentar la misma hidrofobicidad promedio.

La diferencia principal entre 7Sn, 7St-8 y 7St-2,5 con respecto a la tensión superficial radicó en su velocidad de disminución de la tensión superficial debida a la adsorción en la interfase, en el caso de 7St-8 también se detectaron diferencias en el reordenamiento molecular en la interfase.

Al no existir diferencia entre el H_0 de 7Sn y 7St se cree que las diferentes conformaciones adoptadas por esta proteína facilitarían o dificultarían la adsorción a la interfase y reordenamiento en la misma, y a esto se podría deber la diferencia detectada en k_a y k_r . Esto se vería a su vez reflejado en los valores de $V_{LEmáx}$, pero no en v_0 .

4.2.2. Estabilidad de espumas

Para evaluar la estabilidad de las espumas formadas se utilizó el modelo de segundo orden con dos términos desarrollado por Panizzolo (2012):

$$V(t) = \frac{V_g^2 k_g t}{(V_g k_g t + 1)} + \frac{V_d^2 k_d t}{(V_d k_d t + 1)} \quad (\text{Ecuación 2.18})$$

donde:

k_g : es la constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio

k_d : es la constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción.

V_g y V_d : son los parámetros de amplitud correspondiente al proceso de drenado gravitatorio y al proceso de difusión de gas o desproporción.

En la Figura 4.7 se representa el volumen de líquido drenado de una espuma elaborada con 11St-2,5 en función del tiempo de los dos procesos de desestabilización contemplados en la ecuación 2.18, como así también el volumen de líquido drenado correspondiente al proceso total de desestabilización de la espuma. Se observa claramente el predominio del proceso de drenado gravitatorio frente al de desproporción.

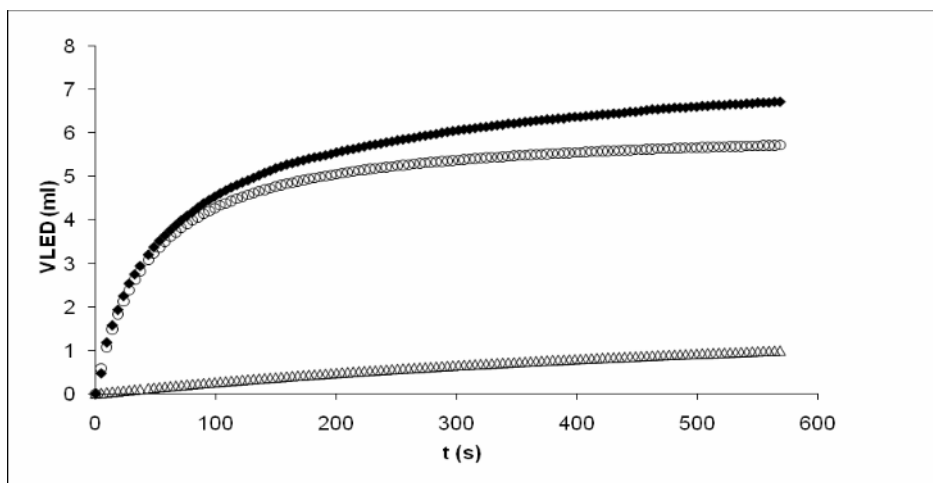


Figura 4.7 Volumen de líquido drenado de una espuma elaborada con 11St en función del tiempo del proceso total de desestabilización (◆), del proceso de desestabilización por drenado gravitatorio (◂) y del proceso de desestabilización por desproporción (▲).

Tabla 4.4 Parámetros de estabilidad de las espumas correspondientes a las muestras ensayadas.

	$k_g \times 10^3 \text{ (ml}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	$k_d \times 10^4 \text{ (ml}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$
APSn-8,0	13±1 c	13±5 c
APSt-8,0	3,3±0,5 a	8±3 b, c
APSt-2,5	3,4±0,4 a	5±1 a, b
11Sn-8,0	17±3 d	3±1 a, b
11St-8,0	3,3±0,4 a	4±2 a, b
11St-2,5	3,5±0,4 a	5,3±0,8 a, b
7Sn-8,0	5,6±0,4 b	1±2 a
7St-8,0	2,7±0,4 a	9±3 b, c
7St-2,5	3,0±0,1 a	12±8 c

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Tanto en las espumas obtenidas con las proteínas tratadas a pH ácido como con las nativas los valores de k_g (drenado gravitatorio) fueron mayores en un orden de magnitud respecto a k_d (desproporción de Ostwald) (Tabla 4.4). Esto concuerda con lo informado por Yu y Damodaran (1991) quienes argumentaron que la magnitud del decaimiento de la espuma por difusión de gas entre burbujas es significativo solamente cuando se está por debajo de un espesor crítico de la lamela, por lo que al inicio del proceso predomina el drenado gravitacional y en la etapas finales comienza a tener incidencia el proceso de drenado de líquido debido a la desproporción de Ostwald.

En general se observó una mayor estabilidad de las espumas formuladas con el aislado y las fracciones tratadas a pH ácido. Las espumas más inestables, debido a la desproporción y el drenado, fueron aquellas preparadas con 11S nativa a pH 8,0.

A pH 8,0 las espumas más estables se obtuvieron con el aislado y las fracciones tratadas a pH ácido, no existiendo diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre las constantes de estabilidad (Tabla 4.4).

Comparando las muestras nativas a pH 8,0, tratadas a pH ácido y luego llevadas a pH 8,0 y las tratadas a pH 2,5 se observa que las espumas formuladas con APS y 11S mejoran su estabilidad luego del tratamiento ácido no existiendo diferencias significativas entre las espumas de las muestras tratadas a pH ácido y neutralizadas a pH 8,0 y las de pH 2,5. En tanto que, las espumas formuladas con 7S mejoraron su estabilidad con el tratamiento ácido existiendo diferencias significativas en los valores de k_g entre las espumas obtenidas con las muestras tratadas a pH ácido y neutralizadas a pH 8,0 y las de pH 2,5.

La fracción que más afecta la formación y estabilidad de espumas obtenidas con el aislado proteico de soja es la 11S, por encontrarse en mayor proporción y ser la fracción que mejora más la estabilidad de la espuma frente al drenado y la espumabilidad luego del tratamiento ácido.

En diversas publicaciones y a través del tiempo varios autores (Graham y Phillips, 1976; Phillips, 1981; Kinsella, 1981; Cheftel et al., 1985; Damodaran, 1996, 1997 y Hill, 1998) han establecido que, generalmente, las proteínas que espuman muy bien no necesariamente son capaces de impartir estabilidad a la espuma, mientras que las proteínas que espuman pobremente pueden llegar a tener características moleculares que imparten estabilidad. La capacidad espumante y la estabilidad están afectadas por dos conjuntos distintos de propiedades moleculares, a menudo antagónicas: mientras la capacidad espumante se ve afectada por la velocidad de adsorción, la flexibilidad y la hidrofobicidad, la estabilidad depende fundamentalmente de las propiedades reológicas de la película proteica interfacial. Las propiedades reológicas de las películas dependen de la hidratación, el grosor, la concentración de proteína y las interacciones intermoleculares favorables. Las proteínas que solo se despliegan parcialmente y retienen cierto grado de estructura plegada suelen formar películas más densas y más gruesas y espumas más estables que aquellas que se despliegan por completo en la interfase aire-agua. La flexibilidad de la cadena de polipéptidos parece ser esencial para la espumabilidad e iría en detrimento de la estabilidad de la espuma. (Panizzolo, 2005)

Los resultados obtenidos no estarían en total consonancia con el planteamiento anterior en lo que concierne a la estabilidad pues las proteínas tratadas a pH ácido espumaron mucho mejor que las nativas y como ya se vio, también le impartieron estabilidad a las espumas formadas. Trabajos como los de Sorgentini et al. (1995), Wagner et al. (1996) y Panizzolo (2005) ya han señalado que aislados de proteínas de soja sometidos a tratamientos de desnaturalización térmica y a pH ácido, forman espumas más estables que los correspondientes a aislados sin tratar. A su vez esos aislados desnaturalizados presentaron mejores características de espumabilidad. Este comportamiento también podría atribuirse al hecho que se trata de una mezcla de proteínas en el caso de APS algunas de las cuales le pueden impartir buenas propiedades de formación de espuma y otras buenas propiedades de estabilización. Yu y Damodaran (1991b) informaron que la glicinina presentó una mayor capacidad de espumado y a su vez mayor estabilidad de las espumas que la β -conglucina. Sin embargo en este trabajo ocurrió lo contrario, en su estado nativo 7S mostró mejor capacidad y estabilidad espumante que 11S. Esto es debido probablemente a que a la fuerza iónica de trabajo (0,28) a pH cercano a 8 coexisten las formas 7S y 10S de la β -conglucina, predominando la forma 7S (Thanh y Shibasaki, 1979) (Figura 4.8). La formas 7S y 10S de la β -conglucina son moléculas más pequeñas (PM: 150-200 kDa) que la glicinina (PM: 320-350 kDa) y no tienen uniones S-S que le den rigidez estructural. También al ser la β -conglucina una proteína glicosilada se favorece la hidratación de la película. La glicinina en su estado nativo (11S) presenta una conformación globular compacta y baja flexibilidad, situación que se modifica con la disociación en subunidades AB (3S), que es la forma de glicinina presente en APSt. No obstante ello las espumas elaboradas con APSt fueron más estables. Si tenemos en cuenta los resultados de las tablas 4.3 y 4.4, ambas proteínas 11S y 7S mejoran tanto la capacidad como la estabilidad espumante cuando son tratadas a pH ácido. Por ello se considera que en este caso no es pertinente atribuir la mejora en las propiedades de formación y estabilización de las espumas de los APSt a la contribución positiva de distintas proteínas en cada una de esas etapas.

Los mecanismos responsables de la desestabilización de una espuma según lo indican Halling (1981), Walstra (1996b) y Wagner (2000) serían el drenado de líquido por efecto de la gravedad y por efecto de la ley de Laplace, la desproporción de Ostwald y el colapso de las burbujas por ruptura de la lamela. Estos mecanismos también ocurren durante la formación de la espuma (Walstra, 1996b y Salager et al, 2003) por

consiguiente para que haya una buena formación de espuma el tensoactivo, en nuestro caso las proteínas, deben ser capaces de contrarrestar estos mecanismos de desestabilización. Por lo tanto es lógico pensar que aquellas proteínas que proporcionen a las soluciones buenas características de espumabilidad tengan cualidades que les permitan contrarrestar los mecanismos de desestabilización ya señalados que conducen a un mayor tamaño de burbuja y menor incorporación de líquido y por consiguiente también podrán contrarrestarlos una vez que esté formada la espuma y por tanto influir favorablemente en la estabilidad de la misma (Panizzolo, 2005).

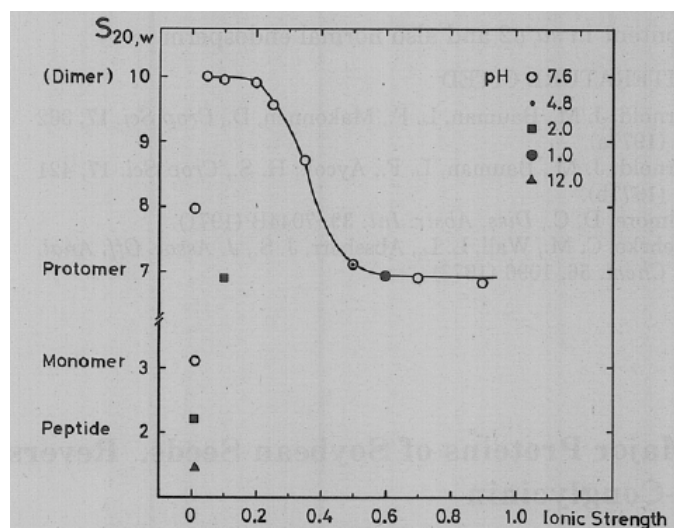


Figura 4.8 Conformación de β -conglicina: coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}^{0.6\%}$) de la proteína a pH 7.6 en función de la fuerza iónica (línea continua) y disociación en protómero, monómeros o péptidos a pH ácidos o alcalinos. Tomado de Thanh y Shibasaki, 1979.

Por otra parte varios autores (Damodaran y Song (1988); Elizalde et al. (1991); Damodaran (1990, 1996)) hacen énfasis en las características que le deben aportar las proteínas a la película interfacial para aumentar la estabilidad. Damodaran y Song (1988) indicaron que para que las proteínas aporten estabilidad a la espuma formada deben tener la capacidad, una vez situadas y orientadas en la interfase, de interactuar con las moléculas vecinas y formar una película viscoelástica fuerte, que soporte los movimientos mecánicos y térmicos. Elizalde et al. (1991) señalan que la excelente habilidad de algunas proteínas para formar espumas estables refleja una combinación de diferentes propiedades. Estas incluyen la capacidad para ligar agua y las propiedades reológicas de la película de proteína, la viscosidad de la fase acuosa y especialmente la

fuerza del gel de la película de proteína adsorbida. Damodaran (1990, 1996) indica que la resistencia mecánica de una película proteica interfacial depende de las interacciones cohesivas intermoleculares, la proteína en la película interfacial alcanza una concentración del 20-25% (p/v) y se encuentra formando una película cohesiva y viscoelástica que tiene características similares a la de un gel. La formación de una red proteica con características de gel es el resultado de un equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-agua. Prácticamente todos los estudios realizados señalan la necesidad de una desnaturalización y desdoblamiento de la proteína, como pasos previos a la interacción ordenada proteína-proteína. Cuanto más ordenada sea la interacción se favorecerá la formación de una estructura más homogénea, muy elástica y estable frente a la pérdida de agua. Una estructura así opondría resistencia al proceso de drenado gravitacional y por capilaridad (efecto del borde de Plateau) que es el que tendría una mayor preponderancia en la fase inicial del mecanismo de desestabilización de las espumas.

Así que las proteínas de APSt y 11St tendrían a priori, al presentar una conformación desplegada en la interfase, buenas cualidades para dotar a la película proteica de características de gel y por tanto una mayor estabilidad a la espuma. Según van Vliet et al. (2002) en las condiciones donde la glicinina está en la forma 3S al adsorberse en la interfase ocurre una formación rápida de una película de proteína rígida que puede ser considerada como una delgada capa de gel. Es probable que las proteínas de APSn y 11Sn no experimenten un gran desdoblamiento en la interfase y por consiguiente no puedan conferir a la película interfacial una estructura tipo gel con las características de la formada por las proteínas de APSt y 11St. Aunque las formas 3S y 11S de la glicinina pueden formar una red en la interfase, la correspondiente a la forma 11S es menos fuerte debido a su estructura más compacta (Martin et al., 2002). De ahí que las espumas preparadas con APSn y 11Sn hayan retenido menor cantidad de agua en la lamela, fenómeno que se evidencia por el mayor valor de k_g que presentaron.

La conformación adoptada por 7St parece favorecer más la formación de un gel que 7Sn ya que presenta un k_g menor. Además β -conglucina es una proteína glicosilada lo cual favorece la retención de líquido en la película, lo que podría explicar la mayor la estabilidad en estado nativo comparada con 11S.

La mejora de la estabilidad con el tratamiento ácido se ve reflejada en los valores de E_d y E_v , ya que los mismos aumentan con el tratamiento ácido como se vio en el punto 4.2 indicando que se producen películas más resistentes.

El tamaño de burbuja, como ya fue discutido, es uno de los parámetros que influye en la cantidad de líquido drenado, cuanto mayor es el radio de la burbuja menor es el drenado de líquido. Las espumas elaboradas con proteínas tratadas a pH ácido a pesar de presentar un menor tamaño de burbuja presentaron menor velocidad de drenado lo que evidencia que las características y desempeño de esas proteínas en la lamela y en la película interfacial son tales que permitieron superar la desventaja de estar en una situación donde las fuerzas impulsoras para el drenado son mayores, por lo que este hecho acrecienta la valorización de su capacidad estabilizadora con respecto a las proteínas nativas.

Las espumas de APSn presentaron una menor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald como lo permiten deducir el valor de k_d , que resultó ser un orden de magnitud mayor que los correspondientes a las espumas de APSt (Tabla 4.4). La desproporción puede ser inhibida o retardada por la presencia de una película interfacial gruesa que resista el pasaje de gas (Salager et al., 2003), lo cual concuerda con el aumento en los valores de E_v y E_d (Tabla 4.2), por lo que las espumas de APSt presentan mayor resistencia a la desproporción.

Las espumas de 7Sn presentaron una mayor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald como se deduce del valor de k_d , que resultó ser menor que los correspondientes a las espumas de 7St-8 y 7St-2,5 (Tabla 4.4). Esto está en contradicción con el aumento observado para E_d y E_v (tabla 4.2), por lo que la película debería resistir el pasaje de gas, y 7St tendría que presentar mayor resistencia a la desproporción. Sin embargo la desproporción está condicionada por el tamaño de la burbuja y como en las espumas preparadas con 7Sn estas fueron de mayor tamaño este factor sería el que finalmente tuvo mayor peso en la determinación de la resistencia a la desproporción.

En cambio las espumas formadas con 11Sn y 11St no presentaron diferencias significativas entre los valores de k_d ($\alpha \leq 0,05$) (Tabla 4.4). En este caso los efectos de la presencia de una película interfacial resistente el pasaje de gas, dado por el aumento de los valores de E_d y E_v (Tabla 4.2) y el tamaño de la burbuja se habrían contrarrestado.

Tabla 4.5 Contribución de los mecanismos de drenado gravitacional y desproporción de Ostwald al total de volumen de líquido drenado. Siendo V_{LEmax} : volumen máximo de líquido incorporado a la espuma, V_g : volumen máximo de líquido debido al proceso de drenado gravitacional, V_d : volumen máximo de líquido drenado por la difusión de gas, V_g (%) y V_d (%): proporción del líquido máximo incorporado a la espuma correspondiente al drenado gravitacional y por desproporción respectivamente.

Muestra	V_{LEmax} (ml)	V_{gmax} (ml)	V_{dmax} (ml)	V_g (%)	V_d (%)
APSn-8	3,5±0,3 a	3,1±0,1 a	0,4±0,2 a	88±5 d	12±5 a
APSt-8	7,0±0,3 d	6,4±0,8 c	0,5±0,5 a	92±8 d	8±8 a
APSt-2,5	8,4±0,2 e	6,7±0,4 c	1,7±0,2 b, c	79±3 c	21±3 b
11Sn-8	4,3±0,3 b	2,6±0,3 a	1,7±0,4 b	63±5 a	37±5 d
11St-8	8,1±0,4 e	5,7±0,2 c	2,3±0,1 c, d	71,1±0,3 b, c	28,9±0,3 b, c
11St-2,5	8,61±0,01 e	6,3±0,3 c	2,3±0,3 d	73±3 b, c	27±3 b, c
7Sn-8	6,3±0,4 c	4,9±0,6 b	2±1 b, c	70±6 a, b	30±6 c, d
7St-8	8,3±0,3 e	6,6±0,1 c	1,8±0,2 b	79±2 c	21±2 b
7St-2,5	8,4±0,1 e	6,8±0,1 c	1,58±0,02 b, c	79±2 c	21±2 b

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$).

Además del estudio de las constantes de velocidad es interesante ver en que medida contribuyen los mecanismos de drenado gravitacional y desproporción de Ostwald al total de volumen de líquido drenado. Para ello se determinaron las proporciones de volumen de líquido drenado mediante escurrido gravitatorio (V_g) y de volumen drenado debido a la desproporción (V_d) de la siguiente forma:

$$V_g(\%) = \frac{V_g}{V_{LEmax}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

$$V_d(\%) = \frac{V_d}{V_{LEmax}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

En todos los casos ensayados la proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior (nunca menor de 60%) al volumen drenado debido a la desproporción. Wagner (2000) ha señalado que en las espumas recién formadas predominan los mecanismos de flotación y drenado, en tanto que en las espumas poliédricas predominan la desproporción y el colapso. La fuerza impulsora de los mecanismos de drenado y desproporción es la diferencia de presión (ΔP) debida a la ley de Laplace, en tanto que el tamaño de burbuja es determinante del valor de ΔP , la cual aumenta con la disminución del tamaño de burbuja. La cantidad de líquido drenado por escurrido gravitatorio y por desproporción no depende solamente del tamaño de burbuja sino también de la resistencia de la película de proteína en la interfase. Entonces

es posible que el tamaño de burbuja logrado en los ensayos realizados y las características de la película formada sean tales que de la combinación de ambos resulta el predominio del drenado sobre la desproporción de Ostwald.

Por otra parte el método de generación de espuma también influye sobre las propiedades espumantes de las proteínas. Si el aire se introduce por burbujeo, suele producirse una espuma “húmeda” con un tamaño de burbuja relativamente grande. El batido a una velocidad moderada suele producir una espuma con burbujas de tamaño pequeño, debido a la acción cizallante que desnaturaliza parcialmente a la proteína antes que se adsorba en la interfase (Damodaran, 1996). De ahí que sea posible que en las espumas obtenidas por batido, donde el tamaño de burbuja es menor que el obtenido por burbujeo, la proporción de líquido drenado por desproporción sea mayor que el encontrado en el presente trabajo y hasta llegue a predominar.

Es importante indicar que los valores de V_g y V_d , a diferencia de lo que ocurre con k_g y k_d , tienen una dependencia mutua puesto que son valores proporcionales.

En la tabla 4.5 se presentan los valores de V_g y V_d . Para el cálculo de V_g y V_d , se hizo la suposición de que todo el líquido drenó (tiempo infinito). Entonces las espumas que incorporaron más líquido drenan más líquido es por eso que el V_g de las proteínas nativas tiene un valor menor que el correspondiente a las tratadas a pH ácido. En cuanto a las proporciones de contribución de cada mecanismo ($\%V_g$ y $\%V_d$) para 11S y 7S, las muestras tratadas a pH ácido tienen una mayor proporción de drenado gravitacional y menor desproporción de Ostwald que las nativas, por tener una película más resistente lo que se ve reflejado en sus valores de E_v y E_d como ya fue discutido en el punto 4.2.

Para APSt-2,5 el aumento del componente elástico (E_d) con respecto al correspondiente a APSn y APSt-8, no se ve reflejado en k_g y k_d , pero sí en los valores de V_g y V_d . APSt-8,0 cuenta con un menor valor de V_d que APSt-2,5, esto es debido a que APSt-8,0 presenta una mayor viscosidad dilatacional. La mayor viscosidad dilatacional evita la ruptura de la película. El mayor valor de la componente viscosa del APSt-8,0 explica la menor proporción de drenado por desproporción de Ostwald (V_d) de las espumas formadas con esta proteína.

4.3 Resumen y conclusiones parciales

Este Capítulo se ha dedicado al estudio de las propiedades espumantes de APS, 11S y 7S nativas y tratadas a pH ácido.

Las propiedades de las espumas encontradas correlacionan con los cambios fisicoquímicos-estructurales discutidos en el Capítulo 3. La desnaturalización proteica total en el caso de 11S y parcial en el caso de 7S provocada al someter a éstas proteínas al tratamiento ácido afectan las propiedades de las proteínas en la interfase aire-agua influyendo directamente en la formación y en la estabilidad de las espumas.

Resumiendo las conclusiones parciales que se extraen del estudio son:

- ✓ La principal diferencia entre las proteínas nativas y tratadas a pH ácido, con respecto a la cinética de modificación de la tensión superficial, no radicó en el valor de equilibrio de la tensión superficial sino en la velocidad con que ocurrió el cambio de la misma. Los valores de velocidad para el proceso de reordenamiento (k_r) no presentaron diferencias significativas entre las proteínas nativas y tratadas a pH ácido para APS y 11S, en cambio sí se observaron diferencias para 7S probablemente debido a los diferentes estados conformacionales observados por DSC y a su menor masa molecular.
- ✓ Por tener APSt-2,5 un mayor módulo dilatacional (E) que APSn y APSt-8,0, produjo una película más resistente. El módulo dilatacional viscoso (E_v) de APSt fue mayor que para APSn, por lo que las películas formadas por APSt-8,0 tuvieron más resistencia ya que la viscosidad superficial disminuyó las distorsiones mecánicas que de otro modo hubieran podido causar una ruptura de las lamelas de las espumas. Para APSt-2,5 se observó un aumento de casi el doble de la componente elástica con respecto a las correspondientes a APSn y APSt-8,0. El mismo comportamiento se observó para la fracción 11S. La proteína 7S presentó un comportamiento similar en todas las condiciones a 11S en cuanto a lo que E y E_d se refiere. Este comportamiento podría ser adjudicado, a la contaminación de la fracción 7S con proteína 11S.
- ✓ Se observó por los parámetros V_{LEmax} y v_o que la espumabilidad del aislado y de las fracciones mejoró con el tratamiento ácido.
- ✓ En general se observó una mayor estabilidad al drenado gravitacional (menor k_g) de aislado y las fracciones tratadas a pH ácido.

- ✓ En cuanto a la desproporción de Ostwald, las espumas de APSn presentaron una menor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald que las espumas de APSt probablemente por la formación de una película interfacial gruesa que resistió el pasaje de gas, lo cual concuerda con el aumento en los valores de E_v y E_d . Las espumas formuladas con 7Sn presentaron una mayor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald que las correspondientes a 7St-8 y 7St-2,5 probablemente debido que en este caso primó el hecho de que las espumas preparadas con 7Sn presentaron burbujas de mayor tamaño. Las espumas formadas con 11Sn y 11St no presentaron diferencias significativas entre los valores de k_d ($\alpha \leq 0,05$).

- ✓ En todos los casos ensayados la proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior (nunca menor de 60%) al volumen drenado debido a la desproporción.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades emulsionantes

5.- PROPIEDADES EMULSIONANTES

5.1 Determinación de tensión interfacial (aceite/agua)

Se evaluaron las propiedades tensioactivas en la interfase agua/aceite de las muestras nativas y tratadas a pH ácido mediante tensiometría de gota, según se ha descrito en el Capítulo 2 (Sección 2.7.1.3).

Para seguir el proceso de modificación de la tensión interfacial con el tiempo se utilizó el modelo descrito en la determinación de la tensión superficial (aire-agua) (sección 4.1), obteniéndose las constantes de velocidad correspondientes a los procesos de adsorción (k_a) y reordenamiento (k_r) de las proteínas en la interfase aceite-agua, y la tensión interfacial de equilibrio (γ_e)

Tabla 5.1 Constante de velocidad de adsorción (k_a), constante de velocidad de reordenamiento (k_r), y tensión interfacial de equilibrio (γ_e) en la interfase de proteínas para las distintas muestras.

	$k_a \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_r \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\gamma_e \text{ (mN/m)}$
APSn-7,0	8,3±0,7 a, b	6,3±1,6 a	8,5±0,5 b
APSt-7,0	7,8±0,5 a, b	5,7±0,8 a	8,4±0,3 b
APSt-2,5	12,3±5,9 c	6,1±0,2 a	10,4±0,6 c
11Sn-7,0	6,4±0,3 a	6,5±0,9 a	6,6±0,6 a
11St-7,0	10,1±1,7 b, c	6,2±0,3 a	8,30±0,03 b
11St-2,5	11,9±0,3 c	6,4±0,8 a	12,3±0,5 d
7Sn-7,0	10,3±1,6 b, c	6,1±0,9 a	6,3±0,4 a
7St-7,0	6,4±0,4 a	6,2±0,8 a	8,5±0,5 b
7St-2,5	10,2±0,5 b, c	6,7±0,7 a	10,2±0,6 c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Como ya se mencionó en la sección 4.1 del capítulo 4, la velocidad de disminución de la tensión superficial debido a las proteínas puede ser evaluada a través de tres etapas consecutivas: 1) la difusión de las moléculas proteicas hacia la interfase, 2) la adsorción a la interfase y 3) el desplegamiento de las moléculas ya adsorbidas.

Los resultados obtenidos muestran, como era de esperar, que los valores de k_a son mayores que los de k_r , pues el proceso de desplegamiento o reordenamiento de la proteína es más lento que el proceso de adsorción a la superficie interfacial. De acuerdo con esto y considerando que la adsorción, el desplegamiento y el reordenamiento de las proteínas en la interfase son la principal causa de la disminución de la tensión superficial, es lógico esperar que estos procesos estén determinando su cinética.

Además considerando que para que disminuya la tensión superficial por reordenamiento de la proteína es necesario que primero ocurra su adsorción, es razonable atribuir k_a , que predomina en el período inicial, al proceso de adsorción de las proteínas en la interfase aceite-agua.

Al principio el descenso de la tensión superficial se debería al proceso de adsorción de las proteínas, efecto que prevalecería al reordenamiento de las mismas en la interfase. A medida que una mayor cantidad de proteína adsorbida cambia de estado conformacional la concentración interfacial de moléculas en su conformación inicial no reordenada disminuye y por tanto su efecto sobre la disminución de la tensión interfacial se hace cada vez menos importante hasta llegar a ser nulo. En ese proceso la concentración interfacial de las proteínas en un estado conformacional reordenado se hace preponderante y entonces predomina su contribución a la disminución de la tensión interfacial (Panizzolo, 2005).

Para 11S se encontró un aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) de la constante de velocidad correspondiente al proceso de adsorción (k_a) con el tratamiento a pH ácido, no existiendo diferencias entre 11St-7,0 y 11St-2,5. Este aumento del valor de k_a indicaría que el proceso de adsorción de las muestras tratadas a pH ácido fue más rápido que el correspondiente a las muestras nativas. Este aumento de la tasa de adsorción estaría relacionado con el aumento de la hidrofobicidad superficial por efecto del tratamiento a pH ácido, discutido en el Capítulo 3, ya que al tener más zonas hidrofóbicas se facilita la adsorción en la interfase aceite-agua. Además la glicinina a pH ácido se encuentra preponderantemente bajo la forma 3S, por lo que tiene una adsorción más rápida en la interfase. De acuerdo a Martin et al. (2002) la forma 3S se despliega y reordena más fácil y rápidamente en la interfase debido a su mayor flexibilidad atribuida a una mayor repulsión electrostática en el interior de la molécula. Además la forma 3S, debido al tratamiento a pH ácido, sufrió una reorganización a nivel de su estructura secundaria y terciaria (Lakemond et al, 2000a). Como la desnaturalización de la glicinina ocasionada por el tratamiento ácido, según los resultados obtenidos en nuestro trabajo, es irreversible, la misma debió permanecer mayoritariamente bajo la forma 3S desnaturalizada, tanto a pH 2,5 como luego de la neutralización a 7,0.

Aunque las proteínas contienen grupos hidrófilos e hidrófobos en su estructura primaria, no tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica claramente definidas como en el caso de la lecitina o de los monoacilglicerol. Estos grupos están

aleatoriamente extendidos por toda la estructura primaria de las proteínas y en la conformación plegada terciaria algunos de ellos existen como parches segregados en la superficie de la molécula. Por lo tanto, cuando una proteína se adsorbe a la interfase aceite-agua, sólo una fracción de los residuos hidrofóbicos están posicionados en la interfase de cara a la fase oleosa y la mayoría de la molécula de proteína se suspende en el seno de la fase acuosa. Debido a las restricciones conformacionales a orientar adecuadamente los grupos hidrófilos e hidrófobos en la interfase y el inadecuado empaquetamiento de las moléculas en la interfase, las proteínas no son capaces de reducir en gran medida la tensión interfacial. Incluso en una monocapa saturada de proteína en la interfase, una fracción grande de agua en la región interfacial se mantiene en un estado de alta energía. La tasa de adsorción de proteínas a la interfase aceite-agua está muy afectada por las propiedades fisicoquímicas de las proteínas (Damoradan, 2005). La propiedad más importante que afecta a la actividad superficial de estas moléculas es su flexibilidad molecular, es decir, la capacidad innata de las proteínas de experimentar un cambio de conformación rápido cuando se transfiere desde un entorno a otro. Las investigaciones sobre varias proteínas han demostrado que la actividad superficial dinámica de las proteínas, es decir, el cambio instantáneo de la presión superficial por miligramo de proteína, durante la adsorción de la fase continua a la interfase aire-agua, está positivamente y linealmente correlacionada con la compresibilidad adiabática de las mismas (Razumovski y Damodaran, 1999). La flexibilidad molecular es una manifestación de la suma de todas las interacciones atractivas y repulsivas, así como las fuerzas estéricas dentro de una molécula de proteína, y representa la susceptibilidad de la conformación de una proteína a la alteración del entorno. El rápido cambio de la conformación en la interfase es esencial para que la proteína reoriente sus residuos hidrófobos e hidrófilos hacia las fases oleosa y acuosa y también para maximizar la exposición y la partición de estos residuos hacia las dos fases. Una proteína de alta rigidez, como 11Sn, no puede disminuir la tensión interfacial significativamente ya que para establecer interacciones proteína-proteína, se requiere que la misma se despliegue (Erickson et al., 2003; Rao y Damodaran, 2000; Damoradan, 2005). El tratamiento ácido provoca la desnaturalización de esta proteína lo que se traduce en un aumento de su flexibilidad y por ende de una mayor tasa de adsorción de 11S.

Para 7S no se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre las constantes de velocidad para el proceso de adsorción (k_a) de 7Sn y 7St-2,5, siendo la k_a de 7St-7,0

menor al de éstas. La disminución del valor de k_a , a pH 7,0, sugiere que el proceso de adsorción de las muestras tratadas a pH ácido y posteriormente neutralizadas fue más lento que el correspondiente a las muestras nativas. Esta disminución de la adsorción estaría relacionada con los cambios estructurales sufridos por la proteína por efecto del tratamiento a pH ácido y posterior neutralización, discutido en el capítulo 3. En el caso de 7St la desnaturalización alcanzada no fue completa recuperando parte de su conformación nativa o adoptando otra conformación diferente cuando se neutralizó a pH 7,0 luego del tratamiento ácido.

Para APS no se observaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre los valores de k_a correspondientes a APSn y APSt-7,0 detectándose un aumento de la velocidad de adsorción para APSt-2,5. Esto probablemente se deba al hecho que en el aislado se encuentran presentes tanto la glicinina como la β -conglucina contrarrestándose los efectos observados para estas fracciones en forma aislada. Este comportamiento sería lógico ya que según Damoradan (2005), los aislados proteicos, como el de soja, que contienen al menos dos fracciones de proteínas, a saber, las leguminas y vicilinas, durante la emulsificación, compiten entre sí por la adsorción a la interfase. La composición de la película de proteína formada en la interfase dependerá de las actividades superficiales relativas de los diferentes componentes proteicos presentes en la mezcla.

La modificación observada en la velocidad de adsorción de 7S y 11S con el tratamiento a pH ácido llevado a cabo en este estudio estaría relacionado con:

- el aumento en la hidrofobicidad superficial detectada en el caso de 11S, dado que la cantidad de zonas hidrofóbicas en la superficie de la molécula de la proteína está directamente relacionada con la fase de penetración durante la adsorción
- que la glicinina se encuentra preponderantemente bajo la forma 3S, por lo que tuvo una adsorción más rápida en la interfase.
- la formación de estructuras diferentes a la nativa, en el caso de 7S, en las distintas condiciones de tratamiento, ya indicadas en la sección 3.2.2, impedirían en menor medida la adsorción a la interfase de 7Sn-7,0 y 7St-2,5 que de 7St-7,0.

Para todas las muestras y condiciones ensayadas no se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en la constante de reordenamiento (k_r) en la interfase aceite-agua a diferencia de lo encontrado para la interfase aire-agua (Sección 4.1). Según Bos y van Vliet (2001), en la interfase aceite-agua se requiere un menor número de interacciones moleculares entre las moléculas de proteína adsorbidas que en el caso de la interfase

aire-agua. Esto implica que el desplegamiento, y de este modo la flexibilidad interna de la proteína es menos importante para el comportamiento de dilatación en la interfase aceite-agua que en la aire-agua. Por lo cual, es lógico no encontrar diferencias significativas en los valores de k_r .

El valor de tensión superficial en equilibrio (γ_e) del sistema aceite-agua, sin agregado de proteínas, fue 26 mN/m a temperatura ambiente y disminuyó debido a la presencia de las macromoléculas. La tensión interfacial de equilibrio de las muestras tratadas a pH ácido fue mayor en todos los casos a la tensión de equilibrio de las muestras nativas, hecho aparentemente contradictorio (Tabla 5.1). Durante la formación de emulsiones y espumas ocurre un enorme incremento en el área interfacial a una cierta velocidad. La cifra importante es por lo tanto, la tensión superficial dinámica (γ_d) a una velocidad relevante de expansión y/o compresión. Pequeños cambios locales en el área interfacial (fluctuaciones) están también implicadas en la estabilización de emulsiones y espumas, debido a procesos dinámicos tales como drenaje, coalescencia, cremado, desproporción, o simplemente debido al movimiento térmico. Así, la reacción de la tensión interfacial a una perturbación, sería más importante que la tensión interfacial de equilibrio (γ_e). (Bos y van Vliet, 2001). Por lo que, los valores de γ_e no aportarían información relevante. Las proteínas son superficialmente activas, resultando en una disminución de la tensión interfacial de las interfases fluidas. Dependiendo del tipo de aceite usado, la tensión interfacial varía entre 8 y 22 mN m⁻¹ (Bos y van Vliet, 2001) valores entre los que se encuentran los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 5.1).

5.2 Comportamiento interfacial dinámico

Las moléculas con actividad superficial tienden a adsorberse en las interfases y decrecer la tensión interfacial. La composición y estructura de estas capas adsorbidas determinan el comportamiento de las emulsiones. En particular, estas películas interfaciales también podrían ser capaces de disminuir las perturbaciones externas previniendo su ruptura. Esta capacidad se refleja en la viscoelasticidad dilatacional interfacial de la película (Maldonado-Valderrama et al., 2008).

La tangente del ángulo de desfase presenta un valor comprendido entre 0,02 y 0,12 lo que indica que la película formada en la interfase por las diferentes proteínas nativas y tratadas a pH ácido tiene un comportamiento puramente elástico (Tabla 5.2). El hecho de que E_d sea prácticamente igual a E es debido a las condiciones de

frecuencia utilizadas en el ensayo experimental, el cual en nuestro caso fue de 200mHz. A estas frecuencias de oscilación el comportamiento que se observa en toda la interfase es esencialmente elástico (Benjamins et al., 1996; Freer et al., 2004). Este comportamiento, tal como se discutió en el capítulo anterior de la Tesis, fue encontrado al estudiar el comportamiento de la interfase aire-agua (ver sección 4.2) y también fue hallado por Medrano (2009) para sistemas con β -lactoglobulina glicosilada y sin glicosilar en la interfase aceite-agua.

Tabla 5.2 E, E_d, E_v y tangente del ángulo de desfase para todas las muestras en todas las condiciones.

	E (mN/m)	E_d (mN/m)	E_v (mN/m)	tg φ
APSn-7,0	30,3±1,9 d	30,1±1,8 d	2,6±0,3 c, d	0,090±0,003 d
APSt-7,0	27,6±0,8 c	27,5±0,8 c	3,0±0,5 d, e	0,12±0,02 e
APSt-2,5	45,3±1,1 f	45,2±1,0 f	3,1±0,7 e	0,073±0,013 c
11Sn-7,0	20,3±2,3 a	20,3±2,3 a	1,2±0,1 a	0,063±0,004 b, c
11St-7,0	34,3±1,4 e	34,2±1,4 e	2,3±0,3 b, c	0,073±0,010 c, d
11St-2,5	51,3±1,4 g	51,3±1,5 g	1,2±0,3 a	0,021±0,001 a
7St-7,0	23,8±1,3 b	23,7±1,3 b	1,4±0,3 a	0,065±0,006 b, c
7St-7,0	28,4±1,8 c, d	28,3±1,9 c, d	2,1±0,2 b	0,073±0,004 c, d
7St-2,5	30,0±0,8 d	30,0±0,8 d	1,5±0,4 a	0,047±0,005 b

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$).

En cuanto a los valores obtenidos para el módulo dilatacional, E, y el módulo dilatacional elástico, E_d, se observó la existencia de diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) para APS, siendo éstos valores mayores para APSt-2,5 y menores para APSt-7,0, siendo los correspondientes a APSn-7,0 intermedios, lo que indicaría que en el caso de APSt-2,5 se produce una película mucho más resistente (Tabla 5.2). Los valores del componente dilatacional viscoso no presentaron diferencias significativas entre APSn-7,0, APSt-7,0 y APSt-2,5. Para la fracción 11S, al igual que en caso de la interfase aire-agua (sección 4.1), E y E_d aumentan con el tratamiento ácido. El mayor aumento se observó a pH 2,5 (más del doble del módulo de la proteína nativa). El módulo dilatacional viscoso fue mayor en caso de 11St-7,0 no existiendo diferencias significativas entre los valores presentados por 11Sn-7,0 y 11St-2,5. Esto podría deberse, como ya fue explicado para la interfase aire-agua en la sección 4.1, a que a pH 7,0 la glicinina se encuentra como hexámero y a pH 2,5 como dímero; según el modelo planteado por Martín et al (2002 tanto las formas 3S (dímero) como 11S (hexámero) son capaces de formar una red, siendo la red de 11S menos fuerte. La diferencia en la

fuerza reside en la estructura más compacta de la forma 11S y la ocurrencia de otros tipos de interacciones dentro de las moléculas. La forma 3S es más flexible debido a la alta repulsión electrostática intermolecular. La forma 11S al ser de mayor tamaño favorece la componente viscosa en el caso de 11St-7,0.

7St-7,0 y 7St-2,5 presentaron mayores valores de E y E_d que 7Sn-7,0 por lo que formarían una película más cohesiva. 7St-7,0 presentó un valor de E_v significativamente mayor que 7Sn-7,0 y 7St-2,5 no existiendo diferencias significativas entre estas dos últimas muestras.

Los valores de E y E_d de las muestras tratadas a pH ácido de 7S son menores que los correspondientes a 11S, por lo tanto 11St forma una película interfacial más resistente que 7St.

La configuración de las moléculas de emulgente en una interfase puede tener una influencia importante sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos emulsionados. La estabilidad de una emulsión depende del desplegamiento y la interacción de las moléculas de proteínas en la superficie de la gota. Cuando se despliegan las proteínas globulares, exponiendo aminoácidos reactivos que son capaces de formar interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro con sus vecinos, generan una membrana altamente viscoelástica que es resistente a la coalescencia (Dickinson y Matsumura, 1991; Dickinson, 1992b). Por lo que el tratamiento a pH ácido otorgó una mayor flexibilidad a la proteína, debido al desplegamiento de la molécula ocasionado por la desnaturalización. Este desplegamiento provocaría una mayor interacción entre las proteínas en la interfase generando una película más viscoelástica y resistente a los procesos de desestabilización.

Cómo ya se indicó en el Capítulo 4 (sección 4.2), E_d aumenta conforme aumenta la frecuencia de oscilación mientras que E_v disminuye al aumentar la frecuencia (Figura 5.1). En el presente trabajo se realizó un estudio de las propiedades reológicas con la variación de la frecuencia de oscilación.

La Figura 5.1 presenta el comportamiento típico de las películas proteicas (Rodríguez Patino et al., 1999, 2003). La dependencia de las propiedades dilatación de la superficie con la frecuencia puede estar asociada con el efecto de la velocidad de deformación en la estructura y el fenómeno de relajación en la película formada por la globulina de soja. El comportamiento viscoelástico, prácticamente elástico, observado para las películas de proteínas en el rango de baja frecuencia ($\omega < 100$ mHz o 1 rad/s) puede estar asociado con la lenta organización/reorganización de la estructura de la

película y con la formación/destrucción de multicapas a las más altas concentraciones y tiempos de adsorción (Rodríguez Patino et al., 2003; Rodríguez Patino et al., 1999). A frecuencias más altas ($\omega > 100$ mHz o 1 rad/s), ya que un comportamiento más elástico caracteriza a la película de proteína, el desplegamiento y la reorganización puede contribuir poco al módulo de dilatación viscoso. Por lo tanto, para escalas de tiempo cortas el intercambio de residuos de proteínas en la conformación de bucles en la interfase y la subinterfase durante el ciclo compresión-expansión pueden desempeñar un papel importante (Rodríguez Patino et al., 2003; Rodríguez Patino et al., 1999), independientemente de cual sea la proteína o el pH (Rodríguez Patino et al., 2005).

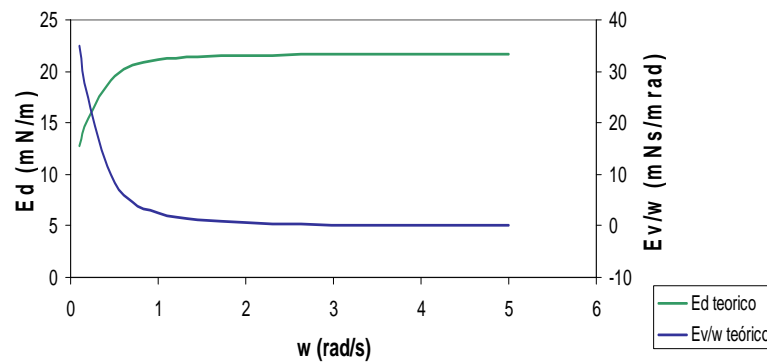


Figura 5.1 Comportamiento típico de una película proteica de los parámetros E_d y E_v con la variación de frecuencia de oscilación.

Saulnier et al. (2001) describieron un modelo que describe la variación de E_d y E_v con la frecuencia de oscilación:

$$E_d = E_e + Ene \left(\frac{w^2 \tau^2}{1 + w^2 \tau^2} \right) \quad \text{Ecuación (5.1)}$$

$$\frac{E_v}{w} = Ene * \tau * \left(\frac{1}{1 + w^2 \tau^2} \right) \quad \text{Ecuación (5.2)}$$

$$\lim_{w \rightarrow 0} E_d(w) = E_e \quad \text{Ecuación (5.3)}$$

$$\lim_{w \rightarrow +\infty} E_d(w) = E_e + Ene \quad \text{Ecuación (5.4)}$$

$$\lim_{w \rightarrow 0} \frac{E_v(w)}{w} = Ene * \tau \quad \text{Ecuación (5.5)}$$

Siendo:

w : frecuencia de las oscilaciones

τ : tiempo de relajación
 E_e : Elasticidad conservativa interfacial
 E_{ne} : Elasticidad disipativa interfacial

Las ecuaciones 5.1 a 5.5 se representan en la Figura 5.2:

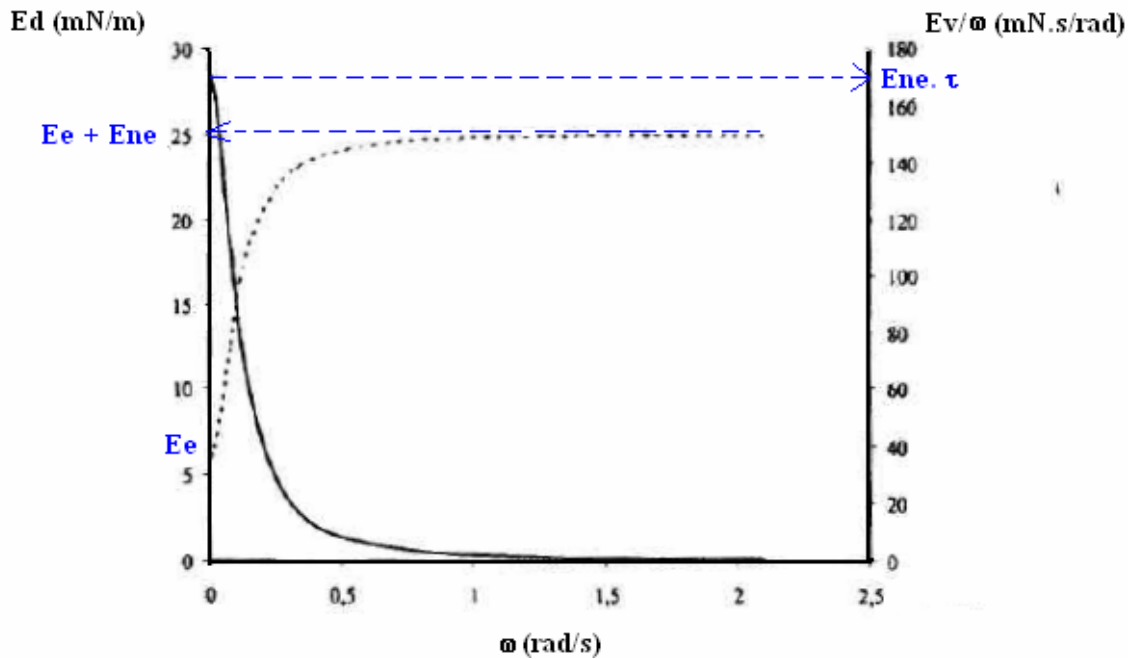


Figura 5.2 Variaciones teóricas de E_d y E_v/ω en función de la frecuencia de oscilación (ω). Adaptado de Saulnier et al. (2001).

Saulnier et al. (2001) trabajaron con monocapas de fosfolípidos considerando a las mismas como un todo interactuando con las dos fases fluidas adyacentes. La cohesión intrínseca de la monocapa debería ser fuertemente dependiente de E_e en relación con las interacciones (tanto hidrofóbicas como hidrofílicas) entre todas las moléculas en la monocapa. De esa manera, E_e describe todas las interacciones laterales entre todas las moléculas de la zona interfacial. Esta constante energética corresponde a una respuesta conservativa elástica de la monocapa inducida por una perturbación reológica. Por otro lado, E_{ne} , caracteriza la disipación de la energía de una perturbación reológica relacionada con interacciones entre las moléculas fosfolípídicas interfaciales y las que se encuentran en el seno de la solución. De esta forma, E_{ne} depende fuertemente del HLB (balance hidrofílico-lipofílico) de los fosfolípidos y del valor de la solubilidad. Finalmente τ representa el tiempo necesario para que la interfase alcance un nuevo estado de equilibrio energético después de la perturbación.

En este trabajo se intentó aplicar este modelo antes descrito a la interfase aceite-agua usando proteínas como tensioactivos y no fosfolípidos como lo hicieron Saulnier et al. (2001). En nuestro caso se observó que los puntos del gráfico (Figura 5.3) correspondientes a las velocidades de oscilación (ω) más bajas (frecuencias más altas) no se ajustaban al modelo de Saulnier et al., en cambio a las velocidades más altas sí lo hacían. Esto puede deberse que a altas velocidades de oscilación no se le da el tiempo suficiente a la proteína para modificar su conformación y se estarían comportando de forma similar a una capa de fosfolípidos.

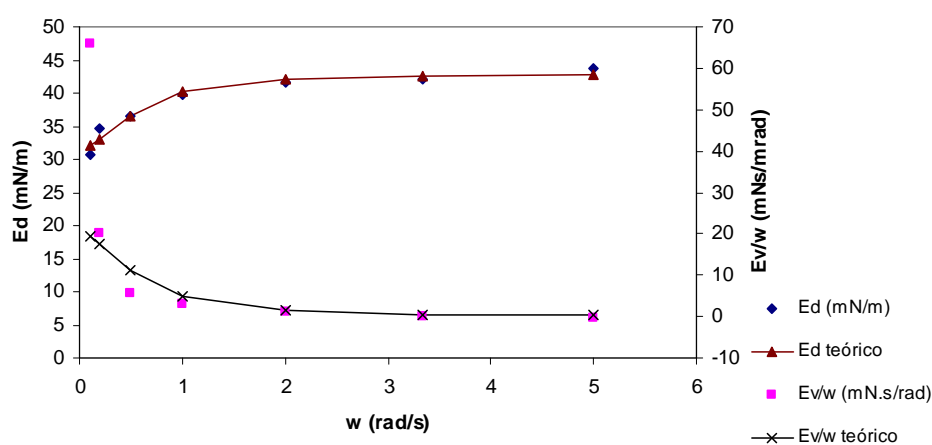


Figura 5.3 Datos experimentales y cálculo según modelo de Saulnier et al. de E_d y E_v/ω .

Los resultados obtenidos de la aplicación de las ecuaciones 5.1 a 5.5 se muestran en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3 E_e , E_{ne} y τ para todas las muestras en todas las condiciones

Muestra	E_e (mN/m)	E_{ne} (mN/m)	τ (s)
APSn-7,0	16,4±1,7 a, b	5,6±0,5 a	2,1±0,8 a, b, c
APSt-7,0	13,6±2,9 a	9,5±2,3 c	3,0±1,2 c
APSt-2,5	29,5±1,2 c	6,3±1,5 a	1,6±0,4 a, b
11Sn-7,0	13,7±0,7 a	6,3±1,3 a	1,4±0,5 a, b
11St-7,0	16,8±1,1 a, b	5,99±0,04 a	2,0±0,4 a, b
11St-2,5	32,04±0,01 c	6,5±1,4 a, b	1,3±0,1 a
7Sn-7,0	19,8±1,2 b	4,83±0,02 a	1,5±0,6 a, b
7St-7,0	31,3±4,4 c	8,5±0,6 b, c	2,4±0,9 b, c
7St-2,5	29,41±0,99 c	6,0±1,0 a	1,5±0,5 a, b

La misma letra en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos siguen la misma tendencia que los obtenidos a una única frecuencia de 200 mHz (sección 5.2). No se observan diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en los tiempos de relajación (τ).

En todos los casos la mejor respuesta elástica (E_e) de la película se encontró para las proteínas tratadas a pH ácido. En el caso de E_{ne} se observó que los mayores valores correspondían a las muestras APSt-7,0 y 7St-7,0, no existiendo diferencias significativas para 11S nativas o tratadas a pH ácido. El parámetro E_{ne} en el caso de los fosfolípidos (Saulnier et al, 2001) está relacionado con las interacciones entre moléculas de fases líquidas adyacentes, en el caso de las proteínas estas interacciones se darían entre las proteínas que se encuentran en la interfase y las que están en el seno de la solución.

5.3 Emulsiones de proteínas de soja

Las propiedades reológicas de las películas de proteínas son muy críticas para la estabilización de la fase dispersa de aceite en condiciones dinámicas de formación de la emulsión. Por ejemplo, a una concentración del 1% la mayoría de las proteínas alimentarias alcanzan la presión superficial de equilibrio muy rápidamente siendo la presión superficial final casi la misma, aproximadamente 15 a 20 mN m⁻¹. Sin embargo, el tamaño de las gotitas de aceite y el área interfacial total de la emulsión creada bajo idénticas condiciones de emulsificación son diferentes para las distintas proteínas. Según Walstra y Roos (1993), el tamaño de la gota de aceite se incrementa en este orden: proteínas de la soja > proteínas de suero > caseinato de sodio > proteínas solubles de trigo > proteínas del plasma sanguíneo. Esta diferencia sería debida principalmente a diferencias en las propiedades viscoelásticas de las películas de proteína formadas en la interfase agua-aceite (Dickinson, 1999) y a la cantidad de proteína adsorbida a la interfase (Γ , mg m⁻²) (Tcholakova et al., 2003).

5.3.1 Formación de emulsiones

Las emulsiones son dispersiones de un líquido en el seno de otro (Walstra y van Vliet, 2010). Las variables más importantes que determinan las propiedades de una emulsión son:

- El tipo de emulsión, es decir, aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o)
- Distribución de tamaño de las gotas. Esta distribución es relevante en la estabilidad física de la emulsión.
- Fracción volumétrica de la fase dispersa (Φ). En la mayoría de los alimentos Φ varía entre 0,01 y 0,4.
- Composición y espesor de la capa superficial alrededor de las gotitas.
- Composición de la fase continua. Esto determina las condiciones del disolvente para el tensioactivo, el pH y la fuerza iónica, y de este modo las interacciones coloidales (Walstra y van Vliet, 2010).

En esta sección se estudiará la propiedad de formación de emulsiones aceite-agua de las proteínas de soja nativas y tratadas en medio a pH ácido mediante medidas de tamaño de partícula, concentración de proteína interfacial, manteniéndose la fracción volumétrica constante e igual a 0,25. Esto se relacionará con parámetros determinados en secciones anteriores como ser la solubilidad, hidrofobicidad superficial, constantes de velocidad de adsorción y reordenamiento en la interfase (k_a y k_r) y resistencia de la película interfacial (E , E_d y E_v).

5.3.1.1 Concentración de proteína interfacial

La glicinina tratada a pH ácido tanto en un medio a pH 7,0 como a 2,5 presentó valores de Γ significativamente mayores ($\alpha \leq 0,05$) que la muestra sin modificar (Tabla 5.5). Este aumento en la concentración proteica interfacial de las emulsiones preparadas con glicinina tratadas a pH ácido estaría relacionado con la desnaturalización ocurrida en este medio, desnaturalización que no se revierte en las muestras neutralizadas. Esta desnaturalización permitiría una mayor interacción entre las proteínas y por tanto una acumulación de las mismas en la interfase. Como ya se trató en el punto 5.1, la glicinina tratada a pH ácido se encuentra en la forma 3S por lo que se despliega y reordena más fácil y rápidamente en la interfase. Además en la sección 5.1 se puede ver que k_a de 11S aumentó con el tratamiento ácido, lo que se ve reflejado en los valores de Γ .

Tabla 5.5 Concentración de proteína interfacial (Γ), área interfacial (Sv) y concentración de proteína adsorbida (Pa) de las emulsiones en estudio.

Muestra	Pa (mg/ml de emulsión)	Sv (m ² /ml emulsión)	Γ (mg/m ²)
APSn-7,0	0,59±0,02 b, c, d	0,274 ± 0,006 a	2,14±0,08 c, d
APSt-7,0	0,58±0,01 b, c, d	0,291 ± 0,032 a	2,00±0,04 b, c, d
APSt-2,5	0,43±0,03 a	0,275 ± 0,009 a	1,55±0,09 a
11Sn-7,0	0,43±0,08 a	0,269 ± 0,016 a	1,58±0,31 a, b
11St-7,0	0,663±0,005 c, d	0,298 ± 0,008 a	2,23±0,02 c, d
11St-2,5	0,56±0,04 b, c	0,280 ± 0,037 a	2,01±0,13 b, c, d
7Sn-7,0	0,70±0,08 d	0,288 ± 0,024 a	2,42±0,29 d
7St-7,0	0,68±0,12 c, d	0,282 ± 0,051 a	2,42±0,41 d
7St-2,5	0,52±0,07 a, b	0,286 ± 0,003 a	1,83±0,23 a, b, c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)

No existieron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre las muestras tratadas a pH ácido y las nativas en el caso de APS y 7S neutralizadas a pH 7,0. En cambio se registró una disminución de Γ en las muestras tratadas a pH 2,5. Probablemente esto sea debido a que la proteína 7S en la conformación que se encuentra luego del tratamiento ácido a pH 2,5 (mayor grado de desnaturalización que para pH 7,0 como se observó en el Capítulo 3, sección 3.2.2) tenga menos posibilidad de compactarse en la interfase y por lo tanto se encuentre en menor cantidad en aquella.

Los perfiles electroforéticos de las proteínas adsorbidas en la interfase realizados para todas las muestras en todas las condiciones de ensayo, solo exhibieron una banda cercana a los 20 kDa que podría corresponderse con la subunidad B de la glicinina. Probablemente al tratarse de soluciones diluidas muchas de las proteínas presentes en la interfase podrían no haberse detectado por electroforesis, por lo tanto, no se pudieron sacar conclusiones definitivas a partir de este ensayo. Panizzolo (2005) determinó para APS nativo que las subunidades β -7S y AB-11S serían las principales proteínas adsorbidas en la interfase y en el caso de APS tratado a pH ácido se adsorbería además el polipéptido ácido de glicinina (A).

5.3.1.2 Distribución de tamaño de partícula.

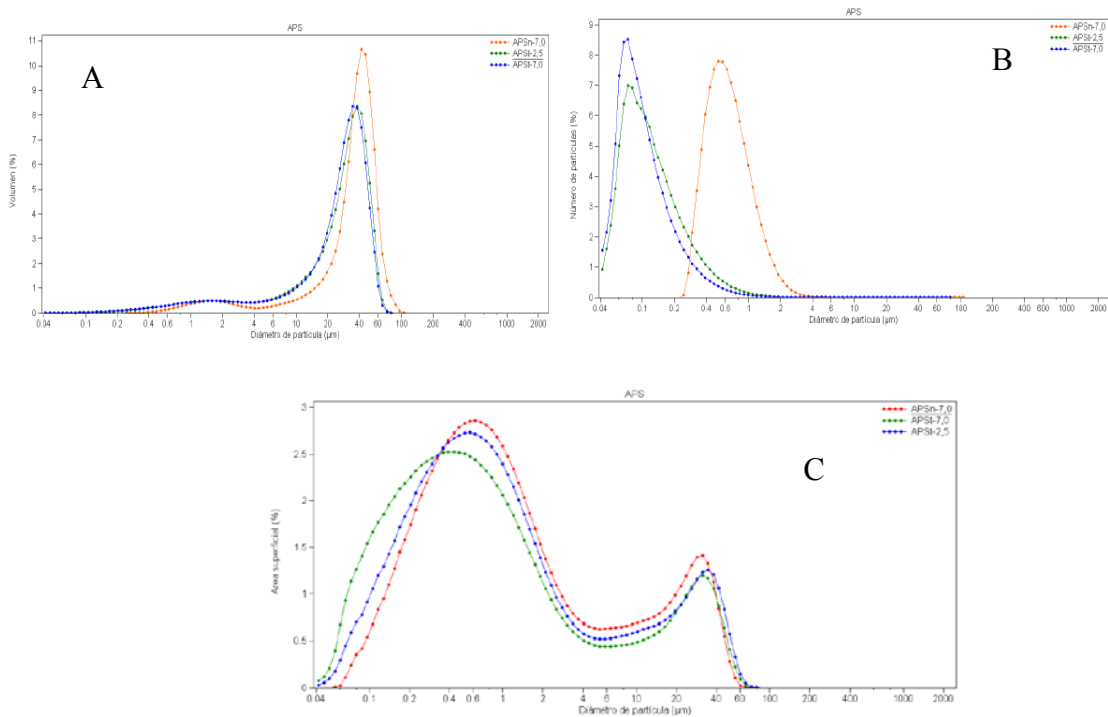


Figura 5.4 Distribución en volumen de tamaño de gota (A), expresada en número (B) y en área de gota (C), de emulsiones preparadas a una concentración 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM de APSn-7,0 (—), APSt-7,0 (—) y APSt-2,5 (—). Las medidas fueron llevadas a cabo en presencia de SDS.

Las emulsiones preparadas con APS, 11S y 7S nativas y aquellas correspondientes a las muestras tratadas a pH ácido presentaron una distribución de tamaño de partícula que abarcó el intervalo comprendido entre 0,04 a 110 µm aproximadamente (Figura 5.4). Las distribuciones de tamaño de partícula expresadas tanto en volumen como en superficie de las emulsiones preparadas exhibieron un carácter bimodal con dos poblaciones de gotas bien definidas: gotas con diámetro mayor y menor a 4 µm (Figura 5.4). Este tipo de comportamiento bimodal fue observado con anterioridad por Mitidieri y Wagner (2002) y Panizzolo (2005) y fue atribuido a las condiciones de homogeneización utilizadas.

En las emulsiones preparadas con las muestras nativas, las partículas con diámetros menores a 4 µm representaron el 99,95% del total y en ellas se distribuyó el 12% del volumen de aceite y el 76% del área creada. Las partículas con diámetros mayores a 4 µm representaron el 0,05% del total, distribuyéndose en ellas alrededor del 88% de la fracción de volumen de aceite de la emulsión y aproximadamente el 24% del área formada.

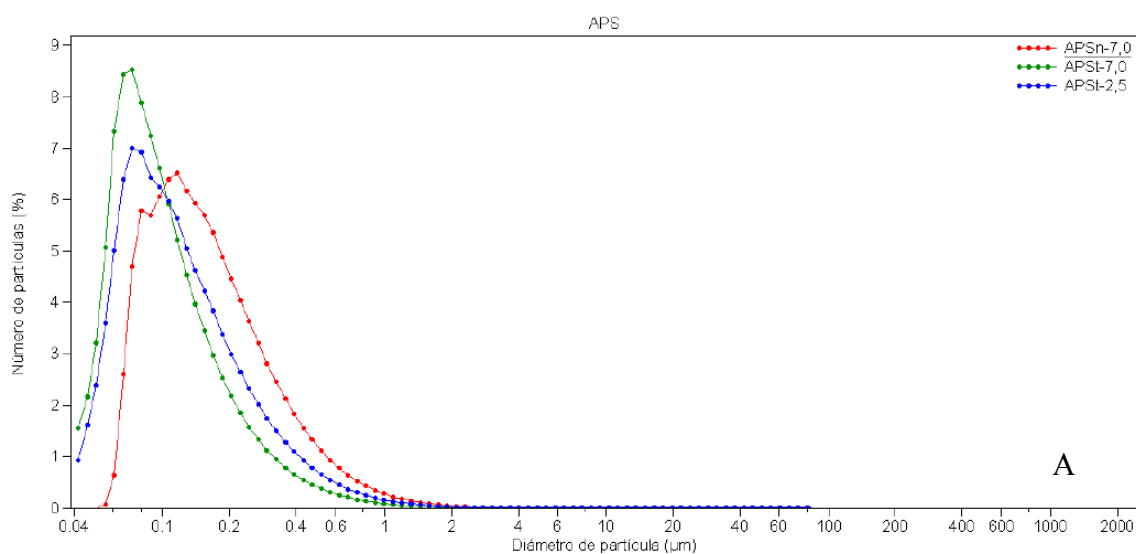
Para las emulsiones preparadas con las muestras tratadas a pH ácido, las partículas con diámetros menores a 4 μm representaron el 99,99% del total y en ellas se distribuyó el 10% del volumen de aceite y el 79% del área creada. Sin embargo entre las partículas con diámetros mayores a 4 μm las cuales representaron el 0,01% del total, se distribuyó alrededor del 90% de la fracción de volumen de aceite de la emulsión y aproximadamente 21% del área formada.

Tanto para las proteínas nativas como tratadas a pH ácido la mayor parte del volumen de aceite emulsionado se distribuyó en unas pocas partículas (las de mayor tamaño) (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Valores promedio de volumen (V), número de partícula (N) y área (A) correspondiente a gotas con diámetros inferiores y superiores a 4 μm , de las emulsiones en estudio tratadas con SDS

Muestra	%V1 (<4 μm)	%V2 (>4 μm)	%A1 (<4 μm)	%A2 (>4 μm)	%N1 (<4 μm)	%N2 (>4 μm)
APSn- 7,0	12,3 \pm 0,9 a, b, c	87,7 \pm 0,9 a, b, c	76,0 \pm 1,2 a	24,0 \pm 1,2 a	99,97 \pm 0,01 b	0,03 \pm 0,02 b, c
APSt-7,0	11,1 \pm 0,8 a, b	88,9 \pm 0,8 b, c	79,0 \pm 3,4 a	21,1 \pm 3,4 a	99,99 \pm 0,01 c	0,01 \pm 0,01 a
APSt-2,5	10,4 \pm 1,5 a	89,6 \pm 1,5 c	79,5 \pm 3,5 a	20,5 \pm 3,5 a	99,99 \pm 0,00 c	0,01 \pm 0,00 a
11Sn-7,0	13,1 \pm 1,0 b, c	86,9 \pm 1,0 a, b	75,6 \pm 0,8 a	24,4 \pm 0,8 a	99,95 \pm 0,01 a	0,05 \pm 0,01 c, d
11St-7,0	11,0 \pm 0,4 a, b	89,0 \pm 0,4 b, c	78,2 \pm 3,4 a	21,8 \pm 3,4 a	99,99 \pm 0,01 c	0,01 \pm 0,02 a, b
11St-2,5	10,8 \pm 0,9 a	89,2 \pm 0,9 c	79,5 \pm 0,7 a	20,5 \pm 0,7 a	99,99 \pm 0,00 c	0,01 \pm 0,00 a
7Sn-7,0	13,7 \pm 2,3 c	86,3 \pm 2,3 a	75,7 \pm 1,9 a	24,3 \pm 1,9 a	99,94 \pm 0,01 a	0,06 \pm 0,00 d
7St-7,0	12,5 \pm 0,5 a, b, c	87,5 \pm 0,5 a, b, c	79,2 \pm 2,4 a	20,8 \pm 2,4 a	99,99 \pm 0,01 c	0,01 \pm 0,01 a
7St-2,5	11,0 \pm 0,3 a, b	89,0 \pm 0,3 b, c	79,9 \pm 0,7 a	20,1 \pm 0,7 a	99,99 \pm 0,00 c	0,01 \pm 0,00 a

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0.05$)



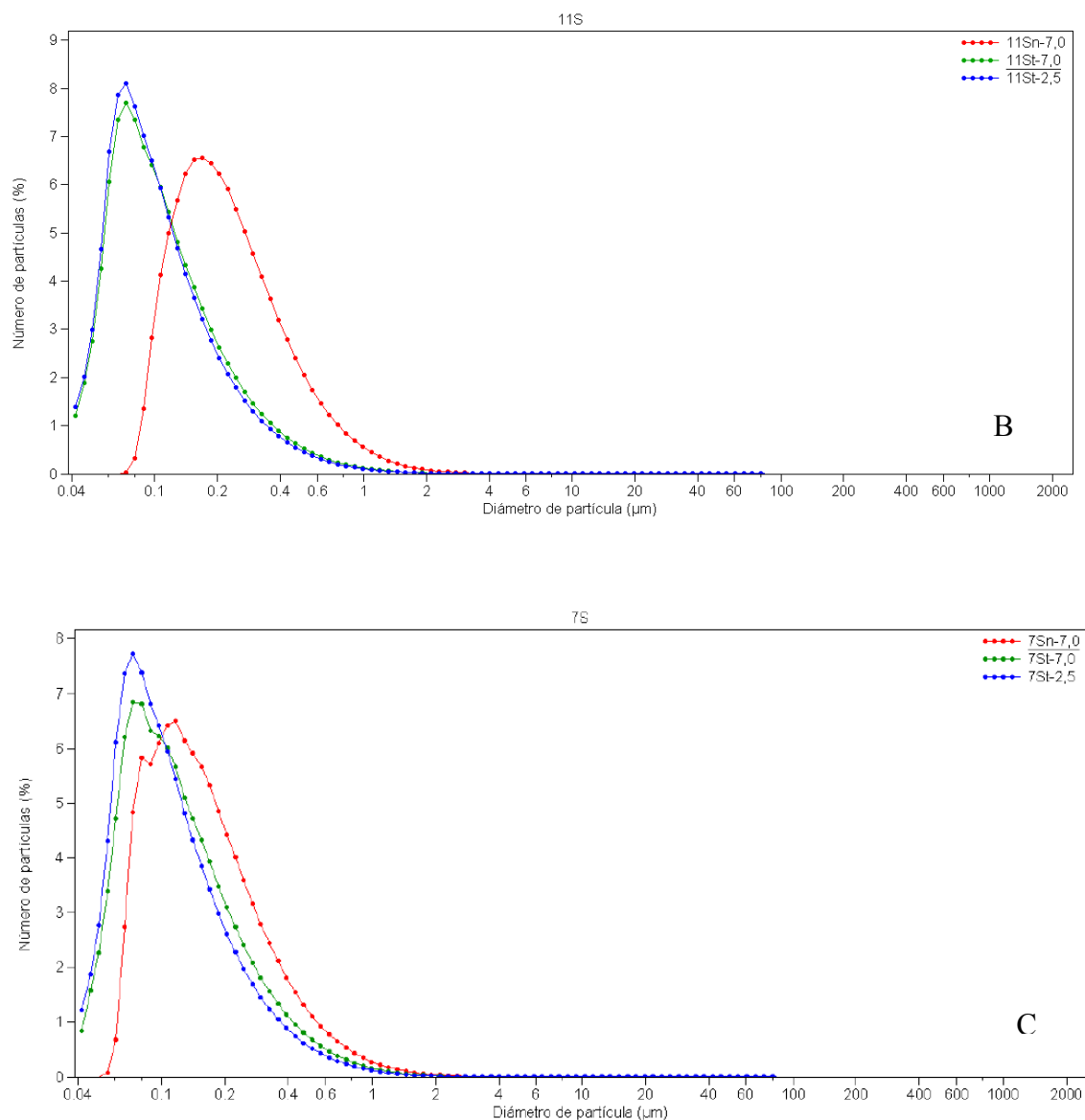


Figura 5.5 Distribución en número de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, en presencia de SDS (A) APSn-7,0 (—), APSt-7,0 (—) y APSt-2,5 (—) (B) 11Sn-7,0 (—), 11St-7,0 (—) y 11St-2,5 (—) y (C) 7Sn-7,0 (—), 7St-7,0 (—) y 7St-2,5 (—).

Las curvas de distribución expresadas en número de gota (Figura 5.5) de las emulsiones preparadas a con APSt-7,0 y APSt-2,5 (A), 11St-7,0 y 11St-2,5 (B) y 7St-7,0 y 7St-2,5 respecto con las correspondientes a las proteínas nativas APSn-7,0 (A), 11Sn-7,0 (B) y 7Sn-7,0 (C) presentaron un corrimiento significativo hacia valores de diámetros de partícula menores y un aumento en el máximo de la curva lo que indica un incremento del número de partículas de menor diámetro.

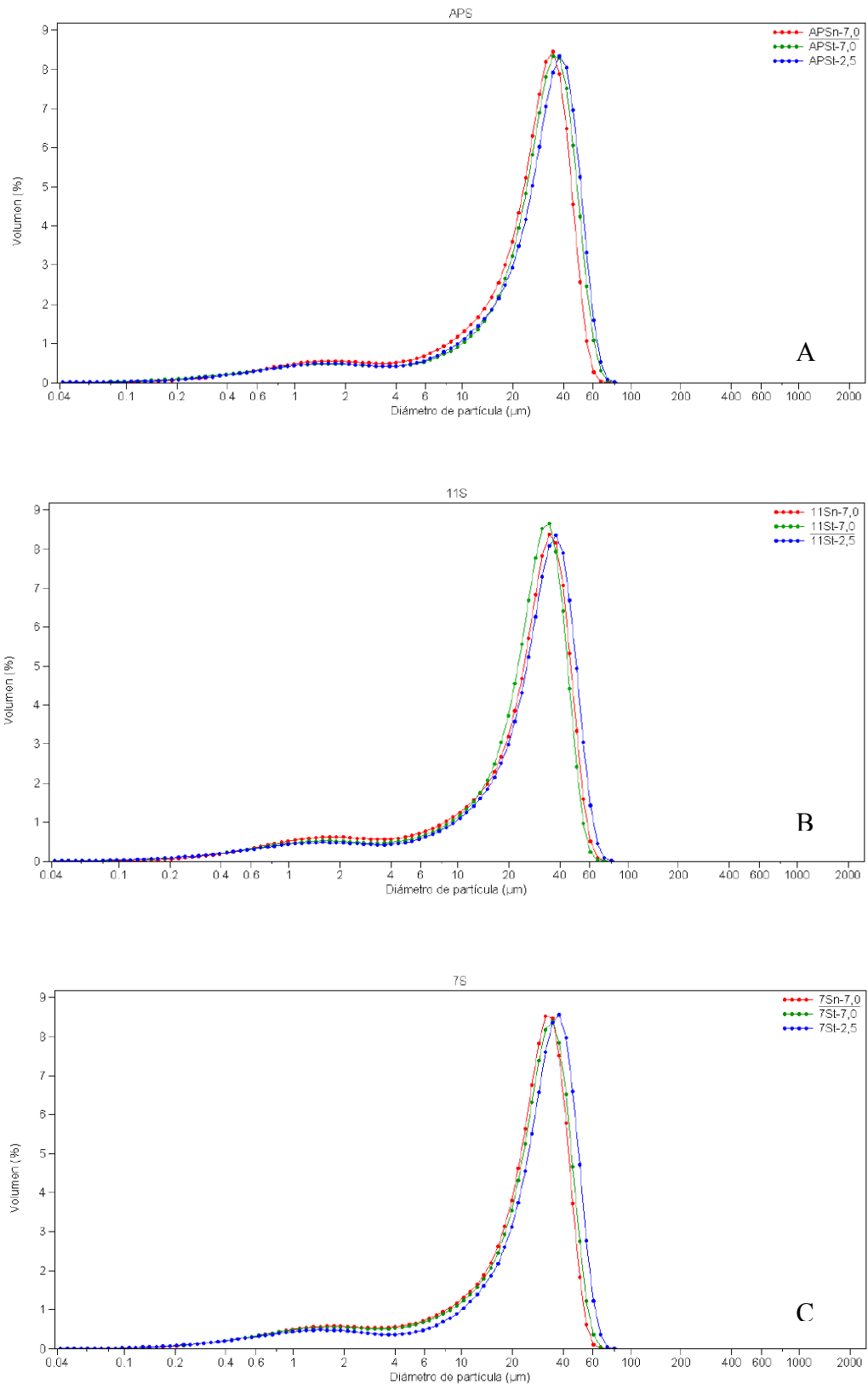
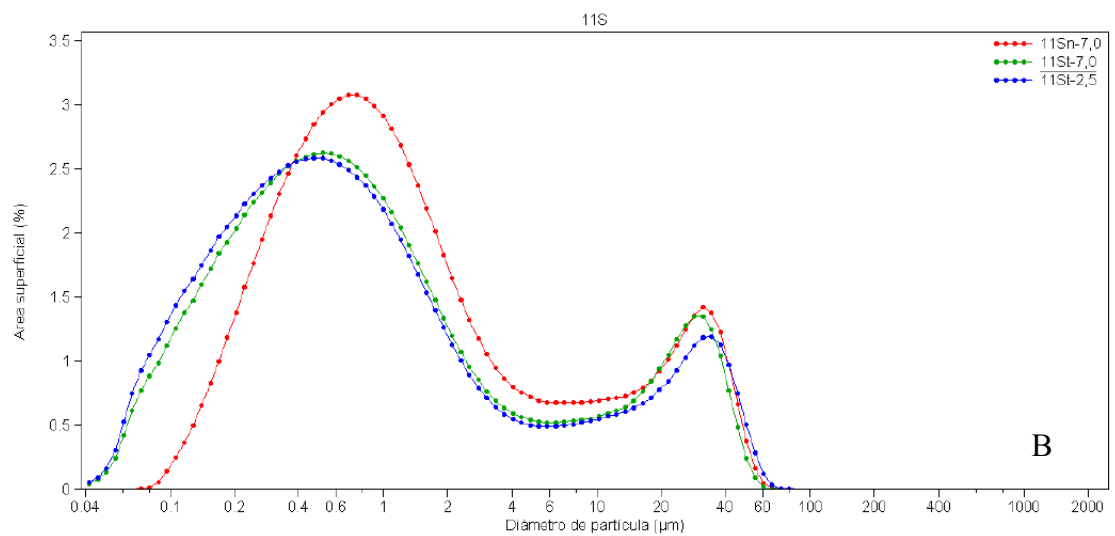
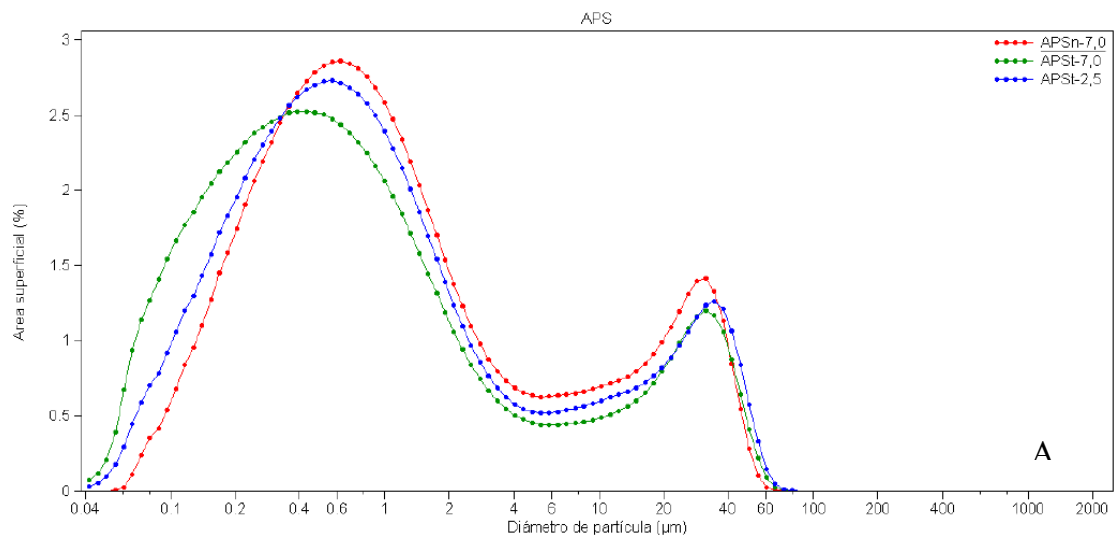


Figura 5.6 Distribución en volumen de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, en presencia de SDS (A) APSn-7,0 (—), APSt-7,0 (—) y APSt-2,5 (—) (B) 11Sn-7,0 (—), 11St-7,0 (—) y 11St-2,5 (—) y (C) 7Sn-7,0 (—), 7St-7,0 (—) y 7St-2,5 (—).

Las curvas de distribución de partículas expresadas en volumen de las emulsiones preparadas con APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5 presentaron en todos los casos un ligero desplazamiento de las curvas hacia mayores tamaños de partícula con respecto a las muestras nativas y tratadas a pH ácido y luego llevadas a pH 7,0 (Figura 5.6-A, B, C). No existieron diferencias en el porcentaje de volumen de aceite correspondiente a las muestras nativas y tratadas a pH ácido (Tabla 5.6).



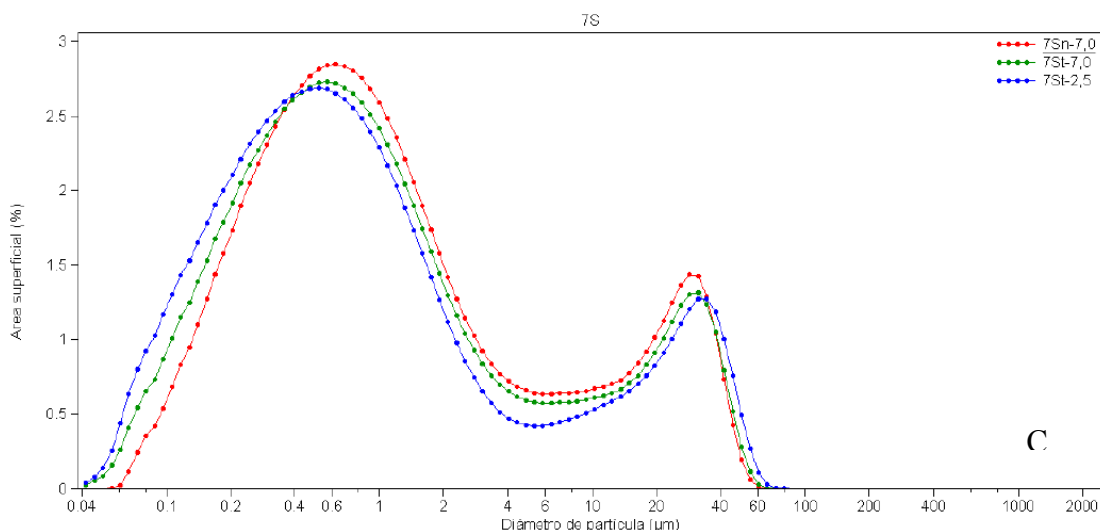


Figura 5.7 Distribución en superficie de gota de emulsiones preparadas con una concentración de muestra: 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, en presencia de SDS (A) APSn-7,0 (—), APSt-7,0 (—) y APSt-2,5 (—) (B) 11Sn-7,0 (—), 11St-7,0 (—) y 11St-2,5 (—) y (C) 7Sn-7,0 (—), 7St-7,0 (—) y 7St-2,5 (—).

En la Figura 5.7- A, B, C se presentan las curvas de distribución de partícula expresadas en superficie de las emulsiones preparadas. Las muestras tratadas a pH ácido presentaron una mayor separación entre las dos poblaciones de partículas encontradas que la existente en las emulsiones formuladas con las muestras nativas. Para las partículas con un diámetro menor a 4 µm las curvas de las muestras tratadas a pH ácido se desplazaron hacia menores diámetros y en el caso de 11S es notorio que hubo además un ensanchamiento del pico y una disminución del área superficial. En cambio para las partículas de diámetro mayor a 4 µm prácticamente no existen diferencias entre las curvas de las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido.

Los valores de $D_{4,3}$ de las emulsiones estudiadas fueron significativamente mayores que los valores $D_{3,2}$ (Tablas 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10), ello denota que las emulsiones obtenidas fueron polidispersas. Este fenómeno es más significativo cuanto mayor es el incremento de $D_{4,3}$ con respecto a $D_{3,2}$ (Walstra, 1983b).

En la Tabla 5.9 se presentan los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ para las emulsiones preparadas con las distintas muestras en las diferentes condiciones tratadas con SDS. Para diámetros de partículas menores 4 µm se observaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) de los valores de $D_{3,2}$ entre las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido tanto en medio a pH 7,0 como 2,5, lo que se corresponde con el desplazamiento, antes discutido, a diámetros menores de las curvas de las muestras

tratadas a pH ácido de la Figura 5.7 B y C. En cambio no se observaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) en los valores de $D_{4,3}$ para las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido.

Para las partículas con diámetros mayores a 4 μm no existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en el valor de $D_{3,2}$ de las emulsiones preparadas con las muestras nativas y tratadas a pH ácido, a excepción de 7St-2,5 que mostró un leve aumento con respecto a 7Sn-7,0 y 7St-7,0. En el caso de $D_{4,3}$ no existen diferencias significativas entre ninguna de las muestras nativas y tratadas a pH ácido para APS, 11S y 7S.

Tabla 5.7 Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio en ausencia de SDS

Muestra	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$
APSn-7,0	10,1±0,5 a, b	33±3 a, b
APSt-7,0	9,7±0,6 a, b	33±4 a, b
APSt-2,5	12±2 c, d	41±4 c, d
11Sn-7,0	11,3±0,2 b, c, d	36,6±0,8 b, c
11St-7,0	9,5±0,2 a	30,5±0,8 a
11St-2,5	12,2±0,1 c, d	42,4±0,4 d
7Sn-7,0	9,3±0,4 a	30±1 a
7St-7,0	10±2 a, b, c	33±8 a, b
7St-2,5	12,3±0,8 d	41±4 c, d

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Tabla 5.8 Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de emulsiones en estudio tratadas con SDS

Muestra	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$
APSn-7,0	5,5±0,1 a	24,6±0,5 a
APSt-7,0	5,2±0,6 a	27±1 a, b, c, d
APSt-2,5	5,5±0,2 a	30±2 d
11Sn-7,0	5,6±0,3 a	24±3 a
11St-7,0	5,0±0,1 a	26±2 a, b, c
11St-2,5	5,4±0,7 a	29±3 c, d
7Sn-7,0	5,2±0,4 a	24,0±0,4 a
7St-7,0	5,3±0,9 a	25±2 a, b
7St-2,5	5,2±0,1 a	28±2 b, c, d

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Tabla 5.9 Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio tratadas con SDS, dividida en dos zonas: una con diámetros (d) menores a $4\mu\text{m}$ y la otra mayores a $4\mu\text{m}$

Muestra	$D_{3,2}$ 1	$D_{4,3}$ 1	$D_{3,2}$ 2	$D_{4,3}$ 2
	Partículas con $d < 4\mu\text{m}$		Partículas con $d > 4\mu\text{m}$	
APSn-7,0	0,9±0,1 a, b	1,56±0,06 a, b, c	20±1 a	27,8±0,3 a
APSt-7,0	0,8±0,1 a	1,47±0,06 a, b, c	22±1 a, b	31±3 a, b, c
APSt-2,5	0,7±0,2 a	1,4±0,1 a	24±4 b	33±5 c
11Sn-7,0	0,97±0,03 b	1,62±0,02 c	20±2 a	28±3 a
11St-7,0	0,73±0,05 a	1,49±0,07 a, b, c	22±2 a, b	29±2 a, b, c
11St-2,5	0,73±0,04 a	1,46±0,01 a, b, c	23±2 b	32±3 b, c
7Sn-7,0	0,99±0,01 b	1,61±0,09 b, c	19±1 a	27,4±0,9 a
7St-7,0	0,8±0,1 a	1,6±0,2 a, b, c	20±2 a	28±2 a, b
7St-2,5	0,72±0,01 a	1,44±0,06 a, b	23,2±0,5 b	32±2 a, b, c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Tabla 5.10 Valores promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones en estudio en ausencia de SDS, dividida en dos zonas: una con diámetros (d) menores a $4\mu\text{m}$ y la otra mayores a $4\mu\text{m}$

Muestra	$D_{3,2}$ 1	$D_{4,3}$ 1	$D_{3,2}$ 2	$D_{4,3}$ 2
	Partículas con $d < 4\mu\text{m}$		Partículas con $d > 4\mu\text{m}$	
APSn-7,0	1,25±0,04 a, b, c	1,65±0,03 a	27±2 a	36±3 a, b
APSt-7,0	1,18±0,09 a, b	1,61±0,08 a	26±1 a	34±2 a, b
APSt-2,5	1,2±0,1 a, b	1,6±0,1 a	33±6 c	44±8 c, d
11Sn-7,0	1,36±0,09 c	1,89±0,09 c	31,2±0,2 b, c	40±1 b, c
11St-7,0	1,31±0,01 b, c	1,883±0,001 c	26,6±0,8 a	33,5±0,8 a
11St-2,5	1,25±0,05 a, b, c	1,81±0,05 b, c	34,8±0,1 c	45,5±0,2 d
7Sn-7,0	1,28±0,02 a, b, c	1,68±0,02 a, b	25±1 a	33±1 a
7St-7,0	1,2±0,1 a, b, c	1,6±0,1 a	28±4 a, b	36±4 a, b
7St-2,5	1,1±0,1 a	1,6±0,1 a	33±3 c	43±3 c, d

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

En la tabla 5.10 se presentan los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ obtenidos en ausencia de SDS para las emulsiones preparadas con las distintas muestras ensayadas.

Para las partículas de diámetro menor a $4\mu\text{m}$ no se observaron diferencias significativas entre los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ para las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido. En cambio para las partículas con diámetros mayores a $4\mu\text{m}$ se observan diferencias significativas en ambos diámetros.

Para ambas poblaciones de partículas (de diámetro mayor y menor a $4\mu\text{m}$) los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones no tratadas con SDS fueron mayores a los observados en la Tabla 5.9 (emulsiones tratadas con SDS), lo que denota que hubo cierto grado de floculación inicial como se verá más adelante en la sección 5.4.1.3.

Como ya se discutió en la Introducción (sección 1.6.2.2.1), el tamaño de las gotas producidas durante la formación de emulsiones depende de dos procesos: 1) la generación de gotas de pequeño tamaño y 2) la rápida estabilización de estas gotas lo que evita su coalescencia una vez formadas (Mc Clements, 1999).

Las soluciones proteicas elaboradas con las muestras tratadas a pH ácido presentaron mayores velocidades de absorción a la interfase y mayor resistencia de la película interfacial a las perturbaciones (medida por E , E_d y E_v) respecto de las muestras nativas, lo cual se vió reflejado en el hecho de que aumentó el número de gotas menores a $4 \mu\text{m}$ (Tabla 5.6) por lo que se podría deducir que disminuyó la coalescencia inicial.

5.3.1.3 Floculación de gotas durante la formación de la emulsión

La adición de SDS, según Anton et al. (2002), permite la disociación de cualquier forma de agregado presente en la emulsiones que estuviera estabilizado por interacciones no covalentes. Consecuentemente los diámetros promedio medidos ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) en presencia de SDS en comparación a los obtenidos en ausencia del mismo, aportan información sobre la tendencia de las gotas a flocular por formación de puentes (floculación por puenteo).

El $D_{4,3}$ es el diámetro que experimenta mayores cambios por el agregado de gotas (Relkin y Sourdet, 2005). El grado de floculación (Ecuación 2.22), de las distintas emulsiones estudiadas, se presenta en la Tabla 5.11.

$$GF = \frac{D - D_{SDS}}{D_{SDS}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.22})$$

Tabla 5.11 Valores promedio de floculación de las emulsiones en estudio

	GF (total)	GF1 (<4 μm)	GF2 (>4 μm)
APSn-7,0	32±3 a, b	5,7±2,0 a	27±5 a, b
APSt-7,0	32±2 a, b	11,6±0,1 b	27±1 a, b
APSt-2,5	36±6 b, c	10,1±2,4 b	30±5 b, c
11Sn-7,0	49±4 e	15,5±0,1 c	46±6 d
11St-7,0	38±3 b, c, d	27,9±3,7 d	32±3 b, c
11St-2,5	40±3 c, d	25,1±0,4 d	35±3 c
7St-7,0	26±4 a	2,9±0,1 a	20±1 a
7St-7,0	33±4 a, b, c	3,9±2,5 a	27±3 a, b
7St-2,5	45±5 d, e	9,6±0,8 b	36±1 c

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

En la Tabla 5.11 se presenta el grado de floculación inicial para las distintas muestras en las diferentes condiciones de trabajo. Siendo GF (total), el grado de floculación calculado los valores globales de $D_{4,3}$ (sin discriminar entre partículas mayores y menores a 4 μm) que se presentan en las Tablas 5.7 y 5.8. GF1 y GF2 se calculan a partir de los valores de $D_{4,3}$ de las tablas 5.9 y 5.10 para diámetros de partícula menores y mayores a 4 μm , respectivamente. En la Tabla 5.11 se puede observar que el GF total no mostró diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) entre las emulsiones preparadas con APSn-7,0, APSt-7,0 y APSt-2,5. Las emulsiones preparadas con 11St-7,0 y 11St-2,5 presentaron un menor grado de floculación que el correspondiente a 11Sn-7,0. En cambio para 7S el grado de floculación aumentó con el tratamiento ácido, siendo el mayor el correspondiente a las emulsiones preparadas con 7St-2,5.

Al determinarse el grado de floculación correspondiente a los intervalos de partículas con diámetros por encima y por debajo de 4 μm se puede apreciar un comportamiento diferente. Las gotas con diámetros mayores a 4 μm presentaron un GF significativamente mayor que las gotas de tamaño menor a 4 μm .

Los grados de floculación para partículas mayores a 4 μm , GF 2, mostraron la misma tendencia que el grado de floculación total. En cambio los grados de floculación correspondientes a las partículas de diámetros menores a 4 μm aumentaron con el tratamiento ácido, con excepción de APSt-7,0. Este comportamiento estaría relacionado con los cambios conformacionales debidos a la desnaturalización proteica provocada por el tratamiento con pH ácido que hace exponer grupos que antes no lo estaban y pueden así interaccionar a través de interacciones hidrofóbicas y uniones electrostáticas, dipolo-dipolo o por puente hidrógeno.

5.3.2 Estabilidad de emulsión

La estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de resistir a los cambios en sus propiedades con en el tiempo. Al considerar la estabilidad de una emulsión, es muy importante distinguir entre la estabilidad termodinámica y la cinética. La estabilidad termodinámica indica si un determinado proceso se llevará a cabo o no, mientras que la cinética nos indica la velocidad a la que el proceso ocurre (Dickinson,

1992b). En este trabajo se estudió la estabilidad cinética, ya que las emulsiones por definición son termodinámicamente inestables.

En la presente sección se exponen los resultados del estudio de emulsiones o/w preparadas con aislado proteico de soja, glicinina y β -conglucina nativas y con tratamiento a pH ácido. Las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas diluidas y con una baja relación volumétrica entre las fases dispersa y acuosa, tienden a desestabilizarse por cremado. La floculación tiene una gran influencia sobre el cremado y puede favorecer o no la separación gravitacional dependiendo del tamaño y estructura de los flóculos (Mc Clements, 1999). Después de un tiempo considerable de almacenamiento, en la parte superior de la emulsión se forma una fase crema, la cual no es más que una emulsión más concentrada en gotas que la emulsión inicial. La fase inferior o suero está empobrecida en gotas de fase dispersa y por lo tanto enriquecida en la fase acuosa.

En general, en ausencia de fuerzas externas aplicadas, la coalescencia es un mecanismo de desestabilización lento, comparado con el cremado y la floculación. Por lo tanto, excepto que el proceso de emulsificación o el agente emulsificante no hayan sido efectivos, la coalescencia tiene lugar una vez que se ha formado la fase crema, es decir, cuando la floculación y el cremado han alcanzado un grado avanzado de desarrollo. Por el contrario, en una emulsión más concentrada, como la fase crema, las gotas pierden movilidad y pueden permanecer en íntimo contacto durante un período prolongado, lo cual promueve la coalescencia. La naturaleza de las interacciones coloidales entre las gotas y la resistencia del film interfacial determinará el grado de desestabilización (Mc Clements, 1999). Por consiguiente, la estabilidad frente a la coalescencia de una emulsión o/w de baja viscosidad, se estudia a través de las características de la fase crema después de un tiempo prolongado de almacenamiento estacionario como proponen Mitidieri et al. (2001).

En este trabajo, se llevó a cabo el estudio de la estabilidad global (cremado, floculación y coalescencia) de emulsiones o/w preparadas con dispersiones diluidas (1 mg/ml) de proteína. Como se indicó en el Capítulo 3, las muestras utilizadas exhibieron diferencias en la solubilidad (Sección 3.3.1), hidrofobicidad superficial (Sección 3.2.3), grado de recuperación de la conformación nativa (Sección 3.2.2), etc. Por otra parte, el hecho de emplear dispersiones acuosas diluidas permite observar más claramente la relación existente entre las características estructurales de las muestras y la estabilidad de las emulsiones resultantes.

En esta sección se analizarán las características de las emulsiones para establecer una correspondencia, en primer lugar con la estabilidad frente al cremado y en segundo lugar con el grado de floculación y/o coalescencia de la fase crema después de 24 horas de almacenamiento estacionario.

5.3.2.1 Estabilidad frente al cremado

En la Figura 5.9 se muestran los perfiles de retrodispersión (RD) en función de la altura del tubo de una muestra correspondiente a una emulsión preparada con proteínas de soja. Para todas las muestras estudiadas se obtuvieron perfiles similares. En la zona inferior del tubo de muestra, zona I (10 – 20 mm), se observó una disminución de los valores de RD con el transcurso del tiempo, que evidencia el desarrollo de un proceso de cremado, mientras que en la zona II se pudo apreciar la fase crema formada, que permaneció aún después que se acumularan las gotas de aceite en la parte superior del tubo.

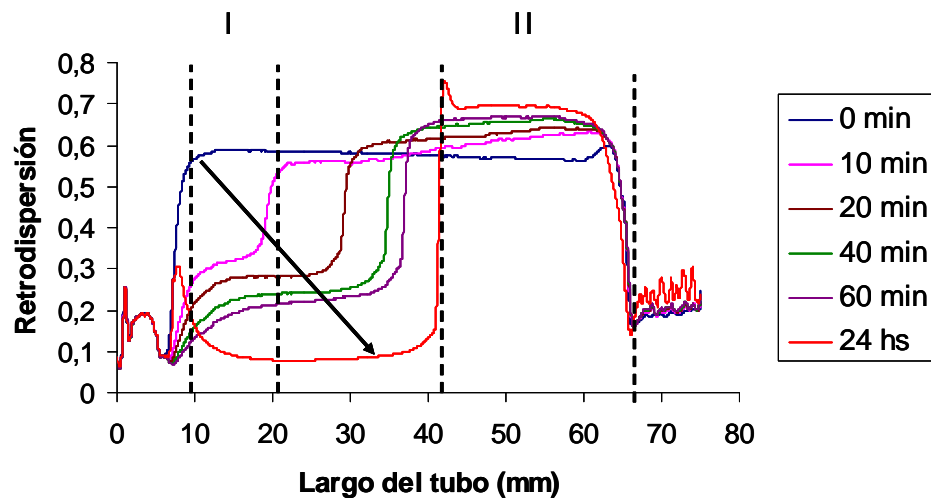


Figura 5.9 Perfil de retrodispersión (RD) en función de la altura del tubo para emulsiones aceite en agua de proteínas de soja concentración 1 mg/ml, fracción volumétrica de aceite 25%. La flecha indica el cambio de perfil con el tiempo.

Para estudiar la estabilidad de las emulsiones obtenidas frente al cremado se analizó la disminución de los valores promedio de la retrodispersión en la parte inferior (zona 10-20 mm, RD_{10-20}) del tubo de medida en función del tiempo (Palazolo et al., 2004). Las curvas de variación de los valores promedio de RD en la zona 10-20 mm

(RD₁₀₋₂₀) en función del tiempo correspondientes a todas las emulsiones ensayadas se presentan en las Figuras 5.10, 5.11 y 5.12.

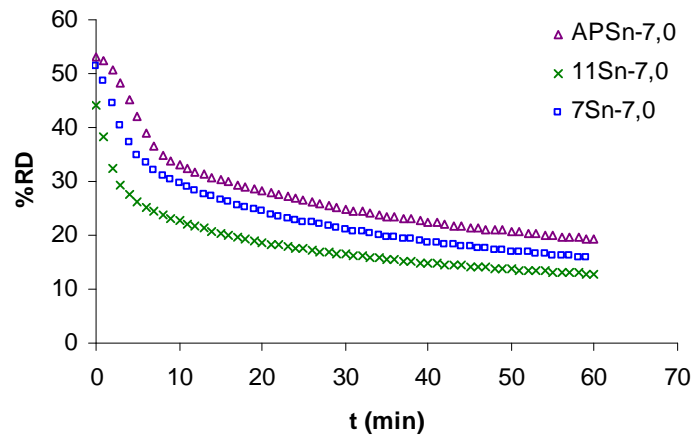


Figura 5.10 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD₁₀₋₂₀) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSn-7,0, 11Sn-7,0 y 7Sn-7,0.

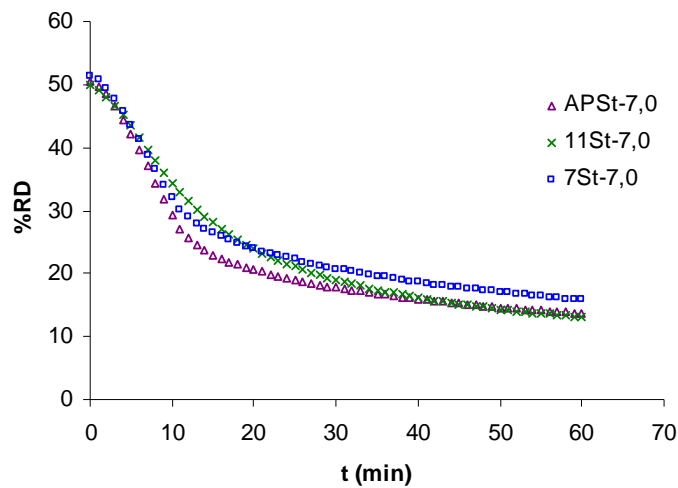


Figura 5.11 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD₁₀₋₂₀) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSt-7,0, 11St-7,0 y 7St-7,0.

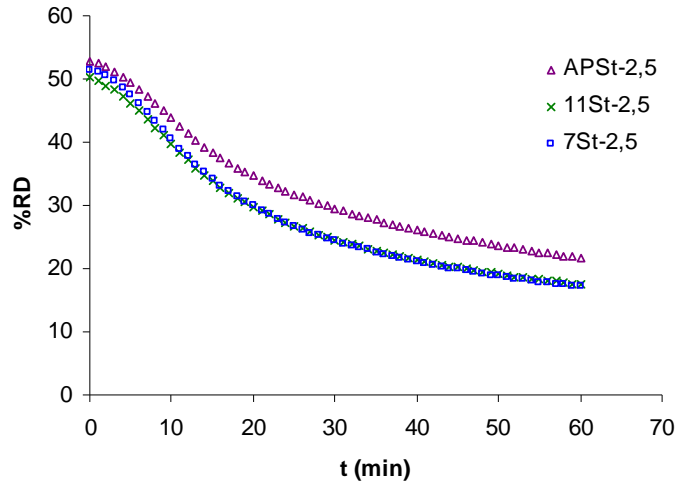


Figura 5.12 Variación de valores promedio de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{10-20}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5.

Se puede constatar que las curvas obtenidas de RD en función del tiempo de las muestras nativas presentan forma hiperbólica (APSn-7,0, 11Sn-7,0 y 11Sn-7,0) mientras las correspondientes a las muestras tratadas a pH ácido (APSt-7,0, 11St-7,0, 7St-7,0 APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5) son de tipo sigmoidea. Según lo planteado por Panizzolo (2005), los perfiles de RD de naturaleza sigmoidea e hiperbólica pueden ajustarse a ecuaciones con dos parámetros que responden a las siguientes expresiones:

La Ecuación 5.6 consta de la suma de dos cinéticas hiperbólicas, a esta ecuación se ajustan las curvas con perfil hiperbólico:

$$RD(t) = \frac{RD_g}{RD_g k_g t + 1} + \frac{RD_p}{RD_p k_p t + 1} \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

La Ecuación 5.7 consta de la suma de dos cinéticas: una hiperbólica y una sigmoidea, a esta ecuación se ajustan las curvas con el perfil sigmoideo:

$$RD(t) = \frac{RD_h}{RD_h k_h t + 1} + \frac{2^2 RD_s}{2^2 + (k_s RD_s)^2 t^2} \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

Donde en la $RD(t)$ es el valor de RD a tiempo t para ambas ecuaciones (5.6 y 5.7). En la ecuación 5.6, k_g es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para las gotas de mayor tamaño, k_p es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para las gotas de menor tamaño y RD_g y RD_p son los

parámetros de amplitud correspondientes a las gotas de mayor y menor tamaño respectivamente, tales que $RD_g + RD_p = RD_0$, siendo RD_0 la retrodispersión de la emulsión a tiempo 0. En la ecuación 5.7, k_h es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo hiperbólico, k_s es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo sigmoideo y RD_h y RD_s son los parámetros de amplitud correspondientes a las cinéticas hiperbólicas y sigmoideas respectivamente, tales que $RD_h + RD_s = RD_0$.

La contribución de cada término de las Ecuaciones 5.6 y 5.7 se representa en las Figuras 5.13 y 5.14 respectivamente.

La ley de Stokes determina que la velocidad de cremado de una partícula esférica aislada en un líquido:

$$v_{Stokes} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1} \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

En la ecuación 5.8, v_{Stokes} es la velocidad de cremado, r es el radio de la partícula, g es la aceleración debido a la gravedad, η_1 es la viscosidad de la fase continua, ρ es la densidad y los subíndices 1 y 2 refieren a las fases continua y dispersa respectivamente.

De la ecuación 5.8 se deduce que las partículas que creman más rápido son las de mayor radio.

En la sección 5.3.1.2 de este capítulo se determinó que las emulsiones constaban de poblaciones de partículas de diámetros menores y mayores a 4 μm , por lo cual es lógico suponer que los términos de las ecuaciones 5.6 y 5.7 representan estas dos poblaciones.

En la Figura 5.13 se puede apreciar que los valores de $RD_g(t)$ descienden más rápidamente reduciendo su contribución al valor de RD total en el tiempo, alcanzando un valor próximo a cero alrededor de los 40 min, mientras que $RD_p(t)$ disminuye paulatinamente aumentando su contribución al valor de RD total con el tiempo, siendo esta contribución casi total luego de 30 min. Dado que las gotas más grandes creman más rápido se representan como $RD_g(t)$ y dominarían el comportamiento de la emulsión durante los primeros minutos de medida. Las gotas de menor tamaño creman más lentamente por lo que se representaría a través del RD_p , siendo este el comportamiento que predomina en los últimos minutos de medida.

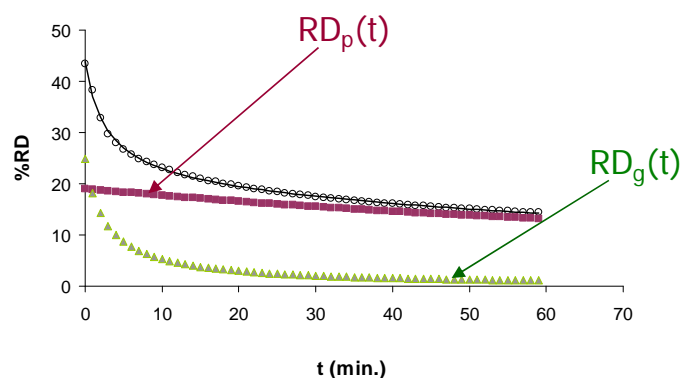


Figura 5.13 Variación de valores promedio y parámetros hiperbólicos de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{10-20}) en función del tiempo según ecuación 5.6

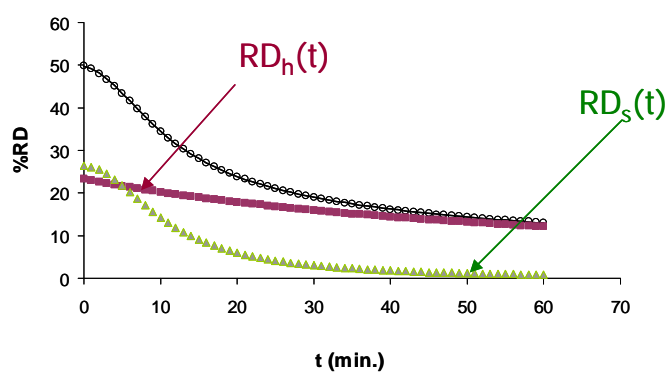


Figura 5.14 Variación de valores promedio y parámetros sigmoideo e hiperbólico de retrodispersión en la zona 10-20 mm (RD_{10-20}) en función del tiempo según ecuación 5.7.

En la Figura 5.14 se puede observar que los valores iniciales de RD correspondientes a la cinética sigmoidea disminuyen su contribución al valor de RD total en el tiempo, haciéndose casi cero alrededor de los 40 min, mientras que la componente hiperbólica disminuye paulatinamente y aumenta con el tiempo su contribución al valor de RD total, siendo esta contribución casi total luego de 40 min. Por tanto es adecuado asociar a las gotas de mayor tamaño con la variación de RD con cinética sigmoidea (RD_s).

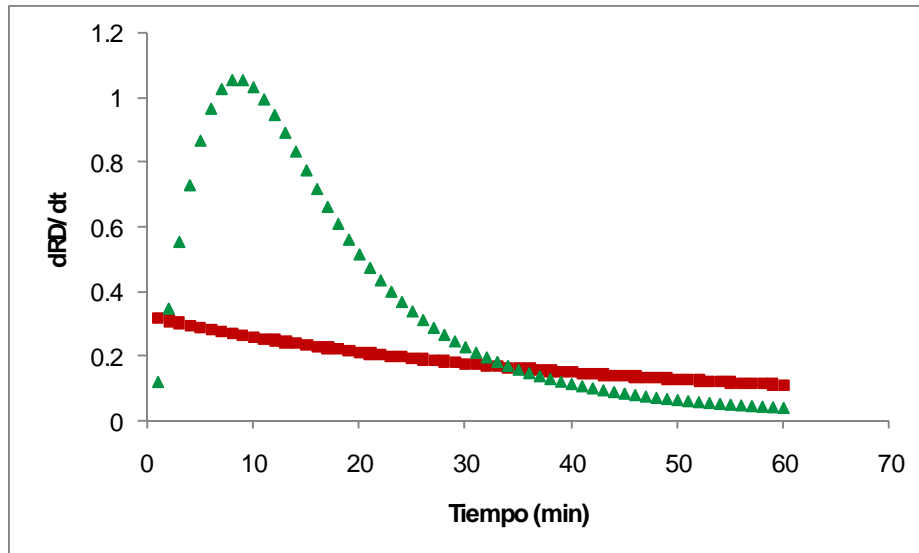


Figura 5.15 Representación de la derivada de retrodispersion en función del tiempo (dRD/dt) correspondientes a las cinéticas sigmoidea (▲) e hiperbólica (■) de emulsiones preparadas con 11St-2,5, concentración de proteína= 1 mg/ml.

La velocidad de variación de RD con respecto al tiempo se puede asociar a la velocidad del proceso de cremado (Panizzolo, 2005). Para el caso de la cinética de comportamiento hiperbólico la expresión que la representa es:

$$\frac{dRD}{dt} = \frac{k_h RD^2}{(1 + k_h RDt)^2} \quad (\text{Ecuación 5.9})$$

y a la cinética de comportamiento sigmoideo le corresponde la ecuación:

$$\frac{dRD}{dt} = \frac{2^2 k_s^2 RD^{2+1} t}{[2^2 + (k_s RD)^2 t^2]^2} \quad (\text{Ecuación 5.10})$$

La representación de la derivada de la retrodispersion en función del tiempo, dRD/dt, correspondiente a las cinéticas hiperbólica y sigmoidea (Ecuaciones 5.9 y 5.10 respectivamente) de emulsiones preparadas con 11St-2.5 se muestra en la Figura 5.15. En ella se puede observar, al igual que ya lo hicieron Panizzolo (2005) y Medrano (2009), que la cinética hiperbólica fue máxima al comienzo de la medida y luego fue disminuyendo, en cambio en la cinética sigmoidea la velocidad de cremado se incrementó hasta un tiempo dado, alcanzando un máximo, y luego disminuyó de forma similar a la presentada por la cinética hiperbólica. Tal como lo señala Panizzolo (2005) en el caso de la cinética hiperbólica las desviaciones a la Ley de Stokes serían tales que si bien afectan la velocidad de cremado de las gotas, éstas lo harían manteniendo la tendencia esperada por la ley donde las gotas de mayor tamaño creman más

rápidamente que las de menor tamaño. Por tanto k_h se podría asimilar a una constante de velocidad que describe el proceso de cremado y sus valores estarían indicando el comportamiento de las emulsiones con respecto a la estabilidad frente a este proceso. En cambio en la cinética sigmoidea la magnitud e incidencia de las desviaciones a la Ley de Stokes serían tales que las gotas de mayor tamaño tendrían impedido el movimiento en el primer intervalo del proceso de cremado, pero con el transcurso del tiempo los efectos retardadores del proceso disminuirían su magnitud e incidencia de modo que la velocidad de cremado pasaría a tener un comportamiento similar al de las emulsiones de perfil de tipo hiperbólico. Por consiguiente, k_s es un índice del efecto de retardo en la velocidad de cremado.

Todas las emulsiones preparadas con proteínas tratadas a pH ácido presentaron un comportamiento sigmoideo en la cinética de cremado. Dicho comportamiento se debería al movimiento simultáneo de las dos poblaciones de gotas encontradas en estas emulsiones, las gotas menores de diámetro entre 0,04 μm y 4 μm y las mayores a 4 μm con un intervalo entre 4 μm a 110 μm . Una de estas poblaciones tendría un perfil hiperbólico y las otras un perfil sigmoideo. Dado que el 99,95% de las partículas tienen diámetros menores de 4 μm es apropiado vincular las mismas a la variación de RD con cinética hiperbólica. Las gotas pequeñas no tendrían impedido el movimiento, por el contrario su disminución es continua y lenta dado el alto porcentaje de partículas comprendido en este intervalo de tamaño. En cambio las gotas de mayor tamaño que presentaron un GF significativamente más alto, podrían estar formando flóculos en estructura de red abierta y tendrían impedido el movimiento en el primer intervalo del proceso de cremado. Una vez que los flóculos pasaron esa barrera estarían liberados aumentando la velocidad de cremado hasta un máximo en el cual nuevamente disminuiría la velocidad debido a que el número de partículas de este intervalo disminuye hasta llegar a 0.

Otra razón posible de este comportamiento sería la concentración de gotas. Cuanto mayor es la concentración de gotas y la polidispersidad, más acentuada es la disminución de la velocidad de cremado hasta punto tal que el cremado puede ser completamente inhibido cuando se excede un determinado valor de Φ_c . En general el valor de Φ_c depende del ordenamiento de las gotas en el seno de la emulsión la cual es determinada por su polidispersión e interacciones coloidales (Mc Clements, 1999). En el caso de las emulsiones de proteínas tratadas a pH ácido, las gotas de mayor tamaño que se encuentran en menor número, serían las que tenderían a moverse más rápido y

antes, sin embargo tendrían impedido el movimiento en las primeras etapas del proceso de cremado debido a la presencia de una gran cantidad de partículas de menor tamaño con una velocidad de cremado mucho menor. De todos modos el conjunto de gotas tendería a un movimiento ascendente permitiendo que poco a poco se fuera descongestionando el sistema y que la población de gotas de mayor tamaño fuera aumentando su velocidad (Figura 5.15). Luego que el efecto retardador de la población de gotas de menor tamaño fuera superado las gotas de mayor tamaño tendrían un comportamiento cinético acorde con la Ley de Stokes.

En el caso de las proteínas nativas no se observó este comportamiento, sino sólo el comportamiento hiperbólico (Figura 5.10). Al encontrarse distintas cinéticas de cremado para las proteínas nativas y las tratadas a pH ácido las constantes determinadas para cada una (nativas: k_g y k_p y tratadas con pH ácido: k_s y k_h) no se pueden comparar. Por lo que se estudió la cinética tomando los valores de RD a una altura del tubo de medida de 10 mm (RD_{10}) ya que se supone que cuanto más cerca del fondo del tubo se realice la medida se detectan menos los efectos del retardo de las gotas de mayor tamaño. Efectivamente, todas las muestras nativas y tratadas a pH ácido presentaron un perfil hiperbólico que se rige por la ecuación 5.6 como se puede observar en las Figuras 5.18, 5.19 y 5.20.

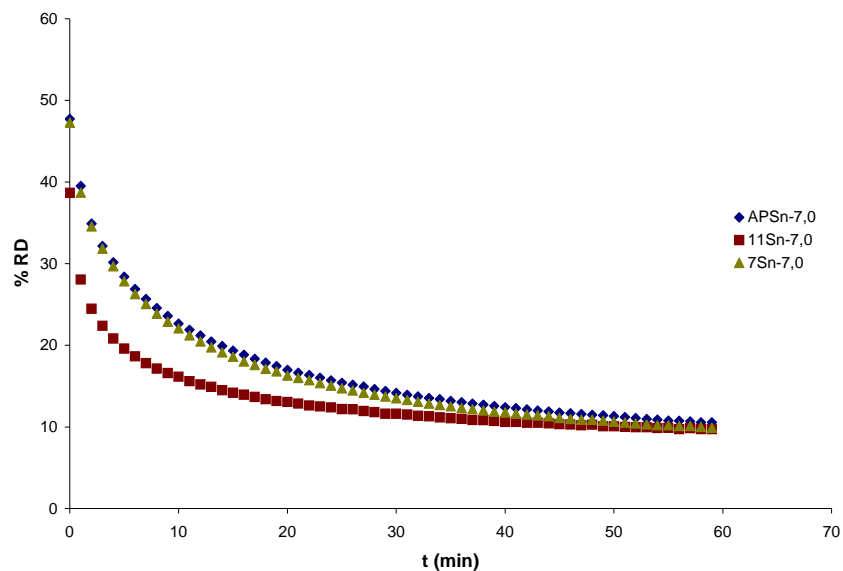


Figura 5.16 Variación de valores promedio de retrodispersión a una altura de 10 mm (RD_{10}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSn-7,0 (◆), 11Sn-7,0 (■) y 7Sn-7,0 (▲).

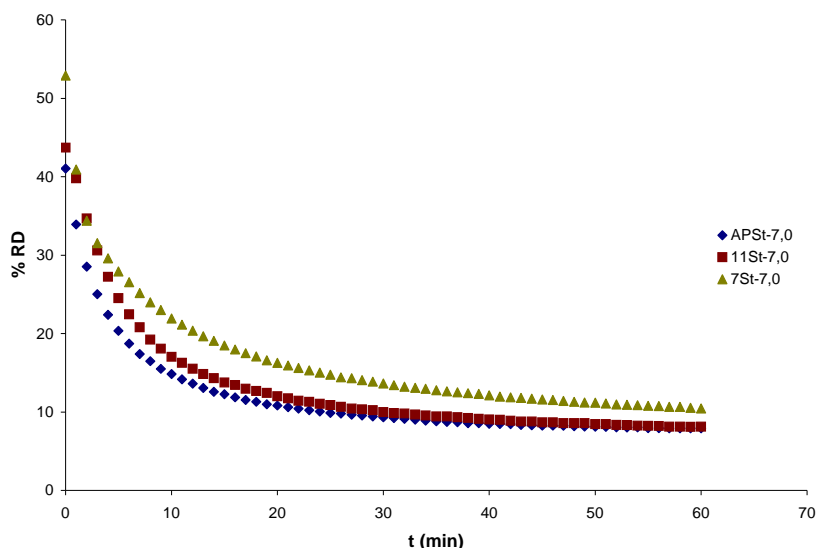


Figura 5.17 Variación de valores promedio de retrodispersión a una altura de 10 mm (RD_{10}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSt-7,0 (◆), 11St-7,0 (■) y 7St-7,0 (▲).

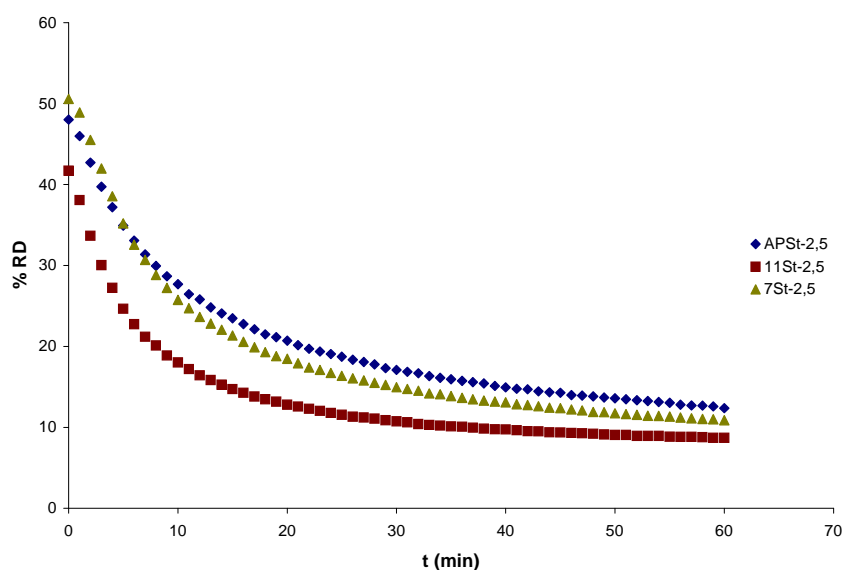


Figura 5.18 Variación de valores promedio de retrodispersión a una altura de 10 mm (RD_{10}) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSt-2,5 (◆), 11St-2,5 (■) y 7St-2,5 (▲).

En la Tabla 5.12 se presentan los valores de k_g , k_p y RD_0 para las emulsiones preparadas con las distintas proteínas en todas las condiciones ensayadas.

Las emulsiones preparadas con las muestras 7Sn-7,0 y APSn-7,0 presentan un k_g menor que 11Sn-7,0 siendo esta última por lo tanto más inestable. Comparando k_p para estas mismas muestras la emulsión más inestable corresponde a la formulada con 7Sn-7,0 ($\alpha \leq 0,05$).

Todas las emulsiones preparadas con 11St-2,5, 7St-2,5 y APSt-2,5 presentaron una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) de los valores de las constantes k_g y k_p respecto a los valores obtenidos para las muestras nativas. Para k_p esta disminución fue de varios órdenes de magnitud, por lo que estas emulsiones presentaron un marcado aumento en la estabilidad al cremado con respecto a las preparadas con las muestras nativas.

Las emulsiones preparadas 11St-7,0 y 11St-2,5, presentaron una disminución de los valores de k_p y k_g con el tratamiento ácido respecto a las emulsiones preparadas con 11Sn-7,0, no existiendo entre las primeras diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$). Las k_p de las emulsiones preparadas con 11St-7,0 y 11St-2,5 fueron varios órdenes de magnitud menores que las preparadas con 11S nativa, lo que indica un pronunciado aumento de la estabilidad respecto al cremado.

En cambio tanto APSt-7,0 como 7St-7,0 presentaron un comportamiento similar, una disminución significativa ($\alpha \leq 0,05$) de k_p (o sea un aumento de la estabilidad al cremado) con respecto a las emulsiones preparadas con proteínas nativas (APSn-7,0 y 7Sn-7,0), siendo ambas constantes del mismo orden de magnitud. Sin embargo la disminución de k_p de APSt-2,5 como 7St-2,5 respecto a las nativas fue de varios órdenes de magnitud por lo que se da un gran aumento de la estabilidad frente al cremado. En cuanto a k_g se detectó un aumento significativo en el caso de 7St-7,0 y APSt-7,0 con referencia a las emulsiones formuladas con las muestras nativas. De lo que se deduce que el comportamiento de APS frente al cremado se rige por el comportamiento de 7S.

Tabla 5.12. Constantes cinéticas de cremado k_p y k_g y retrodispersión a tiempo cero (RD_0) para las emulsiones formadas con las proteínas en estudio.

	$k_p \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_g \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	RD_0
APSn-7,0	9±1 e	9±1 b, c	50±4 d
APSt-7,0	3,0±0,6 b	19±6 d	44±2 b
APSt-2,5	0,0008±0,0002 a	2,1±0,7 a	50±4 b, c, d
11Sn-7,0	8±1 d	17±9 d	38±9 a
11St-7,0	0,0003±0,0002 a	5,8±0,7 a, b	43,8±0,6 b
11St-2,5	0,0005±0,0002 a	6,3±0,7 a, b	43±3 b, c
7Sn-7,0	11,0±0,9 f	9,2±0,5 a, b, c	49±5 b, c, d
7St-7,0	5±1 c	14±11 c, d	48±8 b, c, d
7St-2,5	0,0002±0,0002 a	2,8±0,4 a	50±1 c, d

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

El valor de RD_0 da una idea de la concentración de partículas inicial. Para las emulsiones formuladas con 7S y APS no se observaron diferencias significativas

($\alpha \leq 0,05$) en este valor. En cambio para las emulsiones formuladas con 11S se observó un aumento de los valores de RD_0 con el tratamiento ácido.

De acuerdo a la ley de Stokes (Ecuación 5.8) los parámetros que afectan la velocidad de cremado son el radio de la partícula, la densidad de las fases acuosa y de aceite (que en este estudio no varían) y la viscosidad de la fase continua. Las grandes diferencias encontradas en los valores de k_p entre las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido no se pueden explicar por diferencias en los radios de las gotas de las emulsiones formadas ya que las gotas de diámetro menor a 4 μm no presentaron diferencias significativas en sus valores de $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$. Tampoco los valores de $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ correspondientes a las gotas de diámetro mayor a 4 μm permiten explicar los valores de k_g calculados. Por lo tanto se decidió medir la viscosidad de la fase continua correspondiente a las emulsiones preparadas con las proteínas nativas y tratadas a pH ácido según se describió en el capítulo de Materiales y Métodos (Sección 2.9.3.2).

5.3.2.1.1 Viscosidad de la fase continua de las emulsiones

Como ya se trató en el punto 1.6.4 de la Introducción, en una disolución ideal, el esfuerzo de cizalla, fuerza por unidad de área, F/A , es directamente proporcional a la velocidad de deformación, dv/dr . Dicha relación se expresa como:

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr} \quad (\text{Ecuación 1.16})$$

La constante de proporcionalidad η se denomina coeficiente de viscosidad. Los fluidos que obedecen esta expresión se denominan fluidos newtonianos.

Se determinaron las curvas de flujo de las muestras ensayadas, todas ellas presentaron un comportamiento de tipo newtoniano ya que la viscosidad no varía con el esfuerzo de corte como se observa en las Figuras 5.21, 5.22 y 5.23. Esto es debido a que se trabaja con soluciones diluidas por lo tanto las interacciones proteína-proteína son despreciables.

El cremado generalmente se produce cuando una emulsión está en reposo, y por lo tanto es importante conocer la viscosidad aparente que experimenta una gota a medida que se mueve a través de la fase continua bajo estas condiciones. Típicamente,

la velocidad de cizallamiento que una gota experimenta a medida que crema se encuentra en el rango 10^{-4} a 10^{-7} s^{-1} (Dickinson, 1992).

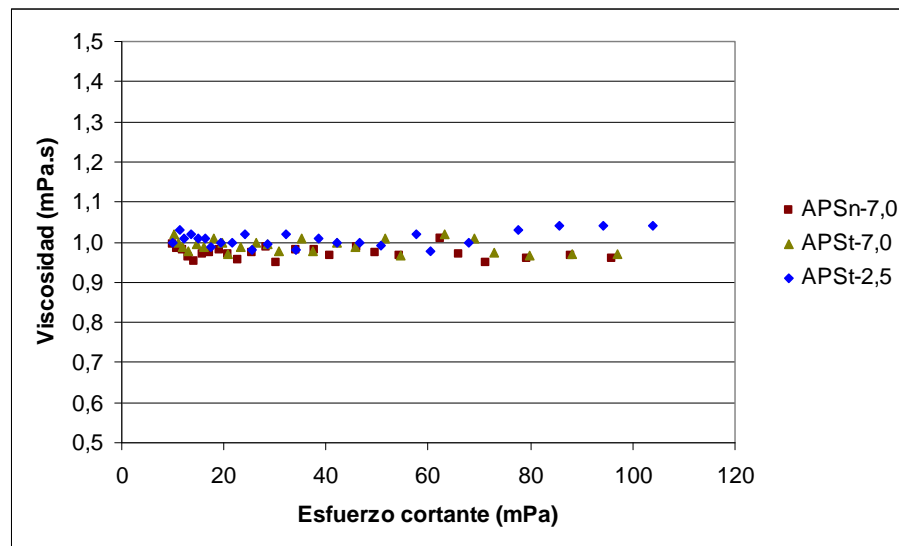


Figura 5.19 Viscosidad de la fase continua de emulsiones preparadas con dispersiones de APSn-7,0 (■), APSt-7,0 (▲) y APSt-2,5 (◆), concentración 1 mg/ml, en buffer fosfato 10 mM.

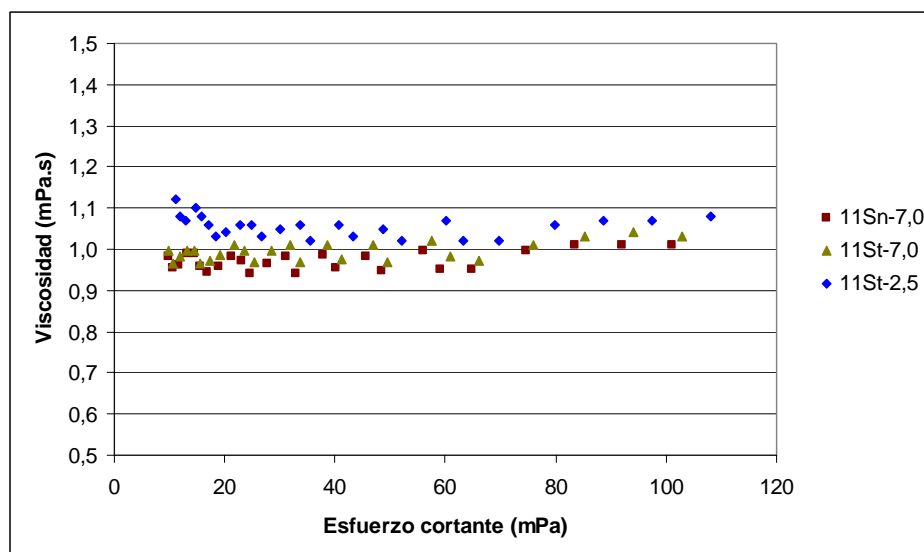


Figura 5.20 Viscosidad de la fase continua de emulsiones preparadas con dispersiones de 11Sn-7,0 (■), 11St-7,0 (▲) y 11St-2,5 (◆), concentración 1 mg/ml, en buffer fosfato 10 mM.

Es importante definir cuidadosamente las propiedades reológicas de la fase continua. Por esta razón, es una buena práctica medir la viscosidad de la fase continua en el intervalo de velocidades de cizallamiento que una gotita de emulsión experimenta durante el procesamiento, el almacenamiento y la manipulación, intervalo

que puede ser tan amplio como 10^{-7} a 10^3 s^{-1} (Dickinson, 1992a). En el presente trabajo se midió la viscosidad a velocidades de cizallamiento de 10 a 100 s^{-1} .

Para calcular la viscosidad se realizó el promedio de las medidas entre los valores de velocidad de cizallamiento de 50 y 100 s^{-1} que corresponden a un esfuerzo cortante de entre 50 y 100 mPa aproximadamente (Tabla 5.13).

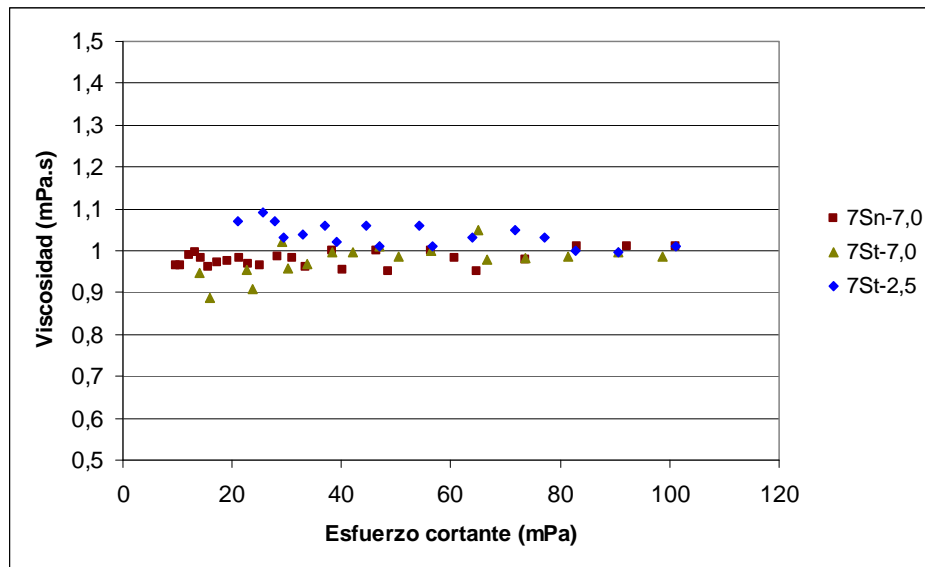


Figura 5.21 Viscosidad de la fase continua de emulsiones preparadas con dispersiones de 7Sn-7,0 (■), 7St-7,0 (▲) y 7St-2,5 (◆), concentración 1 mg/ml, en buffer fosfato 10 mM.

Tabla 5.13 Viscosidad promedio entre los valores de esfuerzo cortante de 50 mPa y 100 mPa de la fase continua de las emulsiones formadas con las proteínas en estudio.

Muestra	Viscosidad (mPa.s)
APSn-7,0	0,98±0,02 a
APSt-7,0	0,98±0,02 a
APSt-2,5	1,02±0,01 b
11Sn-7,0	0,97±0,03 a
11St-7,0	1,01±0,01 b
11St-2,5	1,05±0,03 b
7Sn-7,0	0,99±0,01 a
7St-7,0	1,00±0,01 a, b
7St-2,5	1,02±0,01 b

Letras iguales significa que no existe diferencia significativa entre las muestras con ($\alpha \leq 0,05$)

Para las muestras APSt-2,5, 11St-2,5, 11St-7,0 y 7St-2,5 se encontró un leve aumento de la viscosidad con respecto a APSn-7,0, APSt-7,0, 11Sn-7,0, 7Sn-7,0, 7St-7,0. Las diferencias en la viscosidad de la fase continua encontradas difícilmente expliquen la disminución de k_p para éstas muestras.

5.3.2.1.2 Desviaciones de la ley de Stokes

La ley de Stokes podría ser usada estrictamente sólo para calcular la velocidad de una partícula esférica, rígida y aislada, suspendida en un líquido ideal de extensión infinita (Hiemenz, 1986; Dickinson, 1992a). En la práctica existen a menudo grandes desviaciones entre la velocidad de cremado predicha por la Ley de Stokes y las medidas experimentales de cremado de emulsiones alimentarias debido a que muchas de las suposiciones usadas en la deducción de la Ecuación 5.8 no son válidas. La velocidad de cremado en emulsiones concentradas es menor que en emulsiones diluidas a causa de interacciones hidrodinámicas entre las gotas (Hunter, 1989; Walstra, 1996a). Como en una emulsión las gotas se mueven hacia arriba debido a la gravedad un volumen igual de fase continua debe moverse hacia abajo para compensar. De esta manera existe un flujo neto de fase continua hacia abajo el cual se opone al movimiento hacia arriba de las gotas y de esa manera decrece la velocidad de cremado. Una ecuación semiempírica con la cual se han encontrado predicciones relativamente buenas del comportamiento del cremado de emulsiones concentradas ha sido desarrollada por Hunter (1989):

$$v = v_{\text{Stokes}} (1 - \Phi/\Phi_c)^{k\Phi_c} \quad (\text{Ecuación 5.11})$$

aquí Φ_c y k son parámetros que dependen de la naturaleza de la emulsión. Esta ecuación predice que la velocidad de cremado decrece con el crecimiento de la concentración de gotas hasta que el cremado es completamente inhibido una vez que una fracción de volumen de fase dispersa (Φ_c) ha sido excedida. La variación de la velocidad de cremado de las partículas con respecto a Φ en un sistema monodisperso se muestra en la Figura 5.22 (Pinfield et al., 1994).

Entonces, cuanto mayor es la concentración de gotas más acentuada es la disminución de la velocidad de cremado hasta tal punto que el cremado puede ser completamente inhibido cuando se excede un determinado valor de Φ_c . En general el valor de Φ_c depende del ordenamiento de las gotas en el seno de la emulsión la cual es determinada por su grado de polidispersidad y las interacciones coloidales (Mc Clements, 1999). Entonces, en las emulsiones estudiadas la concentración de partículas

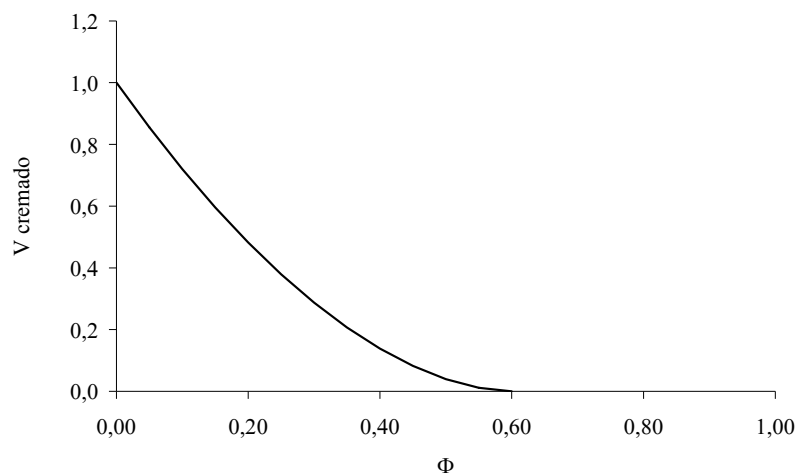


Figura 5.22 Representación de la variación de la velocidad de cremado de las partículas con respecto a Φ en un sistema monodisperso según Pinfield et al. (1994).

puede llegar a ser tal que el efecto de la concentración de gotas y el grado de polidispersión no solo provoque un decrecimiento en la velocidad predicha, tal como ocurre con las emulsiones de tipo hiperbólico, sino que además retarde el movimiento de las gotas más grandes como sucede en la zona de 10 – 20 mm del tubo de medida donde se observan perfiles sigmoideos.

Como se indicó en el punto 5.3.1.2 el tratamiento a pH ácido provocó un corrimiento de la distribución de gotas en términos de número de partículas (Figura 5.5-A, B, C) hacia valores menores de diámetros de partícula y un aumento en el máximo de la curva lo que indica que se incrementó el número de partículas de menor diámetro. Por lo tanto al aumentar la concentración de gotas con el tratamiento a pH ácido se acentuó la disminución de la velocidad de cremado.

Las emulsiones alimentarias poseen un intervalo de tamaños diferentes de gotas (como ya se comprobó en la sección 5.3.1.2), entonces el valor de r^2 de la ecuación 5.8 puede ser reemplazado por $\frac{\sum n_i r_i^5}{\sum n_i r_i^3}$, donde n_i es el número de partículas por unidad de volumen de la clase i con radio r_i (Walstra, 1996b). Las partículas más grandes creman más rápidamente que las más pequeñas por lo que existe una distribución de la velocidad de cremado en la emulsión. Las gotas grandes se mueven hacia arriba más rápidamente y ellas colisionan con las gotas pequeñas (Melik y Fogler, 1988; Dukhin y Sjoblen, 1996), en el caso del presente trabajo, al haber más cantidad de gotas pequeñas en las emulsiones preparadas con proteínas tratadas a pH ácido, estas colisiones son más frecuentes. Por otro lado las gotas de las emulsiones polidispersas tienen la capacidad de llenar los espacios disponibles en forma más efectiva que las gotas en una

monodispersión, dado que las gotas más pequeñas pueden ubicarse entre los huecos dejados por las más grandes (Das y Gosh, 1990). Este fenómeno podría acentuar la disminución de la velocidad de cremado que describe la Ecuación 5.11.

La presencia de una película de moléculas de emulsificante adsorbida en la superficie de la gota afecta la velocidad de cremado por numerosas vías. Primero, por el aumento del tamaño efectivo de las gotas y por tanto la velocidad de cremado es aumentada por un factor de $(1 + \delta/r)^2$ donde δ es el espesor de la capa adsorbida. Típicamente el espesor de una capa adsorbida se encuentra entre 2-10 nm por lo que este efecto es significativo solamente para gotas muy pequeñas ($<0,1\mu\text{m}$). Segundo, la película adsorbida puede alterar la densidad efectiva de la fase dispersa ρ_2 (Tan, 1990). Cuando las gotas están rodeadas por una película adsorbida se puede calcular la densidad efectiva de la fase dispersa asumiendo que el espesor de la película adsorbida es mucho menor que el radio de las gotas ($\delta \ll r$), usando la siguiente ecuación:

$$\rho_2 = (\rho_{\text{gota}} + 3(\delta/r)\rho_{\text{película}})/(1 + 3(\delta/r)) \quad (\text{Ecuación 5.12})$$

La densidad de la película de emulsificante es comúnmente mayor que la de las fases continua y dispersa y por tanto la adsorción de emulsificante aumenta la densidad efectiva de la fase dispersa (Tan, 1990). La densidad de gotas grandes ($r \gg \delta$) es aproximadamente la misma que la de la fase dispersa pero la de las gotas pequeñas puede ser alterada significativamente. Entonces es posible retardar el cremado usando un biopolímero con una actividad de superficie tal que forme una película interfacial de alta densidad. En el caso del presente trabajo esto estaría descartado ya que para el caso de APSt-2,5 y 7St-2,5 disminuyó la concentración de proteína interfacial con respecto a APSn-7,0, APSt-7,0, 7Sn-7,0, 7St-7,0, no existiendo diferencias significativas entre éstas cuatro últimas. Para el caso de 11St-7 y 11St-2,5 hubo un aumento en la concentración de proteína interfacial que podría explicar en parte la disminución de los valores de k_p y k_g para 11S tratada a pH ácido.

Otra gran limitación de la ecuación de Stokes es que esta ignora los efectos del movimiento Browniano en la velocidad de cremado de las gotas de la emulsión (Pinfield et al., 1994). La gravedad favorece la acumulación de gotas ya sea en el cremado como en la sedimentación de la emulsión. Por el contrario, el movimiento Browniano favorece la distribución aleatoria de las gotas a través del total de la emulsión porque esto maximiza la entropía configuracional del sistema. La distribución

en equilibrio de las gotas en una emulsión que es susceptible al cremado y movimiento browniano, está dada por la siguiente ecuación (ignorando el tamaño finito de las gotas) (Walstra, 1996a)

$$\phi(h) = \phi_0 e^{-\frac{4\pi r^3 \Delta \rho g h}{3kT}} \quad (\text{Ecuación 5.13})$$

Donde $\phi(h)$ es la concentración de las gotas a una distancia h de la parte superior de la emulsión y ϕ_0 es la concentración de las gotas en la parte superior de la emulsión. Si $\phi(h) = \phi_0$, entonces las gotas están uniformemente dispersas entre las dos ubicaciones (ej. domina el movimiento Browniano), pero si $\phi(h) \ll \phi_0$, las gotas tienden a acumularse en la parte de arriba de la emulsión (ej. predomina el cremado). Se ha propuesto que si $\phi(h)/\phi_0$ es menor que aproximadamente 0,02, entonces la influencia del movimiento Browniano es despreciable en el comportamiento de cremado de la emulsión (Walstra, 1996a). Esta condición la encuentran las gotas cuando el radio es menor que aproximadamente 0,025 μm , lo cual no es el caso de las emulsiones estudiadas en este trabajo como se deduce de la distribución de tamaño de partícula (Sección 5.3.1.2).

En muchas emulsiones las gotas se agregan para formar flóculos. El tamaño y estructura de los flóculos dentro de la emulsión tienen una gran influencia sobre la velocidad a la cual las gotas creman (Bremer, 1992; Bremer et al, 1993; Walstra, 1996a; Pinfield et al, 1997). Cuando la concentración de gotas es baja o intermedia, donde los flóculos no interactúan sustancialmente con otros flóculos, la floculación tiende a incrementar la velocidad de cremado porque los flóculos tienen un tamaño efectivo más grande que las gotas individuales. Este fenómeno puede ser compensado por el hecho que la diferencia de densidad entre los flóculos y el líquido que los rodea se reduce. En emulsiones concentradas la floculación retarda el cremado porque se forma una red tridimensional de flóculos agregados, lo cual previene el movimiento de las gotas individuales (Mc Clements, 1999) (Figura 5.23). La concentración de gotas a la cual el cremado es evitado depende de la estructura de los flóculos formados. Con una fracción de volumen de fase dispersa baja, cuando las gotas en un flóculo están empaquetadas más sueltamente puede formarse una red y entonces el cremado es evitado a baja concentración de gotas (Mc Clements, 1999) (Figura 5.23). Este empaquetamiento de flóculos suelto o abierto tiende a formarse cuando existe una fuerte atracción entre las gotas.

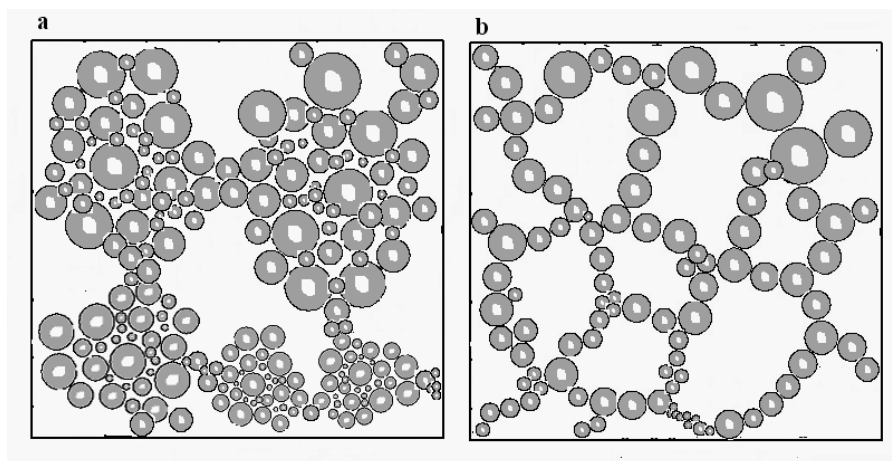


Figura 5.23 Estructura de red de flóculos según la concentración de fase dispersa a) concentración de fase dispersa alta: empaquetamiento de flóculos agregados b) concentración de fase dispersa baja: empaquetamiento de flóculos abierto (adaptado de Mc Clements, 1999).

La velocidad de cremado también puede ser retrasada por la formación de flóculos con estructura de red abierta. Palazolo et al (2004) informaron que emulsiones preparadas con aislado (DSI) y suero (DWSP) de proteína de soja desnaturalizados térmicamente, individualmente y con condiciones de concentración de proteína y pH iguales a las del presente estudio, presentaron una formación de flóculos con estructura de red abierta y a su vez menor tendencia a cremar en comparación con las correspondientes fracciones nativas (NDSI y NWSP). También es importante señalar que en las curvas de RD vs tiempo (Figura 5.24) las emulsiones preparadas con DSI y DWSP presentaban un comportamiento de tipo sigmoideo, mientras las preparadas con las fracciones nativas no, lo que estaría indicando que las emulsiones elaboradas con las fracciones de proteínas desnaturalizadas tenían un marcado efecto de retraso de la velocidad de cremado. Palazolo et al. (2004) consideraron que la mayor resistencia al cremado se debía al hecho que las emulsiones preparadas con DWSP y DSI mostraban una estructura de flóculos abierta favorecida por su mayor H_o debido a la desnaturalización experimentada previamente por las proteínas.

Las muestras tratadas a pH ácido, también presentaron una estructura desnaturalizada y un mayor H_o . Entonces, en principio podría tenerse en cuenta como otra posible causa del retraso de la velocidad de cremado, la existencia de flóculos con estructura de red abierta. En la sección 5.3.1.3 se observó que, a pesar de tener un grado de floculación bajo (GF1), las gotas de menor tamaño (diámetro menor a 4 μm) se

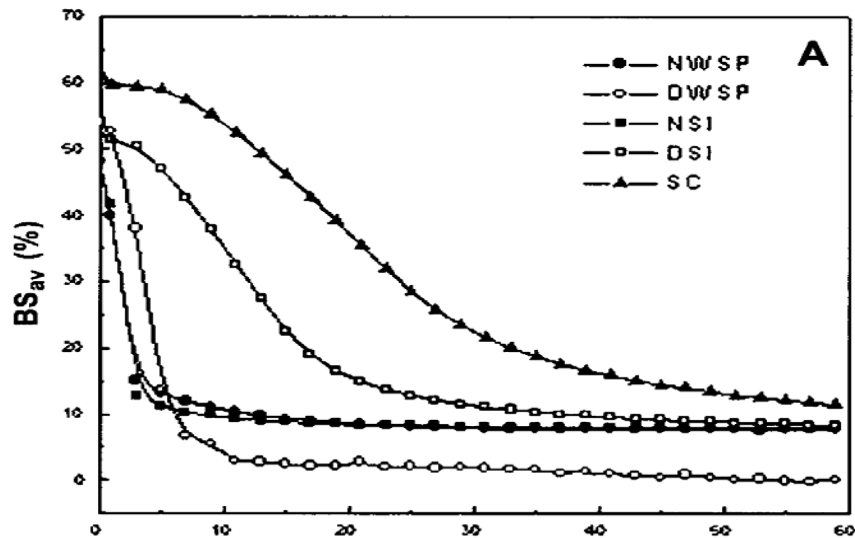


Figura 5.24 Representación de RD_p (BS_{av} en la figura) en función del tiempo de emulsiones preparadas con las proteínas estudiadas en el trabajo de Palazolo et al. 2004.

encontraban en mayor proporción en las emulsiones recién preparadas con proteínas tratadas a pH ácido que en las preparadas con muestras nativas. Según Palazolo et al. (2004) aunque los flóculos existan en condiciones estáticas, son inestables bajo las condiciones de medida de tamaño de gota - alta dilución y flujo turbulento - en especial cuando se trata de emulsiones preparadas con fracciones volumétricas bajas o intermedias - $\phi = 0,33$ - y concentraciones bajas de proteínas (1 mg/ml). Este fenómeno evidentemente también ha de depender de la intensidad de las fuerzas de interacción entre las gotas floculadas.

La fase continua de muchas emulsiones alimentarias es no-newtoniana y tiene algunas características elásticas. Como consecuencia, es importante considerar cual es la viscosidad más apropiada para usar en la ecuación de Stokes (van Vliet y Walstra, 1989; Walstra, 1996a). El cremado ocurre generalmente cuando una emulsión está en reposo, y por lo tanto es importante conocer la viscosidad aparente que experimenta una gota a medida que se mueve a través de la fase continua bajo esas condiciones. Generalmente, la velocidad de cizallamiento que experimentan las gotas a medida que van cremando se encuentra aproximadamente entre 10^{-4} y 10^{-7} s^{-1} (Dickinson, 1992a). Las soluciones de biopolímeros tienen viscosidades aparentes altas a bajas velocidades de cizallamiento, lo que significa que las gotas creman muy lentamente (Walstra, 1996a). En el caso de este trabajo la fase continua tiene propiedades de fluido newtoniano como ya se describió en el punto 5.3.2.1.1

Las gotas de las emulsiones cargadas tienden a moverse más lentamente que las gotas no cargadas por dos razones (Dickinson y Stainsby, 1982; Walstra 1996a). Primero, las interacciones de repulsiones electrostáticas entre las gotas igualmente cargadas implica que ellas no puedan acercarse tanto como las gotas no cargadas, por lo tanto a medida que las gotas se mueven hacia arriba existe una gran probabilidad de que sus vecinas sean atrapadas en el flujo descendente de la fase continua. Segundo, la nube de contracciones que rodea a la gota se mueve más lentamente que la propia gota causando un desbalance en la carga eléctrica que se opone al movimiento de la gota.

Las fracciones 11S y 7S constituyentes de los aislados de proteína de soja presentan pIs diferentes y relativamente alejados de pH 7,0 y 2,5 que son los pHs a los que se prepararon las emulsiones en estudio (pI 11S: 6,4 y pI 7S: 4,8), por lo cual es de esperar que dichas proteínas presenten una determinada carga superficial. Es por tanto esperable que en todas las situaciones estudiadas las gotas de las emulsiones formadas hayan presentado carga superficial y por ende hayan tendido a moverse más lentamente que si no hubieran estado cargadas. Con el tratamiento ácido 11S quedó totalmente desnaturizada y sus aminoácidos cargados expuestos tanto a pH 7,0 como a pH 2,5 (capítulo 3 sección 3.2.2) esto podría explicar la disminución de las velocidades de cremado (k_p y k_g) para 11St-7,0 y 11St-2,5. En cambio 7St tiene su mayor grado de desnaturización a pH 2,5 y quizás en esta conformación exponga más sus aminoácidos cargados por lo que podría ser un motivo por el cual 7St-2,5 presentó los menores valores de k_p y k_g , con respecto a 7Sn-7,0 y 7St-7,0. La conformación adoptada por 7St a pH 7,0 podría ser que expusiera menos aminoácidos cargados por lo cual presentó un k_g más alto que 7Sn-7,0 y 7St-2,5. APS seguiría la misma tendencia que 7S.

5.3.2.2 Estabilidad de la emulsión frente a la floculación y coalescencia

En la zona indicada como II de la Figura 5.9 se puede apreciar la fase crema que permaneció después que las gotas de aceite se acumularon en la parte superior del tubo. Para comparar las fases crema de las diversas emulsiones ensayadas, los perfiles de RD vs la altura del tubo, que se muestran en la Figura 5.8, fueron divididos en las zonas A, B y C, correspondientes respectivamente a la parte baja, media y alta de la fase crema (Figura 5.25). El perfil de todas las emulsiones, representativo de las distintas condiciones estudiadas, presenta un pico en la zona A, atribuido a la acumulación de gotas pequeñas con baja velocidad de cremado (Palazolo et al., 2005). En la zona C

aparece otro pico como resultado de la presencia de espuma en las emulsiones. Para analizar el proceso de coalescencia en la fase crema, es necesario reducir al mínimo la incidencia de los procesos de acumulación de gotas minúsculas y de burbujas de aire, por lo tanto, en la zona media (B) de la fase crema, una caída en el perfil de RD puede ser considerado como la disminución del número de gotas, generada principalmente por coalescencia o por coalescencia más un proceso de floculación (Palazolo et al., 2005).

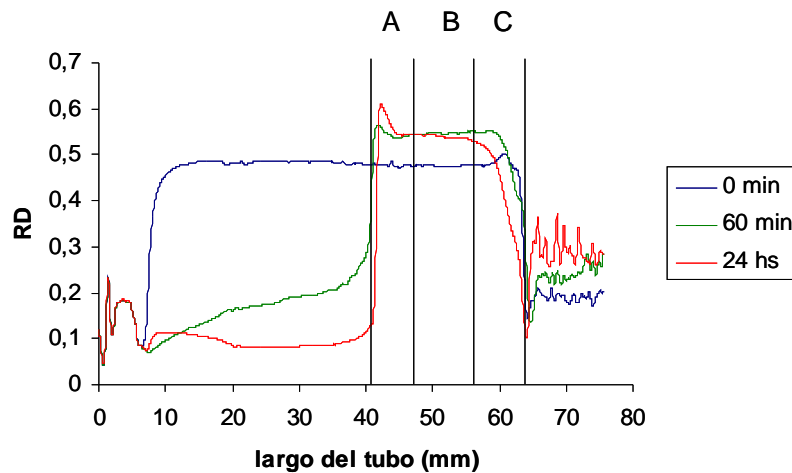


Figura 5.25 Gráfico de RD en función del largo del tubo de emulsiones preparadas con 11Sn-7,0, concentración 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, medida a los tiempo 0 min (—), 60 min (—) y 24 hs (—) de desestabilización.

Aunque la migración de las gotas debido al cremado puede existir, este proceso debe estar reducido al mínimo por la alta concentración de gotas en la fase crema (Mc Clements, 1999). Cuando las emulsiones están preparadas con proteínas como único agente emulsificante, en bajas concentraciones y condiciones estáticas (Britten y Giroux, 1991), la coalescencia es un mecanismo de desestabilización lento en comparación con el cremado y la floculación. Por lo tanto un almacenamiento de las emulsiones bajo condiciones estáticas, a temperatura ambiente y por 24 h, se considera tiempo suficiente para detectar coalescencia (Palazolo et al., 2005).

5.3.2.3 Cinética de desestabilización en la fase crema

Para analizar la cinética de desestabilización en la fase crema, se registró la variación de los valores RD promedio de la zona B (50-53 mm), obtenidos de los perfiles del RD, en función del tiempo (0 – 60 minutos) para todas las emulsiones

ensayadas. El tiempo necesario para que RD alcance un valor máximo (RD_{máx.}) es indicativo del balance entre las velocidades de acumulación y disminución del número de gotas. En la mayoría de las emulsiones estudiadas en este trabajo el valor máximo de RD se obtuvo a los 60 minutos lo que indica una velocidad lenta de formación de una fase crema estable (Figuras 5.26, 5.27, 5.28).

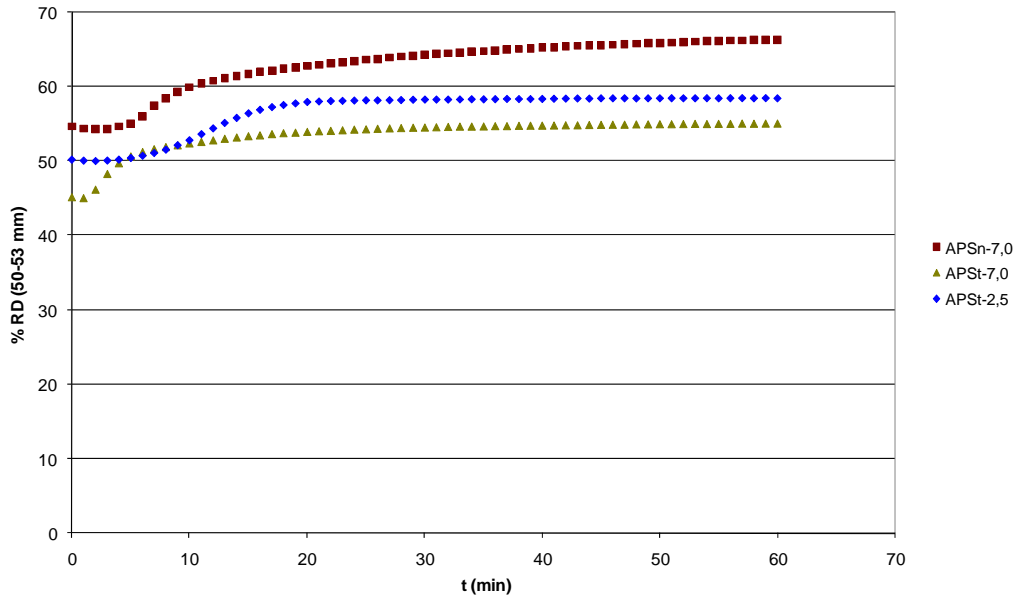


Figura 5.26 Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con APSn-7,0 (■), APSt-7,0 (▲) y APSt-2,5 (◆)

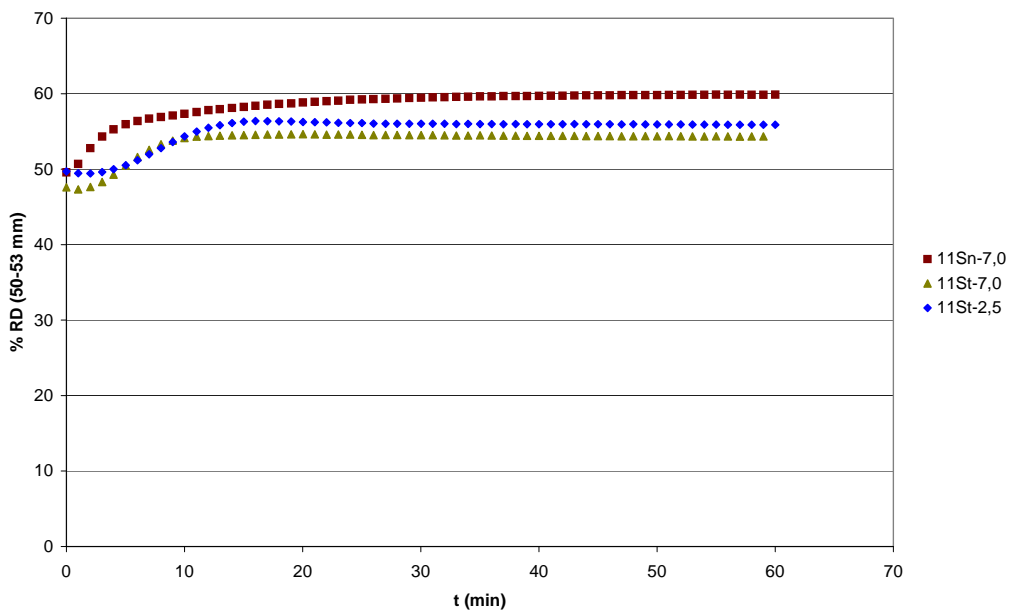


Figura 5.27 Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con 11Sn-7,0 (■), 11St-7,0 (▲) y 11St-2,5 (◆)

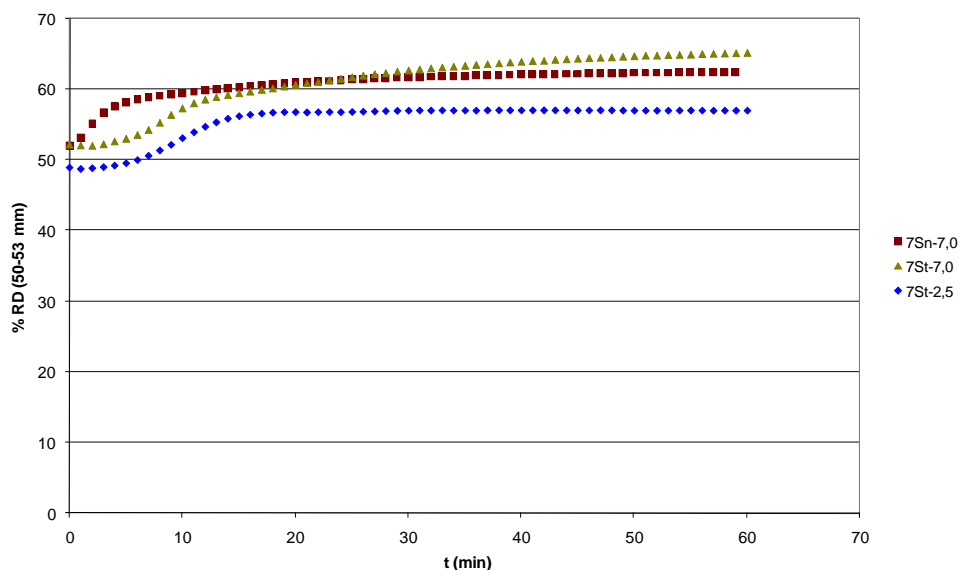


Figura 5.28 Variación de los valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm (RD 50-53) en función del tiempo de emulsiones preparadas con 7Sn-7,0 (■), 7St-7,0 (▲) y 7St-2,5 (◆)

Tabla 5.14 Grado de desestabilización global (%D) de las emulsiones en estudio

Muestra	%D
APSn-7,0	No presenta
APSt-7,0	No presenta
APSt-2,5	No presenta
11St-7,0	$2,0 \pm 0,7$
11St-7,0	No presenta
11St-2,5	$1,8 \pm 0,8$
7Sn-7,0	No presenta
7St-7,0	No presenta
7St- 2,5	No presenta

Los valores de D (%) fueron obtenidos a partir de los perfiles de RD. Este parámetro permitió cuantificar la desestabilización global de la fase crema desde su formación hasta el final de su almacenamiento (24 horas). Puesto que es un índice de la disminución de RD, asociado a un número más bajo de partículas, puede ser relacionado con la coalescencia y/o floculación. En la Tabla 5.14 se muestran los valores de D% calculados según la Ecuación 2.24 para todas las condiciones ensayadas. Las emulsiones preparadas, en las diversas condiciones estudiadas, fueron estables a los

procesos de floculación y coalescencia, como se evidencia por los valores de D%, que en ningún caso superaron el 2%. En las emulsiones preparadas con 11St a pH 2,5 y 11Sn a pH 7,0, la zona B (50 – 53 mm) presentó una pequeña disminución en el perfil de RD a las 24 horas en comparación con el perfil obtenido durante la primera hora de desestabilización, mientras que en las emulsiones que se corresponden con APSt, 7St a pH 2,5 y pH 7,0 y 11St a pH 7,0 no mostraron esa disminución. Estos resultados indican que en el primer grupo de emulsiones se pudo haber producido un aumento del tamaño de gota en la fase crema durante las 24 horas de almacenamiento.

Durante el proceso de migración de gotas hacia la parte superior del tubo, las mismas colisionan entre sí y en este lapso de tiempo la estabilidad de la emulsión frente a la coalescencia está principalmente gobernada por la repulsión estérica entre las capas del surfactante adsorbido y las propiedades viscoelásticas de la película de surfactante. Existen también otros factores importantes que influyen directamente sobre la estabilidad a la coalescencia tales como el comportamiento reológico del film interfacial y la reología global de la fase crema, la cual está afectada fundamentalmente por la existencia de flóculos y su grado de hidratación. (McClements, 1999).

En todos los casos la película interfacial formada fue lo suficientemente fuerte para resistir los procesos de floculación y coalescencia que ocurren en la fase crema ya que no existió desestabilización o ésta fue insignificante.

El grado de hidratación de la fase crema se estimó mediante la Ecuación 2.25 a partir del volumen relativo de fase crema (V_f) calculado de acuerdo a la Ecuación 2.26 de los perfiles de %RD correspondiente a las 24 horas de almacenamiento. Todas las emulsiones presentaron un grado de hidratación de aproximadamente 0,7% y no presentando diferencias significativas entre ellas ($\alpha \leq 0,05$).

5.3.3. Análisis de Imagen

El límite de resolución teórico de un microscopio óptico es de aproximadamente 0,2 μm , pero en la práctica es difícil observar imágenes claras de partículas de tamaño menor a 1-2 μm debido al diseño del instrumento y al movimiento browniano de las gotas. Por lo tanto, las gotas pertenecientes a la población I (0,04-4 μm) que poseen el menor tamaño y son las mayoritarias en número, no se observan de forma completa. Por lo tanto, las micrografías nos brindan una información parcial de la microestructura de

las emulsiones. Lo que se puede observar claramente es si las gotas visibles están o no floculadas y las características de los flóculos formados.

La información con respecto de la determinación del tamaño promedio de gota coincide con los resultados obtenidos por análisis de imagen microscópico ya que estas últimas medidas fueron realizadas inmediatamente después de formada la emulsión (Figuras 5.29 a 5.32). En todas las figuras se observa floclación de las gotas en concordancia con lo observado en la determinación de grado de floclación. Si bien el grado de floclación determinado en el análisis de tamaño de partícula fue bajo, esto se pudo deber a que la floclación pudo haber sido causada por interacciones por depleción y como estas son de carácter débil son desarmadas en este análisis (Palazolo et al., 2004). Algunos de estos flóculos parecen responder a una forma reticular o abierta, encontrándose interconectados unos a otros en forma de collares.

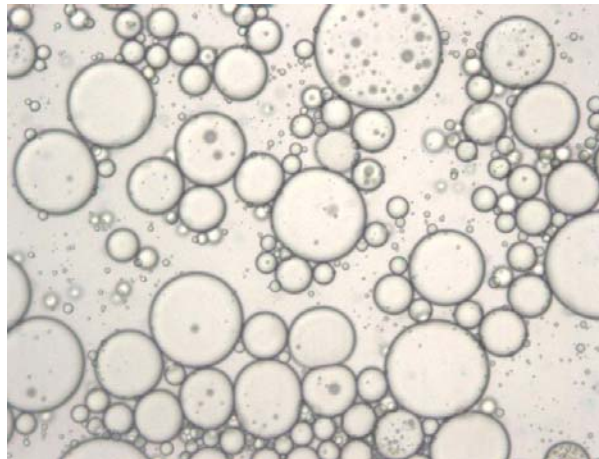


Figura 5.29 Imagen microscópica de emulsión preparada con APSn en una concentración de 1 mg/ml a pH 7 a tiempo 0 de medida

Es también evidente el grado de polidispersión de las emulsiones obtenidas dada la presencia de gotas de diversos diámetros. En la Figura 5.30 se pueden observar partículas en un proceso de coalescencia que se hace notorio por el adelgazamiento de la película que rodea las gotas en la zona de unión (se muestra con un círculo rojo).



Figura 5.30 Imagen microscópica de emulsión preparada con APSt en una concentración de 1 mg/ml a pH 7 a tiempo 0 de medida

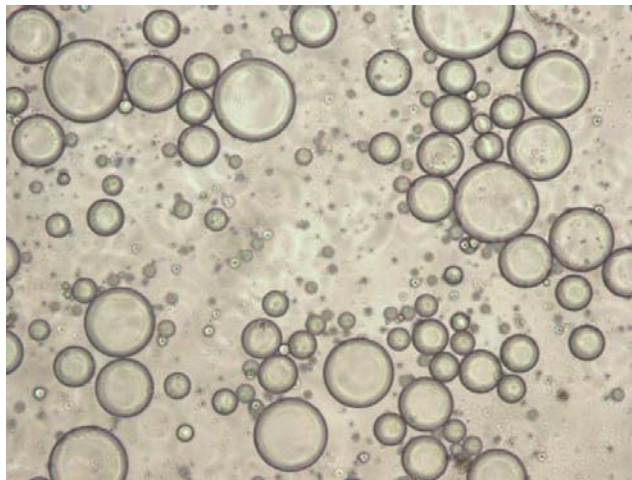


Figura 5.31 Imágen microscópica de emulsión preparada con 7Sn en una concentración de 1 mg/ml a pH 7 a tiempo 0 de medida

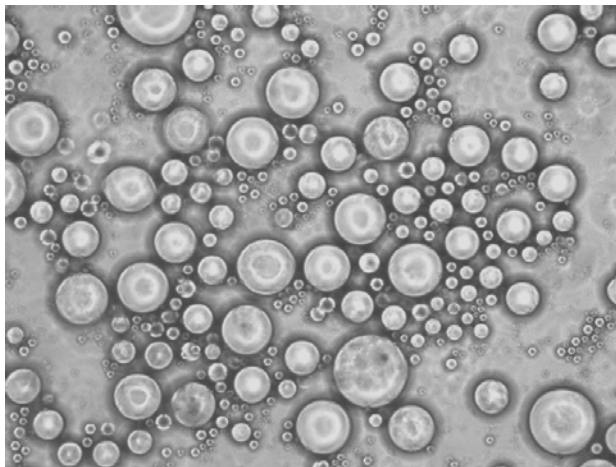


Figura 5.32 Imágen microscópica de emulsión preparadas con 7St en una concentración de 1 mg/ml a pH 7 a tiempo 0 de medida

5.4 Resumen y Conclusiones Parciales

- ✓ La constante de velocidad de adsorción (k_a) presentó diferencias significativas entre las muestras nativas y tratadas a pH ácido, mientras que la constante velocidad de reordenamiento (k_r) en la interfase no ($\alpha \leq 0,05$). Lo que indicaría que sólo el proceso de adsorción global a la interfase fue afectado por el tratamiento a pH ácido.
- ✓ Todas las muestras presentaron un comportamiento puramente elástico. En el caso de las muestras tratadas a pH ácido se observó un aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) de E y E_d lo que estaría relacionado con un aumento en la resistencia de la película interfacial.
- ✓ El valor de $D_{4,3}$ para las partículas menores y mayores a $4 \mu\text{m}$ no se modificó como consecuencia del tratamiento a pH ácido. En cambio para gotas de diámetros menores a $4 \mu\text{m}$ hubo una disminución de los valores de $D_{3,2}$ y un aumento en el número de gotas.
- ✓ Todas las emulsiones estudiadas presentaron un grado de floculación bajo, no mayor del 46%. Las emulsiones preparadas con 11St-7,0 y 7St-2,5 presentaron el mayor grado de floculación.
- ✓ Las muestras tratadas a pH ácido en general fueron más estables al cremado que las muestras nativas. La velocidad de cremado (k_p) de las gotas menores a $4 \mu\text{m}$ disminuyó con el tratamiento ácido. En cambio para las gotas mayores a $4 \mu\text{m}$ si bien hubo una tendencia a la disminución de la velocidad de cremado con el tratamiento ácido, las emulsiones preparadas con 7St-7,0 y APSt-7,0 presentaron un aumento de la velocidad de cremado.
- ✓ Las posibles causas de la mayor estabilidad de las muestras tratadas a pH ácido serían, el aumento significativo ($\alpha \leq 0,05$) en la concentración de proteína interfacial (Γ) en el caso de 11S y de las repulsiones electrostáticas entre las gotas que estaban cargadas.

- ✓ La velocidad de cremado también pudo ser retrasada por la formación de flóculos con estructura de red abierta: aunque en la determinación de tamaño de partícula de las emulsiones recién preparadas el grado de floculación fue bajo, las microfotografías ópticas mostraron flóculos que parecen responder a una forma reticular o abierta, interconectados unos a otros en forma de collares.

- ✓ Las emulsiones, elaboradas en las diversas condiciones de ensayo presentaron un bajo % D (RD_{50-53}) a 24 horas de almacenamiento, evidenciando estabilidad frente a los procesos de floculación y coalescencia en la fase crema formada. Este hecho se correlaciona directamente con el alto porcentaje de hidratación de las muestras, el contenido de agua intersticial de agua habría sido suficiente para evitar la floculación y coalescencia.

Capítulo 6

CONCLUSIONES FINALES

6.- CONCLUSIONES FINALES

Mediante el análisis del perfil térmico de las muestras se determinó que el tratamiento con pH ácido (pH 2,5) provocó una desnaturalización parcial de la β -conglucina recuperando parte de su conformación nativa o adoptando otra conformación diferente a pH 8,0. Sin embargo, se produjo una desnaturalización total de la glicina a pH ácido la cual no fue revertida (o la cual fue irreversible) a pH 8,0. También se observó en los termogramas de 7S una contaminación de ésta con 11S, lo cual fue confirmado por SDS-PAGE. La desnaturalización afectó la solubilidad de las fracciones proteicas en las condiciones ensayadas y produjo un aumento significativo de la hidrofobicidad superficial.

La principal diferencia entre las proteínas nativas y tratadas a pH ácido, con respecto a la cinética de modificación de la tensión superficial, radicó en la velocidad con que se experimenta el cambio de valor de tensión superficial o interfacial y no en el valor alcanzado en el equilibrio de la misma, tanto para las interfases aire-agua como aceite-agua.

Los valores de la constante de velocidad para el proceso de reordenamiento (k_r) en la interfase aire-agua no presentaron diferencias significativas entre las proteínas de APS y 11S nativas y tratadas a pH ácido, pero sí la presentó 7S, probablemente debido a los diferentes estados conformacionales alcanzados y su menor masa molecular. En cuanto a la constante de adsorción (k_a), para 7S se encontró un aumento de la misma debido al tratamiento a pH ácido que estaría relacionado con los cambios estructurales sufridos por la proteína por efecto del tratamiento a pH 2,5. En cambio, 11S y APS no presentaron diferencias en los valores de k_a correspondientes a las muestras nativas y tratadas a pH ácido. La proteína 11S fue la que dominó en el comportamiento del aislado.

Las películas proteicas en la interfase aire-agua presentaron un comportamiento predominantemente elástico. Los valores de E y E_d de las muestras APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5 más altos que los correspondientes a APSn-8,0, 11Sn-8,0, 7Sn-8,0, APSt-8,0, 11St-8,0, 7St-8,0. Por lo que las películas formadas APSt-2,5, 11St-2,5 y 7St-2,5 fueron más resistentes a las deformaciones. También se observó un aumento en el módulo dilatacional viscoso (E_v) para las muestras tratadas a pH ácido evaluadas en un medio a pH 8,0, lo cual también aumentó la resistencia de la película.

La espumabilidad del aislado y de las fracciones mejoró con el tratamiento ácido (V_{LEmax} y v_o). La estabilidad al drenado gravitacional del aislado y las fracciones mejoró con el tratamiento a pH ácido (k_g disminuyó). Las espumas de APSn presentaron una menor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald (mayor k_d) que las espumas de APSt por la presencia de una película más resistente (aumento en los valores de E_v y E_d) que impidió el pasaje de gas. Las espumas de 7Sn presentaron una mayor estabilidad frente a la desproporción de Ostwald que 7St-8,0 y 7St-2,5 probablemente debido al mayor tamaño de las burbujas presentes en las espumas preparadas con 7Sn. Las espumas formadas con 11Sn y 11St no presentaron diferencias significativas entre los valores de k_d ($\alpha \leq 0,05$). En todos los casos ensayados la proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior al volumen drenado correspondiente a la desproporción.

En el caso de la interfase agua-aceite, sólo el proceso de adsorción global a la interfase fue afectado por el tratamiento a pH ácido. 11S presentó un aumento en la velocidad del proceso de adsorción (k_a) con el tratamiento a pH 2,5, no existiendo diferencias entre 11St-7,0 y 11St-2,5. Este aumento de la tasa de adsorción estaría relacionado con el aumento de la hidrofobicidad superficial por efecto del tratamiento a pH ácido.

Para 7S el proceso de adsorción de las muestras tratadas a pH ácido fue más lento que el correspondiente a la muestra nativa. Esta disminución de la adsorción estaría relacionada con los cambios estructurales sufridos por la proteína por efecto del tratamiento con pH ácido.

APSt-2,5 presentó una mayor velocidad de adsorción que APSn y APSt-7,0. Todas las muestras presentaron un comportamiento puramente elástico en la interfase aceite-agua. Las muestras tratadas a pH ácido, al tener mayores E y E_d , presentaron mayor resistencia de la película interfacial que las nativas.

Entre las emulsiones preparadas con muestras nativas y tratadas a pH ácido hubieron diferencias en el tamaño de las gotas, presentando dos poblaciones de partículas con diámetros mayor y menor a $4 \mu m$.

Las muestras tratadas a pH ácido en general fueron más estables al cremado que las muestras nativas. La velocidad de cremado (k_p) de las gotas menores a $4 \mu m$ disminuyó con el tratamiento ácido. En cambio para las gotas mayores a $4 \mu m$ si bien hubo una tendencia a la disminución de la velocidad de cremado con el tratamiento ácido, 7St-7,0 y APSt-7,0 presentaron un aumento. Entre las posibles causas de la mayor estabilidad

de las muestras tratadas a pH ácido están: el aumento de la viscosidad de la fase continua, repulsiones electrostáticas entre las gotas que estaban cargadas y en el caso de 11S un aumento en la concentración de proteína interfacial (Γ).

Todas las emulsiones, elaboradas con proteínas nativas y tratadas con pH ácido, en las diversas condiciones de ensayo, fueron estables a los procesos de floculación y coalescencia en la fase crema formada.

En conclusión, en términos generales, el tratamiento a pH ácido mejoró las propiedades espumantes y emulsificantes del aislado y las fracciones 11S y 7S de soja.

Capítulo 6

BIBLIOGRAFÍA

7.-BIBLIOGRAFÍA

- Aksenenko, E. V.; Kovalchuk, V. I.; Fainerman, V. B. y Miller, R. (2006). Surface dilatational rheology of mixed adsorption layers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 122, 57-66.
- Anand, K. y Damodaran, S. (1995). Kinetics of adsorption of lysozyme and bovine serum albumin at the air/water interface from a binary mixture. *Journal of Colloid and Interface Science*. 176, 63-73.
- Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G., y le Denmat, M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En *Food emulsions and dispersions*. Editado por Anton, M. Research Signpost, Kerala, India. 15-28.
- Añón, M. C. (2004). Relación entre propiedades estructurales y funcionales de hidratación de proteínas de soja. *Revista Aceites y Grasas*. 54, 2-7.
- Argos, P.; Narayana, S. V. L. y Nielsen, N. C. (1985). Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *EMBO Journal*. 4, 1111-1118.
- Arteaga, G. E.; Li-Chan, E.; Nakai, S.; Cofrades, S. y Jimenez Colmenero, F. (1993a). Ingredient interaction effects on protein functionality: mixture design approach. *Journal of Food Science*. 58, 656-662.
- Arteaga, G. y Nakai, S. (1993b). Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties. *Journal of Food Science*. 58, 1152-1156.
- Badley, R. A.; Atkinson, O.; Hauser, H.; Oldani, D.; Green, J. P. y Stubbs, J. M. (1975). The structure, physical and chemical properties of the soybean proteins glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 412, 214-228.

- Badui Dergal, S. (2006a). Soya. En: *Química de los Alimentos*. Editado por Baduí Dergal, S. Pearson Educación, Mexico. 633-650.
- Badui Dergal, S. (2006b). Lípidos. En: *Química de los Alimentos*. Editado por Baduí Dergal, S. Pearson Educación, Mexico. 245-300.
- Benjamins, J.; Cagna, A. y Lucassen-Reynders, E. (1996). Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered with proteins. *Colloid and Surfaces*. 114, 245-254.
- Benjamins, J. y Lucassen-Reynders, E.H. (1998). Surface dilatational rheology of proteins adsorbed at air/water and oil/water interfaces. En: *Proteins at Liquid Interfaces*. Editado por Möbius y Miller D.R. Elsevier Science, Amsterdam, 341–384.
- Beverung, C.J.; Radke, C.J. y Blanch H.W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophys. Chem.* 81, 59-80.
- Bigelow, C. (1967). On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *Journal of Theoretical Biology*. 16, 187-211.
- Bos, M.A.; Dunnewind, B. y Van Vliet, T. (2003). Foams and surface rheological properties of beta-casein, gliadin and glycinin. *Colloids and surfaces B-Biointerfaces*. 31, 95 – 105
- Bos, M. A. y van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Protein Chemistry*. 91, 437- 471.
- Bremer, L. G. B. (1992). Theoretical and experimental. study of the fractal nature of the structure of particle gels. Tesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

- Bremer, L. G. B.; Bijsterbosch, B. H.; Walstra, P. y van Vliet, T. (1993). Formation, properties and fractal structure of particle gels. *Advances in Protein Chemistry*. 46, 117-128.
- Britten, M.; y Giroux, H. J. (1991). Coalescence index of protein-stabilised emulsions. *Journal of Food Science*. 56, 792–795.
- Brooks, J. R. y Morr, C. V. (1985). Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 62, 1347 -1354.
- Carp, D. J. (2001). Formación y estabilidad de espumas de proteínas de soja: efecto de la desnaturalización térmica y de la interacción con polisacáridos. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Carrera-Sánchez, C. y Rodriguez-Patino, J.M. (2005). Interfacial, Foaming and Emulsifying Characteristics of Sodium Caseinate As Influenced by Protein Concentration in Solution. *Food Hydrocolloids*. 19, 407-416.
- Catsimpoolas, N. y Ekenstam, C. (1969). Isolation of alpha, beta and gamma conglycinin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 129, 490-497.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J. L. y Lorient D. (1985). Amino acid, Peptides and Proteins. En: *Food Chemistry*. Editado por Fennema, O.R. Marcel Dekker. New York. 245-369.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L. y Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias; bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Acribia, Zaragoza, España.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L. y Lorient, D. (1993). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: *Química de los Alimentos*. Editado por Fennema, O. W. Acribia, Zaragoza. 275 - 414.

- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. En: *Food proteins*. Editado por Kinsella, J. E. y Souci, W. G. AOCS Press, Champaign, USA. 21-51.
- Damodaran, S. (1990). Interfaces, protein films, and foams. En *Advances in Food and Nutrition Research*. Editado por Kinsella, J. E. Academic Press, Inc. San Diego, USA. 34, 1-79.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and proteins. En: *Food chemistry*. Editado por Fennema, O. R. Marcel Dekker, New York, USA. 321–429.
- Damodaran, S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. En: *Food proteins and their applications*. Editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel Dekker, New York, USA. 57–110.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*. 70, 54 – 66.
- Damodaran, S. y Anand, K. (1997). Sulfhydryl-disulfide interchange–induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 3813–3820.
- Damodaran, S. y Kinsella, J. E. (1982). Effect of conglycinin on the thermal aggegration of glycinin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 30, 812-817.
- Damodaran, S. y Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*. 954, 253-264
- Damodaran, S. y Xu, S. (1996). The Role of Electrostatic Forces in Anomalous Adsorption Behavior of Phosvitin at the Air/Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 178, 426-435.

- Das, A. K. y Ghosh, P. K. (1990). Concentrated emulsions. Investigation of polydispersity and droplet distortion and their effect on volume fraction and interfacial areal. *Langmuir*. 6, 1668-1675.
- Davis, J.P. y Foegeding, E.A. (2007). Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 54, 200–210.
- Deak, N. A.; Murphy, P. A. y Johnson L.A. (2007). Characterization of fractionated soy proteins produced by a new simplified procedure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84, 137–149.
- Derbyshire, E.; Wright, D.J. y Boulter D. (1976). Legumin and vicilin storage protein of legume seeds. *Phytochemistry*. 15, 3-24.
- Dicharry, C.; Arla, D.; Sinquin, A.; Gracia, A. y Bouriat, P. (2006). Stability of Water/Crude Oil Emulsions based on Interfacial Dilatational Rheology. *Journal of Colloid and Interface Science*. 297, 785-791.
- Dickinson, E. (1992a). An introduction to food colloids. Oxford Science Publications, Oxford, UK.
- Dickinson, E. (1992b). Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 88, 2973-2983.
- Dickinson, E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions Stability, rheology and interactions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 94, 1657-1669.
- Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 15, 161–176.

- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 20, 197–210.
- Dickinson, E.; Golding, M. y Povey, M. (1997). Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 185, 515-529
- Dickinson, E. y Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 13, 26–30.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Food*. Applied Science Publishers, London, UK.
- Dukhin, S.; Sjøblom, J. (1996). Kinetics of brownian and gravitational coagulation in dilute emulsions. En: *Emulsions and emulsions stability*. Editado por Sjøblom, J. Marcel Dekker, New York. 41-180.
- Durand, M.; Martinoty G. y Langevin D. (1999). Liquid flow through aqueous foams: From the plateau border-dominated regime to the node-dominated regime. *Physical Review E*, 60, R6307-R6308
- Elizalde, B. E.; Giaccaglia, D.; Pilosof, A. M. R. y Bartholomai, G. B. (1991). Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. *Journal of Food Science*. 56, 24-26, 30.
- Erickson, J.S., Sundaram, S. y Stebe, K.J. (2003). Evidence that the induction time in the surface pressure evolution of lysozyme solutions is caused by a surface phase transition. *Langmuir*. 16, 5072–5078.
- Freer, E.; Yin, K.; Fuller, G. y Radke, C. (2004). Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface: Comparison of Shear and Dilatation Deformation Surface Dilational Modulus or Gibbs' Elasticity of Protein Adsorption Layers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 108, 3835-3844.

- Foegeding, E.A.; Luck, P.J. y Davis, J.P. (2006). Factors determining the physical properties of foams. *Food Hydrocolloids*. 20, 284-292.
- Friberg, S. (1997). Emulsion stability. En: *Food Emulsions*, Third edition, revised and expanded. Editado por S. E. Friberg y K. Larsson. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 1-55.
- Fukushima, D. (1991a). Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Reviews International*. 7, 356–381.
- Fukushima, D. (1991b). Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition. *Food Reviews International*. 7, 323-351.
- Gálvez Mariscal, A., Flores Arguëllo, I., Farrés González, A. (2006). Proteínas. En: *Química de los Alimentos*, editor Baduí Dergal, S., cuarta edición, Pearson Educación, México.
- Gau, C-S.; Yu, H. y Zografí, G. (1994). Surface Viscoelasticity of β -Casein Monolayers at the Air/Water Interface by Electrocapillary Wave Diffraction. *Journal of Colloid and Interface Science*. 162, 214-221.
- Gayler, K. R. y Sykes, G. E. (1981). β -conglycinins in developing soybean seeds. *Plant Physiology*. 67, 958-961.
- German, J. B.; O'Neill, T. E. y Kinsella, J. E. (1985). Film Forming and Foaming Behavior of Food Proteins. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 62.1358-1366.
- González-Tello, P.; Camacho, F.; Guadix, E.M.; Luzón, G. Y González, P.A. (2009). Density, viscosity and surface tension of whey protein concentrate solutions. *Journal of Food Process Engineering*. 32, 235–247.

- Graham, D. E. y Phillips, M. C. (1976). The conformation of proteins at the air-water interface and their role in stabilizing foams. En *Foam*, editado por Akers, R. J. Academic Press, New York, USA. 237-255.
- Graham, D. y Phillips, M. (1979). Proteins at liquid interfaces. III Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*. 70, 427-433.
- Graham, D. y Phillips, M. (1980a). Proteins at liquid interfaces. IV. Dilatational properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 76, 227-239.
- Graham, D. y Phillips, M. (1980b). Proteins at liquid interfaces. V. Shear properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 76, 240-250.
- Gueguen J, Cerletti P (1994) Proteins of some legume seeds: soybean, pea, fababean and lupin. En: *New and Developing Sources of Food Proteins*. Editado por Hudson, B.J.F. Chapman and Hall. Londres, UK. 145-183.
- Hall, G. M. (1996). Basic concepts. En: *Methods of testing protein functionality*. Editado por Hall, G. M. Chapman y Hall. London, UK. 1-10.
- Halling, P. J. (1981). Protein stabilized foam and emulsions. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 15, 155-203.
- Hashizume, K. y Watanabe, T. (1979). Influence of heating temperature on conformational changes of soybean protein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 43, 683-690.
- Hayakawa, S. y Nakai, S. (1985). Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *Journal of Food Science*. 50, 486-491.
- Hermansson, A. M. (1978). Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *Journal of Texture Studies*. 9, 33-58.

- Hermansson, A. M. (1979a). Aggregation and denaturation involved in gel formation. En: *Functionality and Protein Structure*. Editado por Pour-El, A. ACS Symposium Series, Washington, USA. 92, 81–103.
- Hermansson, A. M. (1979b). Aspects of protein structure rheology and texturization. En: *Food Texture and Rheology*. Editado por Sherman P. Academic Press, New York, USA. 265-282.
- Hermansson, A. M. (1986). Soy protein gelation. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 63, 658-666.
- Hiemenz, P. C. (1986). Principles of Colloid and Surface Chemistry. Marcel Dekker, New York, USA.
- Hill, S. E. (1998). Emulsions and foams. En: *Functional properties of food macromolecules*. Editado por Hill, S. E.; Ledward, D. A. y Mitchell, J. R. Aspen Publishers, Inc., Maryland, USA. 302-334.
- Hirano, H.; Kagawa, H.; Kamata, Y. y Yamaguchi, F. (1987). Structural homology among the major 7S globulin subunits of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry*. 26, 41-45.
- Horne, D. S. y Rodríguez Patino, J. M. (2003). En: *Biopolymers at Interfaces*. Editado por Malmsten, M. Marcel Dekker, New York, USA. 857-900.
- Hunter, R. J. (1989). Rheology of Colloidal Dispersions. En: *Foundations of Colloid Science*. Oxford University Press, New York, USA. 2, Capítulo 18.
- Hymowitz, T. (2008). The History of the Soybeans. En: *Soybeans: chemistry, production, processing and utilization*. Editado por Johnson, L.A.; White, P.J.; Galloway, R. AOCS Press, Urbana, Illinois, USA. 1-32.

- Iwabuchi, S., Watanabe, H. y Yamauchi, F. (1991). Observation on the Dissociation of β -conglycinin into Subunits by Heat Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 34-40.
- Iwabuchi, S., y Yamauchi, F. (1987). Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 200-2005.
- Israelachvili, J. N. (1992). Intermolecular and surface forces. Academic Press, New York, USA. 176–178.
- Kato, A. y Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 624, 13-20.
- Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N. y Kobayashi, K. (1983). Changes in emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47, 33–38.
- Kim, S. M. (1985). Structure, surface properties and foam stability of native, reduced and succinylated soy 11S globulins. Tesis de Doctorado, Cornell University.
- Kim, S. H. y Kinsella, J. E. (1985). Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of govine serum albumin. *Journal of Food Science*. 50, 1526-1530.
- Kim, S. H. y Kinsella, J. E. (1987). Surface active properties of food proteins: Effects of reduction of disulfide bonds on film properties and foam stability of glycinin. *Journal of Food Science*. 52,128-131.
- Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 7, 219-280.

- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 56, 242–258.
- Kinsella, J. E. (1981). Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry*. 7, 273-288.
- Kitabatake, N. y Doi, E. (1982). Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*. 47, 1281-122, 1225.
- Koelsch, P. y Motschmann, H. (2005). Relating Foam Lamella Stability and Surface Dilational Rheology. *Langmuir*. 21, 6265-6269.
- Koshiyama, I. (1968). Factors influencing conformation changes in a 7S protein of soybean globulins by ultracentrifugal investigations. *Agricultural and Biological Chemistry*. 32, 879-887.
- Koshiyama, I. (1969). Distribution of the 7S proteins in soybean globulins by gel filtration with Sephadex G-200. *Agricultural and Biological Chemistry*. 33, 281-284.
- Koshiyama, I. (1972). Comparison of acid induced conformation changes between 7S and 11S globulin in soybean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 23, 853-859
- Koshiyama, I. (1983). Storage proteins of soybean. En: *Seed Proteins Biochemistry, Genetics, Nutritive value*. Editado por Gottschalk, W. y Müller, H. P. Martinus Nijhoff and Dr W. Junk Publishers, The Haghe, The Netherlands. 427-450.
- l'Anson, K.J.; Bacon, J.R.; Lambert, N.; Miles, M.J.; Morris, V.J.; Wright, D. J.; Nave, C. (1987). Synchrotron radiation wide-angle x-ray-scattering studies of glycinin solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 9, 368 - 370.
- Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J.; Hessing, M; Gruppen, H. y Voragen, A. G. J. (2000a). Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular

structure at ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1985-1990.

Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J.; Hessing, M; Gruppen, H. y Voragen, A. G. J. (2000b). Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1991-1995.

Lawrence, M. C. (1999). Structural relationships between 7S and 11S globulins. En: *Seed Proteins*. Editado por Shewry, P. R. y Casey, R. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Netherlands. 517-541.

Lawrence, M. C.; Suzuki, E.; Varghese, J. N.; Davis, P. C.; van Donkelaar, A.; Tulloch, P. A. y Colman, P. M. (1990). The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Angstrom resolution. *EMBO Journal*. 9, 9-15.

Langevin, D. (2000). Influence on interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 88, 209-222.

Lei, M. G. y Reeck, G. R. (1987). Two-dimensional electrophoretic analysis of the proteins of isolated soybean protein bodies and of the glycosylation of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 296-300.

Loisel, W.; Guéguen, J. y Popineau, Y. (1993). A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. En *Food Proteins. Structure and functionality*; editado por Schwenke, K. D. y Mothes, R. VCH, Weinheim, Germany. 320-323.

Lowry, O. H.; Rosebroug, H. J.; Lewis. A. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Lucassen-Reynders, E. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*. 12, 1-12.

- Lucassen-Reynders, E. y Kuijpers, K. (1992). The role of interfacial properties in emulsification. *Colloids Surfaces*. 65, 175-184.
- Mackie, A. R. y Wilde, P. J. (2005). The role of interactions in defining the structure of mixed protein-surfactant interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 117, 3-12.
- Maldonado-Valderrama, J; Martín-Rodríguez, A.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Miller, R; Langevin, D. y Cabrerizo-Vílchez, M. A. (2008). Foams and emulsions of β -casein examined by interfacial rheology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 323,116–122.
- Maruyama, N.; Adachi, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Kohno, M.; Takenaka, Y.; Okuda, E.; Nakagawa, S.; Mikami, B. y Utsumi, S. (2001). Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *European Journal of Biochemistry*. 268, 3595-3604.
- Markwell, M. A.; Haas, S. M.; Bieber, L. L. y Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87, 206–210.
- Martin, A. H.; Bos, M. A. y van Vliet, T. (2002). Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air_water interface. *Food Hydrocolloids*. 16, 63-71.
- Martin, A.H.; Grolle, K.; Bos, M.A.; Cohen-Stuart, M.A. y van Vliet, T. (2002). Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*. 254, 175–183.
- Maruyama, N.; Ramlan; M.; Salleh, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Goto, H.; Hontani, N.; Nakagawa, S. y Utsumi, S. (2002). The Effect of the N-Linked Glycans on Structural Features and Physicochemical Functions of Soybean β -Conglycinin Homotrimers. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 79, 139-144.

- McClements, J. (1999). Food emulsions. Principles, practice and techniques. CRC Press. USA.
- McClements, J. (2005). Food emulsions. Principles, practice and techniques, 2nd. Ed. CRC Press, USA.
- Medrano, C. A. (2009). Obtención de proteínas lácteas glicosiladas y evaluación de las modificaciones en las propiedades funcionales de las mismas. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay.
- Melik, D. H. y Fogler, H. S. (1988). Fundamentals of colloidal stability. En: *Quiescent media. Encyclopedia of Emulsion Technology*. Editado por Becher, P. Marcel Dekker, New York, USA. 3, 3-78.
- Miller, R.; Fainerman, V. B.; Leser, M. E. y Michel, M. (2004). Kinetics of adsorption of proteins and surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 9, 350-36.
- Miller, R.; Fainerman, V.B.; Makievski, A.V.; Krägel, J.; Grigoriev, D.O.; Kazakov, V.N. y Sinyachenko, O.V. (2000). Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*. 86, 39-82.
- Mitidieri, F.; Puppo, M. y Wagner, J. (2001). Comportamiento reológico y coalescencia de fase crema de emulsiones estabilizadas por aislados de soja en Ingeniería de Alimentos. 275-280. En: *Nuevas Fronteras en el siglo XXI. Tomo I: Propiedades físicas y aspectos fisicoquímicos en relación con los procesos alimentarios*. Editado por Fito, P.; Mulet, A.; Chiralt A. y Andrés A. Editorial UPV, Valencia, España.
- Mitidieri, F. E. y Wagner, J. R. (2002). Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*. 35, 547-557.

- Monahan, F. J.; McClements, D. J. y Kinsella, J. E. (1993). Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1826–1829.
- Monsalve, A.; Schechter R. S. (1984). The stability of foams: Dependence of observation on the bubble size distribution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 97, 327–335.
- Morita, S., Fukase, M.; Yamaguchi, M.; Fukuda, Y. y Morita, Y. (1996). Purification, characterization and crystallization of single molecular species of beta-conglycinin from soybean seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60, 866–873.
- Murphy, P.A. (2008). Soybean Proteins. En: *Soybeans: chemistry, production, processing and utilization*. Editado por Johnson, L.A.; White, P.J.; Galloway, R. AOCS Press, Urbana, Illinois, USA. 229-268.
- Murray, B.S. (1997). Equilibrium and dynamic surface pressure-area measurements on protein films at air-water and oil-water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 125, 73-83.
- Nagano, T.; Hirotsuka, M.; Kohyama, K.; Nishinari, K. (1992). Dynamic Viscoelastic Study on the Gelation of 7S Globulin from Soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, 941-944.
- Nakai, S.; Li-Chan, E. y Hayakawa, S. (1986). Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Nahrung*. 30, 327-336.
- Nakamura, T.; Utsumi, S. y Mori, T. (1984). Network formation in thermally induced gelation of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32, 647-651.
- Nash, A.M.; Kwolek, W. F. y Wolf, W. J. (1974). Extraction of soybean proteins with aqueous 2-mercaptoethanol. *Cereal Chemistry*. 51, 220-227.

- Nielsen, N. C. (1985). Structure of soy proteins. En: *New protein foods: Seed storage proteins*. Editado por Altschul, A. M. y Wilcke, H. L. Academic Press, Orlando, USA. 5, 27-64.
- Oakenfull, D.; Pearce, J. y Burley, R. W. (1997). Protein gelation. En: *Food Proteins and Their Applications*. Editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel. Dekker, New York, USA. 111–142
- O’Keefe, S.F.; Wilson, L.A.; Resurreccion, A.P. y Murphy, P.A. (1991). Determination of the binding of hexanal to soy glycinin and β -conglycinin in an aqueous model system using headspace technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1022-1028.
- Ogawa, T.; Bando, N.; Tsuji, H.; Nishikawa, K. y Kitamura, K. (1995). Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 57, 1030-1033
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A. y Wagner, J. R. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in water emulsions. *Journal of the American Oil of Chemists’ Society*. 81, 625–632.
- Palazolo, G. G.; Sorgentini, D. A. y 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.
- Panizzolo, L. A. (2005). Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay.
- Panizzolo, L.A.; Mussio L.E. y Añón, M.C. (2012). A Kinetic Description for the Destabilization Process of Protein Foams. *International Journal of Food Properties*. 15, 60-68.

- Peng, I. C.; Quass, D. W.; Dayton, W. R. y Allen, C. E. 1984. The Physicochemical and Functional Properties of Soybean 11S Globulin — A review. *Cereal Chemistry*. 61, 480–490.
- Pernollet, J.C. y Mosse, J. (1983). Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. En: *Seed proteins*. Editado por: Daussant, J.; Mosse, J.; Vaughan, J. Academic Press, New York, USA. 155-191.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. (1994). The relationship between the method of preparation and the structural and functional properties of soy protein isolates. Part I: Structural and hydration properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42, 2161-2169.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. (1995). Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2001-2006.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. (1996). pH-induced modifications in thermal stability of soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 3005-3009.
- Phillips, M. C. 1977. The Conformation and Properties of Proteins at Liquid Interfaces. *Chemistry and Industry*. 5, 170-176.
- Phillips, R. D. y Beuchat, L. R. (1981). Enzyme modification of proteins. En *Protein Functionality in Foods*. Editado por Cherry, J. P. American Chemical Society, Washington DC, USA. 275-298.
- Phillips, L. G.; Whitehead, D. M. y Kinsella J. E. (1994). Functional properties of proteins. En *Structure-function properties of food proteins*. Editado por Phillips, L. G.; Whitehead, D. M. y Kinsella, J. E. Academic Press, San Diego, USA. 108-110.

- Pinfield, V. J.; Dickinson, E. y Povey, M. J. W. (1994). Modelling of Concentration Profiles and Ultrasound Velocity Profiles in a Creaming Emulsion: Importance of Scattering Effects. *Journal of Colloid and Interface Science*. 166, 363-374.
- Pinfield, V. J.; Dickinson, E. y Povey, M. J. W. (1997). Modeling of combined creaming and flocculation in emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 186, 80–89.
- Plietz, P.; Damaschun, G.; Müller, J.J. y Schlesier, B. (1983a). Comparison of the structure of the 7S globulin from *Phaseolus vulgaris* in solution with the crystal structure of 7S globulin from *Canavalia ensiformis* by small angle X-ray scattering. *FEBS Letters*. 162, 43-46.
- Plietz, P.; Damachun, G.; Muller, J. J. y Schwenke, K. D. (1983b). The structure of 11-S globulins from sunflower and rape seed. A small-angle X-ray scattering study. *European Journal of Biochemistry*. 130, 315-320.
- Plietz, P.; Drescher, B. y Damaschun, G. (1987). Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11S seed globulins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 9, 161-165
- Prins, A. (1988). Principles of foam stability. En: *Advances in Food Emulsions and Foams*. Editado por Dickinson, E. y Stainsby, G. Elsevier: London. 91–122.
- Puppo, M. C. (1997). Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Puppo, M. C. y Añón, M. C. (1999). Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. *Journal of Food Science*. 64, 50-56.
- Puppo, M.C.; Speroni, F.; Chapleau, N.; de Lamballerie, M.; Añón, M. C. y Antón, M. (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*. 19, 289–296.

- Rao, C.S. y Damodaran, S. (2000). Is surface pressure a measure of interfacial water activity? Evidence from protein adsorption behavior at interfaces. *Langmuir*. 16, 9468–9477.
- Rao, M. A.; Damodaran, S.; Kinsella, J. E. y Cooley, H. J. (1986). Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions. En: *Food Engineering and Process Application: Transport Phenomena*. Editado por Lemagher, M. y Jelen, P. Basel, Applied Science Publishers, New York, USA. 38-49.
- Razumovsky, L y Damodaran, S. (1999). Surface activity—Compressibility relationship of proteins. *Langmuir*. 15, 1392–1399.
- Reichelt, R.; Schwenke, K. D.; König, T.; Pâhtz, W. y Wangermann, C. (1980). Electron microscopic studies for estimation of the quaternary structure of the 11s globulin (Helianthinin) from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.), *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 175, 653-663.
- Relkin, P. y Sourdet, S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. 19, 503-511.
- Renkema, J. M. S. 2001. Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Tesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Rickert, D.A.; Johnson, L.A. y Murphy, P.A. (2004). Improved fractionation of glycinin and beta-conglycinin and partitioning of phytochemicals. *J Agric Food Chem*. 52:1726-1734.
- Robins, M. (2000). Emulsions-creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 265-272.

- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R. y Carrera Sánchez, C. (1999). Structural and morphological characteristics of β -casein monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*. 13, 401-408.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. A. y Carrera Sánchez, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air-water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 8, 387-395.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R. y Carrera Sánchez, C. (2007). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 12, 187-195.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R. y Carrera Sánchez, C. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*. 140, 95-113.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M.R. y Carrera Sánchez, C. (2009). Implicaciones de las propiedades interfaciales en las características espumantes de proteínas lácteas. En: *Funcionalidad de Componentes Lácteos*. Editado por Fontecha, J.; Recio, I. y Pilosof, A.M.R. CEE Limencop, S.L., España. 71-92.
- Rodríguez Patino, J.M.; Rodríguez Niño, M.R.; Carrera Sánchez, C.; Molina Ortiz S.E. y Añón, M.C. (2005). Dilatational properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface from acidic solutions. *Journal of Food Engineering*. 68, 429-437.
- Salager, J. L.; Andérez, J. M. y Forgiarini, A. (2003). Influencia de la formulación sobre las espumas. *Cuaderno Firp 263-A*. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Santiago, L.G.; Maldonado-Valderrama, J.; Martín-Molina, A.; Haro-Pérez, C.; García-Martínez, J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M.A. y Gálvez-Ruiz, M.J. (2008). Adsorption of soy protein isolate at air-water and oil-water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 323, 155-162.

- Saulnier, P.; Boury, F.; Malzert, A.; Heurtault, B.; Ivanova, T.; Cagna, A.; Panaïotov, I. and Proust, J.E. (2001). Rheological model for the study of dilational properties of monolayers. Comportment of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the dichloromethane (DCM)/water interface under ramp type or sinusoidal perturbations. *Langmuir*. 17, 8104-8111.
- Schubert, H. y Armbruster, H. (1992). Principles of formation and stability of emulsions. *International Chemical Engineering*. 32, 14–28.
- Scilingo, A. (2000). Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja modificados. Efecto de la presencia de calcio. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Segumpta, T.; Razumovsky L. y Damodaran, S. (1999) Energetics of Protein–Interface Interactions and Its Effect on Protein Adsorption. *Langmuir*. 15, 6991-7001.
- Shattuck-Eidens, D. N. y Beachy, R. N. (1985). Degradation of beta-conglycinin in early stages of soybean embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 78, 895–898.
- Schwenke, K. D. (1975). Vegetable seed globulins as dissociating and associating protein systems. *Nahrung*. 19, 69-82.
- Schwenke, K. D.; Knopfe, C.; Mikheeva, L. M. y Grinberg, V.Y. (1998). Structural changes of legumin from faba beans (*Vicia faba* L.) by succinylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2080-2086
- Schwenke, K. D.; Raab, B.; K. J. Linow, K. J.; Pähz, W. y Uhlig, J. (1981). Seed proteins. XIII. Isolation of the 12 S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.) and characterization as a "neutral" protein. *Nahrung*. 25, 271-280.
- Shimada, K. y Matsushita, S. (1980). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28, 413-417.

- Sorgentini, D. A.; Wagner, J. R.; Arrese, E. L. y Añón, M. C. (1991). Water imbibing capacity of soy protein isolates: influence of protein denaturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 39, 1386-1391.
- Sorgentini, D. A. ; Wagner, J. R. y Añón, M. C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure: function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2471-2479.
- Souto, G. (2009). Oleaginosas y derivados: situación y perspectivas. En: Anuario OPYPA 2009 -MGAP, Montevideo, Uruguay.
- Souto, G. (2011). Oleaginosas y derivados: situación y perspectivas. En: Anuario OPYPA 2011 -MGAP, Montevideo, Uruguay.
- Staswick, P. E.; Hermodson, M. A. y Nielsen, N. C. (1981). Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*. 256, 8752-8755.
- Stubenrauch, C.; Miller, R. (2004). Stability of Foam Films and Surface Rheology: An Oscillating Bubble Study at Low Frequencies. *Journal of Physical Chemistry B*. 108, 6412-6421.
- Sykes, G. E. y Gayler, K. R. (1981). Detection and characterization of a new β -conglycinin from soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 210, 525-530.
- Tan, C. T. (1990). Beverage emulsion. En *Food emulsion*. Editado por Friberg, S. y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Tcholakova, S.; Denkov, N.D.; Sidzhakova, D.; Ivanov, I.B. y Cambell, B. (2003). Interrelation between drop size and protein adsorption at various emulsification conditions. *Langmuir*. 19, 5640–5649.

- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1976a). Heterogeneity of beta-conglycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 439, 326–338.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1976b). Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24, 1117-1121.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1977). β -conglycinin from soybean proteins isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 490, 370-384.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1978a). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26, 692-695.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1978b). Major proteins of soybean seeds. Reconstitution of β -conglycinin from its subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26, 695-698.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. (1979). Major Proteins of Soybean Seeds. Reversible and Irreversible Dissociation of β -Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27, 805-809.
- Tornberg, E. (1979). The adsorption behaviour of proteins at an interface as related to their emulsifying properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76, 105-123.
- Tornberg, E. y Ediriweera, N. (1988). Factors that influence the coalescence stability of protein-stabilized emulsion from the proportion of oil extracted by hexane. *Journal of Science and Food Agriculture*. 46, 93-113.

- Tornberg, E.; Granfeldt, Y. y Hakanson, C. (1982). A comparison of the interfacial behavior of three food proteins absorbed at air water and oil water interfaces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 33, 904-917.
- Tornberg, E.; Olsson, A.; y Person, K. (1997). The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions. En: *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Editado por Friberg, S. E. y Larsson, K. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 267-391.
- Townsend, A. y Nakai, S. (1983). Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science*. 48, 588-594.
- Tripp, B.C.; Magda, J.J. y Andrade, J.D. (1995). Adsorption of Globular-Proteins at the Air/Water Interface as Measured Via Dynamic Surface-Tension - Concentration-Dependence, Mass-Transfer Considerations, and Adsorption- Kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science*. 173, 16-27.
- Tolstoguzov, V. B. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. En: *Food Proteins. Structure and Functionality*. Editado por Schwenke, K. D. y Mothes, R. VCH, Weinheim, Germany. 203–209.
- Tulloch, P. A. y Blagrove, R. J. (1985). Electron microscopy of seed-storage globulins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 241, 521–532.
- Utsumi, S.; Matsumura, Y. y Mori, T. (1997). Structure-Function relationships of soy proteins. En *Food Proteins and Their Applications*. Editado por Damodaran, S. y Paraf, A. Marcel Dekker, New York. 257-291.
- Utsumi, S.; Nakamura, T.; Harada, K. y Mori, T. 1987. Occurrence of dissociable and undissociable soybean glycinin. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51, 2139-2144.

- van Aken, G.; Blijdenstein, T. y Hotrum, N. (2003). Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilised emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 8, 371-379
- van Vliet, T.; Martin, A. H. y Bos, M. A. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opininion in Colloid and Interface Science*. 7, 462 - 468.
- van Vliet, T. y Walstra, P. (1989). Weak particle networks. En *Food Colloids*. Editado por Bee, R. D.; Richmond, P. y Mingins, J. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 206-217.
- Visser, A. y Thomas, A. (1987). Review: Soya protein products-their processing, functionality, and application aspects. *Food Reviews International*. 3, 1-32.
- Vojdani, F. (1996). Solubility. En *Methods of Testing Protein Functionality*. Editado por Hall, G. M. Chapman and Hall, London, UK. 11 –60.
- Voutsinas, L. P.; Cheung, E. y Nakai, S. (1983a). Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *Journal of Food Science*. 48, 26-32.
- Voutsinas, L. P.; Nakai, S. y Harwalkar, V. R. (1983b). Relationships between protein in hydrophobicity and thermal functional properties of food protein. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 16, 185-190.
- Wagner, J.R. (2000). Propiedades superficiales. En: *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Editado por Bartholomai, W. y Pilosof, A. M. R. Editorial EUDEBA, Argentina. 41-74.
- Wagner, J. R. y Añón, M. C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhidryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolate. *Journal of Food Science*. 50, 765-770.

- Wagner, J. R. y Gueguen, J. (1995). Effects of dissociation, deamidation and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 1993-2000.
- Wagner, J. R. y Gueguen, J. (1999). Surface functional properties of native, acid treated, and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2173-2180.
- Wagner, J. R.; Sorgentini, D. A. y Añón, M. C. (1996). Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 1881-1889.
- Walstra, P. (1983). Formation of Emulsions. En: *Encyclopedia of emulsion technology*. Editado por Becher, P. Marcel Dekker, New York, USA. 1, 57-127.
- Walstra, P. (1989). Principles of foam formation and stability. En: *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. Editado por Wilson, A. J. Springer-Verlag, London, UK. 1-15.
- Walstra, P. (1993a). Introduction to aggregation phenomenon in food colloids. En: *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Editado por Dickinson, E. y Walstra, P. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Walstra, P. (1993b). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*. 48, 333-349.
- Walstra, P. (1996a). Emulsion stability. En *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Editado por Becher, P. Marcel Dekker, New York. 4, 1-62.
- Walstra, P. (1996b). Dispersed systems: basic considerations. En: *Food chemistry*. Editado por Fennema, O. R. Marcel Dekker, New York. 95-155.
- Walstra, P. y de Roos, A.L. (1993). Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Rev. Int.* 9, 503-525.

- Walstra, P. y van Vliet, T. (2010). Sistemas dispersos: Consideraciones básicas. En: *Química de los Alimentos*, Tercera edición. Editado por Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. Acribia S.A., Zaragoza, España. 779-845.
- Waugh, D. F. (1954). Protein-protein interactions. *Advances in Protein Chemistry*. 9, 325-437.
- Wilde, P.J. (2000). Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 176–181.
- Wilde, P. J.; Mackie, A. R.; Husband, F.; Gunning, P. y Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 108-109, 63-71.
- Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 18, 969-976.
- Wolf, W. J. (1972). Purification and properties of the proteins. En *Soybeans: Chemistry and Technology*. Editado por Smith, A. K. y Circle, S. The AVI Publishing Company, Westport, USA. 1, 93-143.
- Wolf, W. J. (1993). Sulfhydryl content of glycinin: Effect of reducing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 168-176.
- Wolf, W. J. y Briggs, D. R. (1958). Studies on the cold insoluble fraction of the water extractable soybean proteins II. Factors influencing conformation changes in the 11S component. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 76, 377-393.
- Wolf, W. J. y Nelsen, T. C. (1996). Partial purification and characterisation of the 15 globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 785-791.

- Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. Van Nostrand Reinhold, AVI, New York.
- Wright, D. J. y Hemmant, J. W. (1987). Foaming properties of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 41, 361-371.
- Wu, S.; Murphy, P.A.; Johnson, L.A.; Reuberb, M.A. y Fratzke, A. R. (2000). Simplified Process for Soybean Glycinin and β -Conglycinin Fractionation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2702-2708.
- Wu, S.; Murphy, P.A.; Johnson, L.A.; Fratzke, A. R. y Reuberb, M.A. (1999). Pilot-Plant Fractionation of Soybean Glycinin and β -Conglycinin. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. 76, 285-293.
- Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W.; Kamata, Y. y Shibasaki, K. (1981). Isolation and identification of a new type of β -conglycinin in soybean globulins. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45, 2863-2868.
- Yamauchi, F.; Sato, K. y Yamagishi, T. (1984). Isolation and partial characterization of a salt-extractable globulin from soybean seeds. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48, 645-650.
- Yamauchi, F.; Yamagishi, T. y Iwabuchi, S. (1991). Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean proteins. *Food Reviews International*. 7, 283-322.
- Yarranton, H.W.; Sztukowski, D.M. y Urrutia, P. (2007). Effect of Interfacial Rheology on Model Emulsion Coalescence Part I: Interfacial Rheology. *Journal of Colloid and Interface Science*. 310, 246-252.
- Ye, A. y Singh, H. (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*. 15, 195-207.

- Yu, M. A. y Damodaran, S. (1991a). Kinetics of foam destabilization: Evaluation of a method using bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1555–1562.
- Yu, M. A. y Damodaran, S. (1991b). Kinetics of destabilization of soy protein foams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1563–1567.
- Xu, S. y Damodaran, S. (1993). Comparative adsorption of native and denatured egg white, human and T4 phage lysozyme at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 159, 124–133.

Capítulo 6

ANEXOS

ANEXO 1: DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS

A1.1 Publicaciones en revistas arbitradas

- ✓ Abirached, C; Medrano, A; Araújo, A.C.; Moyna, P.; Añón, M.C.; Panizzolo, L.A. (2012). Comparison of Interfacial and Foaming Properties of Soy and Whey Protein Isolates. *Journal of Food Science and Engineering*, vol.: 2 págs.: 376 – 381.
- ✓ Abirached, C; Medrano, A.; Panizzolo, L.A.; Moyna, P.; Añón, M. C. (2011). Desestabilización de emulsiones aceite-agua preparadas con proteínas de soja. *INNOTEC*, vol.: 6, págs.: 7 – 10.
- ✓ Abirached, C; Medrano, A.; Panizzolo, L. A.; Moyna, P.; Añón, M.C. (2010). Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido. *INNOTEC*, vol.: 5, págs.: 58 – 62.

A1.2 Trabajos presentados en congresos

A1.2.1 Presentaciones orales:

- ✓ Comportamiento interfacial de glicinina, β -conglucina de soja y aislado proteico de soja en emulsiones aceite en agua. VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios. JIPCA VI; Buenos Aires, 2011.

A1.2.2 Presentaciones en formato póster:

- ✓ Study of foaming properties of soybean proteins isolate, glycinin and β -conglycinin proteins by kinetic constants of disproportion and gravitational drainage. 16th World Congress of Food Science and Technology-IUFoST 2012, Foz de Iguazú, 2012.

- ✓ Estudio de la mejora de las propiedades emulsionantes del aislado proteico de soja sometido a condiciones ácidas. XIII Congreso CYTAL, organizado por la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios, Buenos Aires, 2011.
- ✓ Soy protein isolate (SPI) and milk whey protein isolate (MWPI) interfacial and foaming properties study. 102nd AOCS Annual Meeting and Expo, Cincinnati, 2011.
- ✓ Estudio de la desestabilización de emulsiones aceite-agua preparadas con proteínas de soja. II Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos - Riteq 2010, Córdoba, Argentina.
- ✓ Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido. XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Concordia, 2009.
- ✓ Determinación de propiedades reológicas superficiales de proteínas en interfase (agua/aire). INNOVA 2009, Montevideo, 2009.

A1.3 Proyectos realizados derivados de la tesis

- ✓ Proyecto I + D 2006, Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República. *“Estudio de las propiedades emulsionantes de las proteínas glicinina y conglucina de semilla de soja”*.
- ✓ Proyecto de investigación científica y/o desarrollo tecnológico en el área de oportunidad: “tecnologías de los alimentos”, Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT), Ministerio de Educación y Cultura, 2006. *“Aislamiento y estudio de las propiedades funcionales de las fracciones 11S y 7S de proteínas de semilla de soja”*.

ANEXO 2: SÍMBOLOS, TERMINOLOGÍA Y ABREVIACIONES

γ : tensión superficial

γ_e : tensión superficial de equilibrio

Γ : concentración de proteína en la interfase

δ_a : densidad del aceite

δ_{agua} : densidad del agua a 20° C

$\Delta\delta$: diferencia de densidad entre la fase continua y dispersa

ΔA : área superficial o interfacial.

$\Delta A/A$: amplitud de la deformación

ΔG : variación de la energía libre del sistema

ΔP : diferencia de presión

ΔP_L : diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota

η : viscosidad del medio

η_c : es la viscosidad de la fase continua

π : presión superficial o interfacial

ρ : densidad, los subíndices 1 y 2 refieren a las fases continua y dispersa respectivamente.

ϕ : fracción volumétrica

φ : diferencia de fase

τ : tiempo de relajación

ω : frecuencia de la oscilación

A: área

A_a : parámetro de amplitud de la tensión superficial e interfacial en la adsorción

ANS: ácido 1-anilino-8- naftalen-sulfónico

A_r : parámetro de amplitud de la tensión superficial e interfacial en el reordenamiento

C_i : conductividad inicial

C_t : conductividad a tiempo t.

D (%): grado de desestabilización global de las emulsiones en estudio

D: diámetro de la gota.

$D_{3,2}$: diámetro de la esfera de área superficial equivalente, también denominado diámetro medio de Sauter

$D_{4,3}$: diámetro de la esfera de volumen equivalente, también denominado diámetro medio de De Broucker

DSC: calorimetría diferencial de barrido

dv/dr: velocidad de deformación

E: elasticidad de Gibbs o elasticidad límite de Gibbs

E_d : elasticidad dilatacional interfacial

E_e : elasticidad conservativa interfacial

E_{ne} : elasticidad disipativa interfacial

E_v : viscosidad dilatacional interfacial

F/A: fuerza por unidad de área

g: aceleración debido a la gravedad

GD: grado de desnaturalización

GF (%): grado de floculación

GF (total): grado de floculación calculado los valores globales de $D_{4,3}$ (sin discriminar entre partículas mayores y menores a $4\ \mu\text{m}$)

GF1: grado de floculación calculado a partir de los valores de $D_{4,3}$ para diámetros de partícula menores a $4\ \mu\text{m}$

GF2: grado de floculación calculado a partir de los valores de $D_{4,3}$ para diámetros de partícula mayores a $4\ \mu\text{m}$

GRN: grado de recuperación de la estructura nativa

H_o : hidrofobicidad superficial

IS: índice de solubilidad

k_1 y k_2 : constantes de velocidad de desestabilización por cremado

k_a : constante de velocidad de primer orden para el proceso de adsorción de las proteínas en la interfase

k_d : constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción

k_g : constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio

k_g : constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para las gotas de mayor tamaño de la emulsión

k_h : constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo hiperbólico

k_p : constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para las gotas de menor tamaño de la emulsión

k_r : constante de velocidad de primer orden para el proceso de reordenamiento de las proteínas en la interfase

k_s : es la constante de velocidad de variación de RD en función del tiempo para una cinética de tipo sigmoideo
 N: número de partículas
 o/w: emulsión aceite en agua
 Pa: concentración de proteína adsorbida en la emulsión
 r: radio de la partícula
 R: radio de las gotas
 Ra y Rb: radios de curvatura de las burbujas pequeña y grande respectivamente
 Ra y Rb: son los radios de curvatura del borde Plateau y de la lamela, respectivamente
 RD: retrodispersión
 RD(t): valor de RD a tiempo t
 RD₀: retrodispersión de la emulsión a tiempo 0.
 RD₁ y RD₂: parámetros de amplitud correspondientes a cada una de las cinéticas de desestabilización por cremado
 RD₁₀₋₂₀: valores promedio de RD en la zona 10-20 mm en función del tiempo
 RD_g: parámetro de amplitud correspondiente a las gotas de mayor tamaño
 RD_p: parámetro de amplitud correspondiente a las gotas de menor tamaño
 RD_h: parámetro de amplitud correspondiente a la cinética hiperbólica
 RD_s: parámetro de amplitud correspondiente a las cinética sigmoidea
 RD_i: valor de RD inicial
 RD₁₀: valores promedio de la retrodispersión en la parte inferior a una altura de 10 mm del tubo de medida
 RD_{p24}: promedio del valor de retrodispersión a 24 horas en un intervalo determinado
 RD_{p50-53}: valores promedio de retrodispersión en la zona 50-53 mm en función del tiempo
 RD_{pmáx.}: promedio del máximo valor de retrodispersión en el tiempo en un intervalo determinado
 SDS: dodecil sulfato sódico
 Sv: área interfacial.
 T (%): transmitancia
 Td: temperatura de desnaturalización
 tg ϕ : tangente del ángulo de pérdida
 Tris: trisaminometano
 V: volumen

v : velocidad de cremado de una emulsión

V_d : parámetro de amplitud correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción.

V_g : parámetro de amplitud correspondiente al proceso de drenado gravitatorio

$V_{LE}(t)$: volumen de líquido en la espuma a un tiempo t

V_{LEmax} : volumen máximo de líquido retenido en la espuma

V_{Li} : volumen de solución de proteína inicial

v_o : velocidad de pasaje del líquido a la espuma

V_r : volumen relativo de fase crema

w/o: emulsión agua en aceite

ΔH_d : entalpía de desnaturalización

ΔH_{dn} : entalpía de desnaturalización de la proteína nativa

ΔH_{dm} : entalpía de desnaturalización de la proteína tratada a pH ácido y luego llevada a pH 8,0

ΔH_{dt} : entalpía de desnaturalización de la proteína tratada a pH ácido

v_{Stokes} : es la velocidad de cremado según ley de Stokes