



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

***Formación y estabilidad de emulsiones
o/w preparadas con proteínas nativas y
desnaturalizadas de soja***

Lic. Gonzalo G. Palazolo

Tesis

2006

TESIS
Nº 1118

DONACION.....
A.....
Fecha. 13-07-07.....
Inv. E..... Inv. B. 58380

El presente trabajo para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) bajo la dirección del Doctor Jorge Ricardo Wagner

*Con todo afecto,
a mis padres, Graciela y Víctor
a mi tío Héctor*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Wagner, por abrirme las puertas al CIDCA y por su gran esfuerzo y dedicación al dirigirme en este trabajo de beca.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) por haberme otorgado las becas que posibilitaron la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata) por haber contribuido a mi formación académica.

A la Dra. Delia Sorgentini, por aportar su experiencia en la discusión de los resultados y a la Dra. Mabel Tomás, por su constante apoyo a lo largo de estos años.

A Sergio, Pani y Andrés, por los momentos compartidos.

A la empresa Refinerías de Maíz S.A.I.C.F, por la disponibilidad del analizador de tamaño de partícula.

A mis compañeros del laboratorio de Proteínas, de Aceites y a todo el personal del CIDCA, por el afecto recibido durante estos años.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

Palazolo, G.G, Mitidieri, F. E.; Wagner, J. R. Relationship between interfacial behavior of native and denatured soybean isolates and microstructure of o/w emulsions. Effect of salt and protein concentration. *Food Science and Technology International*. **9/6**, 409-421 (2003).

Palazolo, G.G.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of o/w emulsions. *Journal of American Oil and Chemists' Society*. **81**, 625-632 (2004).

Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. Coalescence and interfacial behavior of o/w emulsions of isolate soybean proteins. influence of thermal denaturation, salt addition and protein concentration. *Food Hydrocolloids*. **19**, 595-604 (2005).

Palazolo, G.G. y Wagner, J.R. Estabilidad frente a la congelación de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja. Efecto de la adición de crioprotectores. Libro de actas del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA-CYTAL). 1° Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías ISBN N° 987-22165-1-7

Palazolo, G.G. y Wagner, J.R. Estabilidad frente a la congelación de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja. Efecto de la adición de crioprotectores. Libro de actas del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA-CYTAL). 1° Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. ISBN N° 987-22165-1-7

Contenido	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de las emulsiones en la industria alimenticia	1
1.2 La emulsificación como propiedad funcional	2
1.3 Definiciones y generalidades sobre emulsiones	2
1.4 Agentes emulsificantes proteicos y no proteicos	4
1.5 Proteínas de soja y caseinato de sodio	7
1.5.1 Proteínas de reserva y del suero de soja. Propiedades estructurales	7
1.5.2 Proteínas de reserva y del suero de soja. Desnaturalización térmica	11
1.5.3 Caseínas y caseinato de sodio	12
1.6 Comportamiento interfacial de las proteínas	15
1.7 Procesos de formación de emulsiones	20
1.7.1 Homogeneización primaria y homogeneización secundaria	20
1.7.2 Procesos críticos sobre la formación de emulsiones	21
1.7.3 Fuerzas de ruptura durante el proceso de homogeneización	22
1.7.4 Dispositivos de homogeneización	24
1.7.5 Capacidad emulsionante	26
1.8 Evaluación de la eficiencia de los procesos de homogeneización: actividad emulsionante	27
1.8.1 Principios de dispersión de luz	27
1.8.2 Actividad emulsionante por técnicas de dispersión de luz	28
1.8.3 Distribuciones de tamaño de partícula	31
1.9 Estabilidad de emulsiones: estabilidad termodinámica y estabilidad cinética	37
1.10 Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones	41
1.10.1 Cremado	45
1.10.2 Floculación	47
1.10.3 Coalescencia	50
1.11 Evaluación de la estabilidad global de una emulsión por medidas de dispersión múltiple de luz	53
1.12 Congelación de emulsiones. Antecedentes	56
OBJETIVO	58
2 MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.1 Materiales y reactivos	59
2.2 Preparación de las muestras proteicas de soja	59
2.2.1 Aislados nativos y desnaturalizados de soja	59
2.2.2 Proteínas del suero de soja nativas y desnaturalizadas	60
2.3 Ensayos realizados sobre las dispersiones acuosas de proteínas	60
2.3.1 Determinación de la solubilidad proteica	60
2.3.2 Determinación de la tensión superficial e interfacial	61
2.3.3 Determinación de la hidrofobicidad aromática superficial	62
2.3.4 Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)	62
2.3.5 Congelación de las dispersiones acuosas	63
2.4 Preparación de las emulsiones	63

2.4.1	Emulsiones para el estudio de la estabilidad frente al almacenamiento estacionario	63
2.4.2	Emulsiones para el estudio de la estabilidad frente al esfuerzo de corte (agitación)	63
2.4.3	Preparación de las emulsiones para el estudio de la estabilidad frente a la congelación	64
2.5	Tratamientos de las emulsiones	65
2.5.1	Almacenamiento estacionario	65
2.5.2	Esfuerzo de corte	65
2.5.3	Congelación	65
2.6	Ensayos de caracterización de las emulsiones iniciales y sometidas a tratamientos	65
2.6.1	Determinación de la fracción volumétrica de las emulsiones	66
2.6.2	Determinación de la actividad interfacial específica	66
2.6.3	Determinación del porcentaje de proteína adsorbida y la concentración proteica interfacial aparente	67
2.6.4	Distribución de tamaño de partícula y determinación de parámetros de estabilidad	68
2.6.5	Microestructura de las emulsiones	69
2.6.6	Determinación de los parámetros de estabilidad frente a la agitación	69
2.6.7	Estabilidad global de las emulsiones en condiciones de almacenamiento estacionario	70
2.6.8	Comportamiento reológico de la fase crema	71
2.6.9	Estimación de la cantidad de aceite separado. Método de dilución del colorante	72
2.7	Análisis estadístico	75
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
3.1	Propiedades estructurales y tensioactivas de proteínas de soja	76
3.1.1	Caracterización estructural de proteínas de soja	76
3.1.2	Comportamiento superficial e interfacial de proteínas de soja en dispersiones diluidas	80
3.1.3	Comportamiento superficial e interfacial de las proteínas de soja. Efecto de la concentración de muestra	82
	Conclusiones parciales	87
3.2	Estabilidad de emulsiones o/w en condiciones de almacenamiento estacionario	88
3.2.1	Características de las emulsiones iniciales	89
3.2.1.1	<i>Distribuciones de tamaño de partícula</i>	89
3.2.1.2	<i>Correspondencia con los parámetros iniciales obtenidos a partir del analizador óptico vertical</i>	93
3.2.1.3	<i>Micrografías ópticas de las emulsiones iniciales</i>	97
3.2.1.4	<i>Análisis de la incorporación de aire en las emulsiones iniciales. Relación con el tipo de muestra y la adición de NaCl</i>	100
3.2.2	Estabilidad de las emulsiones frente al cremado-floculación	101
3.2.2.1	<i>Efecto del tipo de muestra</i>	101
3.2.2.2	<i>Efecto de la adición de NaCl</i>	108
3.2.3	Estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia	113
3.2.3.1	<i>Estabilidad global de las emulsiones. Evaluación múltiple de luz</i>	113
3.2.3.2	<i>Efecto de la adición de NaCl</i>	117
3.2.3.3	<i>Relación entre coalescencia, microestructura y comportamiento reológico de la fase crema</i>	118
3.2.3.4	<i>Relación entre la desestabilización por dispersión múltiple de luz y la distribución de tamaño de gota</i>	124
	Conclusiones parciales	130
3.3	Estabilidad de emulsiones o/w bajo condiciones de trabajo mecánico	131

3.3.1	Características de las emulsiones iniciales	131
3.3.1.1	<i>Actividad emulsionante y proteína adsorbida</i>	131
3.3.1.2	<i>Concentración proteica interfacial y presión interfacial de equilibrio</i>	135
3.3.1.3	<i>Distribuciones de tamaño de partícula y correspondencia con el método turbidimétrico</i>	137
3.3.1.4	<i>Distribuciones de tamaño de partícula y relación con la microestructura de las emulsiones</i>	141
3.3.2	Estabilidad frente a la coalescencia durante la agitación	148
3.3.2.1	<i>Efecto del tipo y concentración de muestra</i>	149
3.3.2.2	<i>Efecto de la adición de NaCl sobre la estabilidad de las emulsiones</i>	152
	Conclusiones parciales	157
3.4	Estabilidad de las emulsiones o/w frente a la congelación	158
3.4.1	Características de las emulsiones iniciales	158
3.4.2	Efecto de la congelación sobre las emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de aislados de soja y caseinato de sodio	171
3.4.2.1	<i>Congelación de emulsiones en ausencia de crioprotectores</i>	172
3.4.2.2	<i>Efecto de la adición de crioprotectores</i>	190
4	Conclusiones finales	202
5	BIBLIOGRAFÍA	205

LISTA DE ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

Letras y abreviaturas griegas

ϕ	fracción volumétrica de fase dispersa
δ	densidad
ε	densidad de energía
τ	turbidez
Γ_{ap}	concentración proteica interfacial aparente
λ	longitud de onda
η	viscosidad
η_c	viscosidad de la fase continua
η_D	viscosidad de la fase dispersa
γ	tensión interfacial
π	presión interfacial
π_i^e	presión interfacial de equilibrio
γ_i^e	tensión interfacial de equilibrio
ϕ_m	fracción en masa de fase dispersa
π_s^e	presión superficial de equilibrio
γ_s^e	tensión superficial de equilibrio

Letras y abreviaturas latinas

% p/v	porcentaje peso en volumen
% p/p	porcentaje peso en peso
A	absorbancia
AIE	área interfacial específica
ANS	ácido 8 anilino-1 naftalen sulfónico
AS %	aceite separado ("oiling off")
ASD	aislado de soja desnaturalizado térmicamente
ASN	aislado de soja nativo
BS %	porcentaje de backscattering
BS _{max prom} %	porcentaje de backscattering máximo promedio
BS _{prom} %	porcentaje backscattering promedio
BS _{prom 24} %	porcentaje de backscattering promedio a las 24 horas
BS _{0, prom} %	porcentaje de backscattering promedio inicial
C %	porcentaje de coalescencia por agitación
CE	capacidad emulsificante
CS	caseinato de sodio
D	diámetro de gota
D _{3,2}	diámetro promedio de Sauter

$D_{4,3}$	diámetro promedio de De Brouker
$D_{4,3} + sds$	diámetro promedio de De Brouker medido en ausencia de SDS
$D_{4,3} + sds$	diámetro promedio de De Brouker medido en presencia de SDS
$D_{inf} \%$	porcentaje de desestabilización por cremado-floculación
$D_{med} \%$	desestabilización por coalescencia-floculación en la fase crema
$D_{v,0,1}$	percentil del 10 % de la distribución en volumen
$D_{v,0,5}$	mediana de la distribución en volumen o percentil del 50 %
$D_{v,0,9}$	percentil del 90 % de la distribución en volumen
$D_{x,y}$	percentil de la distribución de tamaño de partícula
F %	porcentaje de floculación por agitación
FPLC	cromatografía rápida de proteína en medio líquido
G'	módulo de almacenamiento o elástico
G''	módulo de pérdida o viscoso
GF %	grado de floculación
GF/IF	cociente entre grado de floculación (GF %) e índice de floculación (IF %)
H_0	hidrofobicidad aromática superficial
Hz	hertz
IAE	índice de actividad emulsionante
IC %	índice de coalescencia
ICF %	índice de coalescencia-floculación
IF %	índice de floculación
kDa	kilodalton
kHz	kilohertz
mg/ml	miligramos por mililitro
MPa	megapascal
N	número total de gotas en la emulsión
P	polidispersidad
Pa	pascal
$P_A \%$	porcentaje de proteína adsorbida
R	radio de gotas
SDS	dodecil sulfato de sodio
T %	transmitancia
T'_g	temperatura de transición vítrea (en la solución máximamente crioconcentrada)
$\tan \delta$	tangente del ángulo de desfase
T_g	temperatura de transición vítrea
$T_{prom} \%$	transmitancia promedio
V_r	volumen relativo de fase crema
$W_{(h)}$	potencial inter-gotas

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Importancia de las emulsiones en la industria alimenticia

Las emulsiones tienen su origen en la evolución de las especies animales y del hombre. La leche, la cual es un vehículo para el transporte de nutrientes en la primera etapa de la vida de los mamíferos, es una emulsión que contiene lactosa, proteínas, triglicéridos y minerales fundamentales para el crecimiento y desarrollo. A lo largo del tiempo, se desarrollaron y elaboraron alimentos que en la actualidad son de consumo cotidiano como la crema de leche, manteca, yogures, quesos, cremas heladas (emulsiones derivadas de la leche), mayonesa, margarina y emulsiones cárnicas. Estos alimentos emulsionados exhiben una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas y organolépticas, siendo esta diversidad producto no sólo de la presencia de distintos ingredientes sino también de diferentes condiciones de procesamiento durante el proceso de elaboración.

La industria alimentaria se basó en la tradición para la formulación, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento de productos alimenticios. Sin embargo, en los últimos años la industria alimentaria moderna debe responder rápidamente a los cambios en las preferencias del consumidor mediante la elaboración de nuevos productos y el mejoramiento de los ya existentes, con propiedades organolépticas y textura adecuadas, saludables y de costo relativamente bajo. Esto implica cambios no sólo en el desarrollo del producto en sí mismo sino también en la tecnología de los procesos de elaboración. En los últimos años la cantidad de alimentos emulsionados se ha diversificado notablemente. En el mercado existen emulsiones alimentarias tradicionales de contenido lipídico reducido (crema de leche, mayonesa, manteca, cremas heladas), con adición de componentes beneficiosos para la salud, bebidas ("soft drinks"), sustituto de leche o crema de leche ("coffee whiteners"), leche de soja y derivados, aderezos, salsas y alimentos especiales para un determinado segmento de la población (niños o ancianos). En este contexto, es fundamental tener conocimiento de los factores que determinan y afectan las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los productos alimenticios y en el caso de los alimentos emulsionados en particular, esto no constituye una excepción.

Para este fin, es de vital importancia desarrollar o contar con técnicas para la adecuada caracterización de las emulsiones, independientemente de su complejidad. Estas técnicas se utilizan en el laboratorio para lograr un mayor entendimiento de los cambios que pueden producirse en las propiedades de las emulsiones (y los factores

que los gobiernan) durante el almacenamiento, transporte o por efecto de un tratamiento específico. Debido a la diversificación de las técnicas de caracterización de las emulsiones se ha aceptado la inclusión de las mismas dentro de la química analítica (Palanuwech y col., 2003). En conclusión, es tan importante el desarrollo de productos como el de nuevas técnicas para caracterizarlos de manera adecuada.

1.2.- La emulsificación como propiedad funcional

Cheftel y col. (1989) definen las propiedades funcionales de un componente como aquellas propiedades fisicoquímicas que determinan las características de los alimentos en los cuales se encuentran o son agregados. Las propiedades funcionales de un componente en particular no están relacionadas con sus propiedades nutricionales ni con la función biológica que pueda cumplir en la fuente de origen de donde es extraído, pero son propiedades que tienen una gran importancia desde el punto de vista tecnológico. Además, estos autores clasifican las propiedades funcionales para 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) 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.

Como se verá más adelante las propiedades funcionales no son independientes y están relacionadas entre sí, porque una propiedad funcional implica en muchos casos, más de un tipo de interacción. Por ejemplo, la propiedad emulsionante de una proteína también depende de su solubilidad, la cual es una propiedad de hidratación. 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.

1.3.- Definiciones y generalidades sobre emulsiones

Las emulsiones son sistemas heterogéneos compuestos por una mezcla de dos fases inmiscibles, una continua y otra dispersa en forma de pequeñas gotas y por ende, desde el punto de vista fisicoquímico son dispersiones coloidales liofóbicas (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005). Como se mencionó en la sección 1.1, estos sistemas tienen gran importancia en la industria alimenticia ya que están presentes

en muchos alimentos, tanto naturales (como la leche y la crema) como elaboradas (queso, helado, mayonesa, entre otras). En estas emulsiones la fase dispersa es un aceite o una grasa, mientras que la fase acuosa continua contiene generalmente proteínas, polisacáridos, componentes solubles (como sales minerales, saborizantes, conservantes, vitaminas, azúcares) y otros surfactantes no proteicos (Dickinson, 1992) (Tabla 1).

En la mayoría de las emulsiones alimentarias, los diámetros de gota varían entre 0,1 y 100 μm y pueden clasificarse convenientemente de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa. Un sistema que consiste en una fase oleosa dispersa en una acuosa se denomina *emulsión aceite en agua* (oil in water, o/w); en cambio, si la fase continua es oleosa, las emulsiones correspondientes son *emulsiones agua en aceite* (water in oil, w/o). La manteca y la margarina son los ejemplos más importantes de emulsiones agua en aceite. El concepto de emulsión alimentaria se amplía a sistemas que pueden contener una fase sólida o gaseosa en las fases líquidas. Por ejemplo, las cremas heladas se consideran emulsiones o/w aireadas o espumadas, debido a la inclusión de aire en la fase continua (Tabla 1).

La concentración de gotas en una emulsión se describe en términos de una *fracción volumétrica de fase dispersa* (ϕ) o de una *fracción másica de fase dispersa* (ϕ_m). Si V_d y m_d son el volumen y la masa de las gotas y V_e y m_e , el volumen y la masa de la emulsión, entonces ϕ y ϕ_m vienen dados por:

$$\phi = V_d/V_e \quad (1)$$

$$\phi_m = m_d/m_e \quad (2)$$

Ambos parámetros pueden relacionarse conociendo las densidades de las fases dispersa (δ_d) y continua (δ_c):

$$\phi_m = [(\phi\delta_d / \phi\delta_d + (1-\phi)\delta_c)] \quad (3)$$

Estrictamente, ϕ y ϕ_m coinciden sólo cuando las densidades de las dos fases que constituyen el sistema son iguales (Mc Clements, 1999).

También es posible preparar emulsiones múltiples como son las *agua en aceite en agua* (w/o/w) o *aceite agua en aceite* (o/w/o). Por ejemplo, una emulsión w/o/w consiste de gotas de agua dispersas dentro de gotas de fase oleosa más grandes. Estas, a su vez se encuentran dispersas en una fase acuosa externa o continua. La investigación en el campo de las emulsiones múltiples es reciente y tiene como

objetivos principales la obtención de sistemas dispersos para la liberación controlada de ingredientes y reducir el contenido lipídico total de los alimentos emulsionados.

1.4.- Agentes emulsificantes proteicos y no proteicos

Los agentes emulsificantes son moléculas de carácter anfílico que se adsorben en la interfase agua/aceite durante la preparación de una emulsión. Estas moléculas tienen la particularidad de tener regiones polares que se orientan preferentemente hacia la fase acuosa y regiones no polares que interaccionan favorablemente con la fase lipídica. En una emulsión (tanto o/w como w/o), el contacto directo entre las moléculas de aceite y de agua son reemplazados por contactos entre las regiones no polares del agente emulsificante y la fase dispersa y entre las regiones polares y la fase acuosa. Estas interacciones son más favorables desde el punto de vista termodinámico, dando como resultado una acumulación del agente emulsificante en la interfase y por ende, un descenso de la tensión interfacial (γ) entre la fase acuosa y la fase dispersa (Mc Clements, 1999).

Los agentes emulsificantes más empleados son los *agentes surfactantes de bajo peso molecular* y los *biopolímeros*. Los agentes surfactantes de bajo peso molecular tienen una estructura general R-X donde R es siempre una cadena lateral de ácidos grasos (“cola hidrofóbica”) y X un grupo de carácter hidrofílico (“cabeza hidrofílica”). Las cadenas laterales de ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas y alifáticas o aromáticas e interaccionan con la fase oleosa durante la formación de la emulsión. La naturaleza de los grupos polares también es muy variada: los grupos pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos o iones mixtos.

Las diferencias entre las propiedades de estos emulsificantes se expresan en términos de un concepto semiempírico ampliamente utilizado denominado balance hidrofílico-lipofílico (BHL). El BHL se describe mediante un número que da una indicación sobre la afinidad relativa de una molécula de agente surfactante por las fases acuosa y oleosa. Los surfactantes más solubles en la fase oleosa tienen valores bajos de BHL (< 7) y son más adecuados para la preparación de emulsiones w/o mientras que los agentes surfactantes de alto BHL son solubles en la fase acuosa y forman emulsiones o/w. Sin embargo, la estabilidad de las emulsiones resultantes también se ve notablemente afectada por otros factores como la geometría molecular y la asociación de las moléculas en estructuras termodinámicamente estables en la fase acuosa u oleosa (Israelachvili, 1992).

Tabla 1: Emulsiones alimentarias más comunes. (*) En las cremas heladas, además hay inclusión de aire, por lo que se considera también una emulsión aireada o espumada.

Emulsión alimentaria	Tipo de emulsión	Componentes de la fase acuosa	Componentes de la fase oleosa
Leche / Crema de leche	o/w	Caseínas y proteínas del lactosuero, vitaminas hidrosolubles, lactosa	grasa láctea, vitaminas liposolubles
Mayonesa	o/w	Proteínas de huevo, vitaminas hidrosolubles, sales, polisacáridos (en versiones de contenido lipídico reducido)	aceite vegetal, colorantes y vitaminas liposolubles, antioxidantes sintéticos
Manteca	w/o	Caseínas y proteínas del lactosuero, sales, vitaminas hidrosolubles, lactosa	grasa láctea, vitaminas liposolubles
Cremas heladas (*)	o/w	Caseínas y proteínas del lactosuero, agentes emulsificantes no proteicos, polisacáridos, azúcares, sales, vitaminas hidrosolubles	grasa láctea, vitaminas liposolubles
Margarinas	w/o	Caseínas y proteínas del lactosuero, agentes emulsificantes no proteicos, sales	aceites hidrogenados o transesterificados, grasa láctea, antioxidantes sintéticos, vitaminas liposolubles
Leche de soja	o/w	Proteínas de soja, oligosacáridos, sales, vitaminas hidrosolubles	aceite de soja, vitaminas liposolubles, fosfolípidos
Emulsiones cárnicas	o/w	Proteínas cárnicas, proteínas de soja, polisacáridos, aditivos, sales minerales	grasas animales

Las proteínas son los principales biopolímeros con propiedades emulsificantes. Tanto las proteínas como los polisacáridos, aunque estos últimos sin actividad emulsificante, son ingredientes comunes de las emulsiones alimentarias que contribuyen en aumentar su estabilidad. Estos biopolímeros además de constituir una fuente importante de energía y nutrientes en la dieta humana, sus propiedades funcionales tienen una influencia determinante en la apariencia y textura de las emulsiones resultantes.

En general, con algunas excepciones, los polisacáridos no tienen tendencia a adsorberse en la interfase agua/aceite debido a que están formados por unidades monoméricas que tienen afinidad casi exclusivamente por la fase acuosa. En una molécula de cualquier polisacárido existe como máximo cuatro tipos de monómero diferentes. Además, la capacidad de adsorción interfacial está también limitada por restricciones estructurales como la capacidad de rotación a través de los enlaces glicosídicos (Stainsby, 1986). Sin embargo, pueden aumentar la estabilidad de una emulsión debido a un incremento en la viscosidad de la fase continua, lo cual dificulta la movilidad de las gotas (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005).

A diferencia de los polisacáridos, las proteínas son biopolímeros sintetizados en base a 20 aminoácidos que, al tener distintos grados de polaridad y carga, poseen una afinidad variable por la fase oleosa y acuosa. Las moléculas de proteína son estructuralmente más complejas que las de los emulsificantes no proteicos y de todas las conformaciones teóricamente posibles en un medio acuoso, la proteína adopta la conformación nativa que es la de menor energía libre. Las interacciones no covalentes (hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y electrostáticas) y en menor medida la formación de puentes disulfuro, contribuyen a la estabilidad de la conformación nativa. Las proteínas exhiben diferentes niveles de organización: la estructura primaria incluye todos los enlaces covalentes entre aminoácidos y viene normalmente definida por la secuencia de los aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y la localización de los puentes disulfuro. La estructura secundaria se refiere a las disposiciones regulares y repetitivas en el espacio de restos aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica (α -hélice, β -hoja plegada, giros- β). La estructura terciaria es la descripción de la relación espacial entre todos los restos aminoácidos en un polipéptido, o dicho de otro modo su estructura tridimensional completa. Las proteínas formadas por varias cadenas polipeptídicas tienen un nivel adicional de organización estructural, la estructura cuaternaria y se refiere a la relación espacial de los polipéptidos o subunidades en la proteína global. Debido a la gran complejidad estructural, no puede asignarse un valor de BHL para las

proteínas. En general, al tener mayor afinidad por la fase acuosa tiende a estabilizar, al igual que los emulsificantes de alto BHL, emulsiones o/w.

1.5.- Proteínas de soja y caseinato de sodio

1.5.1.- Proteínas de reserva y del suero de soja. Propiedades estructurales

La soja (*Glycine max*) es uno de los cultivos más antiguos conocidos por el hombre. En Oriente se ha consumido la soja en forma de poroto entero, salsas, tofu ("queso de soja") y otros productos fermentados (miso, natto, tempeh). En los países occidentales, la soja fue incorporada a través de Estados Unidos a partir del siglo XX al conocerse su alto tenor en proteínas de calidad nutricional y su versatilidad de usos tecnológicos, los cuales han posibilitado la incorporación en alimentos debido a sus propiedades funcionales: absorción de agua, espumado, emulsificación y gelificación (Cheftel y col., 1989; Fukushima, 2004).

Sin embargo, el consumo de soja solo ha crecido lentamente en la población de los países occidentales, debido probablemente a la ocurrencia de factores que pueden afectar negativamente las características organolépticas y por ende, disminuir la aceptabilidad de los productos a base de soja. No obstante, en los últimos años el consumo ha aumentado, debido a los resultados de numerosas investigaciones que atribuyen a las proteínas de soja y otros componentes efectos positivos en la prevención de enfermedades crónicas (Fukushima, 2004).

En Argentina el cultivo de soja se incrementó marcadamente en las últimas dos décadas para convertirse en la actualidad en el principal cultivo del país y ser uno de los cuatro principales productores mundiales junto a Estados Unidos, Brasil y China. La semilla se utiliza principalmente para la elaboración de aceite y alimentación animal.

Las semillas de soja maduras presentan una forma casi esférica y están formadas por tres partes principales: la envoltura, cáscara o tegumento, los cotiledones y el hipocotilo, los cuales representan el 8, 90 y 2 % de la semilla de soja, respectivamente. La cáscara está compuesta por 4 o 5 capas superpuestas de células de diferentes tipos. Los cotiledones son células alargadas que contienen el aceite y las proteínas en forma de cuerpos lipídicos (esferosomas, 0,1 a 0,5 μm de diámetro) y proteicos (2 a 10 μm de diámetro). Los cuerpos proteicos contienen la mayor parte de las proteínas del grano de soja, denominadas *proteínas de reserva*. Las mismas se

hidrolizan durante la germinación y sirven de sustrato para el crecimiento del embrión. Las proteínas estructurales, enzimas e inhibidores enzimáticos se localizan en el resto de la célula (Cheftel y col, 1989).

En la industrialización de la soja como oleaginosa se obtienen fundamentalmente el aceite y un pellet desgrasado. Este subproducto contiene la totalidad de proteínas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas hidrosolubles de la soja. Si el pellet es desolventizado a temperatura controlada (para evitar la desnaturalización e insolubilización proteica) y molido, la harina desgrasada de soja resultante contiene la totalidad de las proteínas en estado nativo y soluble.

Después de la disolución en agua o a un pH ligeramente alcalino, las proteínas de soja pueden separarse en varias fracciones por cromatografía de exclusión molecular, electroforesis, precipitación fraccionada o ultracentrifugación. Cuando se utiliza esta última técnica para la separación de las proteínas se separan cuatro fracciones cuyos coeficientes de sedimentación $S_{20, w}$ (unidades Svedberg a 20° C en agua) son respectivamente iguales a 2, 7, 11 y 15 S (Wolf y Briggs, 1956) (Tabla 2).

A partir de la harina, por extracción acuosa y precipitación isoelectrica a pH 4,5 de las proteínas de reserva *glicinina* (globulina 7S) y β -*conglucina* (globulina 11S) es posible preparar los *aislados proteicos de soja*. Estos aislados son los productos proteicos más refinados que se obtienen a partir de la harina de soja y pueden contener hasta un 90 % de proteínas (Kinsella, 1986).

Tabla 2: Proporciones y características de las fracciones proteicas hidrosolubles de las semillas de soja

Fracción	Porcentaje sobre proteína total	Especies proteicas	Pesos moleculares o rango de pesos moleculares (kDa)
2S	≈ 15	Inhibidores de tripsina Citocromo C	8 – 21,5
7S	≈ 35	Hemaglutinina Lipoxigenasa Globulina 7S o β -conglucina	62 – 210
11S	≈ 40	Globulina 11S (glicinina)	320-360
15S	≈ 10	dímeros de glicinina	> 600

Las globulinas 7S y 11 S han sido extensamente estudiadas desde el punto de vista funcional y nutricional (Cheftel y col., 1989). Estas globulinas tienen una estructura cuaternaria bien definida. La glicinina es una proteína de almacenamiento compuesta por diferentes polipéptidos, cuatro de naturaleza ácida (A_1 - A_4 , 34-44 kDa) y cuatro básicos (B_1 - B_4 , 20 kDa). Los polipéptidos ácidos y básicos están unidos entre sí por un puente disulfuro formando seis subunidades A-B que le dan a la molécula de glicinina, un peso molecular aproximado de 360 kDa (Yamauchi y col., 1991).

En la glicinina han sido identificadas 5 subunidades: $A_{1a}B_{1b}$, $A_{1a}B_2$, A_2B_{1a} , A_3B_4 , $A_5A_4B_3$ clasificadas dentro de dos grupos de acuerdo a la homología de secuencia de aminoácidos: grupo I ($A_{1a}B_{1b}$, $A_{1a}B_2$, A_2B_{1a}) y grupo II (A_3B_4 , $A_5A_4B_3$). (Tabla 3). Las subunidades del grupo I contienen dos residuos de cisteína, tres de cistina (-S-S-), y son ricas en metionina; cada subunidad del grupo II tiene dos residuos de cisteína, dos de cistina y 3 residuos de metionina (Utsumi y col., 1997). Las subunidades de la glicinina son polimórficas, es decir, entre distintos cultivos existen reemplazos aminoacídicos en el mismo tipo de subunidad (Fukushima, 2004).

Tabla 3: Características de las subunidades constituyentes de la glicinina (Utsumi y col., 1997)

Grupo	Subunidad	Peso molecular (kDa)	Cisteína (-SH)	Cistina (-S-S-)	Metionina
I	$A_{1a}B_{1b}$	53,6	2	3	5-6
I	$A_{1a}B_2$	52,4	2	3	5-6
I	A_2B_{1a}	52,2	2	3	7-8
II	A_3B_4	61,2	2	2	3
II	$A_5A_4B_3$	55,4	2	2	3

El modelo más aceptado para la molécula de glicinina es el propuesto Badley y col. (1975). Estos autores plantearon un modelo de dos anillos hexagonales superpuestos, uno por encima y otro por debajo formando un cilindro hueco con dos pares de subunidades A-B por hexágono. Las interacciones dentro del cilindro son de naturaleza hidrofóbica, mientras que los anillos hexagonales se estabilizan por interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Utsumi y col., 1997). A partir

de una variedad especial de soja, donde las globulinas están constituidas por subunidades del mismo tipo (A_3B_4), se ha logrado elucidar la estructura cristalográfica por difracción de rayos X (Fukushima, 2004). Por ende, en la actualidad se conoce la estructura cristalográfica del homohexámero $6 A_3B_4$, la cual muestra similitud con el modelo de Badley y col. (1975).

Dependiendo de la solubilidad, fuerza iónica y pH, la glicinina (11S) se disocia en la forma 7S, que es un trímero de subunidades A-B y en la forma 3S, que es un monómero A-B (Martin y col., 2002). También puede tener lugar una asociación en la forma 15S (un dímero de 11S). Los pesos moleculares promedio de las formas 3S, 7S, 11S y 15S son aproximadamente 50, 175, 350 y 780 kDa, respectivamente (Cheftel y col., 1989).

La β -conglucina es una glicoproteína trimérica (150-200 kDa) que está formada por tres subunidades α (≈ 72 kDa), α' (≈ 68 kDa) y β (≈ 52 kDa), las cuales están unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Las secuencias de aminoácidos de estas subunidades son similares. Las subunidades α y α' poseen un residuo de cisteína cerca del extremo N-terminal, mientras que la β no posee ninguno (Utsumi y col., 1997). Además, estas subunidades no poseen residuos de cistina (-S-S-). Como se mencionó anteriormente esta proteína de reserva es una glicoproteína: las subunidades α , α' tienen mayor contenido de hidratos de carbono que la subunidad β y por ende, son más hidrofílicas. La globulina 7S presenta heterogeneidad molecular, habiendo sido identificadas siete especies moleculares ($\alpha\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3 y β_3). La estructura cristalográfica del homotr trímero β_3 de la β -conglucina ha sido elucidada recientemente (Fukushima, 2004).

Por otra parte, las proteínas no precipitables a pH 4,5 conjuntamente con la totalidad de los demás componentes hidrosolubles constituyen el *suero de soja*, el cual originalmente era un desecho industrial y ahora está comenzando a aprovecharse debido al alto aporte nutricional y a la funcionalidad de sus componentes.

Las *proteínas del suero de soja* (representan alrededor de 30 % de las proteínas totales), han sido muy poco estudiadas desde el punto de vista funcional, aún cuando están presentes no sólo como contaminantes sino como integrantes de productos de soja como la leche, concentrados y harinas. Estas proteínas no están presentes en los cuerpos proteicos y están constituidas mayoritariamente por los *factores antitripticos* de Kunitz (KTI), de Bowman-Birk (BBTI) y la *lectina* o *hemaglutinina (L)*. El KTI y el BBTI son proteínas monoméricas, con pesos moleculares de 20 y 8 kDa, respectivamente y se encuentran en la fracción 2S de

soja (Tabla 2). El KTI tiene una estructura rica en conformación β -hoja plegada y dos puentes disulfuro, uno de ellos localizado en la parte polar y superficial, no indispensable para la actividad antitriptica. El BBTI es una proteína globular muy pequeña y compacta que tiene la particularidad de tener 7 enlaces disulfuro, lo cual le da una extraordinaria estabilidad térmica. La hemaglutinina es una glicoproteína (4,5 % de D-manosa y 1,5 % de N-acetil-D-glucosamina) cuyo nombre se atribuye a su capacidad de aglutinación de hematíes *in vitro* (Lotan y col., 1974). Es una molécula tetramérica (peso molecular 120 kDa) compuesta por subunidades idénticas (30 kDa cada una), sin enlaces disulfuro y punto isoelectrico aproximado de 5,8 (Sorgentini y Wagner, 1999).

El contenido en aminoácidos esenciales de las proteínas del suero de soja es superior a la de las proteínas de reserva con un adecuado balance en aminoácidos azufrados y aromáticos. Como se mencionó anteriormente estas proteínas tienen actividad biológica en estado nativo, pero son fácilmente inactivadas por tratamientos hidro-térmicos suaves, lo cual hace factible su empleo en alimentación humana (Liener, 1981)

1.5.2.- Proteínas de reserva y del suero de soja. Desnaturalización térmica

Como se mencionó en la sección anterior, las proteínas de reserva de soja son globulinas de estructura cuaternaria compleja. El efecto del tratamiento térmico ha sido extensivamente estudiado ya que el calor es un agente modificador muy común para cualquier proteína alimentaria, sea para obtener el comportamiento funcional requerido o simplemente durante el proceso de cocción.

La desnaturalización de las globulinas 7S y 11S provoca fenómenos de disociación y agregación de sus estructuras cuaternarias (Cheftel y col., 1989; Yamauchi y col., 1991; Fukushima, 2004). Las subunidades constituyentes de ambas proteínas tienen grupos sulfhidrilos libres y puentes disulfuro, los cuales se intercambian fácilmente para producir distintos productos, lo cual depende del pH, fuerza iónica y concentración proteica. La concentración proteica es de suma importancia y está relacionada directamente a la funcionalidad deseada. Una dispersión proteica de aislado de soja a concentraciones iguales o levemente mayores a 5 % (50 mg/ml) será suficiente para producir una gelificación incipiente, en tanto que a partir de 8 % se forma un gel firme (Cheftel y col., 1989). Por lo tanto, como para la aplicación de los aislados en emulsiones se requiere que las proteínas posean una alta solubilidad, la desnaturalización térmica debe realizarse con la mínima pérdida de solubilidad lo que se logra si la concentración de la dispersión tratada no

supera el 5 % (Sorgentini y col., (1995). Yamauchi y col. (1991) hicieron una revisión de los probables mecanismos de gelificación por tratamiento térmico de la glicinina, β -conglucina y una mezcla de ambas proteínas. A bajas concentraciones (inferiores a las necesarias para la formación de geles) ocurren procesos de disociación y formación de agregados, que estos permanecen en estado soluble.

Por otro lado, la desnaturalización de aislados de soja seguida por calorimetría diferencial de barrido revela la presencia de dos picos endotérmicos: el primero aparece entre 67 y 78° C y corresponde a la desnaturalización de la β -conglucina; el segundo se produce entre 80 y 90° C, correspondiendo a la desnaturalización de la glicinina. Esta desnaturalización va acompañada de un importante incremento de la hidrofobicidad aromática superficial del aislado de soja (Sorgentini y Wagner, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002). La presencia de NaCl estabiliza marcadamente a las proteínas de reserva, con incrementos de las temperaturas de pico entre 15 y 20° C. Trabajos previos mostraron que los aislados nativos y en mayor grado los aislados modificados por tratamientos térmicos poseen excelentes propiedades superficiales, lo cual hace posible su empleo como agentes emulsificantes (Wagner y Guéguen, 1995, 1999 a,b, Mitidieri y Wagner, 2002).

Por otra parte, estudios previos sobre las proteínas de suero, permitieron observar que además de exhibir propiedades superficiales, presentan alta solubilidad y poca tendencia a la agregación en un amplio rango de pH y fuerza iónica (Sorgentini y Wagner, 1999). Los estudios de calorimetría diferencial de barrido realizado por estos autores, mostraron que los termogramas de las proteínas del suero muestran dos picos endotérmicos a 75° C y a 90° C, atribuidos a la desnaturalización térmica de las principales proteínas constituyentes, el KTI y la hemaglutinina, respectivamente. Sin embargo, estas proteínas tienen una hidrofobicidad aromática superficial mucho menor que las de aislado de soja (Mitidieri y Wagner, 2002). Esto se manifiesta a través de la menor dependencia de la estabilidad térmica y solubilidad con la fuerza iónica (Sorgentini y Wagner, 1999).

1.5.3- Caseínas y caseinato de sodio

En la leche hay dos grupos de proteínas, las cuales pueden separarse en base a su solubilidad a pH 4,6 a 20° C. Bajo esas condiciones, un grupo de proteínas precipitan y son las denominadas caseínas. Este grupo de proteínas constituye aproximadamente el 80 % de las proteínas de la leche. El segundo grupo minoritario, está formado por proteínas que permanecen solubles en las condiciones

mencionadas. Este grupo es el de las proteínas del lactosuero o de suero de leche (Fox y Kelly, 2004). Haciendo una comparación con las proteínas de soja, observamos que en este caso, la forma de fraccionamiento entre los principales grupos de proteínas es similar.

En la caseína bovina podemos encontrar cuatro proteínas principales: α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseínas (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN, en una proporción de 38, 10, 36 y 13 %, respectivamente (Tornberg y col., 1997; Fox y Kelly, 2004). Las caseínas bovinas presentan polimorfismo genético: se han caracterizado 7, 4, 9 y 8 variantes para la α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN. Sus principales propiedades se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Propiedades principales de las caseínas (Fox y Kelly, 2004).

Proteína	Peso molecular (kDa)	Residuos de prolina	Residuos de cisteína (-SH)	Grupos fosfato	Glicoproteína
α_{s1}-caseína	23,2	17	0	8-9	no
α_{s2}-caseína	25,4	10	2	10-13	no
β-caseína	24,0	35	0	5	no
κ-caseína	19,0	20	2	1	si

Todas las caseínas son proteínas fosforiladas. Los grupos fosfato están esterificados como monoésteres a residuos de serina (Ser-P) y en menor medida, de treonina (Thr-P), lo cual les da una gran capacidad de unión a cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} , que es el principal catión divalente en la leche (Ye y Singh, 2001). Esta propiedad es de suma importancia desde el punto de vista nutricional. Los grupos fosfatos son provistos por el ATP en una reacción catalizada por caseinquininas. Los residuos de Ser-P no están ubicados al azar en la estructura primaria de las caseínas sino que forman parte de "clusters" o grupos. Debido a que la κ -CN, tiene un solo residuo de Ser-P, exhibe la menor capacidad de unir cationes divalentes de todas las moléculas de caseína.

Por otro lado, la κ -CN es la única caseína glicosilada; contiene restos glucosa, galactosamina y ácido *N*-acetilneuramínico (como tri o tetrasacáridos) ligados a restos de treonina por enlaces O-glicosídicos en la región C terminal.

La α_{S2} -CN y la κ -CN tienen grupos de cisteína, que normalmente están formando parte de puentes disulfuro intermoleculares. La α_{S2} -CN existe normalmente como dímero, mientras que la κ -CN puede formar agregados de hasta 10 moléculas (Fox y Kelly, 2004). Las α_{S1} -CN y β -CN no poseen restos de cisteína en su estructura primaria (Tabla 4).

Los residuos de prolina están distribuidos uniformemente a lo largo de la molécula, previniendo la formación de α -hélices, β -hoja plegada y giros β . Por tal motivo estas proteínas no tienen elementos de estructura secundaria ni una estructura terciaria definida, lo cual les da un alto grado de flexibilidad estructural y e hidrofobicidad superficial.. Los restos aminoacídicos no polares, polares y cargados no se encuentran distribuidos uniformemente en la secuencia sino están agrupados dentro de la misma (como "clusters"). En consecuencia, las estructuras tienen un marcado carácter anfífilico, con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas perfectamente definidas lo que les da una gran capacidad de asociarse en solución y de tener una elevada actividad superficial

Debido a esta capacidad de asociación, las caseínas forman agregados supramoleculares de naturaleza coloidal llamadas micelas. Por estudios de microscopía electrónica se sabe que las micelas de caseína tienen forma esférica y su diámetro puede variar entre 50 y 500 nm (promedio, 120 nm), con un peso molecular en el rango de 10^3 - $3 \cdot 10^6$ kDa. Estas partículas coloidales son altamente hidratadas (2,0 g de H₂O por cada g de proteína) y el material seco contiene 94 % de proteínas y 6 % de sustancias no proteicas, especialmente calcio y fosfato, formando fosfato de calcio coloidal. Las propiedades de unión al Ca²⁺ de las caseínas y su organización micelar permiten que este fosfato de calcio coloidal se mantenga "soluble" en la leche. Más allá de que se propusieron distintos modelos de estructura micelar, se sabe que la κ -CN es la proteína estabilizante de dicha estructura, debido a su poca sensibilidad al Ca²⁺ y el extremo C-terminal hidrofílico, el cual contiene doce residuos aminoacídicos cargados negativamente y la unión del resto oligosacárido. Según el modelo propuesto por Walstra (1999), la micela de caseína está constituida por partículas coloidales de menor tamaño denominadas submicelas (aproximadamente 10-15 nm), que se forman en la glándula mamaria y se ensamblan por efecto del fosfato de calcio coloidal. La κ -CN, que se ubica heterogéneamente en la superficie de las submicelas más externas, impide la

agregación de las micelas en la leche (medio rico en Ca^{2+}), por repulsión electrostática y estérica.

La caseína comercial se prepara por acidificación de la leche descremada a pH 4,5 y calentamiento a 45° C (Kinsella, 1984). Los cambios en la estructura de la micela por efecto de la reducción del pH están mediados en parte por los cambios en el contenido de fosfato coloidal en las micelas. El efecto es su gradual desintegración, como consecuencia de la reducción de la carga neta negativa de las caseínas, la reducción en el grado de hidratación (en el rango de pH 4,6-5,4) y el incremento de la fuerza iónica del suero por la disolución del fosfato de calcio coloidal, lo cual favorece la agregación de las caseínas. En el punto isoeléctrico, se forma una red proteica de moléculas de caseína que se disociaron durante el proceso de acidificación, los cuales conservan de manera residual la estructura micelar. Esto ha sido confirmado por estudios de microscopía electrónica (Fox y Kelly, 2004).

El caseinato de sodio (CS) se obtiene a partir de una suspensión viscosa de caseína ácida (20 % de proteínas), por neutralización con NaOH, pasteurización y posterior secado por spray (Kinsella, 1984). El producto obtenido es un polvo blanco-amarillento, con un contenido de proteínas promedio de 90 % (N×6,38). Los caseinatos son completamente solubles entre pH 5,5 y 7,5, pudiendo prepararse dispersiones hasta el 15 %. Esta alta solubilidad, la cual no podría lograrse con muestras de caseína, le da al CS excelentes propiedades espumantes y emulsificantes, por lo que tiene gran aplicación industrial en la formulación de alimentos (Ye y Singh, 2001; Dickinson y col., 2003). Según Creamer y Berry (1975), el caseinato de sodio está formado por partículas coloidales de 10 nm de diámetro, en promedio y un peso molecular de aproximado 250 kDa. La estructura de estas partículas sería similar a la de las submicelas de caseína. De todas maneras, hay que aclarar que el proceso de neutralización de la caseína ácida no logra restablecer la estructura natural de las micelas (Fox y Kelly, 2004). El CS conserva aproximadamente la misma proporción de las cuatro proteínas principales constituyentes en la micela de caseína, lo cual ha sido confirmado por ensayos electroforéticos (Tornberg y col., 1997).

1.6.- Comportamiento interfacial de las proteínas

Cuando una proteína se adsorbe en la interfase sufre un proceso de desplegamiento, adoptando una nueva conformación que minimice la energía libre interfacial. Según Israelachvili (1992), la proteína adsorbida en la interfase aceite/agua adopta una configuración en “filas”, “lazos” y “colas”. Los “lazos” y las “colas”, compuestos mayormente de aminoácidos hidrofílicos se orientan hacia la fase acuosa, mientras que las “filas” se orientan en la interfase. En caso de haber una larga secuencia de aminoácidos hidrofóbicos, estos podrían eventualmente formar “lazos” o “colas” orientados hacia la fase oleosa (Figura 1)

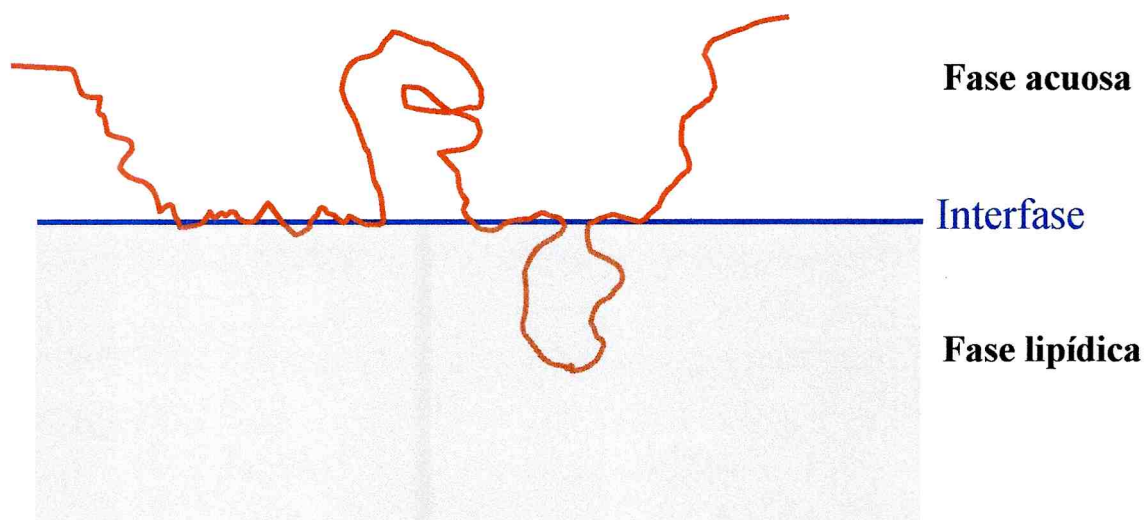


Figura 1: Esquema de la una cadena polipeptídica adsorbida en una interfase agua-aceite luego del proceso de penetración y reordenamiento molecular

La reducción de la tensión interfacial debido a la presencia de un agente emulsificante se expresa mediante el concepto de *presión superficial o interfacial* (π), la cual se define como:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (4)$$

donde γ_0 y γ son las tensiones superficiales o interfaciales entre la fase acuosa y oleosa en ausencia y presencia del agente emulsificante, respectivamente (Stainsby, 1986; McClements, 1999). En general el término “superficial” se utiliza para la interfase agua/aire, en tanto que el término “interfacial” para la interfase agua/aceite.

Por otra parte, la acumulación del agente emulsificante en la interfase debido al proceso conocido como adsorción interfacial se caracteriza por medio de la *concentración superficial o interfacial de exceso* (Γ):

$$\Gamma = m / A \quad (5)$$

donde m es la cantidad de emulsificante presente en la interfase y A el área total interfacial. Generalmente, este parámetro se expresa en mg emulsificante/ m^2 .

La *cinética de adsorción* de una proteína en la interfase aceite/agua se evalúa mediante la variación de la tensión o presión interfacial en el tiempo. La adsorción de una proteína en la interfase se produce en tres etapas: difusión, penetración y reordenamiento. Para los agentes emulsificantes no proteicos, sólo tienen lugar las dos primeras etapas, debido a su estructura molecular más simple. La tensión interfacial disminuye hasta llegar a un valor mínimo, la *tensión interfacial de equilibrio* (γ_e). Por consiguiente, la presión interfacial de equilibrio alcanza un valor máximo dado por:

$$\pi_e = \gamma_o - \gamma_e \quad (6)$$

El equilibrio se establece entre la velocidad de adsorción y la de desorción de la proteína en la interfase. Este equilibrio, que es de naturaleza dinámica, está casi totalmente desplazado hacia la adsorción interfacial por que esta situación es energéticamente más favorable. 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*. En dispersiones proteicas muy concentradas, el exceso de proteína puede adsorberse en *multicapas*, dependiendo principalmente de la naturaleza de las interacciones que se establecen entre las moléculas de proteína adsorbidas en la monocapa y las que provienen del medio acuoso (Stainsby, 1986; McClements, 1999).

Por estudios de espectroscopía infrarroja y dicroísmo circular, se demostró que los cambios conformacionales más importantes durante la adsorción interfacial de una proteína se da a nivel de la estructura terciaria y cuaternaria (van Aken, 2003). Aunque la estabilización de la monocapa o multicapas tiene lugar por interacciones de tipo no covalente, cuando en la secuencia aminoacídica existen grupos sulfhidrilos libres los mismos se pueden exponer y producirse una

polimerización de la proteína en la interfase por reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo. Esto contribuye a la formación de un film interfacial resistente y de alta viscoelasticidad que contribuye a la estabilidad de la emulsión (Damodaran, 2005).

Para ser considerados buenos agentes emulsificantes, las proteínas deben poseer otras propiedades: *flexibilidad molecular*, *solubilidad* e *hidrofobicidad superficial*. La flexibilidad molecular es la capacidad que tiene la proteína de sufrir rápidos cambios conformacionales cuando es transferida de un medio a otro medio diferente. Durante la preparación de una emulsión por homogeneización, el transporte de la proteína a la interfase se realiza por convección más que por difusión (Walstra, 1983). Por tal motivo, los rápidos cambios conformacionales 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 emulsificante. 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 isoelectrico, no son adecuadas para la preparación de las emulsiones. 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 una proteína 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, las moléculas de 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 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 y col., 2003). Este mecanismo de desplazamiento, llamado mecanismo orogénico de desplazamiento (“orogenic displacement mechanism”) también puede aplicarse con el mismo razonamiento 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.

Las propiedades interfaciales de un agente emulsificante tienen una gran importancia sobre las características finales de las emulsiones a las cuales estabilizan. En la Tabla 5 se muestran los dispositivos más importantes para la evaluación de las propiedades interfaciales.

Tabla 5: Principales dispositivos para la evaluación de las propiedades interfaciales de un agente emulsificante

Equipo	Propiedad interfacial evaluada
Tensiómetro de placa	Variación de γ_e en función de la concentración del agente emulsificante
Tensiómetro de anillo	Variación de γ_e en función de la concentración del agente emulsificante
Tensiómetro a volumen de gota	Cinética de adsorción interfacial. Variación de γ en función del tiempo.
Balanza de superficie	Estructura de la monocapa. Reología interfacial (propiedades viscoelásticas del film interfacial)
Microscopía de ángulo Brewster (BAM)	Morfología y espesor de la monocapa

1.7.- Procesos de formación de emulsiones

1.7.1.- Homogeneización primaria y homogeneización secundaria

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina *homogeneización*, mientras que el dispositivo diseñado para llevar a cabo este proceso recibe el nombre de *homogeneizador*. 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 2). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

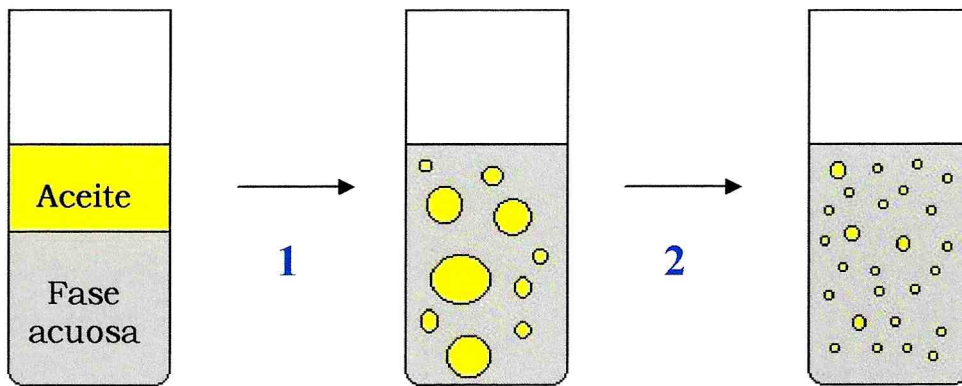


Figura 2: Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (o/w): La homogeneización primaria (1) implica la conversión de dos fases separadas en una emulsión, mientras que en la homogeneización secundaria (2) se produce una reducción del tamaño de gota de la emulsión preexistente

1.7.2.- Procesos críticos durante la formación de emulsiones

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 se 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* (Figura 3) (McClements, 1999).

Durante el proceso de homogeneización primaria, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión, 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:

$$\Delta P_L = \frac{4 \cdot \gamma}{D} \quad (7)$$

donde ΔP_L es la diferencia 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 7), 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 3).

El transporte de las moléculas del agente surfactante hacia la interfase durante el proceso de homogeneización no está determinada por difusión sino por convección (Walstra, 1983). Por lo tanto, es sumamente importante que el agente emulsificante recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En caso de que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Esto determina que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente (Ford y col., 1997).

1.7.3.- Fuerzas de ruptura en el proceso de homogeneización

Las gotas se forman mediante las *fuerzas de ruptura*, que se clasifican en *fuerzas viscosas y fuerzas inerciales*. Las fuerzas viscosas generan esfuerzos de cortes normales y tangenciales en la superficie de la gota, mientras que las fuerzas inerciales generan diferencias de presión en el seno de un fluido. En la práctica, es útil distinguir tres situaciones que pueden darse durante la homogeneización: *flujo laminar, flujo turbulento y flujo cavitacional* (Walstra, 1983).

En la situación de flujo laminar predominan las fuerzas viscosas, las cuales actúan sobre la superficie de las gotas y producen su deformación y ruptura (en gotas más pequeñas). La extensión de la deformación se caracteriza por un parámetro adimensional conocido como número de Weber, W_e^L , el cual se define como el cociente entre el esfuerzo de corte producido por las fuerzas viscosas y las fuerzas interfaciales conservativas que tienden a restablecer la forma esférica de las gotas. A un cierto valor de W_e^L , llamado número de Weber crítico ($W_{e\text{ crit}}^L$), se alcanza las fuerzas viscosas alcanzan un valor por encima de la cual se produce la

ruptura de las gotas. El parámetro $W_{e\text{ crit}}^L$, es función del cociente de viscosidades entre las fases dispersa (η_D) y continua (η_C) ($W = f(\eta_D/\eta_C)$). Las gotas son menos estables a la ruptura cuando la relación η_D/η_C está entre 0,1 – 1 y por lo tanto esta es la situación de homogeneización más eficiente. Si $\eta_D/\eta_C < 0,1$ las gotas sufren procesos de deformación sin ruptura; a alta relación de viscosidades (> 5), el tiempo de deformación no es suficiente para producir la ruptura (Ford y col., 1997; McClements, 1999).

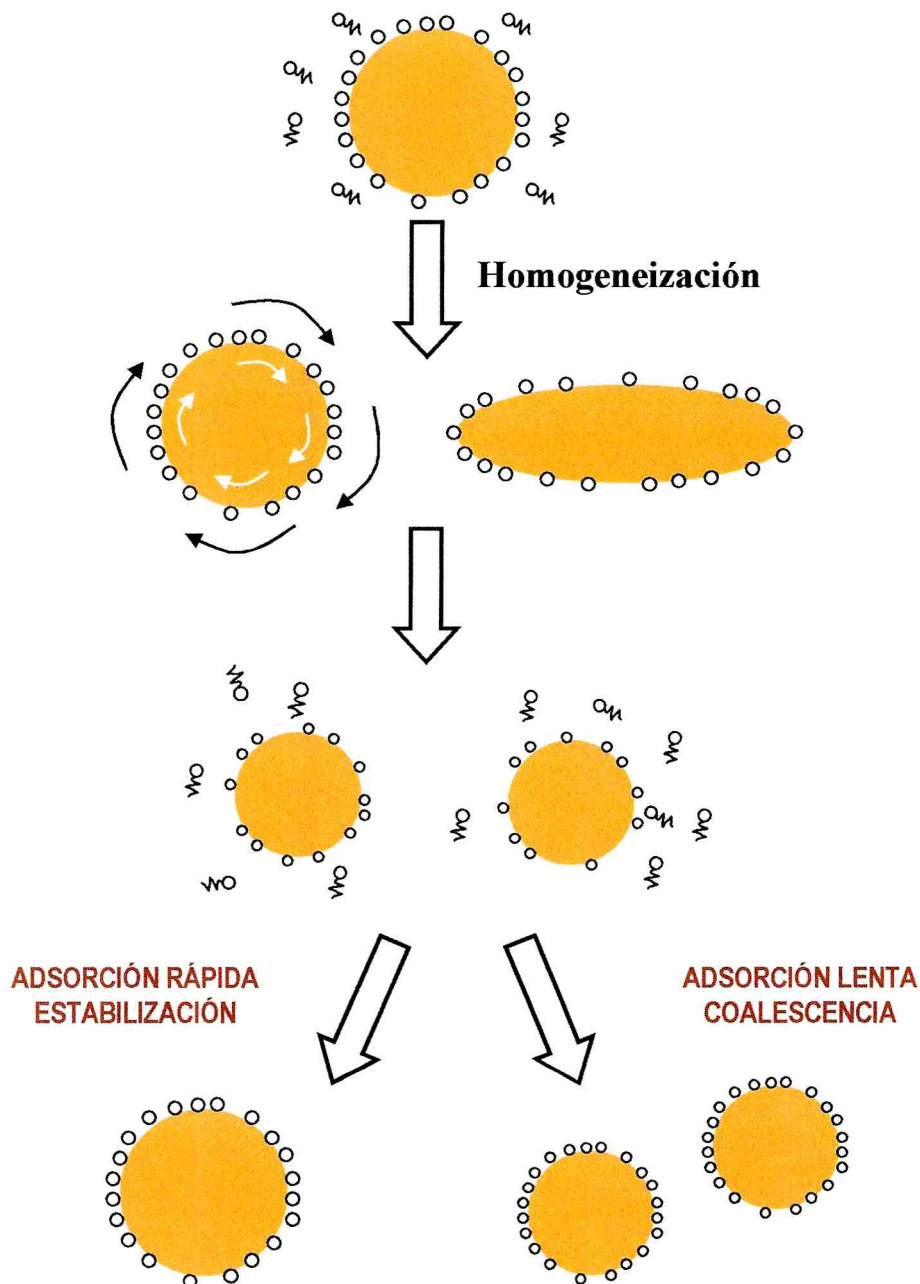


Figura 3: Proceso de homogeneización que involucra la ruptura de gotas grandes en pequeñas y adsorción en la interfase creada del agente tensioactivo (McClements, 1999).

El movimiento global del líquido en un flujo turbulento se caracteriza por la presencia de remolinos de gran tamaño que tienen asociada una energía cinética, la cual puede transferirse a remolinos de menor tamaño en el seno del líquido sujeto a la agitación mecánica. Si las gotas de aceite tiene un tamaño menor que los remolinos, estas gotas siguen el movimiento de los mismos sin ruptura. En cambio, si el tamaño de las gotas es mayor que el de los remolinos, los gradientes fluctuantes de velocidad en la superficie de las gotas pueden deformarlas lo suficiente para producir su ruptura (Ford y col., 1997).

La cavitación es un fenómeno que ocurre en fluidos sometidos a cambios bruscos de presión y es un fenómeno formación y colapso de pequeñas burbujas de vapor en un líquido. Un fluido se contrae cuando la presión crece y se expande cuando la presión decrece. Cuando la presión en un líquido cae por debajo de una presión crítica (la presión de vapor), se produce una cavidad, la cual crece por expansión y evaporación del fluido. Durante una nueva compresión la cavidad colapsa repentinamente generando una onda de choque que se propaga en el líquido circundante, causando deformación y ruptura de las gotas (Walstra, 1983).

1.7.4.- Dispositivos de homogeneización

En el mercado existen muchos tipos diferentes 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).

La intensidad de agitación mecánica se atribuye a la densidad de energía en el líquido (ϵ), la cual es la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (o la potencia por unidad de volumen). La cantidad total de energía mecánica suministrada debe ser extremadamente grande, debido a la oposición de la presión de Laplace (ecuación 7). (Walstra, 1983; Ford y col., 1997). La mayoría de la energía suministrada actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor. Por tal motivo, la temperatura del sistema debe controlarse, especialmente en los dispositivos de alta ϵ .

La tabla 6 muestra los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio.

Los homogeneizadores de baja (≈ 3000 r.p.m.) y de alta velocidad (hasta 25000 r.p.m.) 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 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 aspira axialmente y se presiona 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.

Tabla 6: Principales dispositivos de homogeneización y características: **a)** A = alta; M= mediana; B = baja; **b)** C = continuo; D = discontinuo o batch; **c)** L= flujo laminar; T= flujo turbulento; C= cavitación; **d)** tamaño de gota máximo, en promedio; **e)** B= baja; M= mediana; A=alta.

Homogeneizador	Densidad de energía (ϵ) (a)	Modo de operación (b)	Mecanismo de ruptura (c)	Tamaño de gota (d)	Viscosidad de la muestra (e)
Homogeneizadores de baja velocidad (sistemas cuchilla)	B	D	L, T	5	B - M
Homogeneizadores de alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator)	B	D	L, T	2	B - M
Molino coloidal	I	C	L, T	1	M - A
Homogeneizador a válvula de alta presión	A	C	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador ultrasónico	A	D	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador de membrana	A	C	T	0,1	B - M

Los molinos coloidales son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator al igual que los homogeneizadores de alta velocidad. La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular por variación de la distancia entre el rotor y el estator.

Aunque se pueden homogeneizar fases 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 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 (sección 1.8.3).

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 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.

1.7.5.- Capacidad emulsionante

La capacidad emulsionante (CE) en una emulsión o/w es la cantidad de aceite que una dispersión proteica (a una concentración dada) puede emulsificar hasta el momento en que se produce la inversión de fase (Wagner, 2000). El principio del

método, establecido por Swift y col. (1961) consiste en adicionar aceite con caudal constante a una dispersión proteica bajo agitación intensa hasta el punto de inversión, donde una emulsión o/w se transforma en una w/o (sección 1.10).

La disponibilidad de un método adecuado para la determinación del mismo es fundamental para la aplicabilidad de la técnica. Jiménez Colmenero y García-Matamoros (1981) han desarrollado un método que permite medir el punto de inversión mediante un aumento brusco en la resistencia eléctrica, momento en el cual se detiene la adición de aceite y se determina gravimétricamente el aceite emulsificado por diferencia de masa del recipiente antes y después del agregado de aceite.

La CE se expresa generalmente en gramos o mililitros de aceite por gramo de proteína y el método tiene la ventaja de poder adecuarse a distintas condiciones para estudiar el efecto de la fuerza iónica, tipo de proteína y tipo de aceite. El valor obtenido de CE depende de la velocidad del agregado de aceite y la geometría del homogeneizador y como la determinación requiere un proceso de agitación, el incremento de temperatura e incorporación de aire es un inconveniente adicional, por el cual esta técnica fue paulatinamente reemplazada por otros métodos.

1.8.- Evaluación de la eficiencia de los procesos de homogeneización: actividad emulsionante

1.8.1.- Principios de dispersión de luz

La formación de una emulsión durante tiene por objeto aumentar del área interfacial entre las fases continua y dispersa. El término *actividad emulsionante o emulsificante* se refiere al área creada durante el proceso de homogeneización, la cual se puede relacionar al tamaño de las gotas de la emulsión cuando la fracción volumétrica de la misma se mantiene constante.

Las técnicas basadas en la *dispersión estática de luz* se utilizan para determinar tamaños de partícula de emulsiones comprendidos entre 0,1 y 1000 μm ; por lo tanto se aplican exhaustivamente a la caracterización de emulsiones alimentarias. Cuando un haz de luz incide a través de la emulsión, el mismo es dispersado por las gotas en distintas direcciones. La intensidad con la que se produce este fenómeno está determinada principalmente por el tamaño de las gotas (y por ende, el área creada durante el proceso de homogeneización) la longitud de onda de la luz y la diferencia entre los índice de refracción de las fases dispersa y

continua. La interacción de una onda electromagnética con una emulsión se caracteriza mediante un patrón de dispersión, el cual representa la dependencia angular de la intensidad de luz que emerge de la emulsión. A través de teorías adecuadas, este patrón de dispersión puede dar información sobre la fracción volumétrica de la fase dispersa y el tamaño de gota de las emulsiones.

La interacción entre las ondas electromagnéticas y las gotas en la emulsión puede dividirse en tres regímenes, de acuerdo a la relación entre el radio de las gotas (R) y la longitud de onda de la radiación incidente (λ): régimen de longitud de onda larga ($R < \lambda/20$), régimen de longitud de onda intermedia ($R \approx \lambda/20$) y régimen de longitud de onda corta ($R > \lambda/20$).

Las emulsiones alimentarias contienen gotas cuyo tamaño están en el régimen de longitud de onda intermedio. El patrón de dispersión es extremadamente complejo, porque las ondas de luz dispersadas por distintas partes de la misma gota están fuera de fase y por lo tanto pueden interferirse entre si de manera constructiva o destructiva. La teoría de Mie fue desarrollada para interpretar patrones de dispersión de emulsiones diluidas que contienen partículas esféricas independientemente de su tamaño. Esta teoría asume que las ondas de luz son dispersadas por una partícula por única vez, de manera que puede aplicarse solo cuando $\phi < 0,05$. En emulsiones más concentradas, el haz de luz dispersado por una gota interactúa inmediatamente con otra gota, de manera que el patrón de dispersión se altera. La teoría de la dispersión de luz múltiple se desarrolló para el análisis de patrones de dispersión de emulsiones concentradas.

La dispersión de la luz por parte de las emulsiones está estrictamente ligada con su apariencia. La intensidad de luz dispersada es mayor cuando la longitud de onda de la luz incidente está en el mismo orden que el tamaño de las gotas y cuando la diferencia de índices de refracción entre las fases continua y dispersa es mínima. Por tal motivo, la mayoría de las emulsiones alimentarias tienen una apariencia opaca, mientras que las microemulsiones, al tener un tamaño de gota que cae dentro de un régimen de longitud de onda larga ($R < \lambda/20$) dispersan la luz con menor intensidad y por ende, son emulsiones traslúcidas (McClements, 1999).

1.8.2. Actividad emulsionante por técnicas de dispersión de luz

El área total creada durante el proceso de homogeneización, se expresa mediante el parámetro denominado *área interfacial específica* (AIE). En caso de una

emulsión monodispersa, formada por gotas esféricas de un mismo tamaño el parámetro ASE puede expresarse como:

$$\text{AIE} = S \cdot N \quad (8)$$

donde S es el área de una gota y N es el número total de gotas en la emulsión.

Si V es el volumen de una gota y V_0 es el volumen total de la fase dispersa, entonces $V_0 = N \cdot V$. Además, si D es el diámetro de la gota, $V = (1/6) \cdot \pi \cdot D^3$; $S = \pi \cdot D^2$ y el AIE puede expresarse en función de V_0 y D a través de la siguiente expresión:

$$\text{AIE} = 6 \cdot V_0/D \quad (9)$$

La fracción volumétrica de la fase dispersa $\phi = V_0/V_T$, entonces

$$\text{AIE} = 6 \cdot \phi / D \quad (10)$$

Sin embargo, como se verá más adelante, las emulsiones no están constituidas por gotas del mismo tamaño, por lo que D será expresado como un diámetro promedio de todas las gotas de la emulsión.

El método de Pearce y Kinsella (1978), que determina la actividad emulsionante a partir de medidas turbidimétricas es el más ampliamente empleado debido a su sencillez y a la utilización de equipos de costo relativamente bajo. El fundamento de este método es que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial. Según la teoría de Mie, existe una relación entre la turbidez τ de una solución que contiene partículas esféricas de radio R y número de esas partículas, de manera que:

$$\tau = K \cdot \pi \cdot R^2 \cdot N \quad (11)$$

donde R es el radio medio de la partícula, N es el número de partículas y K es el coeficiente de difusión de la luz (Reddy y Fogler, 1981). Pearce y Kinsella (1978) definen la actividad emulsionante como el área interfacial creada y estabilizada por una concentración dada de proteína y la expresan como el *índice de actividad emulsionante* (IAE en m^2/g) según la expresión:

$$\text{IAE} = 2 \cdot T / \phi \cdot C \quad (12)$$

donde C es la concentración de proteína en mg/ml. Por otro lado,

$$\phi = \pi \cdot R^3 \cdot N / V_T \quad (13)$$

donde V_T es el volumen total de la emulsión. Relacionando las expresiones anteriores tenemos que:

$$\text{IAE} = (3 \cdot K \cdot V_T) / (2 \cdot R \cdot C) \quad (14)$$

lo cual demuestra que IAE y por ende, el área interfacial es mayor cuanto menor es el radio de las partículas o gotas de fase dispersa en la emulsión. Además, dado que la turbidez se define como:

$$\tau = 2,303 \cdot A / L \quad (15)$$

donde A es la absorbancia a 500 nm y L es el camino óptico; combinando las ecuaciones (12) y (15), el IAE se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\text{IAE} = 4,606 \cdot A / L \cdot \phi \cdot C \quad (16)$$

Las medidas de IAE se llevan a cabo por dilución 1/100 o 1/200 de una alícuota de la emulsión en un buffer que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS). La adición de SDS previene la floculación de las gotas por el desplazamiento de las proteínas del film interfacial por parte de las moléculas del agente surfactante. El SDS adsorbido le da las gotas una carga neta negativa, lo cual previene su agregación debido a la repulsión electrostática. El valor de IAE depende de la clase y condiciones de homogeneizador, concentración de muestra y clase y cantidad de aceite, de manera que estas condiciones deben ser estrictamente fijadas de antemano. Además, al ser una medida turbidimétrica se debe tener la precaución de evitar la incorporación de aire, el cremado durante la lectura y cuidar la forma de dilución y tiempo entre las diluciones sucesivas (Wagner, 2000).

La actividad superficial específica (ASE) puede expresarse en función de los parámetros de turbidez, a partir del conocimiento del IAE. Si V_T es el volumen total de la emulsión y V_A es el volumen de la fase acuosa entonces;

$$V_T = V_A + V_O = \phi \cdot V_O \quad (17)$$

luego,

$$V_A = V_T \cdot (1 - \phi)$$

Dado que la masa del agente emulsificante viene dado por $C \cdot V_A$ por lo tanto

$$\text{IAE} = \text{área superficial de las partículas} / \text{masa de agente emulsificante} \quad (18)$$

$$\text{IAE} = \text{área superficial de las partículas} / C \cdot V_T \cdot (1 - \phi) \quad (19)$$

y el AIE viene dada por

$$\text{AIE} = \text{área superficial de las partículas} / V_T \quad (20)$$

luego,

$$\text{AIE} = \text{IAE} \cdot C \cdot (1 - \phi) \quad (21)$$

Sustituyendo la ecuación (16) en esta última expresión tenemos:

$$\text{AIE} = 4,606 \cdot 10^{-6} \cdot A \cdot D \cdot (1 - \phi) / L \cdot \phi \quad (22)$$

El factor 10^{-6} se introdujo en la expresión para expresar la AIE en m^2/ml de emulsión. La ecuación (22) permite estimar el área total creada por ml de emulsión a partir de medidas espectrofotométricas. Este parámetro, a diferencia del IAE, no incluye la concentración del agente emulsificante.

1.8.3. Distribuciones de tamaño de gota

Muchas propiedades importantes de las emulsiones como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligadas al tamaño de las

gotas que contienen. Por consiguiente es sumamente importante poder contar con métodos para medir este parámetro de manera sencilla y reproducible.

Las emulsiones alimentarias son siempre *polidispersas*, es decir, el tamaño de todas las gotas varían dentro de un rango definido entre un valor mínimo y un valor máximo, especialmente aquellas que son de fuente natural. En el caso de emulsiones elaboradas de composición más simple, los métodos de homogeneización normalmente empleados tampoco tienen la capacidad de generar emulsiones monodispersas.

Por lo tanto, para el análisis del tamaño de gota de las emulsiones alimentarias es conveniente referirse en términos de una *distribución de tamaño de gota*. En una emulsión monodispersa este concepto carece de sentido por lo cual el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un solo parámetro, el radio (R) o el diámetro (D). Sin embargo, las emulsiones polidispersas requieren un análisis más complejo. Dado que el diámetro de las gotas está siempre comprendido entre un valor mínimo y un máximo, es conveniente dividir la escala de tamaños en varios rangos más pequeños y discretos, detallando el número de gotas que entran dentro de cada rango. Los resultados pueden presentarse en forma tabular o mediante un histograma. En la práctica es más conveniente e informativo presentar los datos como una frecuencia de tamaños en número, en superficie o en volumen.

$$f_n = n_i / N \quad (23)$$

$$f_s = a_i / A \quad (24)$$

$$f_v = v_i / V \quad (25)$$

n_i , a_i y v_i son el número, área y volumen de las gotas del i -ésimo rango; N es el número total de gotas, A es el área total creada durante el proceso de homogeneización y V es el volumen total de las gotas en la emulsión.

La distribución de tamaño de partícula también puede representarse como curvas continuas: la *función de distribución* $F(D_i)$ y la *función de distribución acumulativa* $C(D_i)$. La función de distribución en número se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de manera tal que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo razonamiento puede generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie y en volumen. Asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas, las funciones de distribución en número, $F_n(D_i)$,

superficie, $F_s (D_i)$ y volumen, $F_v (D_i)$ pueden relacionarse entre sí a partir de las siguientes expresiones:

$$F_v (D_i) = (1/6) \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \quad (26)$$

$$F_s (D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n (D_i) \quad (27)$$

Las funciones de distribución son *monomodales* cuando presentan un único pico, *bimodales* cuando presentan dos picos principales o *multimodales* si hay más de dos picos. En general, la complejidad de las funciones de distribución hace imposible la descripción mediante un modelo matemático. En algunos casos, cuando las funciones de distribución son monomodales, se puede hacer un modelado mediante una función de distribución normal o una función de distribución normal logarítmica.

Por otra parte, las funciones acumulativas $C(D_i)$ representan el porcentaje en número, superficie o volumen de las gotas que son menores a D_i . Los gráficos $C(D_i)$ en función de D_i son curvas sigmoideas, donde $C(D_i)$ varía entre 0 y 100 %. La Figura 4 muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión o/w.

La utilización de modelos matemáticos para las funciones de distribución tiene la ventaja de describir un sistema complejo mediante un número pequeño de parámetros. Aunque en la mayoría de los casos no puede aplicarse un modelo matemático de manera satisfactoria, a partir de las funciones de distribución pueden calcularse distintos diámetros promedio (Tablas 7 y 8).

La determinación de los diámetros promedio $D_{1,0}$, $D_{2,0}$ y $D_{3,0}$ requieren el conocimiento del número total de gotas. El conteo de gotas en una emulsión es un proceso extremadamente tedioso y complejo, de manera que se utilizan los *diámetros promedio de Sauter* ($D_{3,2}$) y *de De Brouker* ($D_{4,3}$), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas (Tabla 8). Estos diámetros se conocen como “moment diameters” e introducen otro término lineal en el diámetro, de manera que en el numerador el término superficial tiene una dependencia con D^3 y el volumen con D^4 (McClements, 1999; Wasltra, 1983; Rawle, 2005).

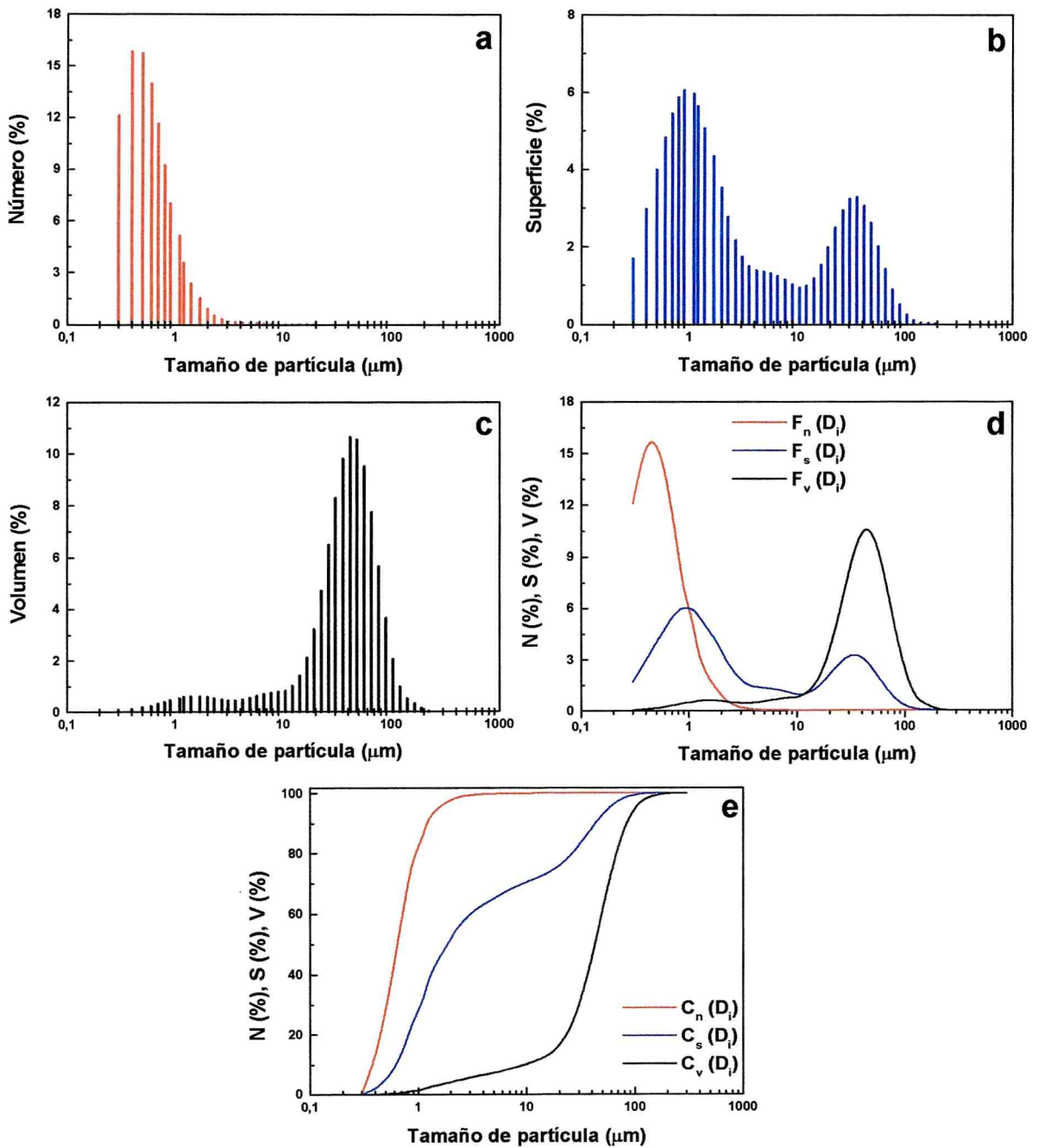


Figura 4: Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión multimodal: a), b) y c), distribuciones en número, superficie y volumen, expresadas como histograma; d) y e) las mismas distribuciones anteriores expresadas como una función de distribución continua o una función de distribución acumulativa.

Tabla 7: Diferentes formas de expresar el diámetro promedio de las gotas en una emulsión polidispersa. N = número; S = superficie; V= volumen.

Diámetros promedio	Notación	Tipo de distribución relacionada
Diámetro promedio en número	$D_{1,0}$	N
Diámetro promedio en superficie	$D_{2,0}$	S
Diámetro promedio en volumen	$D_{3,0}$	V
Diámetro promedio de Sauter	$D_{3,2}$	S
Diámetro promedio de De Brouker	$D_{4,3}$	V
Percentil 0,5 o 50 % (mediana)	$D_{x,0,5}$ (x = N, S, V)	N, S, V

Tabla 8: Definición matemática de los diámetros promedio más utilizados en emulsiones

$$D_{1,0} = \frac{\sum n_i \times D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i}{N}$$

$$D_{2,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{N}$$

$$D_{3,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{N}$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i \times D_i^2}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \times D_i^4}{\sum n_i \times D_i^3}$$

El diámetro promedio $D_{3,2}$ se puede relacionar con el área interfacial específica (ASE, en m^2/ml de emulsión) a partir de la siguiente expresión (Walstra, 1983):

$$AIE = 6 \cdot \phi / D_{3,2} \quad (28)$$

donde ϕ es la fracción volumétrica. Esta expresión es similar a la ecuación 10.

Las emulsiones polidispersas también pueden caracterizarse mediante los *percentiles* ($D_{x,y}$) donde $x = n, s$ o v , dependiendo si la distribución es en número, superficie o volumen e y es un número cualquiera comprendido entre 0 y 1. El percentil 0,5 o del 50 % ($D_{x,0,5}$) es el más común y se denomina *mediana de la distribución*. La mediana es el valor de tamaño de partícula que divide a la población de gotas de la emulsión en dos partes iguales, es decir 50 % por encima y 50 % por debajo. Los percentiles 0,1 (10 %) y 0,9 (90 %) también se utilizan para dar un parámetro relacionado con la polidispersidad (P) de la emulsión:

$$P = [(D_{x,0,9} - D_{x,0,1}) / D_{x,0,5}] \quad (29)$$

de manera que al emulsión es más polidispersa cuanto mayor es el valor de P. Los percentiles $D_{x,y}$ pueden calcularse fácilmente a partir de las funciones acumulativas.

La determinación de tamaño de partícula debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi < 0,05$) y con agitación, con el objeto de que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Un volumen pequeño de la emulsión se coloca en un recipiente con agua y un haz de radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El software incorporado en el equipo se encarga de traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partícula (McClements, 1999).

La teoría de Mie ha sido desarrollada para interpretar los patrones de dispersión de luz de partículas homogéneas y esféricas, independientemente del tamaño de las mismas respecto a la longitud de onda de la radiación incidente. Esta teoría concuerda muy bien con los resultados experimentales y es utilizada por la mayoría de los analizadores de tamaño de partícula. La traducción del patrón angular de dispersión de luz en la correspondiente distribución de tamaño de

partícula para una emulsión según la teoría de Mie, requiere el conocimiento previo del índice de refracción de la fase dispersa y del índice de absorción de luz que pueda causar el film interfacial. Aunque estos parámetros podrían determinarse experimentalmente, generalmente están incluidos en una base de datos del software del equipo.

Además, las distribuciones de tamaño de partícula pueden obtenerse en medios ópticamente opacos, es decir en las emulsiones concentradas sin realizar una dilución previa:

- Se ha desarrollado equipos que permiten obtener distribuciones de tamaño de partícula en emulsiones concentradas por dispersión de luz. Sin embargo, tienen aplicación en emulsiones cuyo tamaño de gota es muy pequeño ($< 5 \mu\text{m}$) y por ende, sólo puede aplicarse a algunos tipos de emulsiones alimentarias (McClements, 1999).
- Las espectroscopía acústica se basa en la interacción de las gotas de la emulsión con ondas de ultrasonido. Las mismas son dispersadas, obteniendo un espectro de atenuación a partir del cual se obtiene la fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ) y distribución de tamaño de partícula (Dickinson y col., 1997; Alba y col., 1999; McClements, 1999). Las ondas ultrasónicas son de baja intensidad y la energía involucrada es de varios órdenes de magnitud menor a las utilizadas para la emulsificación (Dickinson y McClements, 1996).
- La resonancia magnética nuclear de pulsos permite la obtención de la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones. Aunque los equipos tienen un costo muy elevado, la principal ventaja es que también permite la caracterización de emulsiones w/o, lo cual no puede realizarse con los métodos mencionados anteriormente (Dickinson y McClements, 1996).

1.9. Estabilidad de emulsiones: estabilidad termodinámica y estabilidad cinética

La estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de la misma de resistir modificaciones de sus propiedades en función del tiempo. Las propiedades de una emulsión pueden cambiar debido a la ocurrencia de procesos físicos y químicos. Los procesos físicos originan variación en la distribución espacial o el tamaño de las gotas, mientras que los procesos químicos producen una alteración de los componentes de las fases dispersa y/o continua de la emulsión. En la práctica, estos procesos pueden actuar de manera simultánea.

El período de tiempo en que una emulsión debe permanecer estable depende de la naturaleza del producto. Mientras que algunos productos deben permanecer estables durante largos períodos de tiempo (mayonesas, aderezos, “soft drinks”), otros requieren un proceso de desestabilización controlada durante su manufactura o elaboración (margarinas, manteca y cremas heladas). La desestabilización total implica la separación de las fases que constituyen el sistema y obviamente, esta situación no es deseable en una emulsión alimentaria.

Al considerar la estabilidad de una emulsión, es importante distinguir entre la *estabilidad termodinámica* y la *estabilidad cinética*. La termodinámica trata sobre la posibilidad de que un proceso puede ocurrir o no de manera espontánea; en cambio la cinética se refiere a la velocidad con la que dicho proceso tiene lugar.

La inestabilidad termodinámica de una emulsión se demuestra de manera sencilla si se agita vigorosamente un recipiente sellado que contiene agua y aceite. La emulsión ópticamente opaca que se forma inicialmente se desestabiliza a lo largo del tiempo hasta observar una capa superior de aceite sobre la capa acuosa, en la cual se minimiza el área de contacto entre las fases inmiscibles. El origen de la inestabilidad termodinámica puede ilustrarse comparando la energía libre de un sistema que contiene una fase oleosa dispersa y una fase acuosa continua, antes y después de la homogeneización. Para simplificar el análisis se asume que las densidades de la fase acuosa continua y dispersa son iguales, de manera que el estado inicial consiste en una única gota suspendida en la fase continua en lugar de una capa de aceite sobre la capa acuosa (Figura 5).

En el estado inicial, antes de la homogeneización la energía libre del sistema está dada por:

$$G^i = G^i_{fd} + G^i_{fc} + G^i_I - TS^i_{conf} \quad (30)$$

y en su estado final, después de la emulsificación

$$G^f = G^f_{fd} + G^f_{fc} + G^f_I - TS^f_{conf} \quad (31)$$

G_{fd} , G_{fc} y G_I son la energía libre de las fases dispersa, continua e interfacial respectivamente, T es la temperatura absoluta y S_{conf} es la entropía configuracional de las gotas de la emulsión; los superíndices i y f se refieren los estados inicial y final del sistema. Las energía libre de la fase continua y dispersa antes y después de la

formación de la emulsión permanecen constantes de manera que la diferencia de energía libre de los estados inicial y final del sistema ($\Delta G_{\text{formación}}$) viene dada por:

$$\Delta G_{\text{formación}} = G^f_I - G^i_I - (TS^f_{\text{conf}} - TS^i_{\text{conf}}) \quad (32)$$

$$\Delta G_{\text{formación}} = \Delta G_I - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (33)$$

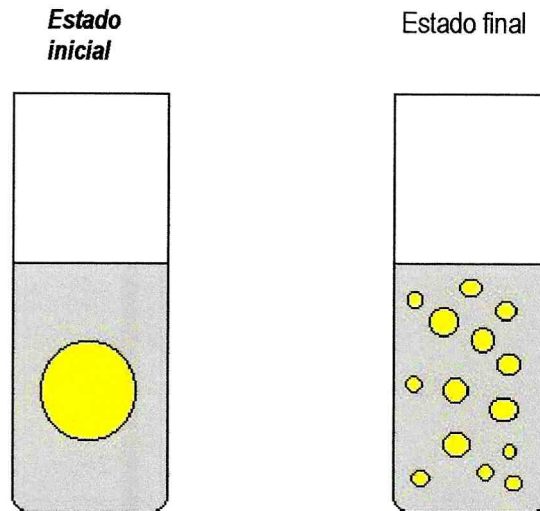


Figura 5

Las fases acuosa y dispersa son inmiscibles o muy poco miscibles entre sí, de manera que las mismas presentan una tensión interfacial (γ). Por consiguiente el término ΔG_I es igual al producto de γ y el incremento de área entre las fases acuosa y dispersa (ΔA) de manera que:

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \Delta A - T\Delta S_{\text{conf}} \quad (34)$$

El cambio de energía libre interfacial ($\gamma \Delta A$) es siempre positivo porque el área interfacial se incrementa después de la formación de la emulsión, mientras que la entropía configuracional ($- T\Delta S_{\text{conf}}$) es siempre negativo, debido a que el número de ordenamientos posibles que las gotas pueden adoptar en el estado emulsificado es mucho mayor que en el estado inicial. En la mayoría de las emulsiones alimentarias, con gotas que varían de 0,1 a 100 μm , el término configuracional es mucho menor que la energía libre interfacial (McClements, 1999). La ecuación (34) se reduce a:

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \cdot \Delta A \quad (35)$$

Por consiguiente la formación de una emulsión alimentaria es un proceso termodinámicamente desfavorable, debido al incremento de área interfacial después del proceso de homogeneización. El término configuracional sólo puede dominar el comportamiento del sistema en emulsiones donde la tensión interfacial entre las fases continua y dispersa es extremadamente baja de manera que se forman sistemas termodinámicamente estables. Este tipo de sistemas reciben el nombre de *microemulsiones* para distinguirlos de las *emulsiones* que trataremos a lo largo de este trabajo.

El cambio de energía libre asociado con la formación de una emulsión determina si el proceso es o no termodinámicamente desfavorable, pero no da ninguna indicación sobre la velocidad a la cual las propiedades de la emulsión cambian con el tiempo ni del (de los) mecanismo (s) responsables de estos cambios. El hecho de que las emulsiones permanezcan en muchos casos en un estado cinéticamente estable (o metaestable) puede atribuirse a la existencia de una energía de activación (ΔG^*), la cual debe superarse para alcanzar la separación total de las fases, el estado termodinámico más estable (Figura 5). Para que una emulsión sea cinéticamente estable el valor de ΔG^* debe ser significativamente mayor a la energía térmica E_T ($E_T = kT$). En realidad, debido a que hay diferentes mecanismos por los cuales una emulsión puede desestabilizarse es muy común que las emulsiones tengan más de un estado metaestable, cada uno de ellos con su propia energía de activación. El pasaje de un estado metaestable a otro puede ser suficiente para tener un efecto indeseable sobre la estabilidad.

La estabilidad cinética de las emulsiones se atribuye a la naturaleza dinámica de estos sistemas bifásicos. Las gotas de una emulsión, lejos de permanecer estáticas están en continuo movimiento y colisionan unas con otras debido al movimiento browniano, la gravedad o fuerzas externas aplicadas. Si las gotas se alejan o se fusionan después de una colisión depende de la naturaleza de las interacciones coloidales entre ellas. Por lo tanto la estabilidad cinética de las emulsiones está determinada por la dinámica y las interacciones de las gotas que contienen.

La teoría de la estabilidad coloidal o teoría DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Oberveek) establece que la estabilidad cinética de un sistema coloidal depende esencialmente de la dependencia del potencial creado entre la superficie de dos gotas con la distancia que las separa (h).

Es muy importante recalcar que la teoría DLVO no permite interpretar todos los fenómenos que afectan la estabilidad de la emulsión (Friberg, 1997; McClements, 1999). La complejidad de la estructura de las proteínas y aún de los agentes emulsificantes no proteicos genera otras interacciones coloidales (Tabla 9).

El potencial total $W(h)$ por lo tanto viene dado por la suma de los potenciales generados por todas las interacciones coloidales

$$W(h) = W(vdW) + W(elect) + W(est) + W(hid) + W(dep) + W(hidrat) + W(fluc term) \quad (36)$$

Depende de cada sistema el que algunas de las interacciones posibles sean despreciables frente a otras, las cuales pasarán a ser las que gobiernan las características de la emulsión.

En el caso de que las emulsiones estén estabilizadas por proteínas, en base a las características estructurales de estas macromoléculas, las interacciones electrostáticas son muy importantes lejos del punto isoeléctrico (alta carga neta) y se hacen despreciables cerca de este, en el cual se intensifican las interacciones hidrofóbicas.

1.10.- Mecanismos físicos de desestabilización 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 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).

En el caso particular de las emulsiones alimenticias, los cambios producidos por la desestabilización deben controlarse para que las características de la emulsión se mantengan dentro de un rango de valores estrechos, fuera del cual ya no sería posible su utilización o comercialización (Wagner, 2000).

Tabla 9: Características de las interacciones coloidales posibles entre las gotas en una emulsión.

Interacción	Signo	Intensidad	Rango	Efecto del pH	Efecto de la fuerza iónica	Efecto de la temperatura
Van der Waals	A	F	L	N	Reducido	Disminuye
Electrostática	R	D - F	C - L	S	Reducido	Aumenta
Estérica:						
De mezclado	A o R	D - F	C	DS	DS	DS
	R	F	C	DS	DS	Aumenta
Elástica	A	D - F	C	DS	DS	Aumenta
Depleción	A	F	L	N	S	Aumenta
Hidrofóbica	R	F	C - L	Indirecto	Indirecto	Disminuye
Hidratación	R	F	C	Indirecto	N	Aumenta
Fluctuación térmica						

A: atracción, R: repulsión, F: fuerte, D: débil, L: largo (> 10 nm), C: corto (< 10 nm), DS: dependiente del sistema, S: si, N: no

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 6).

La *floculación* y la *coalescencia* son mecanismos de desestabilización que surgen como consecuencia de un fenómeno de agregación entre las gotas. En el primer caso, las gotas mantienen su integridad individual, mientras que en la coalescencia el proceso de agregación entre dos gotas culmina con la formación de

una gota de mayor tamaño y por lo tanto implica la ruptura del film interfacial. Si la coalescencia se da en mayor extensión, puede conducir eventualmente a la formación de una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión (Friberg, 1997). Este fenómeno se conoce, en inglés, como “*oiling off*” y culmina con la separación de las fases constituyentes del sistema (Figura 6).

Si la fase oleosa cristaliza parcialmente puede tener lugar un mecanismo adicional de desestabilización conocido como *coalescencia parcial*, en donde los cristales de aceite o grasa de una gota pueden penetrar en otra gota formando agregados (Boode y Walstra, 1993; Boode y col., 1993). La cristalización de grasa se puede producir por refrigeración o aun a temperatura ambiente después de la elaboración de una emulsión empleando la fase grasa fundida. Por otra parte, la formación de cristales en las gotas de una emulsión o/w elaborada con aceite se produce cuando la emulsión es sometida a congelación. El proceso de coalescencia parcial se puede tornar en coalescencia total si la temperatura del sistema aumenta a un valor por encima de la temperatura de fusión de los cristales de aceite o grasa (Figura 7).

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.

La *inversión de fase* es un proceso en el cual se produce un cambio desde una emulsión aceite en agua (o/w) a una emulsión agua en aceite (w/o) y viceversa. Este mecanismo de desestabilización es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, como la margarina y la manteca (Dickinson y Stainsby, 1988). La base de este fenómeno es muy compleja, y se cree que involucra aspectos fisicoquímicos de la floculación, coalescencia, coalescencia parcial (cuando las gotas son semicristalinas) y formación de emulsiones. Después de la inversión de fase, las propiedades de la emulsión pueden cambiar considerablemente; esta ha sido la base para la determinación de la capacidad emulsificante (CE) de una proteína (Swift y col., 1961; Jiménez Colmenero y García-Matamoros (1981).

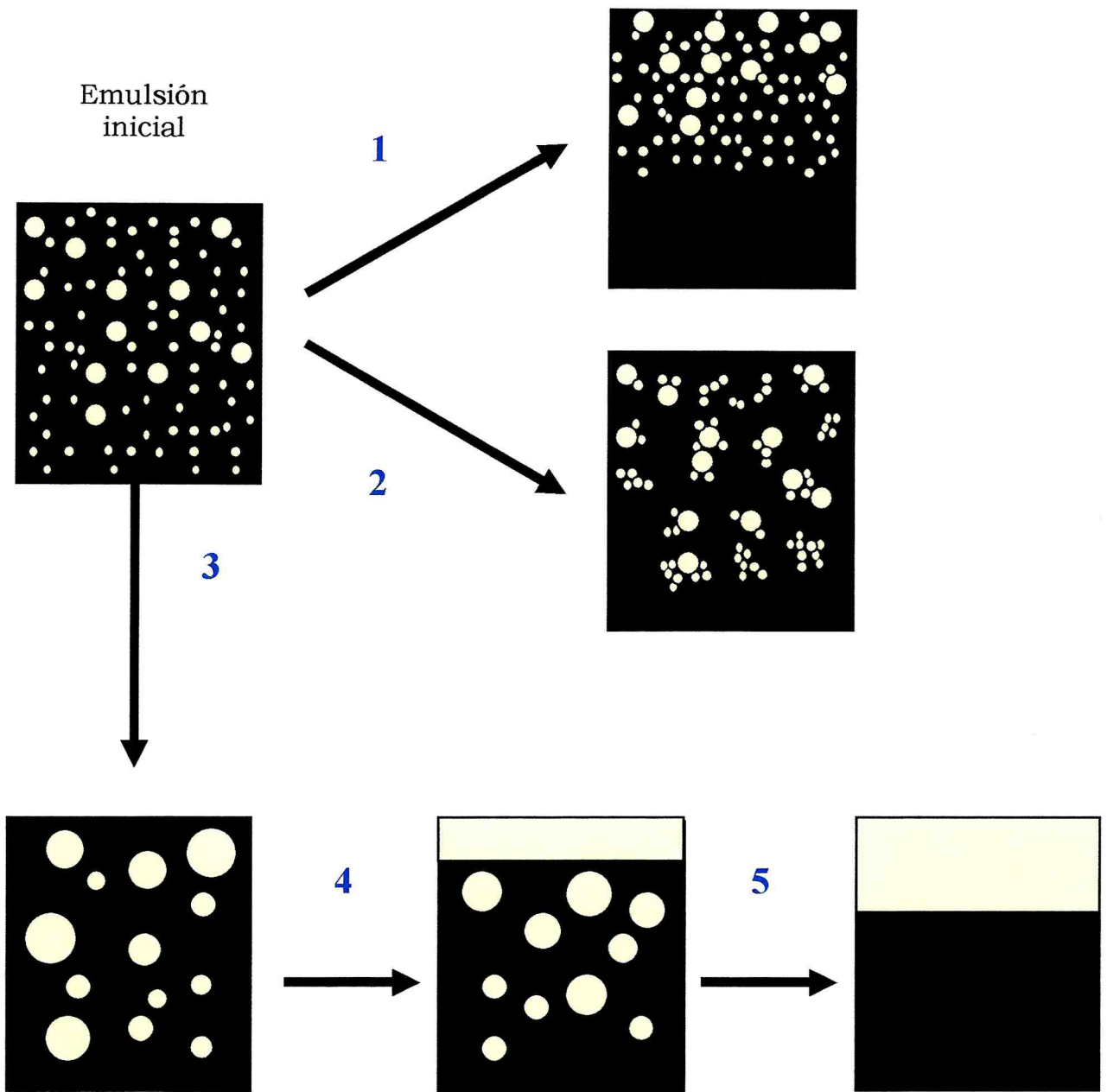


Figura 6: Mecanismos de desestabilización más importantes de una emulsión aceite en agua (o/w) : 1- Cremado; 2- Floculación; 3- Coalescencia. Si el proceso de coalescencia continua en el tiempo, se forma una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión (oiling off, 4), que culmina con la separación de fases (5). Los mecanismos de desestabilización no son independientes. En general el cremado y la floculación anteceden a la coalescencia.

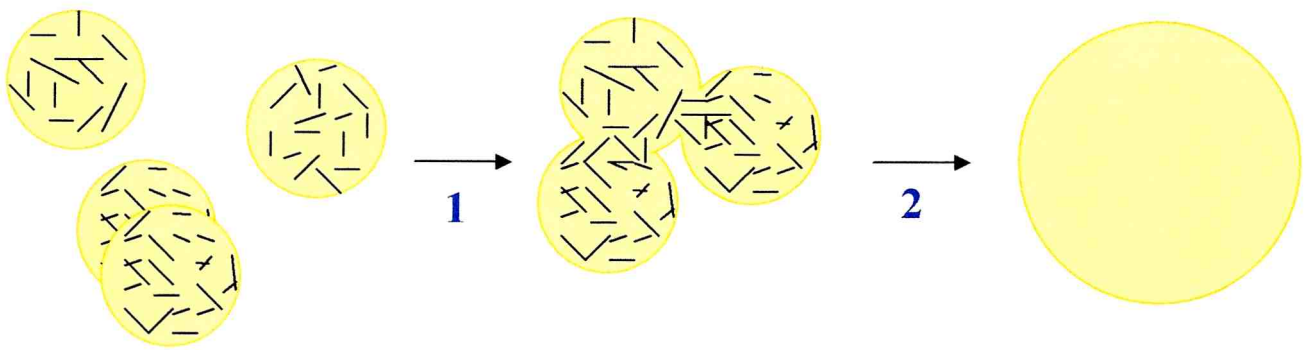


Figura 7: Mecanismos de desestabilización de una emulsión o/w por coalescencia parcial. Los cristales de grasa de una gota (representados por barras negras) pueden penetrar el dominio de otra gota por ruptura del film interfacial, formando un agregado (1); si la temperatura aumenta por encima de la de fusión de los cristales de grasa se produce la coalescencia total (2)

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).

1.10.1. Cremado

Como se mencionó anteriormente el cremado es un proceso de separación gravitacional. 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 el cual 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:

$$v = \frac{2 \cdot R^2 \cdot \Delta\delta \cdot g}{9 \cdot \eta} \quad (37)$$

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, la ley de Stokes tiene muchas limitaciones para su describir el comportamiento de las emulsiones. Las más importantes son:

- 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 alto ϕ .
- 2- Esta ecuación 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. El efecto es importante si el diámetro de las mismas es menor a $1 \mu\text{m}$ (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 (o ϕ_m) 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 ley de Stokes.
- 4- El film interfacial está altamente hidratado, debido a la interacción de las moléculas de agua con los restos aminoacídicos polares de las proteínas o emulsificantes no proteicos adsorbidas/os 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, en cambio 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*.

1.10.2. Floculación

La floculación es un proceso de agregación de gotas, que puede ser o no reversible, el cual depende fundamentalmente de las interacciones coloidales que existen entre las gotas. En general la floculación se da cuando el potencial cae en un mínimo primario o secundario. En los últimos años se propusieron distintos mecanismos, los cuales dependen de la concentración y tipo de proteína o emulsificante no proteico utilizado, del método de homogeneización y la presencia de componentes sin actividad interfacial en la fase continua (McClements, 1999). Si las interacciones atractivas predominan sobre las interacciones repulsivas se produce la atracción entre las gotas con formación de agregados.

Tabla 10: Métodos para evaluar el cremado en emulsiones o/w. D: destructivo; ND: no destructivo * método ND-mono-dato, ** método ND multi-datos. Referencias: a) Tornberg y Hermansson, (1977); Ye y Singh (2001) b) Dagorn-Scaviner y col., (1986) c) Kato y col., (1985) d) Mengual y col. (1999) e) Dickinson y col., (1997) f) Kauten y col., (1991).

Método	Característica	Descripción
Gravimétrico ^(a)	D	Determinación de materia grasa (MG) por el método de Mojonnier o Röse-Gottlieb. Comparación de MG entre el suero y la emulsión inicial a un tiempo determinado
Volumétrico ^(b)	ND *	Variación de la altura de la interfase entre la fase crema y el suero en función del tiempo
Conductimétrico ^(c)	ND **	Variación de conductancia de la emulsión en la parte inferior del recipiente que contiene la muestra
Ópticos (dispersión de luz, ^{d)}	ND **	Obtención de perfiles de dispersión de luz en función de la altura de la muestra
Ultrasónicos de baja intensidad ^(e)	ND **	Obtención de fracción volumétrica de la emulsión en función de la altura de la muestra
Resonancia magnética nuclear ^(f)	ND **	Obtención de la fracción volumétrica de la emulsión en función de la altura de la muestra / obtención de imágenes

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 “filas”, “lazos” 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 y col., 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 y col., 1997). Para una dada proteína 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 (Figura 3), obteniéndose emulsiones de tamaño de gota elevado. A concentraciones altas de proteína la floculación por puenteo es inhibida (Dickinson y col., 1997). Durante el proceso de homogeneización, el transporte de las moléculas de proteína a la interfase es por convección (Walstra, 1983); 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 de las proteínas (Tornberg y col., 1997).

El mecanismo de floculación por puenteo también puede darse en emulsiones en donde las proteínas cubren eficientemente el área interfacial creada. En el primer caso, 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). En segundo lugar, la floculación por puenteo puede darse por efecto de un hidrocólide 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 y col., 1989).

Cuando la floculación por puenteo es irreversible en condiciones de dilución, puede estudiarse por técnicas que la involucran: microscopía óptica y confocal (Tornberg y Ediriweera, 1988; Mc Clements, 1999), turbidimetría y determinación de la distribución de tamaño de gota en ausencia y presencia de SDS (Ye y Singh, 2001; Anton, 2002; Relkin y Sourdret, 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; Anton, 2002; Relkin y Sourdret, 2005). Como conclusión, hay que destacar que los flóculos que se determinan son aquellos *estables en las condiciones de medición*.

Por otra parte, existe un 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). Este efecto de depleción se ve también en emulsiones sin adición de polisacáridos. Las emulsiones estabilizadas con bajas concentraciones de caseinato de sodio en general son más estables que las estabilizadas con concentraciones intermedias. El exceso de caseinato de sodio no adsorbido, el cual tiene una estructura similar a las submicelas de caseína (Creamer y Berry, 1975) puede promover la floculación por agotamiento, aumentando la velocidad de cremado (Dickinson y Golding, 1997; Dickinson y col., 1997). Recientemente, Anton y col (2002) propusieron un método reológico para el estudio de la floculación por depleción.

1.10.3.- Coalescencia

Cuando una emulsión se almacena en condiciones estacionarias, con excepción de que se haya elegido un método de homogeneización ineficiente, un agente emulsificante inadecuado o tenga un valor de ϕ muy elevado, la coalescencia es un mecanismo de desestabilización más lento que el cremado y la floculación (Britten y Giroux, 1991). Para que este proceso ocurra, las gotas deben estar lo suficientemente cerca 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).

La coalescencia es un proceso irreversible. Se forma una gota más grande a expensas de gotas más pequeñas por una ruptura del film interfacial (McClements, 1999; Damodaran, 2005). Cuando dos gotas se acercan hay una delgada capa 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 7). 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 o manufactura 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.

Por otra parte, cuando el grado de desestabilización por coalescencia es muy alto, el tamaño de algunas gotas es tal que se termina formando una capa de aceite en la parte superior de la emulsión (oiling off). En emulsiones con este avanzado grado de desestabilización, gran parte del aceite que permanece emulsionado está contenido en gotas de tamaño elevado, lo cual dificulta su manipulación y caracterización por las técnicas mencionadas. Por tal motivo, es necesario recurrir a técnicas que cuantifiquen la cantidad de aceite separado en una emulsión.

Uno de las técnicas para cuantificar el grado de coalescencia involucra la extracción del aceite separado con solventes orgánicos de muy baja polaridad (hexano, cloroformo), que no afectan el aceite emulsificado debido a la protección que le otorga el film interfacial, el cual está hidratado y por tal efecto no permite a las moléculas de solvente orgánico realizar la extracción del aceite emulsificado. El solvente es posteriormente evaporado y el aceite se determina gravimétricamente, refiriéndolo a la cantidad de aceite inicialmente agregado a la emulsión (Tornberg y Ediriweera, 1988). Por otro lado, la calorimetría diferencial de barrido generalmente se utiliza para analizar la estabilidad de las emulsiones frente a los ciclos térmicos, dado que el aceite separado tiene un comportamiento térmico diferente al del aceite emulsificado (Thanasukarn y col., 2004). El principal inconveniente en el primer caso es realizar la extracción con un solvente inadecuado, el cual puede extraer parte del aceite emulsificado y dar valores sobre estimados de oiling off, además acarrea el problema de la introducción de una nueva interfase en el sistema y la posible modificación de la estructura proteica en la interfase que puede llevar a una coalescencia adicional. En el segundo caso, el principal inconveniente es la inhomogeneidad de la emulsión. La cantidad de emulsión necesaria para realizar la medición es muy pequeña y pueden surgir errores, los cuales se minimizarían realizando un gran número de repeticiones.

Recientemente, Palanuwech y col. (2003) han propuesto un método basado en la dilución de un colorante liposoluble en el aceite separado de la emulsión. Además de ser liposoluble, el colorante debe ser totalmente insoluble en la fase acuosa, carecer de propiedades emulsionantes y tener un alto coeficiente de absorción en la región visible del espectro, de manera que no haya interferencias con otros colorantes naturales presentes en la emulsión. Utilizando emulsiones modelo y emulsiones alimentarias de composición más compleja, estos autores han

demostrado que el colorante no interacciona con los agentes emulsificantes ni con la fase lipídica emulsificada.

El método de dilución del colorante, consiste en colocar una solución del mismo preparada en aceite sobre la superficie de la emulsión a estudiar, mezclar suavemente por inversión y realizar una centrifugación suave de manera de separar nuevamente el aceite coloreado. Si hay desestabilización por oiling-off, el aceite no emulsificado se mezcla con el aceite coloreado y luego de la centrifugación el colorante estará diluido en un volumen mayor de aceite. De manera que el grado de desestabilización es proporcional a la disminución de absorbancia de la solución del colorante.

Palanuwech y col., (2003) han seleccionado el colorante Oil Red O (Solvent Red 27) pero también proponen otras alternativas, como la utilización de colorantes de estructura química similar al Oil Red O (Sudan III, Sudan IV, Sudan Black B). En el presente trabajo, se utilizará el colorante Sudan III (Solvent Red 23) cuya estructura química es muy similar al del Oil Red O (Figura 8). Este tipo de colorantes pertenecen a la familia de los azo-colorantes liposolubles, comúnmente utilizados para la tinción de lípidos en sistemas biológicos.

1.11.- Evaluación de la estabilidad global de una emulsión por medidas de dispersión múltiple de luz

El analizador óptico vertical (Quick Scan®, Turbiscan®) permite medir la desestabilización global de emulsiones, suspensiones y espumas sin dilución, con tamaños de partícula entre 0,05 a 5000 μm y una concentración de 60 % v/v, determinando los diferentes mecanismos que la conducen. Este equipo consiste de una cabeza lectora que se mueve a lo largo de una celda cilíndrica de vidrio donde la muestra es almacenada estacionariamente durante un cierto período de tiempo. La cabeza lectora es una fuente pulsante de radiación electromagnética en el infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$), conjuntamente con dos detectores sincrónicos: el de transmisión que detecta la radiación transmitida a través de la muestra y el de backscattering recibe la radiación dispersada por la muestra en una dirección de 135° respecto a la fuente. (Pan y col., 2002). Este equipo mide la desestabilización en emulsiones concentradas, las cuales son medios ópticamente opacos. El principio de medición del equipo se basa en la teoría de dispersión múltiple de luz: los valores de transmisión (T %) y de backscattering (BS %) dependen no sólo del diámetro de las gotas, sino también de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ). El principio de

medición del analizador óptico vertical ha sido exhaustivamente estudiado por Mengual y col. (1999).

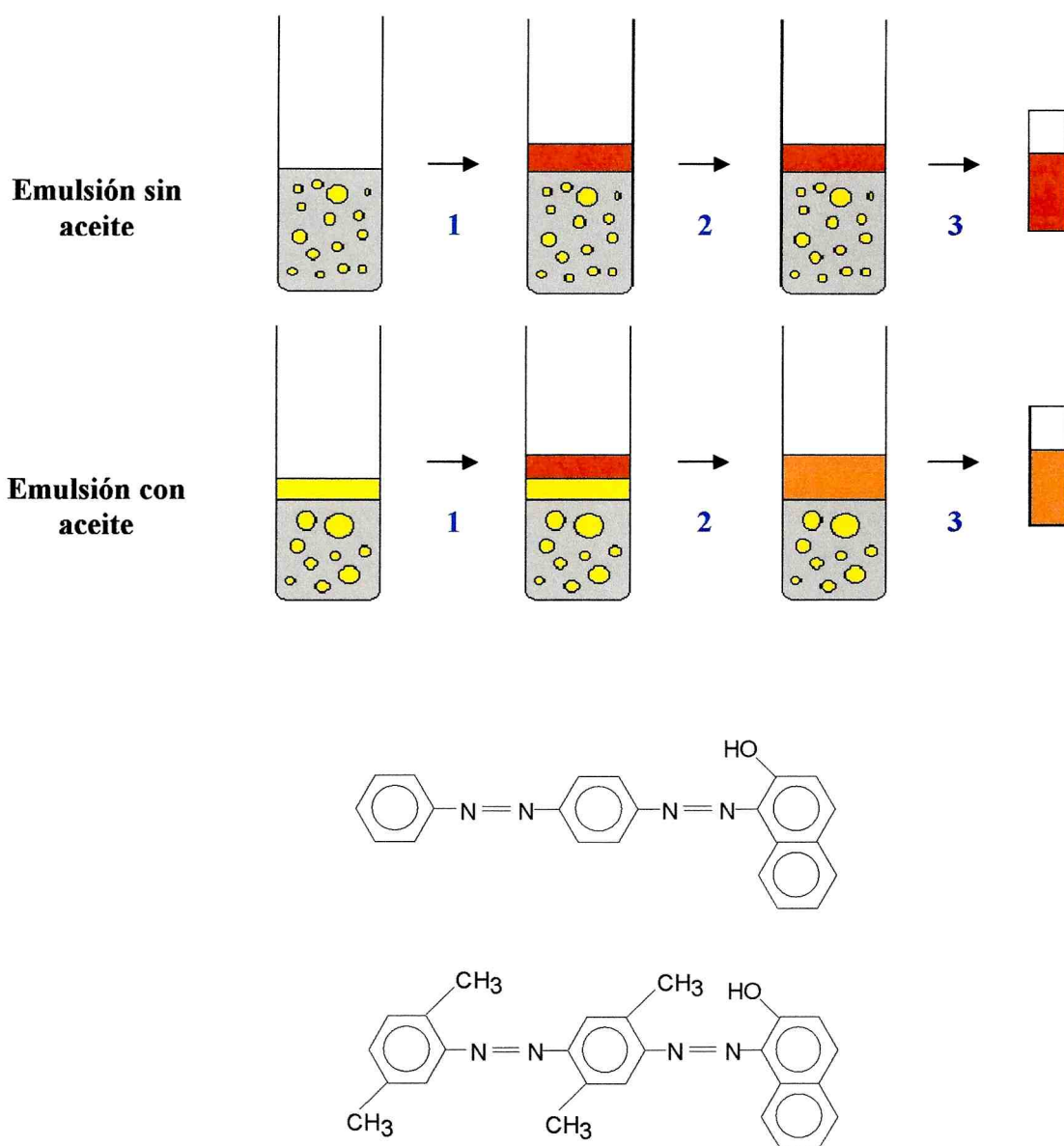


Figura 8: Representación esquemática de la medición del aceite libre en emulsiones sin y con aceite separado (en amarillo): 1) colocado de la solución de aceite coloreado (en rojo); 2) mezclado por inversión y centrifugación a baja velocidad; 3) extracción de la alícuota; eventualmente la misma debe centrifugarse a alta velocidad antes de efectuar la lectura espectrofotométrica. La alícuota de la emulsión con aceite separado está más diluida en el colorante y tendrá un valor más bajo de absorbancia. Estructura química de los azo-colorantes liposolubles Sudan III (arriba) y Oil Red O (abajo).

La cabeza lectora adquiere los datos de *transmisión* (T %) y de *backscattering* (BS %) cada 40 μm a lo largo de la celda, en una longitud máxima de 80 mm, realizando un barrido vertical de la emulsión contenida en la celda (Figura 9). Los resultados son presentados en un software por medio de las correspondientes curvas de T % y de BS % en función de la altura del tubo. La adquisición puede repetirse a lo largo del tiempo de una forma programada y los resultados son expresados en función del tiempo, obteniendo según la zona del tubo elegida la cinética de los distintos mecanismos de desestabilización (Pan y col., 2002). El análisis de los perfiles de T % y BS % obtenidos permite determinar la cinética para un dado mecanismo de desestabilización (cremado o coalescencia) si se elige adecuadamente la zona del tubo.

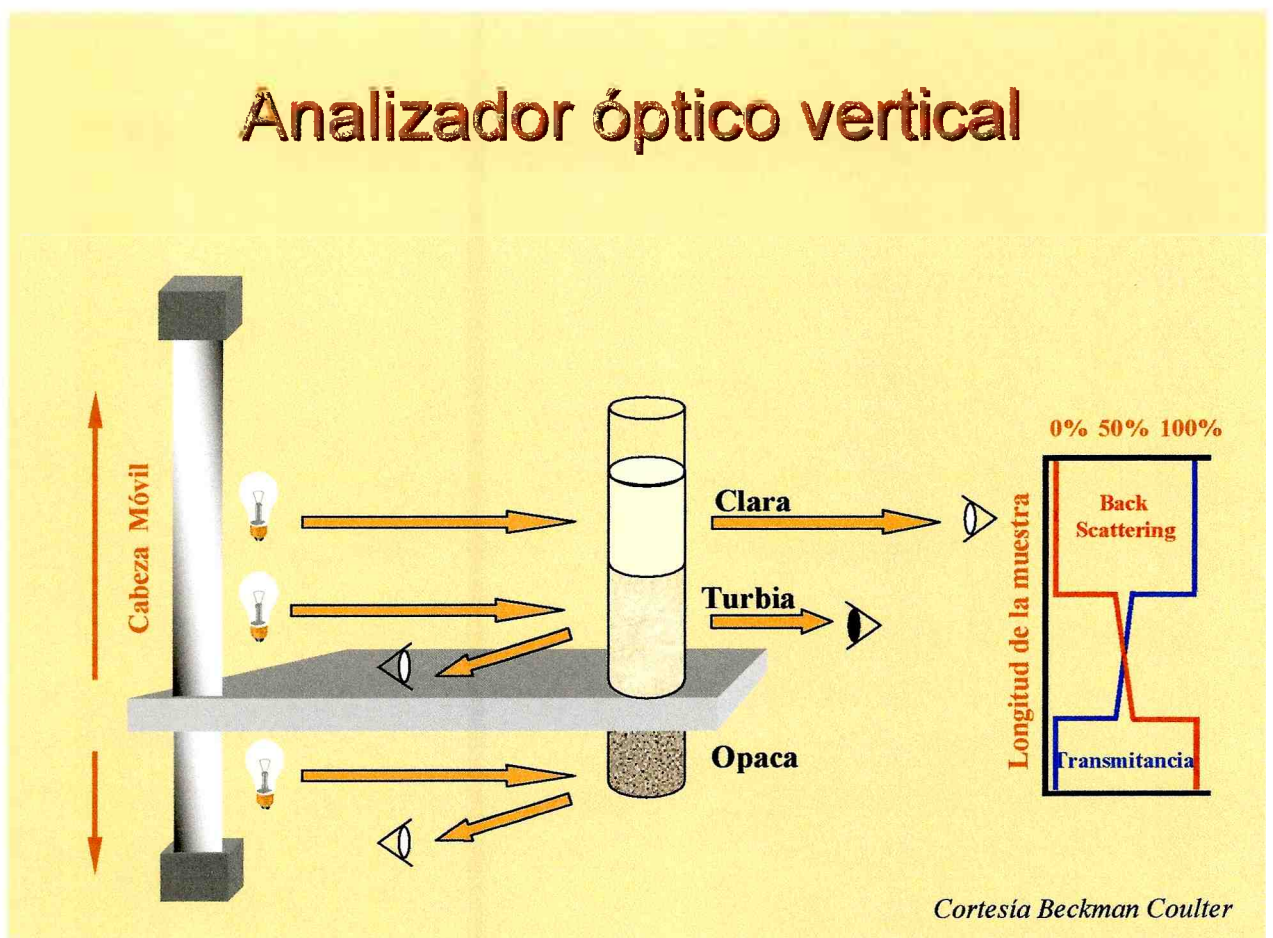


Figura 9. Representación esquemática del principio de funcionamiento del Analizador óptico vertical QUICKSCAN.

1.12.- Congelación de emulsiones. Antecedentes

La necesidad de conservar las emulsiones alimentarias para aumentar su vida útil hace indispensable conocer las alteraciones que pueden producirse por los métodos habituales de almacenamiento: refrigeración y congelación. El almacenamiento refrigerado es un método de conservación ampliamente utilizado en las emulsiones alimentarias debido a que restringe procesos indeseables que pueden ser riesgosos para la salud, como el crecimiento de microorganismos patógenos o el enranciamiento de los lípidos. Del mismo modo, los procesos físicos de desestabilización de emulsiones también se ven lentificados cuando estas son almacenadas a temperaturas de refrigeración. Por otra parte, son muchos los alimentos que se conservan por congelación, debido a que este proceso permite la conservación de los mismos por un período más prolongado que en estado refrigerado. Sin embargo, son pocas las emulsiones que se someten al congelamiento debido a la baja estabilidad que presentan (Berger, 1997). La estabilidad fisicoquímica de una emulsión durante el congelación y el almacenamiento congelado está gobernado principalmente por el grado de cristalinidad de la fase dispersa y el comportamiento de la fase acuosa (Hartel, 2001; Thanasukarn y col., 2004). En la mayoría de los alimentos el congelamiento del agua comienza por debajo de 0° C debido al subenfriamiento y al descenso crioscópico, producto de la presencia de azúcares, proteínas y sales. Como resultado de esta congelación se genera una crioconcentración de todos los componentes de la fase acuosa, lo que lleva a un aumento de la fuerza iónica y de la interacción entre componentes en esta región, lo cual produce cambios indeseables en el caso de una emulsión. Por otra parte, y dependiendo de la composición de la fase dispersa, se puede producir también la cristalización de grasa o del aceite (según la temperatura a la cual se lleva el proceso de congelación) en esta fase, lo que podría generar coalescencia parcial de las gotas. En este caso, el mecanismo real de la pérdida de estabilidad de la emulsión por congelamiento es complicado. En primer término la fase lipídica solidifica, disminuyendo tanto el volumen de gota, como su superficie. La formación de hielo cambia la composición del solvente con respecto a la fuerza iónica y al pH, lo que lleva a que los azúcares y sales poco solubles presentes en la fase continua cristalicen. El movimiento de las gotas se ve restringido en la fase acuosa líquida remanente, y finalmente los cristales tanto de grasa como de hielo rompen las películas interfaciales separándose las fases que constituyen el sistema (Dickinson y Stainsby, 1988).

Los productos elaborados a base de proteínas de soja como la leche o el tofu (queso de soja), pierden sus características de textura originales al ser congelados. En el caso de la leche de soja, las proteínas – fundamentalmente las globulinas 7S y 11S – precipitan parcialmente por su tendencia a la agregación, aumentando la viscosidad del producto. El tofu, al ser congelado, se convierte luego de la descongelación en un producto viscoelástico, esponjoso y exudativo, a causa de la tendencia de las proteínas de soja a formar geles y a la fusión de los cristales de hielo formados. Más allá de estos productos, no existen estudios sistemáticos sobre el efecto de la congelación y los factores que determinan la desestabilización de emulsiones simples formuladas con proteínas de soja como únicos emulsificantes.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad de emulsiones aceite en agua (o/w) preparadas con proteínas aisladas de soja nativas y desnaturalizadas en comparación con emulsiones de caseinato de sodio, frente a distintos tratamientos: agitación orbital, almacenamiento estacionario y congelación.

Se evaluará la influencia del tipo de proteína, la concentración de la misma en la fase acuosa, la fuerza iónica y en el caso particular de los ensayos de congelación, la presencia de crioprotectores de naturaleza no proteica. En este contexto, se cuantificará el grado de evolución de los principales procesos que conducen a la desestabilización de las emulsiones: cremado, floculación y coalescencia, a través de microscopía óptica, espectrofotometría y técnicas de dispersión de luz.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Materiales y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La harina de soja desgrasada (40 % p/p de proteínas, N × 6,25, desolventizada sin inactivación térmica para evitar la desnaturalización proteica), fue cedida por la empresa Santista (San Pablo, Brasil). Como proteína control se utilizó caseinato de sodio (Sigma–Aldrich Co, Missouri, USA), sin purificación previa. El contenido proteico fue de 92% p/p (N x 6,38) y el de Ca²⁺ de 0,7 % p/p, esto último determinado según el método descrito por Ntailianas y Whitney (1964).

2.2.- Preparación de las muestras proteicas de soja

2.2.1.- Aislados nativos y desnaturalizados de soja

La harina de soja desgrasada se dispersó en agua destilada (relación agua - harina 10:1) y se agitó en un agitador magnético por 2 horas a 20° C, ajustando periódicamente el pH a 8,0 con NaOH 2 N. La dispersión resultante se centrifugó a 10.400 g durante 15 minutos a 20° C (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25, rotor JA-14, Beckman Coulter, Fullerton, USA), descartando el pellet. El sobrenadante se ajustó a pH 4,5 con HCl 2 N y luego se realizó una segunda centrifugación a la misma velocidad y en las mismas condiciones. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se reservó para la preparación de las proteínas del suero de soja; el precipitado resultante se lavó y resolubilizó en agua destilada, ajustando el pH a 8,0 con NaOH 2 N. La cantidad de agua utilizada para la solubilización fue suficiente para asegurar que la concentración de las proteínas sea al menos de 40 mg/ml.

El aislado nativo de soja (ASN) se obtuvo, secando las dispersiones a 40 mg/ml por liofilización. El contenido proteico de ASN fue de 90 ± 1 % p/p (N × 6,25) (AOAC, 1984). El aislado desnaturalizado de soja (ASD) se preparó por tratamiento a 90° C por 5 minutos de una dispersión de ASN en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 con una concentración proteica acorde a los ensayos a realizar (1–20 mg/ml). Este tratamiento fue suficiente para la desnaturalización total de las globulinas de reserva, 7S y 11S. (Sorgentini y Wagner, 1999).

2.2.2.- Proteínas del suero de soja nativas y desnaturalizadas

Para preparar las proteínas del suero nativas (PSN) se siguió el procedimiento experimental descrito por Sorgentini y Wagner (1999). El sobrenadante de la precipitación isoelectrica a pH 4,5 obtenido de la preparación del aislado, se filtró a través de una malla de algodón, se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 2 N y se centrifugó a 12.400 g durante 15 minutos a 20° C (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25, rotor JA-14, Beckman Coulter, Fullerton, USA). El sobrenadante clarificado se trató con (NH₄)₂SO₄ al 90 % de saturación (aproximadamente 650 g de (NH₄)₂SO₄ por litro de sobrenadante) y se llevó a cabo una segunda centrifugación a la misma velocidad y en las mismas condiciones. El precipitado se lavó y se dializó a 4° C durante 24 horas contra agua destilada conteniendo azida sódica (0,03 % p/v) como preservante. Las proteínas del suero nativas (PSN) se obtuvieron secando por liofilización las soluciones resultantes. El contenido proteico de las PSN fue 99,0 ± 0,5 % p/p (N × 6,25) (AOAC, 1984). Las proteínas del suero desnaturalizadas (PSD) se prepararon por tratamiento térmico a 90° C por 5 minutos de una dispersión de PSN (1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0). La desnaturalización total de las los principales componentes de las proteínas del suero, el inhibidor de tripsina de Kunitz y la lectina fue total en estas condiciones (Sorgentini y Wagner, 1999).

2.3.- Ensayos realizados sobre las dispersiones acuosas de proteínas

Las muestras nativas (ASN, PSN o CS) se dispersaron en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 por agitación magnética durante 2 horas. Las dispersiones se prepararon en un rango de concentraciones de muestra entre 1 y 20 mg/ml (0,1 - 2 % p/v). Como se mencionó anteriormente (sección 2.2.1. y 2.2.2.), las dispersiones de las muestras desnaturalizadas (ASD y PSD) se obtuvieron por tratamiento térmico de las correspondientes dispersiones acuosas de ASN Y PSN, respectivamente.

2.3.1.- Determinación de la solubilidad proteica

La solubilidad de las diferentes muestras en las dispersiones acuosas (1-20 mg/ml) en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 se determinó como porcentaje a partir de la relación entre la concentración proteica en el sobrenadante después de una centrifugación a 15.000 g por 30 minutos y la concentración proteica total en la

dispersión, según el procedimiento experimental descrito por Mitidieri y Wagner (2002). Los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

2.3.2.- Determinación de la tensión superficial e interfacial.

Las mediciones de tensión superficial (agua/aire) e interfacial (agua/aceite) de equilibrio de las dispersiones de ASN, PSN, ASD, PSD y CS (0,1-10 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0), se llevaron a cabo según el método del anillo en un tensiómetro CSC-DuNouy 70535 (CSC Scientific Company, Inc., Fairfax, USA). Las lecturas obtenidas en el tensiómetro (L) se corrigieron para obtener los valores de tensión superficial e interfacial aplicando las siguientes ecuaciones:

$$B = 0,725 + \left(\frac{4 \cdot 10^{-4} \cdot L}{\delta_d - \delta_a} + 0,014 \right)^{0,5} \quad (38)$$

$$\gamma = B \cdot L \quad (39)$$

donde δ_d y δ_a fueron las densidades de las dispersiones acuosas y del aire (o del aceite para la corrección de los valores de tensión interfacial), respectivamente (Couper, 1993). La presión superficial (π_s^e) e interfacial (π_i^e) de equilibrio se definieron como:

$$\pi_s^e = \gamma_s^e - \gamma_s^o \quad (40)$$

$$\pi_i^e = \gamma_i^e - \gamma_i^o \quad (41)$$

donde γ_s^o y γ_i^o fueron las tensiones superficiales e interfaciales del buffer y γ_s^e y γ_i^e las tensiones superficiales e interfaciales de equilibrio de las dispersiones a una concentración determinada de muestra. La temperatura fue de $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ$. Cada medición se realizó al menos, por triplicado.

Las mediciones de densidad utilizadas en la fórmula de corrección (ecuación 28) se llevaron a cabo mediante determinaciones picnométricas a $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ$.

La densidad de las dispersiones acuosas o del aceite ($\delta_{d/a}$), se calcularon a partir de la siguiente expresión

$$\delta_{d/a} = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \cdot \delta_{\text{agua}} \quad (42)$$

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 la muestra (dispersiones acuosas o aceite, en gramos)
 δ_{agua} = densidad del agua a 20° C

2.3.3.- Determinación de la hidrofobicidad aromática superficial

Los valores de hidrofobicidad aromática superficial (H_0) de cada muestra fueron determinados por medio de la sonda fluorescente ANS (ácido 8-anilino 1 naftalen-sulfónico) de acuerdo al método de Kato y Nakai (1980). Las dispersiones proteicas (1 mg/ml) fueron preparadas en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 sin y con adición de NaCl 150 mM, agitadas durante 2 horas a 20° C y centrifugadas posteriormente a 15.000 g por 15 minutos. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (1976). El sobrenadante fue serialmente diluido con el mismo buffer, hasta obtener concentraciones en el rango de 0,5 a 0,005 mg/ml. A 3,0 ml de cada dilución se agregó 40 μ L de ANS (8,0 mM en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0) y la intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de emisión de 484 nm y una de excitación de 364 nm en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 2000. Los valores de H_0 se obtuvieron a partir de la pendiente inicial en el gráfico de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína, por análisis de regresión lineal.

2.3.4.- Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)

Alícuotas de las dispersiones de ASN, PSN, ASD, PSD y de CS se liofilizaron para poder preparar dispersiones más concentradas. Se disolvieron en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 (13,75 mg/ml), fueron luego agitadas por 15 minutos en un minishaker (IKA-MS1 Minishaker) y centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos (centrifuga IEC Centra MP4R, International Equipment Company, USA). EL sobrenadante se filtró y aplicó a una columna de filtración por gel (Superose 6B HR 10/30, Pharmacia LKB, Upsala, Suecia) con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min., operando a una presión máxima de 1 MPa. Las muestras se eluyeron con el mismo buffer utilizado para prepararlas. Las fracciones fueron colectadas (FRAC-100 collector, Pharmacia LKB, Upsala, Suecia) y analizadas por absorbancia a 280 nm (UV-1 detector, Pharmacia LKB, Upsala, Suecia). La columna fue calibrada con los

siguientes patrones de peso molecular (Sigma – Aldrich Co, Missouri, USA): azul de dextrano (volumen excluido), tiroglobulina (669 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa) y citocromo-C (12.4 kDa).

2.3.5.- Congelación de las dispersiones acuosas

Las dispersiones acuosas (20 ml) de las distintas muestras se congelaron en frascos de policloruro de vinilo con tapa (sección transversal, 3 cm.) por introducción directa en cámaras de frío de -20 y -80° C, almacenándose en estas condiciones durante 24 horas. Posteriormente las dispersiones se descongelaron en un baño de agua a 20° C y fueron inmediatamente utilizadas en las técnicas de caracterización.

2.4.- Preparación de las emulsiones

2.4.1.- Emulsiones para el estudio de la estabilidad frente al almacenamiento estacionario

Las emulsiones aceite en agua (o/w) se prepararon por homogeneización de 10 ml de las dispersiones acuosas de ASN, ASD, PSN, PSD o CS (1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 sin o con NaCl 500 mM) con 5 ml de aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata, Avellaneda, Argentina), utilizando un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania). La velocidad del rotor (S25N-10G, GmbH & Co., Staufen, Alemania) se ajustó en 20.000 r.p.m., el tiempo de homogeneización fue de 1 minuto y la temperatura de 20° C \pm 2°. Las condiciones de homogeneización se eligieron con el objeto de minimizar la inclusión de aire en el seno de la emulsión, la cual es una característica del método de homogeneización empleado.

2.4.2.- Emulsiones para el estudio de la estabilidad frente al esfuerzo de corte (agitación)

Las emulsiones o/w en este caso, por requerir mayor volumen de emulsión para los ensayos, se prepararon por homogeneización de 150 ml de las dispersiones acuosas de ASN, ASD o CS (1 –10 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0)

con 50 ml de aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata, Avellaneda, Argentina), utilizando un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) a temperatura controlada ($20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$). La velocidad del rotor (S20-25NK-19G, GmbH & Co., Staufen, Alemania) se ajustó en 20.000 r.p.m. y el tiempo de homogeneización fue de 1 minuto. Para estudiar el efecto del agregado de sal en la estabilidad de las emulsiones resultantes, se adicionó NaCl, de manera que su concentración final en la fase acuosa de la emulsión sea de 150 mM, de acuerdo al procedimiento experimental de Mitidieri y Wagner (2002). Las condiciones de homogeneización se eligieron, como en el caso anterior, con el objeto de minimizar la inclusión de aire en el seno de la emulsión, la cual es una característica del método de homogeneización empleado.

2.4.3.- Preparación de las emulsiones para el estudio de la estabilidad frente a la congelación

Las emulsiones se prepararon en dos etapas:

I) Homogeneización primaria: Se preparó una pre-emulsión por homogeneización de 150 ml de las dispersiones acuosas de ASN, ASD, o CS (0,1 - 2 % en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0) con 50 ml de aceite de girasol refinado (Molinos Río de la Plata, Avellaneda, Argentina), utilizando un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) a temperatura controlada ($20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$). La velocidad del rotor (S20-25NK 19G, GmbH & Co., Staufen, Alemania) se ajustó en 20.000 r.p.m. y el tiempo de homogeneización fue de 1 minuto.

II) Homogeneización secundaria: La emulsión final se preparó haciendo circular la pre-emulsión a través de un homogeneizador a válvula de alta presión (Stansted Fluid Power FPG 7400, Essex, Reino Unido) usando dos válvulas con la presión regulada en 40 Mpa la primera y 4 Mpa la segunda. El tiempo de homogeneización fue el suficiente para que la pre-emulsión circule 4 veces en el equipo, a una velocidad de flujo de 70 ml/min. Este procedimiento de re-circulación tiene por objeto favorecer la obtención de una emulsión de distribución de tamaño de gota pequeño y monomodal.

2.5.- Tratamientos de las emulsiones

2.5.1.- Almacenamiento estacionario

Las emulsiones se almacenaron en tubos de ensayo o en celdas cilíndricas de medición de vidrio (ver sección 2.6.7) en condiciones estacionarias durante 24 horas. La temperatura fue de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$.

2.5.2.- Esfuerzo de corte

El tratamiento de agitación se realizó de acuerdo al procedimiento experimental descrito en trabajos anteriores (Britten y Giroux, 1991; Mitidieri y Wagner, 2002). Las emulsiones (50 ml) fueron transferidas a frascos de Erlenmeyer (250 ml) y colocadas en una cabina de agitación (Environ Shaker Lab-line 3527-1, Lab-line Instruments, Illinois, USA) la cual provee una agitación orbital (19 mm de radio a 150 r.p.m.). Este tratamiento se realizó a una temperatura constante de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ durante 60 minutos.

2.5.3.- Congelación

Alicuotas de 20 ml de las emulsiones preparadas con las distintas muestras se congelaron en frascos de policloruro de vinilo con tapa (sección transversal, 3 cm.) por introducción directa en cámaras de frío de -20 y -80°C , almacenándose en estas condiciones durante 24 horas. La congelación se llevó a cabo en ausencia o en presencia de agentes crioprotectores (glucosa o sorbitol, 1, 3 y 5 % p/v, en la fase acuosa) los cuales se agregaron después del proceso de homogeneización. Posteriormente las emulsiones se descongelaron en un baño de agua a 20°C y fueron inmediatamente utilizadas en las técnicas de caracterización. La historia térmica del proceso de congelación/descongelación se registró mediante la inserción de una termocupla T de Cu-Cn en la parte central de la emulsión.

2.6.- Ensayos de caracterización de las emulsiones iniciales y sometidas a tratamientos

2.6.1.- Determinación de la fracción volumétrica de las emulsiones

La fracción volumétrica (ϕ) de las emulsiones se determinó mediante el proceso experimental descrito por Hill (1996). Se pesó, con exactitud de 0,1 mg, 5 g de emulsión en una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro, secándose posteriormente en estufa (Científica Central, Buenos Aires) a $105^\circ \text{C} \pm 2^\circ$ y presión normal hasta peso constante. Para estimar la fracción volumétrica en la fase crema después de 24 horas de almacenamiento estacionario, se separó la misma del suero empleando una espátula metálica y se siguió el mismo procedimiento que en las emulsiones recién preparadas. El valor de ϕ se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\phi = \frac{P_S - [C \times P]}{P_S + P \times \left[\frac{(1 + C) \times \delta_A}{\delta_M} - C \right]} \quad (43)$$

$$P_S = \frac{m_s}{m_e} \quad (44)$$

$$P = \frac{m_e - m_s}{m_e} \quad (45)$$

Donde m_s representa la masa de la emulsión seca, m_s la masa inicial de la emulsión (5 g), C es la concentración de muestra (expresada en % p/p), δ_A y δ_M son las densidades de la fase dispersa y de la dispersión acuosa de la muestra, respectivamente. Los parámetros δ_A y δ_M fueron determinados por picnometría (sección 2.3.2.).

2.6.2.- Determinación de la actividad interfacial específica

La actividad emulsionante también conocida como *actividad interfacial específica* (AIE) se determinó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Pearce y Kinsella (1978) para la determinación del índice de actividad emulsificante. Se tomaron al menos tres alícuotas (50 μL) de emulsión y se dispersaron rápidamente por inversión en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 conteniendo SDS al 0,1 %. La diluciones fueron de 1/100 o 1/200 a fin de que las absorbancias den valores en el rango 0,5 - 0,9. La absorbancia se midió a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. El parámetro AIE fue utilizado en vez del índice de actividad emulsificante

(IAE), debido a que es independiente de la concentración de proteína utilizada en la fase acuosa para preparar la emulsión, es decir, que AIE da la área total de las gotas (creada durante la homogeneización) por ml de emulsión. La AIE fue calculada a partir del IAE por medio de la expresión:

$$AIE = 10^{-6} \cdot IAE \cdot C \cdot (1 - \phi) \quad (46)$$

donde $IAE = 4,606 \cdot A \cdot D / l \cdot \phi \cdot C$ (ecuación 16), C es la concentración proteica en g/m³; A, la absorbancia a 500 nm; D, el factor de dilución (sin unidades); l, el camino óptico (en m) y ϕ , la fracción volumétrica de la fase dispersa. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

2.6.3.- Determinación del porcentaje de proteína adsorbida y la concentración proteica interfacial aparente

Las emulsiones se centrifugaron a 2000 g por 3 minutos a 25° C para acelerar el proceso de cremado sin romper el film interfacial. La fase inferior se retiró con una jeringa y fue centrifugada nuevamente a 15.000 g por 30 minutos. Esta etapa se repitió nuevamente para asegurar la total separación de las gotas de fase dispersa más pequeñas. Se determinó el contenido proteico final de la fase acuosa (C_f) mediante el método de Bradford (1976), realizándose el mismo procedimiento para las dispersiones iniciales (C_i). La porcentaje de proteína adsorbida (P_A %) y la concentración proteica superficial aparente (Γ_{ap} , en mg de proteína/m²) se calcularon como:

$$P_A \% = (C_i - C_f) \cdot 100 / C_i \quad (47)$$

$$\Gamma_{ap} = (1 - \phi) \cdot \%P_A \cdot C_i / 100 \cdot AIE \quad (48)$$

donde ϕ es la fracción volumétrica y AIE, la actividad interfacial específica. El parámetro Γ es aparente porque las proteínas pueden adsorberse en multicapas, especialmente cuando la concentración de la muestra proteica en la fase acuosa es elevada. Cuando las ecuaciones (46) y (47) se reemplazan en la (48) se obtiene la expresión de Haque y Kinsella (1988) para el cálculo de Γ , indicando que las mismas son equivalentes. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado.

2.6.4.- Distribución de tamaño de partícula y determinación de parámetros de estabilidad

La distribución de tamaño de partícula de las diferentes emulsiones se determinó por dispersión de luz utilizando un analizador de partículas Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Limited., Worcester, Reino Unido). Para llevar a cabo las determinaciones, dos alícuotas de 1 ml de emulsión inicial o emulsiones sometidas a distintos tratamientos fueron diluidas (1/2): la primera con el mismo buffer de la fase acuosa utilizado en la preparación de la emulsión y la segunda alícuota se diluyó con buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo 1% SDS para asegurar la completa defloculación de la emulsión (Anton, 2002). A partir de la distribución de tamaño de partícula expresada como % volumen o como % superficie en un rango de diámetros de 0,03 a 360 μm , se obtuvieron los diferentes diámetros promedio: $D_{3,2}$; $D_{4,3}$ y $D_{v,0,5}$.

A partir de los valores de $D_{4,3}$ se calcularon los índices de coalescencia (IC %), de floculación (IF %) y de coalescencia + floculación (ICF %) de las emulsiones sometidas a un tratamiento determinado, empleando las siguientes expresiones:

$$\text{IC \%} = [(D_{4,3 + \text{SDS}} - D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}) / D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}] \cdot 100 \quad (49)$$

$$\text{ICF \%} = [(D_{4,3 - \text{SDS}} - D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}) / D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}] \cdot 100 \quad (50)$$

$$\text{IF \%} = \text{ICF \%} - \text{IC \%} \quad (51)$$

donde $D_{4,3 - \text{SDS}}$ y $D_{4,3 + \text{SDS}}$ son los diámetros promedio de las emulsiones almacenadas un tiempo t , medidos en ausencia y presencia de SDS, respectivamente; $D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}$ es el diámetro promedio de la emulsión inicial con SDS. Además, se calculó el grado de floculación (GF %) como:

$$\text{GF \%} = [(D_{4,3 - \text{SDS}} - D_{4,3 + \text{SDS}}) / D_{4,3 + \text{SDS}}] \cdot 100 \quad (52)$$

$$\text{GF}_i \% = [(D_{4,3 \text{ i} - \text{SDS}} - D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}) / D_{4,3 \text{ i} + \text{SDS}}] \cdot 100 \quad (53)$$

Este parámetro puede calcularse tanto para las emulsiones sometidas a distintos tratamientos (ecuación 52), como para las iniciales (ecuación 53).

Aunque estos parámetros podrían calcularse también a partir del diámetro promedio de Sauter $D_{3,2}$, a fin de evaluar adecuadamente el grado de coalescencia y el de floculación es más conveniente utilizar $D_{4,3}$ debido a los cambios producidos en

las emulsiones por efecto de la congelación son detectados con mayor sensibilidad (Relkin y Sourdet, 2005).

La principal diferencia entre IC %, ICF %, IF % y GF % es que los primeros tres toman como referencia a la emulsión inicial y los cambios producidos en el tamaño de partícula (por coalescencia y floculación) respecto a la misma. En cambio, GF % refleja simplemente la variación del tamaño de partícula cuando la distribución se determina en ausencia y presencia de SDS y por ende, puede calcularse para las emulsiones iniciales y las sometidas a cualquier tratamiento como se mencionó anteriormente. Cuando una emulsión no se desestabiliza por coalescencia por efecto de un determinado tratamiento, IC % = 0 y el valor de ICF % se atribuye exclusivamente a la formación de flóculos. En este caso particular ICF % = IF % = GF %. Sin embargo, cuanto mayor es el grado de coalescencia de la emulsión, más bajo es el valor de GF % respecto a IF % e ICF %.

2.6.5.- Microestructura de las emulsiones

La microestructura de las emulsiones se evaluó por colocando alícuotas de 10 μ L de emulsión (sin o con dilución previa) sobre un portaobjetos. El cubreobjetos (22 \times 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, 200 y 400 X.

2.6.6.- Determinación de los parámetros de estabilidad frente a la agitación

La coalescencia acelerada se evaluó en el transcurso de 60 minutos de una agitación orbital controlada (sección 2.5.2). Cada 10 minutos se retiraron alícuotas (50 μ L) y se diluyeron 100 veces en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 conteniendo 0,1 % de SDS. La absorbancia de las emulsiones diluidas se midió a 500 nm (espectrofotómetro Beckman DU-650, USA). El porcentaje de coalescencia (C %), se determinó por medio de la expresión:

$$C \% = (A_o - A_t) \cdot 100 / A_o \quad (54)$$

donde A_0 es la absorbancia de la emulsión inicial y A_t es la absorbancia de la emulsión sometida a agitación al tiempo t .

Para obtener el porcentaje de floculación ($F\%$), alícuotas de $50\ \mu\text{L}$ de las mismas emulsiones fueron diluidas en buffer fosfato de sodio $10\ \text{mM}$ pH $7,0$ en ausencia y presencia de SDS $0,1\%$. $F\%$ se determinó a partir de la siguiente expresión:

$$F\% = (A_{\text{SDS}} - A) \cdot 100 / A_{\text{SDS}} \quad (55)$$

donde A y A_{SDS} son los valores de absorbancia a $500\ \text{nm}$ de las emulsiones diluidas en ausencia y en presencia de SDS, respectivamente. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

2.6.7.- Estabilidad global de las emulsiones en condiciones de almacenamiento estacionario

La estabilidad global de las emulsiones se analizó usando un analizador óptico vertical (Quick Scan, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA). Las emulsiones recientemente preparadas se colocaron en una celda cilíndrica de vidrio ($80\ \text{mm}$) para registrar los perfiles de transmisión ($T\%$) y backscattering ($BS\%$) en función de la altura en la celda. Los perfiles de $T\%$ y $BS\%$ se registraron durante 60 minutos a intervalos de 1 minuto, llevándose a cabo para cada muestra, una medida final a las 24 horas de almacenamiento.

La cinética de cremado-floculación se evaluó a partir de la variación de los valores promedio de $BS\%$ ($BS_{\text{prom}}\%$) en la parte inferior del tubo de medida (10 - $20\ \text{mm}$). La constante cinética de cremado-floculación se definió por medio de la expresión:

$$K = 10^3 / BS_{0\ \text{prom.}\%} \cdot t_{1/2} \quad (56)$$

donde $BS_{0\ \text{prom}}\%$ es el valor promedio inicial de BS (correspondiente al perfil a $t = 0$ min) y $t_{1/2}$ es el tiempo para el cual $BS_{\text{prom}}\% = BS_{0\ \text{prom}}\% / 2$. Además de K , la cual da información sobre la velocidad con la que se desarrollan los procesos de cremado-floculación en los estadios iniciales, se determinó $D_{\text{inf}}\%$ que es el porcentaje de desestabilización de estos procesos simultáneos en función del tiempo en la parte inferior del tubo. $D_{\text{inf}}\%$ se calculó mediante la siguiente expresión:

$$D_{\text{inf}} \% = [(BS_{0, \text{prom}} - BS_{\text{prom}}(t)) / BS_{0, \text{prom}}] \cdot 100 \quad (57)$$

Por otra parte, la desestabilización de la fase crema (coalescencia + floculación) a las 24 horas de almacenamiento estacionario, se evaluó a partir de la variación de los valores promedio de BS % en función de tiempo en la zona media de la fase crema formada. Esta zona fue elegida para evaluar los cambios microestructurales de la crema sin la interferencia de burbujas de aire provenientes de la formación de espuma, las cuales se encuentran después de 24 horas mayoritariamente en la zona superior. El porcentaje de desestabilización en la crema $D_{\text{med}} \%$ se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$D_{\text{med}} \% = [(BS_{\text{prom, max}} \% - BS_{\text{prom, 24}} \%) / BS_{\text{prom, max}} \%] \cdot 100 \quad (58)$$

donde $BS_{\text{prom, max}} \%$ es el valor promedio máximo de BS correspondiente a la zona media de la fase crema formada y $BS_{\text{prom, 24}}$ es el valor promedio de BS a las 24 horas de almacenamiento.

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

$$V_r = \frac{\text{longitud de la fase crema (mm)}}{\text{longitud total (fase crema + suero) (mm)}} \quad (59)$$

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.

2.6.8.- Comportamiento reológico de la fase crema

El comportamiento reológico de la fase crema de las emulsiones preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD y CS se analizó en un reómetro Haake CV20 (Haake, Karlsruhe, Alemania) utilizando un sensor de platos paralelos con una separación (gap) de 1mm. Después de 24 horas de almacenamiento estacionario, la fase crema se separó cuidadosamente del suero con una espátula metálica, colocándose posteriormente una alícuota en el plato inferior del reómetro. La temperatura se controló a $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ$, mediante un baño termostático Haake F3 (Haake, Karlsruhe,

Alemania) adaptado al reómetro. Para prevenir la deshidratación se adicionó silicona alrededor de los bordes de los platos. Las determinaciones se llevaron a cabo registrando la variación del módulo de almacenamiento (G'), del módulo de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$) en función de la frecuencia de oscilación (0,03 – 5 Hz), con una deformación de 3 %, dentro del rango viscoelástico lineal.

Los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

2.6.9.- Estimación de la cantidad de aceite separado. Método de dilución del colorante

La solución madre de Sudan III (Croma-Gesselchaft, Schmid GmbH & Co., Alemania) se preparó en aceite de girasol refinado (0,015 % p/p) por agitación magnética durante 24 horas (Palanuwech y col., 2003).

El espectro de absorción del colorante se muestra en la Figura 10a observándose la presencia de un único pico con un máximo de absorción a 508 nm. Además, la absorbancia a 508 nm (A_{508}) exhibe una dependencia lineal con la concentración del colorante en el rango de concentración 0 – 0,001 % p/p, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer (Figura 10b). Teniendo en cuenta estos datos, se realizó una dilución de la solución madre de Sudan III hasta una concentración de 0,001 % p/p. Esta dilución de la solución madre se utilizó para llevar a cabo todas las determinaciones.

En primer lugar se realizó un experimento control en donde a una emulsión estable (emulsión preparada con CS, 20 mg/ml de muestra en la fase acuosa, según sección 2.4.3) se le agregó cantidades crecientes y conocidas de aceite de girasol más la solución del colorante según el protocolo que se muestra en la Tabla 11, el cual es similar al descrito por Thanasukarn y col., (2004) en un trabajo previo.

La determinación se realizó con una leve modificación del procedimiento experimental descrito por Palanuwech y col. (2003). La emulsión problema y la solución de la colorante en el aceite, en cantidades dadas por el protocolo (Tabla 11), se colocaron en tubos de centrifuga de plástico y se mezclaron por inversión suave, incubando durante 60 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 250 g (centrifuga Rolco 2036, Rolco S.R.L, Buenos Aires), sólo para permitir que la capa del aceite coloreado (fase superior) se separe completamente de la emulsión problema (fase inferior). La centrifugación a baja velocidad tiene por objeto minimizar la desestabilización que podría darse por efecto de una

centrifugación a alta velocidad, lo cual podría conducir a resultados sobre estimados de oiling off (Thanasukarn y col., 2004).

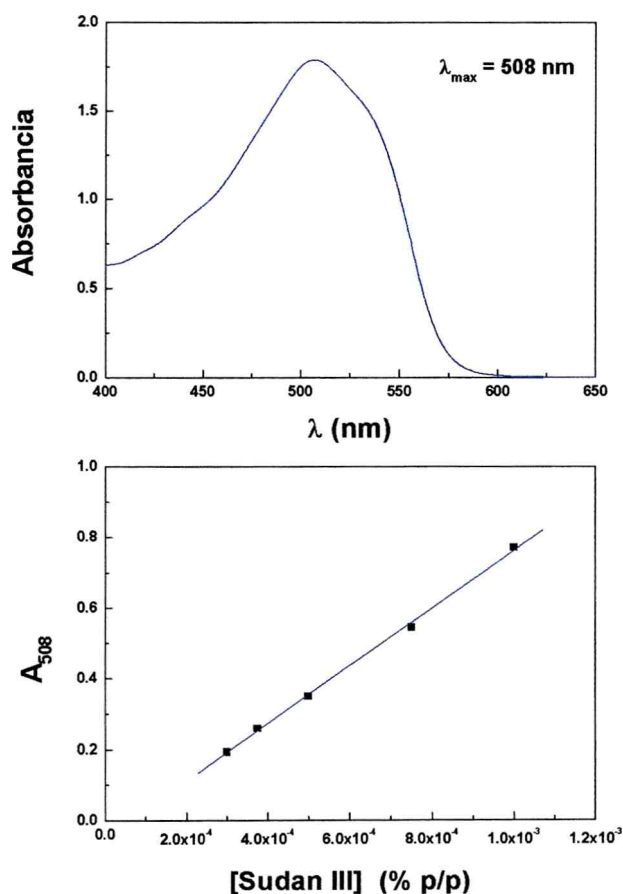


Figura 10: a) Espectro de absorción del colorante Sudan III (0,015 % p/p en aceite de girasol refinado); b) Variación de la absorbancia a 508 nm con la concentración (% p/p) de sudan III ($r^2 = 0,99$).

A continuación, para cada muestra, se retiró una alícuota (aproximadamente 1,5 ml) del aceite coloreado en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14.000 g (centrífuga IEC Centra MP4R, International Equipment Company, USA) durante 15 minutos para eliminar cualquier interferencia que puede afectar la medida espectrofotométrica.

La fracción en masa del aceite separado o no emulsificado (AS %) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$AS\% = \frac{m_o \cdot (A - 1)}{m_e \cdot \phi_m} \quad (60)$$

donde m_o es la masa de solución de colorante, m_e es la masa de la emulsión, ϕ_m es la fracción en masa del aceite en la emulsión y A es la relación de las absorbancias a 508 nm del aceite coloreado antes y después del proceso de extracción. Por definición el parámetro A es igual a 1 cuando no hay aceite separado, en caso contrario el valor de A siempre será mayor a 1.

Tabla 11: Protocolo de determinación de aceite separado para las emulsiones control y problema. Emulsión control: CS (dispersión acuosa de 20 mg/ml, preparada según lo indicado en la sección 2.4.3). El aceite separado teórico se calculó de acuerdo a la masa agregada de aceite, sin tener en cuenta el aceite presente en la emulsión (emulsionado).

Emulsión	Masa de aceite (g)	Masa de emulsión (g)	Masa de Sudan III (0,001 % p/p) (g)	Aceite separado (teórico)
Control 1	0	8,0	2,0	0
Control 2	0,5	8,0	2,0	28,2
Control 3	1,0	8,0	2,0	53,8
Control 4	1,5	8,0	2,0	80,6
Control 5	1,9	8,0	2,0	100,0
Emulsión problema	0	8,0	2,0	-

La buena correlación lineal observada entre el aceite separado calculado teóricamente y el aceite separado calculado a partir de la variación de la absorbancia de la solución del colorante ($r^2 = 0,98$), indica que el colorante no interfiere con la fase dispersa ni el agente emulsificante (Figura 11). Este resultado está de acuerdo con el obtenido por Palanuwech y col. (2003).

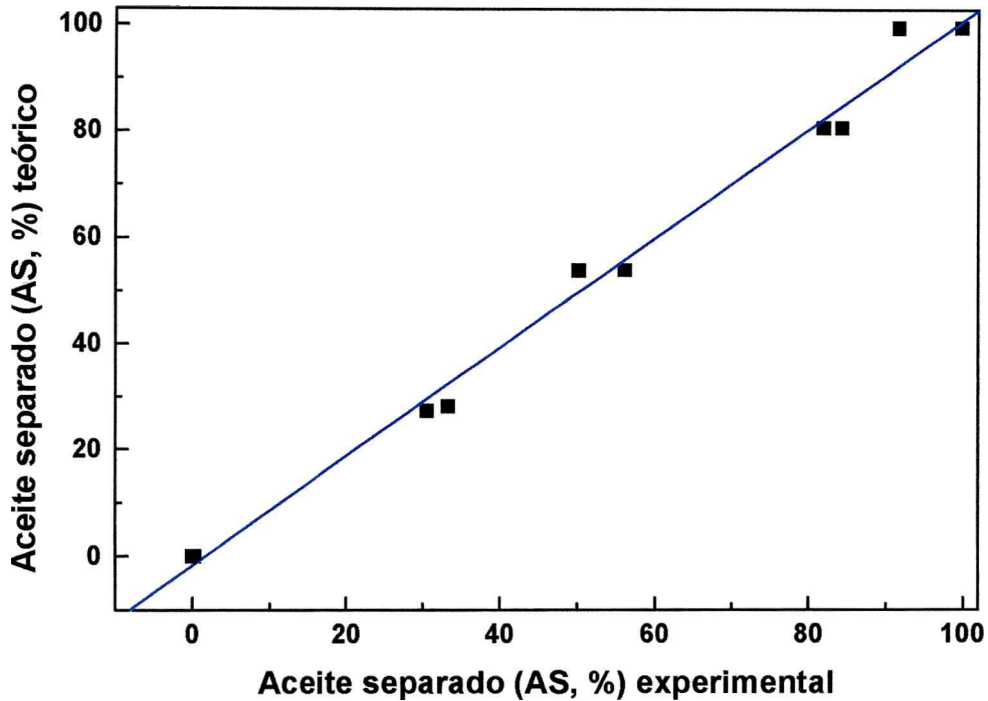


Figura 11: Relación entre aceite separado (AS %) teórico y experimental obtenido mediante la adición de distintas cantidades de aceite de girasol a una emulsión estable preparada con una dispersión 20 mg/ml de CS (sección 2.4.3) ($r^2 = 0,98$)

2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANAVA) y las diferencias entre medias mediante el Test de Fisher a un nivel de significación $\alpha = 0,05$. (Statgraphics Plus versión 2.1, Statistical Graphics Corp., Princeton, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y TENSIOACTIVAS DE PROTEÍNAS DE SOJA

3.1.1.- Caracterización estructural de proteínas de soja

Las proteínas de reserva y del suero son los principales grupos de proteínas del grano de soja. El aislado nativo de soja (ASN) se obtiene por precipitación isoeléctrica en medio ácido de un extracto acuoso de harina de soja, con posterior solubilización y neutralización. Está compuesto principalmente por las globulinas 7S (β -conglucina) y 11S (glicinina). Las proteínas nativas del suero (PSN) constituyen la fracción soluble separada de las proteínas de almacenamiento durante la precipitación en medio ácido y los principales componentes de esta muestra son los inhibidores trópticos de Kunitz (KTI), de Bowman Birk (BBTI) y la lectina (L). Como se mencionó en la introducción (sección 1.5.1.), la glicinina, la β -conglucina y la lectina son proteínas oligoméricas. La β -conglucina está formada por tres subunidades (α , α' y β), la glicinina es un hexámero de subunidades A-B y la lectina es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas. En cambio, el KTI y el BBTI son proteínas globulares y monoméricas de bajo peso molecular. Por otra parte, el caseinato de sodio (CS) consiste en partículas coloidales submicelares con un peso molecular aproximado de 250 kDa (Creamer y Berry, 1975). Se obtiene por precipitación ácida de la leche y posterior neutralización con NaOH de los coágulos obtenidos. Su estructura y composición son similares a la de las micelas de caseína, lo cual significa que está compuesto por las α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseínas en una proporción aproximada de 38, 10, 36 y 13 % respectivamente (Tornberg y col., 1997; Fox y Kelly, 2004). En este trabajo el CS se utilizó como muestra proteica control debido a sus buenas propiedades emulsificantes, informadas en distintos trabajos (Dickinson y col., 1997; Ye y Singh, 2001; Dickinson y col., 2003).

La solubilidad (S) de las dispersiones acuosas de las muestras nativas (ASN, PSN y CS) en buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,0 fue mayor al 99 %. El tratamiento térmico a 90° C durante 5 minutos sobre las dispersiones acuosas de AN y PSN fue suficiente para desnaturalizar totalmente sus especies constituyentes (Sorgentini y Wagner, 1999). Sin embargo, no se observó una disminución de S en las dispersiones ASD y PSD, indicando que los posibles agregados que podrían formarse permanecieron en estado soluble.

A fin de analizar la distribución de masa molecular y presencia de agregados de las distintas muestras, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular empleando como buffer de elución el mismo que se utilizó para preparar las emulsiones. Los resultados se muestran en la Figura 12. Los perfiles de elución de aislado nativo (ASN) mostraron los picos característicos de $\geq 15S$ (dímero y polímeros de glicinina), 11S (glicinina), 7S (β -conglucina) y 4S (glicinina disociada), con MM > 700, 360, 270 y 60 kDa, respectivamente (Figura 12a). En la dispersión de ASD, se observó la desaparición total del pico correspondiente a 15S, la reducción del de 11S y la aparición de especies moleculares con pesos moleculares menores 100 kDa (subunidades de las globulinas 7S y 11S. El cromatograma de ASD mostró también la presencia de un pico pequeño correspondiente a un agregado de elevado peso molecular y superior al de 15 S (> 1000 kDa). De acuerdo a Yamauchi y col. (1991) por efecto del tratamiento térmico a concentraciones relativamente bajas se produce la disociación de la glicinina y β -conglucina en sus subunidades constituyentes, las cuales pueden permanecer como tales y/o formar agregados solubles.

El perfil cromatográfico de las proteínas del suero nativas (PSN, Figura 12b) mostró tres picos: el de menor peso molecular correspondiente a la hemaglutinina o lectina (tetrámero de 120 kDa) y los otros probablemente a agregados de lectina y KTI. El KTI es una proteína globular pequeña (20 kDa); la ausencia de un pico a pesos moleculares < 30 kDa en el cromatograma de PSN indica que esta proteína forma agregados de mayor peso molecular. La ausencia del pico correspondiente a BBTI (peso molecular < 10 kDa), se atribuye a la baja proporción de esta proteína en PSN. La desnaturalización térmica de PSD provocó la disminución del pico de mayor peso molecular y la aparición de especies de bajo peso molecular, correspondiente al KTI y a monómero de la lectina (20-30 kDa). Además, al igual que en muestra ASD, el cromatograma de PSD también evidenció la presencia de un pequeño pico que correspondería a agregados de alto peso molecular de las proteínas desnaturalizadas. La solubilidad total de la muestra ASD, indica que estos agregados permanecieron en estado soluble.

Por otra parte, el caseinato de sodio (CS) presentó los componentes de mayor peso molecular de las tres fracciones (Figura 12c), atribuibles a agregados submicelares de distinto tamaño. Según Creamer y Berry (1975), el CS está compuesto por partículas submicelares con pesos aproximados de 250 kDa. De acuerdo a lo observado en el cromatograma, es probable que estas partículas coloidales se agreguen en especies de mayor peso molecular.

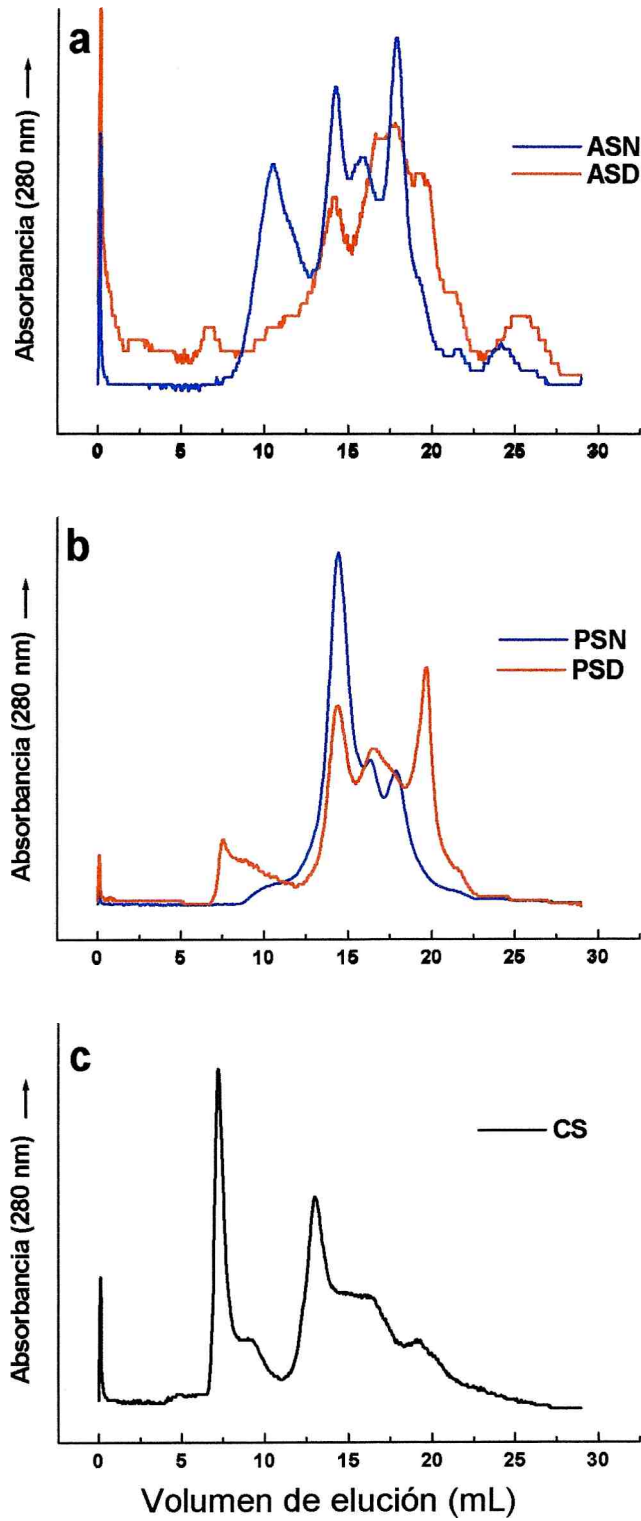


Figura 12: a) Perfiles de elución de las dispersiones acuosas de: a) ASN y ASD; b) PSN y PSD; c) CS. Velocidad de flujo: 0,2 ml/min, presión máxima: 1 MPa

El contenido de aminoácidos hidrofóbicos y su ubicación espacial en la proteína ha sido relacionado con las propiedades funcionales (Kato y Nakai, 1980). En una proteína globular, los restos aminoácidos hidrofóbicos tienden a localizarse en el interior de la proteína, evitando el contacto con el medio acuoso. Sin embargo, debido a impedimentos estéricos no todos los restos aminoácidos hidrofóbicos residen en el interior de la molécula de la proteína. Por tal motivo un número importante de ellos pueden permanecer en la superficie de la molécula de la proteína conjuntamente con restos aminoacídicos polares y cargados. En este trabajo, la hidrofobicidad superficial de las muestras (H_0) sin y con la adición de 150 mM de NaCl se evaluó mediante la utilización de la sonda fluorescente ANS dando los valores que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Hidrofobicidad aromática superficial (H_0) de las dispersiones de ASN, ASD, PSN, PSD y CS, en ausencia y presencia de NaCl, 150 mM. Cada valor fue el promedio de al menos dos determinaciones independientes.

Muestra	NaCl agregado	H_0 (sin unidades)
ASN	0 mM	98 ± 7
ASD		350 ± 12
PSN		< 10
PSD		142 ± 9
SC		220 ± 11
ASN	150 mM	191 ± 10
ASD		521 ± 15
PSN		63 ± 6
PSD		178 ± 12
SC		340 ± 10

En ausencia de NaCl, ASN mostró un valor de H_0 muy superior al de PSN. La exposición de los restos aminoacídicos hidrofóbicos por efecto de la desnaturalización

térmica en ASN y PSN provocó un incremento de H_0 . Los valores de H_0 de ASN y PSN fueron de 98 ± 7 y < 10 , respectivamente, incrementándose cuatro y seis veces en las muestras ASD y PSD, respectivamente. El CS fue más hidrofóbico que ASN y PSD y menos que ASD. Aún cuando sus principales proteínas constituyentes son muy hidrofóbicas, la presencia de los restos glicosídicos la κ -caseína en la superficie de las partículas coloidales de CS, explicaría el valor de H_0 obtenido para esta muestra proteica.

La adición de NaCl produjo un aumento de H_0 independientemente del tipo de muestra analizada, resultado acorde al obtenido por Mitidieri y Wagner (2002) en un trabajo previo. La presencia de electrolitos modifica la organización estructural de las moléculas de agua alrededor de los restos no polares, lo cual tiene una influencia directa sobre las interacciones hidrofóbicas entre estos grupos. En nuestro caso, la presencia de los iones Na^+ y Cl^- aumenta la magnitud de las interacciones hidrofóbicas entre la sonda fluorescente y los restos aminoácidos superficiales no polares de las moléculas de proteína. Esto explicaría el incremento de H_0 observado para todas las muestras.

3.1.2. Comportamiento superficial e interfacial de proteínas de soja en dispersiones diluidas

Se evaluaron las propiedades tensioactivas de las proteínas de soja y el caseinato de sodio en la interfase a/w y o/w mediante tensiometría de anillo. Este método permite determinar las tensiones superficial (γ_s^e) e interfacial de equilibrio (γ_i^e) a partir de las cuales puede calcularse las correspondientes presiones superficiales e interfaciales de equilibrio (π_s^e y π_i^e) en dispersiones con y sin adición de NaCl (Tabla 13). El tensiómetro de anillo permite realizar medidas de tensión superficial o interfacial con una exactitud de hasta 0,1 mN/m (Couper, 1993). Las determinaciones se realizaron sobre las dispersiones acuosas diluidas de las muestras (1 mg/ml) que fueron empleadas para preparar las emulsiones y estudiar su estabilidad en condiciones de almacenamiento estacionario (sección 3.2).

En ausencia de NaCl, la muestra PSN exhibió el menor valor de π_i^e de todas las muestras analizadas, mientras que en la muestra desnaturalizada PSD se observó una mejora en la tensioactividad. De la misma manera, ASD fue más tensioactivo que ASN ($p < 0,05$). Este incremento de la tensioactividad por efecto del tratamiento térmico sería atribuible a la presencia de moléculas de proteína con mayor

hidrofobicidad superficial (H_0) y grado de disociación (especies de menor MM observables en FPLC, Figura 12). Cuando una proteína se adsorbe en la interfase, los restos aminoacídicos no polares se orientan favorablemente hacia la fase lipídica a través de interacciones de carácter hidrofóbico. La muestra CS, con un alto valor H_0 fue la más tensioactiva a pesar de estar constituida por partículas submicelares de alto peso molecular. Este resultado podría atribuirse al hecho de que las micelas de caseína están constituidas por proteínas muy hidrofóbicas (α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas) que al interactuar con la interfase o/w son fácilmente adsorbidas por disociación micelar (Tornberg y col., 1982; Tornberg y col, 1997).

La adición de NaCl en la dispersión acuosa (500 mM) produjo un leve pero significativo aumento de π_i^e en ASD, PSD y CS ($p < 0,05$). En las muestras nativas, la magnitud del incremento fue superior que en las muestras desnaturalizadas: aproximadamente 10 % para ASN y 15 % para PSN (Tabla 13).

Tabla 13: Presión interfacial (interfase o/w) y superficial (interfase a/w) de equilibrio (π_i^e y π_s^e) para las dispersiones diluidas de ASN, ASD, PSN, PSD y CS. Concentración de muestra: 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0. Desviación estándar máxima: 5 %. Mínima diferencia significativa ($\alpha=0,05$): 0,3 y 0,4 mN/m para π_i^e y π_s^e , respectivamente. Temperatura: 20° C.

Muestra	NaCl agregado	Presión interfacial	Presión superficial
		(π_i^e mN/m)	(π_s^e mN/m)
ASN	0 mM	13,2 ± 0,1	21,0 ± 0,3
ASD		14,2 ± 0,1	21,7 ± 0,3
PSN		12,2 ± 0,3	19,2 ± 0,5
PSD		14,3 ± 0,1	21,9 ± 0,3
CS		15,2 ± 0,1	24,6 ± 0,5
ASN	500 mM	14,6 ± 0,2	23,0 ± 0,4
ASD		14,7 ± 0,2	23,2 ± 0,2
PSN		14,0 ± 0,6	21,1 ± 0,4
PSD		14,7 ± 0,3	23,1 ± 0,2
CS		15,8 ± 0,2	25,2 ± 0,2

En estas condiciones, el aumento de la tensioactividad se atribuiría principalmente a una interacción más favorable de los restos aminoacídicos no polares y la fase lipídica, lo cual se corresponde con el incremento de H_0 en presencia de NaCl (Tabla.12). Además, para las muestras nativas es probable también que el NaCl reduzca la magnitud de las interacciones electrostáticas repulsivas por un efecto de apantallamiento de cargas (McClements, 1999). El incremento de la tensioactividad de las muestras proteicas por efecto de la adición del NaCl también fue observado previamente por Tornberg y col. (1982), trabajando con proteínas aisladas de soja, concentrado proteico del lactosuero y caseinato de sodio.

Las determinaciones llevadas a cabo en la interfase a/w mostraron la misma tendencia que en la interfase o/w. Los valores de π_s^e aumentaron significativamente por efecto del tratamiento térmico para las proteínas de soja y también se incrementaron cuando el NaCl se agregó a las dispersiones acuosas ($p < 0,05$). Graham y Phillips (1980) y Tornberg y col. (1982), utilizando métodos de tensiometría dinámicos encontraron que las características de adsorción de diferentes proteínas en las interfases a/w y o/w fueron cualitativamente similares.

3.1.3. Comportamiento superficial e interfacial de las proteínas de soja. Efecto de la concentración de muestra.

En esta sección, se analizó la dependencia de las presiones superficial e interfacial de equilibrio (π_s^e y π_i^e) con la concentración de muestra en las dispersiones acuosas para ASN, ASD y CS, las cuales se emplearon para preparar emulsiones o/w y estudiar la estabilidad de las mismas bajo condiciones de trabajo mecánico (sección 3.3).

Las Figuras 13 y 14 muestran la variación de π_s^e y π_i^e con la concentración de muestra, en ausencia y en presencia de 150 mM de NaCl. Independientemente de la adición de sal en las dispersiones acuosas, para las tres muestras estudiadas se observó un incremento inicial de π_s^e y π_i^e hasta llegar a un valor máximo que correspondería a la situación de saturación de la interfase (Graham y Phillips, 1980; Phillips, 1981). Este tendencia fue similar en las interfases a/w y o/w.

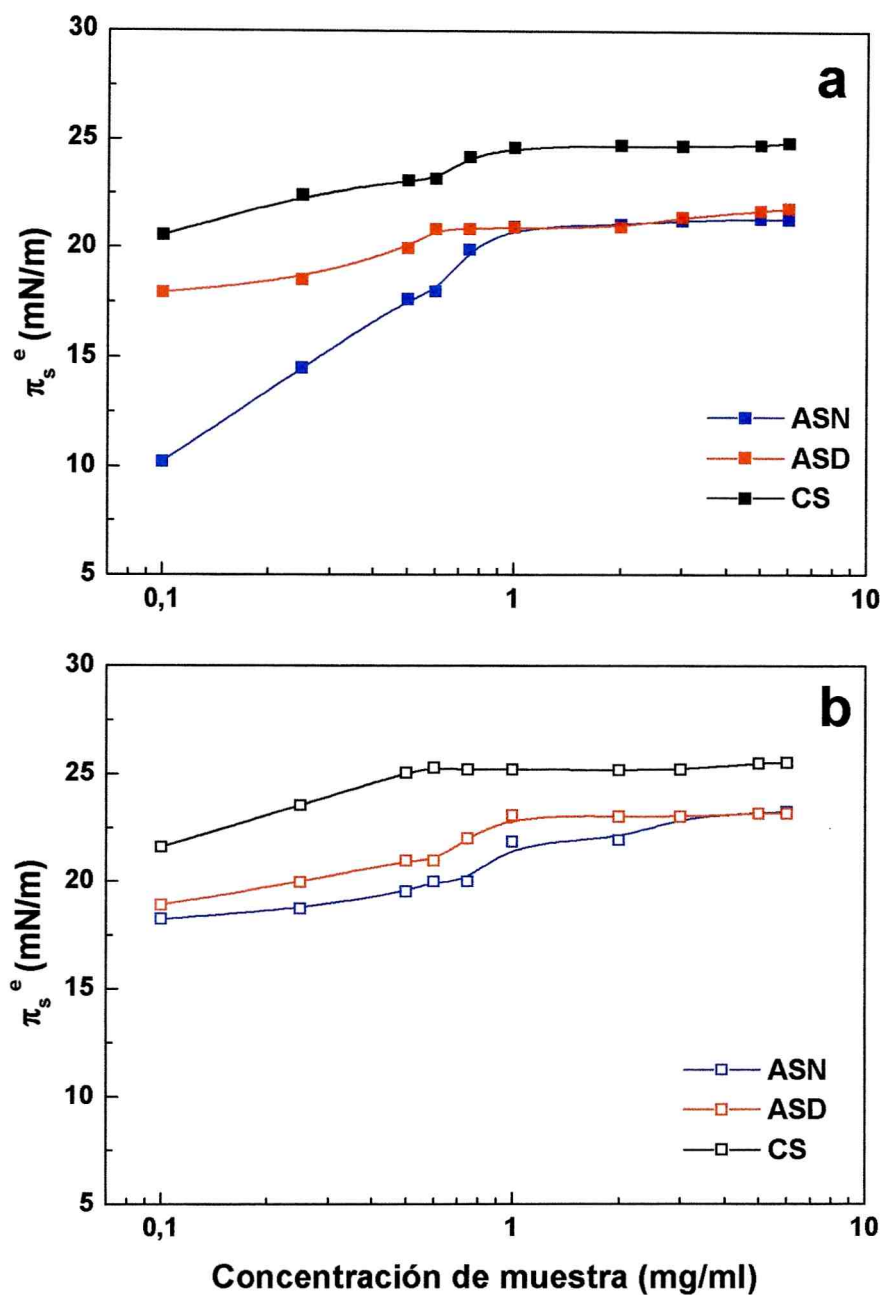


Figura 13: Variación de la presión superficial de equilibrio (π_s^e) de ASN, ASD y CS con la concentración de muestra en las dispersiones acuosas. Los valores son el promedio de, al menos dos determinaciones independientes. Desviación estándar máxima: 5 %.

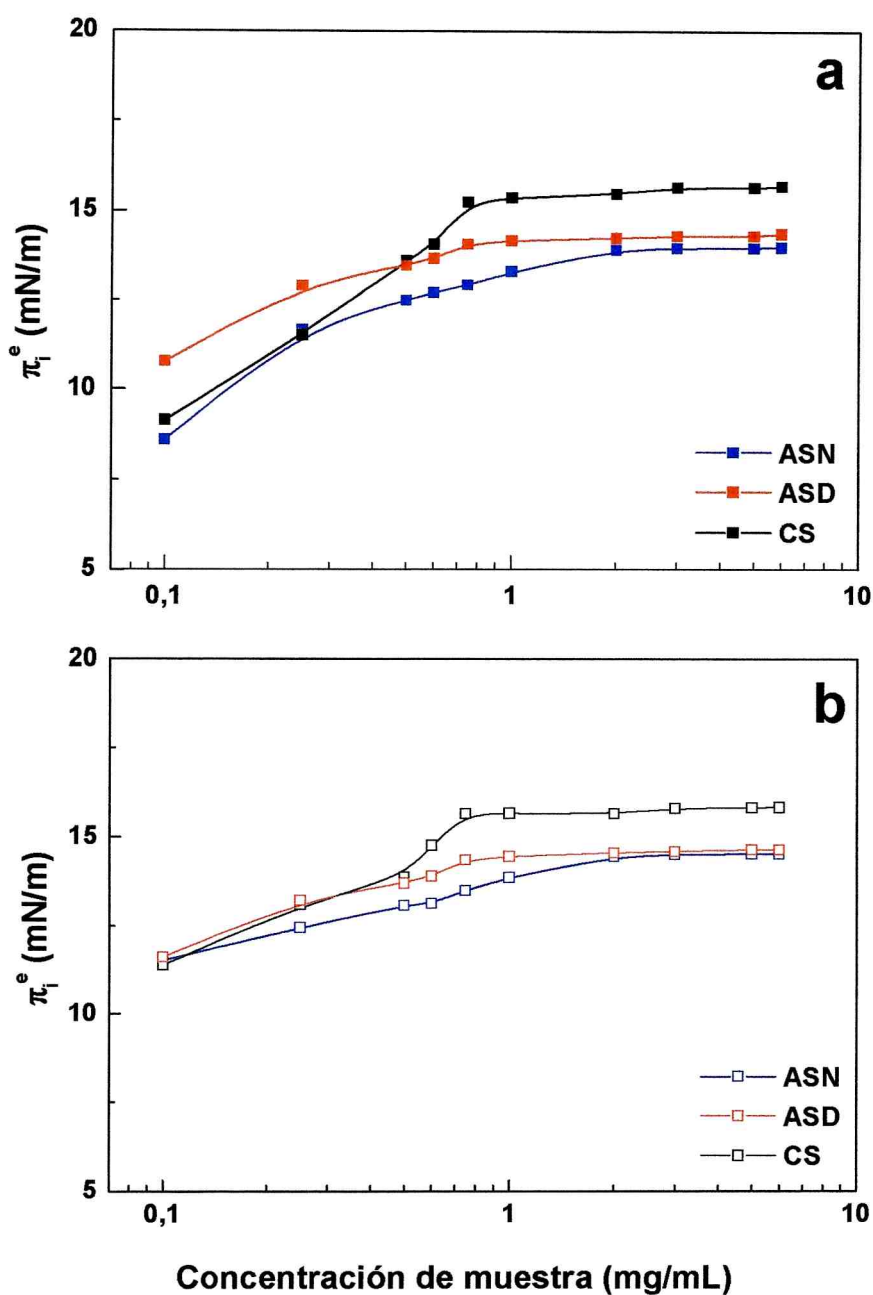


Figura 14: Variación de la presión interfacial de equilibrio (π_i^e) de ASN, ASD y CS con la concentración de muestra en las dispersiones acuosas. Los valores son el promedio de, al menos dos determinaciones independientes. Desviación estándar máxima: 5 %.

En la interfase a/w, en ausencia de NaCl y a concentraciones de muestra menores a 0,5 mg/ml, π_s^e mostró claramente el orden CS > ASD > ASN (Figura 13a). En presencia de sal, la dispersión acuosa de CS exhibió la mayor tensioactividad, mientras que los valores de π_s^e de ASN fueron sólo levemente menores a los ASD ($p < 0,05$) (Figura 13b). A concentraciones más elevadas y en condiciones de saturación interfacial (> 1,2 mg/ml) sólo las dispersiones acuosas de CS mostraron una π_s^e significativamente mayor, independientemente de la fuerza iónica ($p < 0,05$). Este resultado refleja la alta actividad superficial de las proteínas constituyentes de CS en relación a las proteínas de soja tanto nativas como desnaturalizadas.

En la interfase o/w, a concentraciones de muestra menores a 0,3 mg/ml y en ausencia de NaCl, ASD disminuyó la tensión interfacial en mayor medida que ASN y CS (Figura 14a), en tanto que con la adición de NaCl no hubo diferencias significativas entre las tres muestras (Figura 14b). En comparación con el comportamiento observado en la interfase a/w, estos resultados reflejan que la actividad interfacial de las proteínas de soja se asemeja más a la del CS. En este contexto, Tornberg y col. (1982), utilizando el método de tensiometría dinámica de volumen de gota, analizó comparativamente el comportamiento interfacial de proteínas aisladas de soja, concentrados proteicos de suero de leche y caseinato de sodio en la interfases a/w y aceite de soja/agua. Encontraron que la tensioactividad de las proteínas de soja se incrementó en relación a la de otras muestras cuando las determinaciones se realizaron en la interfase aceite de soja/agua. Esto implicaría, que las proteínas de soja podrían estructurarse formando una conformación más expandida en la interfase o/w, en relación a la interfase a/w. A concentraciones de muestra superiores a 0,5 mg/ml, tanto en ausencia como en presencia de NaCl, el comportamiento interfacial de las muestras fue diferente. Entre los aislados de soja, ASD fue más tensioactivo que ASN sólo en ausencia de NaCl. Al igual que en la interfase a/w el CS fue más tensioactivo, resultado que concuerda con los obtenidos por Tornberg y col. (1982).

La eficiencia de adsorción es la medida de la mínima cantidad de agente tensioactivo necesaria para producir la saturación de la interfase (McClements, 1999). La concentración de muestra requerida en la dispersión acuosa para saturar la interfase fue aproximadamente 0,8 mg/ml para CS y ASD, mayor para ASN (1,2 mg/ml), y similar en interfases a/w y o/w.

Habiendo visto que CS y ASD exhiben valores de H_0 más elevados que ASN (Tabla 12), se puede inferir que poseen una mayor proporción de aminoácidos no polares expuestos al medio acuoso y agrupados en zonas. Estas zonas o “patches” hidrofóbicos servirían como sitios de unión a las interfases a/w y o/w. El cambio energético termodinámicamente favorable asociado con la unión de estos sitios a las interfases a/w y o/w sería mayor en el caso de ASD y CS, hecho que explicaría la mayor eficiencia de adsorción de estas muestras en relación a ASN.

En conclusión, la desnaturalización térmica de las proteínas de reserva de soja incrementó su eficiencia de adsorción, por lo cual el comportamiento interfacial de ASD a bajas concentraciones es similar al de CS. Sin embargo, a concentraciones elevadas de muestra y en condiciones de saturación interfacial, la actividad interfacial de ASD no mejoró demasiado respecto de ASN, siendo inferior a la de CS. Dada la alta hidrofobicidad de las proteínas de ASD, a concentraciones superiores a 0,8 mg/ml habría una estabilización de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas lo que restringiría la adsorción interfacial o, viéndolo de otra manera, habría una competencia entre las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-interfase.

Por su parte, CS exhibe una muy alta actividad interfacial, a pesar de estar formados por partículas coloidales de peso molecular elevado (Figura 12). En un trabajo más reciente, Tornberg y col. (1997) informó el comportamiento interfacial de las caseínas no varía significativamente con el estado coloidal de la misma, lo que implica que las partículas submicelares se disocian fácilmente cuando interaccionan con la interfase, aún a altas concentraciones.

Conclusiones parciales

- ✓ La desnaturalización del aislado nativo de soja por tratamiento térmico de dispersiones diluidas de 1 mg/ml del mismo, produjo la disociación de las globulinas 7S y 11S en sus subunidades, con formación de agregados que permanecieron en estado soluble.
- ✓ El tratamiento térmico de las dispersiones acuosas de proteínas nativas del suero de soja, produjo la disociación de la lectina en sus monómeros y la disociación de los agregados del inhibidor de tripsina de Kunitz. Al igual que en los aislados de soja se formaron especies de peso molecular muy elevado que permanecieron solubles luego del tratamiento térmico.
- ✓ La desnaturalización térmica de los aislados y proteínas del suero de soja produjo un incremento en la hidrofobicidad aromática superficial. Acorde a la formación de agregados solubles, el tratamiento térmico no ocasionó una pérdida de solubilidad.
- ✓ La adición de NaCl a las dispersiones acuosas produjo un aumento de la hidrofobicidad aromática superficial y de la tensioactividad de todas las muestras, tanto nativas como desnaturalizadas
- ✓ El incremento de la tensioactividad de las muestras por el agregado de NaCl se observó tanto en la interfases aire/agua como en la interfase aceite/agua.
- ✓ En la interfase aceite/agua, a concentraciones menores a la mínima necesaria para la saturación interfacial, las proteínas de soja muestran una tensioactividad más parecida a la del caseinato de sodio, especialmente en presencia de NaCl. Este efecto no se observó en la interfase agua/aire.
- ✓ La desnaturalización térmica de los aislados de soja, incrementó su eficiencia de adsorción pero no su actividad interfacial. En condiciones de saturación interfacial el caseinato de sodio fue mucho más tensioactivo que las muestras proteicas de soja, tanto nativas como desnaturalizadas térmicamente.

3.2. ESTABILIDAD DE EMULSIONES O/W EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO ESTACIONARIO

En la presente sección se presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad global de emulsiones o/w preparadas con proteínas de soja bajo condiciones de almacenamiento estacionario. 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 un 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 inicial. La fase inferior o suero está empobrecida en gotas de fase dispersa y por lo tanto enriquecida en la fase acuosa. En trabajos previos (Tornberg y Hermansson, 1977; Kato y col., 1985; Dagorn-Scaviner y col., 1987; Dickinson y col., 1997; Kauten y col., 1991) se han propuesto distintos métodos, tanto destructivos como no destructivos, para el análisis de la separación gravitacional en las emulsiones o/w. Estos métodos han sido analizados brevemente en la Introducción.

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, que la floculación y el cremado han alcanzado un grado avanzado de desarrollo. Por el contrario, en una emulsión más concentrada en fase dispersa, como es la 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 coalescencia (Mc Clements, 1999). Por consiguiente, la estabilidad frente a la coalescencia de una emulsión o/w de baja viscosidad, se evalúa a través de las características de la fase crema después de un tiempo prolongado de almacenamiento estacionario, como se propuso en un trabajo previo (Mitidieri y col., 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 aislados nativos y desnaturalizados de soja (ASN y ASD), proteínas del suero de soja nativas y desnaturalizadas (PSN y PSD) y caseinato de sodio (CS). El

efecto de la presencia de NaCl (500 mM) se analizó adicionando la sal antes de la homogeneización. Como se mencionó en la sección 3.1, las muestras utilizadas exhibieron marcadas diferencias en la estructura, hidrofobicidad superficial y comportamiento interfacial. El hecho de emplear dispersiones 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 iniciales para establecer una correspondencia, en primer lugar con la estabilidad frente al cremado-floculación y en segundo lugar con el grado de coalescencia de la fase crema después de 24 horas de almacenamiento estacionario.

3.2.1.- Características de las emulsiones iniciales

3.2.1.1.- Distribuciones de tamaño de partícula.

Las emulsiones mostraron un comportamiento newtoniano con viscosidades menores a 10 cP. Considerando que las condiciones de preparación (velocidad del rotor del dispositivo Ultraturrax y tiempo de homogeneización) fueron similares para todas las emulsiones, las diferencias en las características microestructurales iniciales se atribuyeron a la actividad interfacial de la proteína empleada, a la naturaleza del film interfacial y a las interacciones coloidales entre las gotas.

La Figuras 15 y 16 muestran las distribuciones de tamaño de partícula en volumen y en superficie para las emulsiones iniciales, en presencia y ausencia de NaCl (500 mM). En todos los casos, estas distribuciones exhibieron un carácter trimodal, con tres poblaciones de gotas bien definidas: I) gotas menores a 2 μm ; II) gotas con diámetros comprendidos entre 2 y 10 μm ; III) gotas con diámetro mayor a 10 μm . Esto se atribuye directamente a las características del homogeneizador empleado.

En un trabajo previo, Mitidieri y Wagner (2002), trabajando con dispersiones acuosas diluidas de aislados de soja (1 mg/ml) y proteínas del suero de soja, informaron una distribución en volumen de tamaño de partícula del tipo trimodal para las emulsiones PSN y PSD, pero bimodal para las ASN y ASD. Las diferencias observadas respecto al trabajo anterior, se atribuyen no sólo a la utilización de un rotor más pequeño y de diseño diferente, sino también a la mayor fracción volumétrica de aceite ($\phi = 0,33$). En este contexto, Márquez y col (2005), encontraron que en las mismas condiciones de homogeneización y cantidad de agente

emulsificante en la fase acuosa, la polidispersidad de las distribuciones de tamaño de gota fue mayor con el incremento de ϕ .

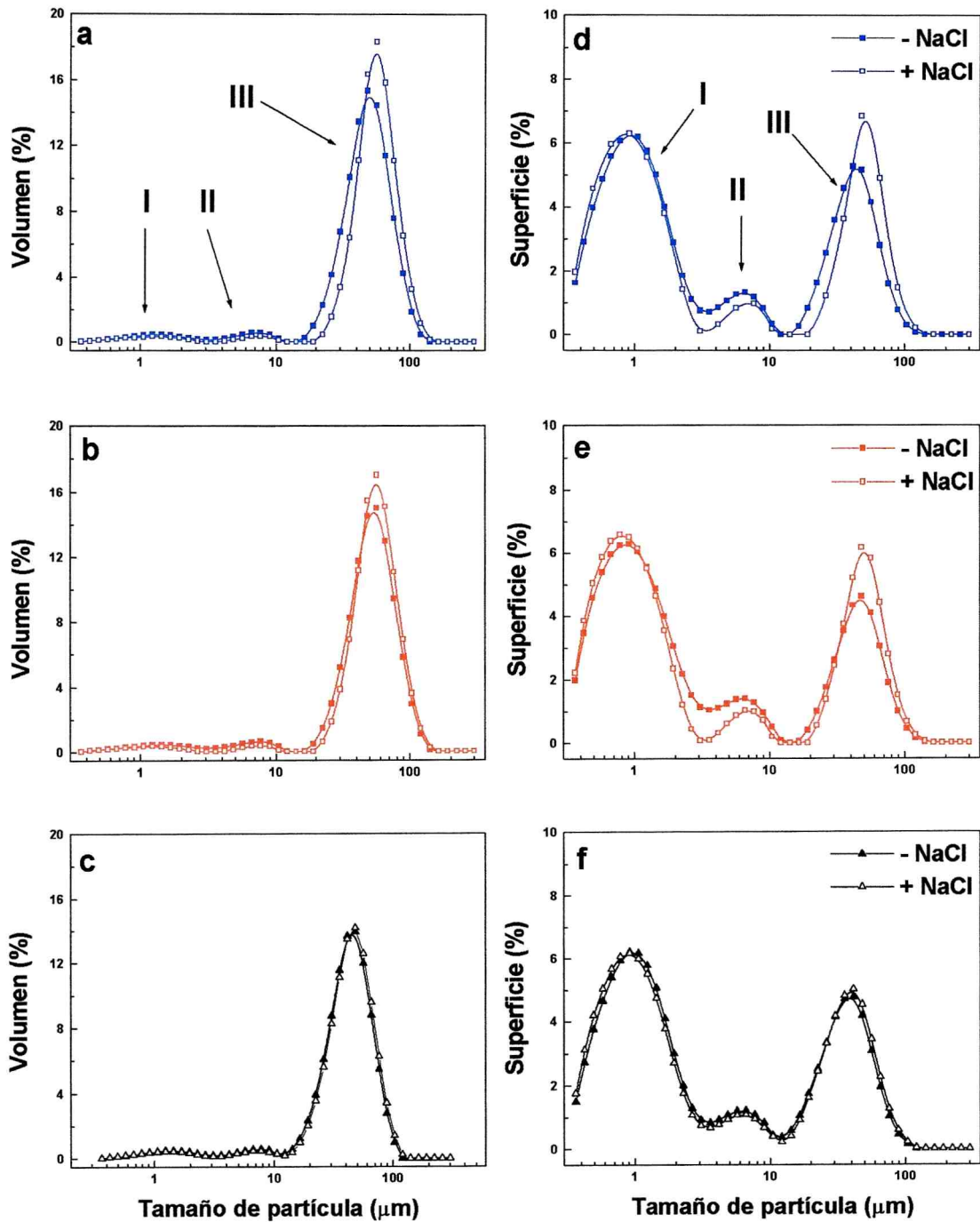


Figura 15: Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones ASN, ASD y CS en ausencia y presencia de NaCl. Distribuciones en volumen: a) ASN; b) ASD; c) CS. Distribuciones en superficie: d) ASN; e) ASD; f) CS. La adición de NaCl (500 mM) se llevó a cabo en las dispersiones acuosas antes de la homogeneización. Las flechas indican las tres poblaciones de gotas (I, II y III).

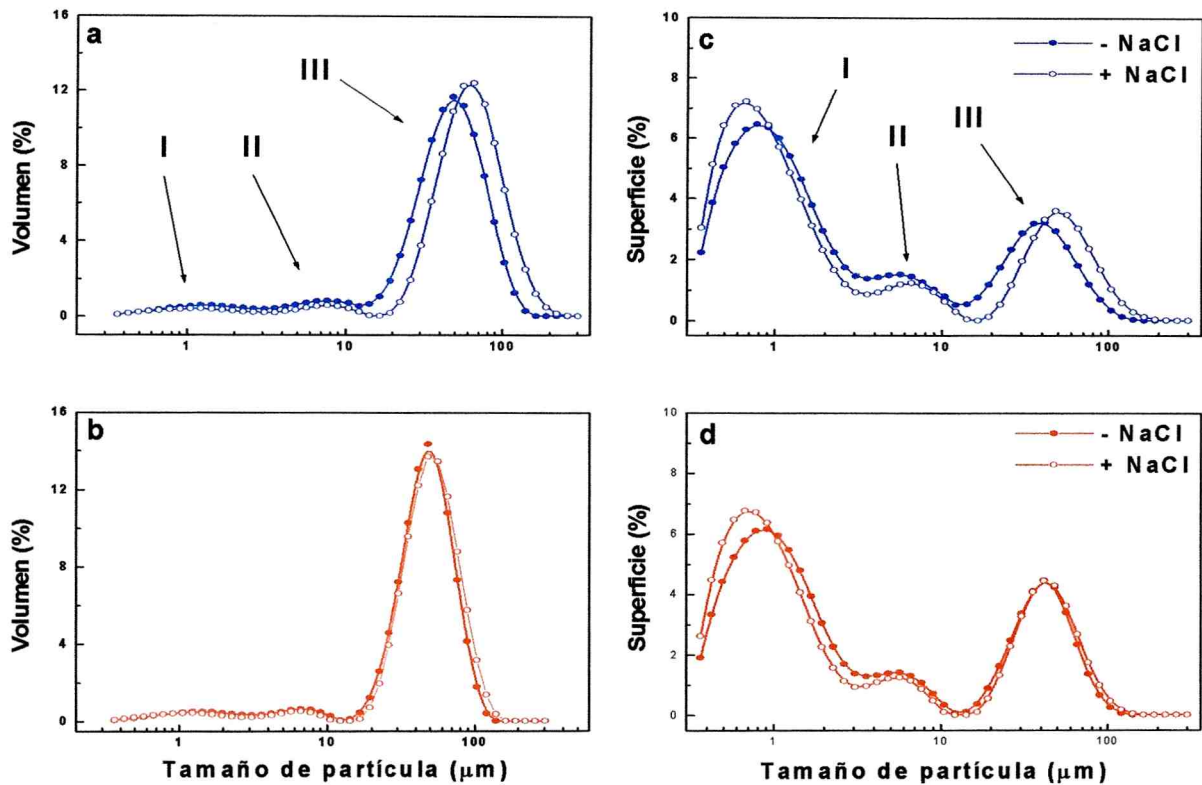


Figura 16: Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones PSN y, PSD en ausencia y presencia de NaCl. Distribuciones en volumen: a) PSN; b) PSD. Distribuciones en superficie: c) PSN; d) PSD. La adición de NaCl (500 mM) se llevó a cabo en las dispersiones acuosas antes de la homogeneización. Las flechas indican las tres poblaciones de gotas (I, II y III).

Las distribuciones de tamaño de partícula expresadas en número (no mostradas) fueron similares para todas las emulsiones: el percentil del 90 % ($D_{n,0,9}$) fue en promedio de 1,5 μm . Esto significa que el 90 % de las gotas de las emulsiones tienen un tamaño menor o igual a 1,5 μm , las cuales se encuentran en la población I.

A partir de las distribuciones de tamaño de partícula mostradas en las Figuras 15 y 16, se puede deducir que las poblaciones I y II no contribuyen significativamente al volumen total de la fase dispersa (pico I muy pequeño en la distribución en %V), pero sí al área creada durante el proceso de homogeneización (pico I predominante en la distribución expresada en % S). En cambio, la población III (gotas mayores a 10 μm) concentra casi todo el volumen de la fase dispersa de las emulsiones. El comportamiento de las emulsiones, en lo que respecta al cremado y a la coalescencia, está gobernado por la presencia de gotas más grandes, aún cuando estas representen un pequeño porcentaje en número de la totalidad de las gotas. Por tal motivo, las

distribuciones en volumen de tamaño de partícula y los parámetros obtenidos a partir de ellas, fueron los elegidos para el análisis de la estabilidad de las emulsiones.

A partir de la mediana ($D_{v,0,5}$) y los percentiles del 10 y 90 % ($D_{v,0,5}$ y $D_{v,0,9}$, respectivamente) de la distribución en volumen se calculó el grado de polidispersidad (P) de las emulsiones (ecuación 29, sección 1.8.3). En ausencia de NaCl, el valor de P de la emulsión PSN ($P = 1,62$), fue significativamente mayor que en la demás emulsiones ($p < 0,05$). Por otra parte, con la adición de NaCl en las dispersiones acuosas, los valores de P siguieron el orden $PSN > PSD \approx CS > ASD > ASN$ (Tabla 14).

En la Tabla 14 también se muestran los diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouker ($D_{4,3}$) y la mediana ($D_{v,0,5}$) de las distribuciones de tamaño de partícula. Los valores de los diámetros promedio no mostraron diferencias significativas cuando las determinaciones se llevaron a cabo en ausencia y presencia de SDS ($p < 0,05$). Este resultado sugiere que si hay presentes flóculos, estos son de baja estabilidad como será explicado mas adelante. A pesar de ser más tensioactivas (Tabla 13, sección 3.1), las muestras desnaturalizadas ASD y PSD dieron emulsiones con mayores valores de $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y $D_{v,0,5}$ respecto a las muestras nativas ASN y PSN. La emulsión preparada con PSN, muestra con los menores valores de actividad interfacial π_i^e y H_o (Tablas 13 y 12, sección 3.1), exhibió el valor más bajo de $D_{3,2}$. Por otro lado, las emulsiones CS fueron las únicas emulsiones que dieron valores de $D_{4,3}$ y $D_{v,0,5}$ menores a $40 \mu\text{m}$.

A pesar de que la adición de NaCl aumentó la actividad interfacial de todas las muestras, produjo a la vez un incremento en todos los diámetros promedio de las emulsiones, como fue observado previamente (Mitidieri y Wagner, 2002). Esto se evidenció en las distribuciones de tamaño de partícula a través del desplazamiento de las curvas hacia tamaño de gota mayores. Según los resultados obtenidos, el aumento de la actividad interfacial (π_i^e), ya sea por efecto de la desnaturalización térmica o por adición de NaCl no es una condición necesaria y suficiente para dar emulsiones de tamaño de gota pequeño. Durante el proceso de homogeneización, las gotas colisionan de manera continua de manera que el film interfacial debe ser suficientemente resistente para evitar la coalescencia. Según Walstra (1983) este es un factor importante que explica la pobre correlación observada entre los diámetros promedio de gota y π_i^e .

Tabla 14: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouker ($D_{4,3}$), mediana ($D_{v,0,5}$) y polidispersidad de las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones o/w iniciales preparadas con dispersiones acuosas (1 mg/ml) de ASN, ASD, PSN, PSD y CS. La concentración de NaCl en las dispersiones acuosas fue de 500 mM. a) No hubo diferencias significativas cuando las determinaciones se realizaron en presencia de SDS; Desviación estándar máxima 5 %.

Muestra proteica	NaCl	$D_{3,2}$ (μm) (a)	$D_{4,3}$ (μm) (a)	$D_{v,0,5}$ (μm) (a)	Polidispersidad (sin unidades) (e)
CS	-	13,4	39,7	38,8	1,23
	+	14,2	41,7	40,4	1,19
ASN	-	15,0	44,7	43,7	1,10
	+	18,7	52,2	50,9	0,23
ASD	-	14,2	47,8	47,0	1,14
	+	17,9	52,3	50,7	0,99
PSN	-	11,2	43,0	41,0	1,62
	+	14,8	59,0	55,0	1,32
PSD	-	13,1	43,3	42,4	1,20
	+	14,0	47,6	47,6	1,19

3.2.1.2.- Correspondencia con los parámetros iniciales obtenidos a partir del analizador óptico vertical

Para llevar a cabo el estudio de la estabilidad global de las emulsiones, se analizaron los perfiles de backscattering (BS %) en función de la longitud del tubo de medida. Si bien este estudio tuvo como principal objetivo evaluar la estabilidad de las emulsiones preparadas, los perfiles iniciales dan una cierta información de la microestructura de la emulsión de partida. La Figura 17 muestra los perfiles iniciales de backscattering (BS_0 %) de las emulsiones preparadas con las dispersiones acuosas de las distintas muestras, en ausencia y en presencia de NaCl.

Los valores de BS dependen no sólo del diámetro de las gotas (D), sino también de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ), es decir $BS = f(D, \phi)$ (Mengual y col., 1999). Los perfiles de BS_0 % corresponden a la emulsión recién preparada, donde las gotas están uniformemente distribuidas a lo largo de todo el tubo de medida o sea

con un valor de ϕ constante. Por lo tanto, en el instante inicial el BS_0 % dependería sólo del diámetro de la gotas ($BS = f(D)$).

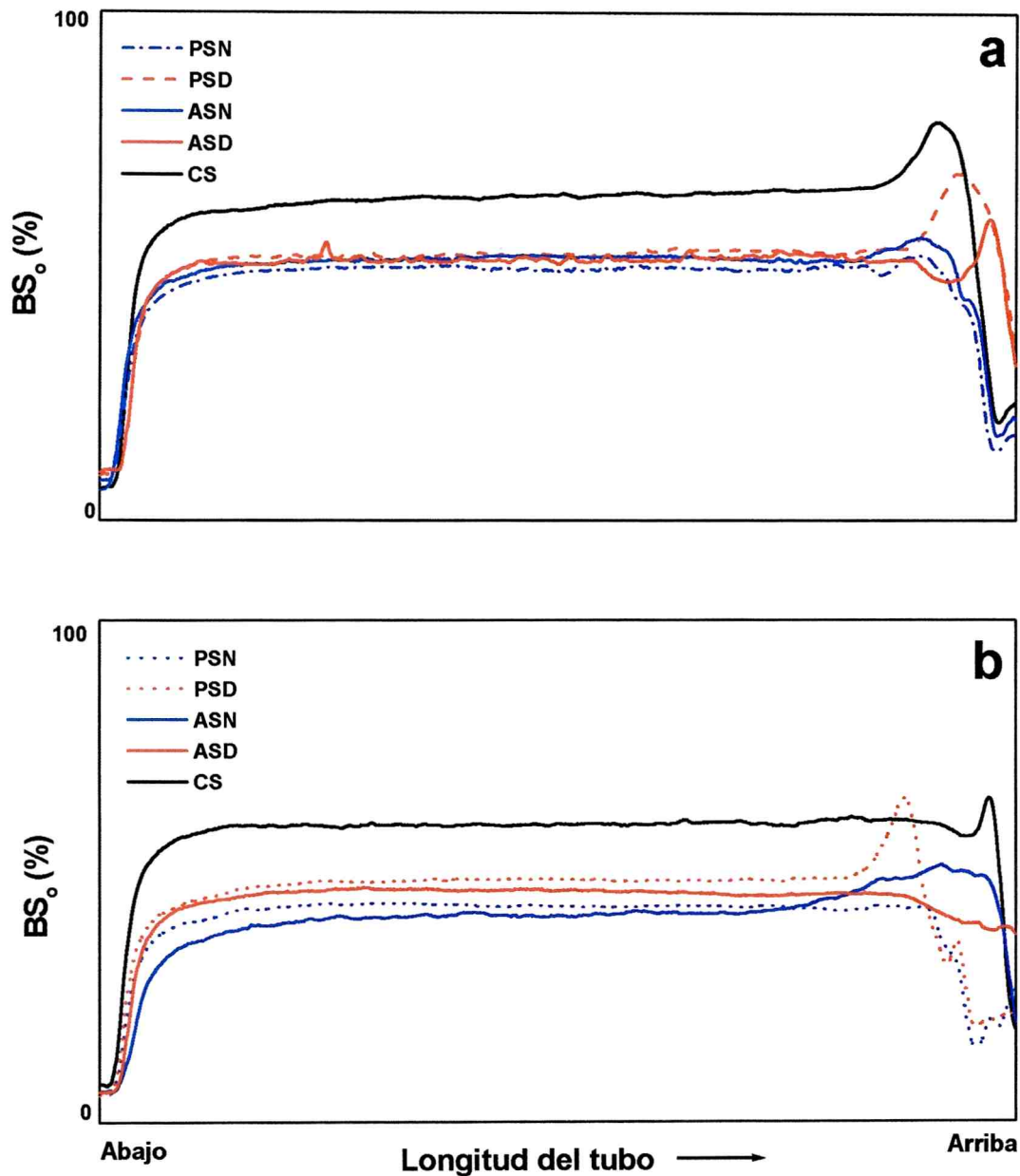


Figura 17: Perfiles iniciales de backscattering (BS_0 %) de emulsiones o/w preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD y CS: a) en ausencia de NaCl y b) en presencia de NaCl (500 mM en la fase acuosa, antes de la homogeneización). Longitud del tubo: 60 mm

La Figura 18 muestra la relación entre el backscattering promedio inicial ($BS_{0, prom}$ %) y los diámetros promedio de las distribuciones de tamaño de partícula ($D_{v0,5}$, $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$). En todos los casos se observó una correlación negativa ($r = -0,84$, $-0,80$ y

-0,62 para $D_{v0,5}$, $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$, respectivamente). Este resultado es esperable, puesto que a fracción volumétrica constante, las gotas de menor tamaño dispersan una mayor cantidad de luz. Márquez y col. (2005) han encontrado una relación similar entre $BS_{0 \text{ prom}} \%$ y $D_{3,2}$ trabajando con emulsiones preparadas con leche de soja, aceite de girasol y grasa láctea.

El hecho de que el coeficiente de correlación (r) en los tres casos no haya sido más alto se atribuye a distintos factores. En primer lugar, la distribución de tamaño de partícula se determina con el equipo Malvern sobre una emulsión diluida ($\phi < 0,05$) y bajo agitación (se analizan partículas individuales y con una posible disminución de tamaño por defloculación), mientras que el $BS_{0 \text{ prom}} \%$ se obtiene sobre la emulsión real sin diluir, la cual es un medio ópticamente opaco (las partículas tiene mayor posibilidad de interacción y con una posible presencia de flóculos). En el analizador de tamaño de partícula, el patrón angular de dispersión de luz se traduce en la correspondiente distribución a través de la teoría de Mie (Mie scattering), la cual establece que el fotón debe ser dispersado una sola vez por la partícula (Mc Clements, 1999; Rawle, 2005). En el analizador óptico vertical (Quick Scan) en cambio, un fotón es dispersado varias veces por distintas partículas antes de alcanzar el detector (dispersión múltiple de luz) (Mengual y col., 1999). En segundo lugar, el hecho de que los diámetros promedio no hayan mostrado diferencias significativas cuando las determinaciones se realizaron en presencia y en ausencia de SDS, no es indicativo de la ausencia de flóculos en la emulsión inicial (Tabla 14). El Quick Scan es un método no invasivo y no destructivo. Los flóculos formados, al no disociarse en la emulsión sin diluir podrían comportarse como partículas de mayor tamaño, lo cual puede tener una influencia directa sobre los perfiles de $BS_{0 \text{ prom}} \%$ y por ende, sobre el valor de $BS_{0 \text{ prom}} \%$.

Teniendo en cuenta que las condiciones de medición en ambos métodos fueron totalmente diferentes, el $BS_{0 \text{ prom}} \%$ debe utilizarse con precaución ya que sólo permite hacer una evaluación cualitativa del tamaño de gota en una emulsión. Por ejemplo, en presencia de NaCl, todas las emulsiones exhibieron valores de $BS_{0 \text{ prom}} \%$ menores que las preparadas en ausencia de sal. Esto nos permite inferir que la adición del electrolito a las dispersiones antes de la homogeneización, produce un aumento del tamaño de las gotas, lo cual se vió efectivamente reflejado en los valores de la Tabla 14. Además, la condición fundamental que debe cumplirse para realizar un estudio comparativo a través de $BS_{0 \text{ prom}} \%$ es que $BS = f(D)$, de manera que la fracción volumétrica debe ser la misma para todas las emulsiones.

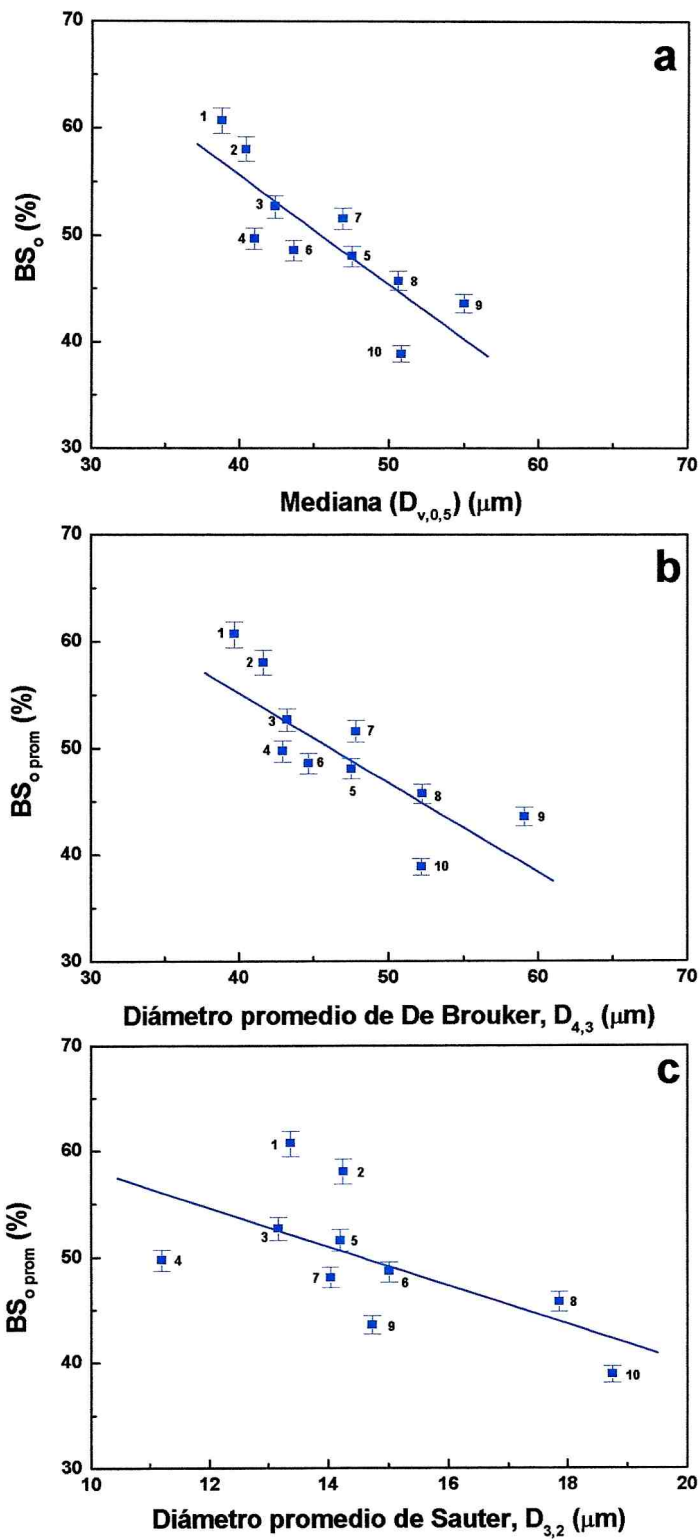


Figura 18: Correlación entre el backscattering inicial promedio (BS_{0 prom} %) y los diámetros promedio de las distribuciones de tamaño de partícula ($D_{v,0,5}$, $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$) para las emulsiones preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD y CS. Muestras: 1) CS; 2) CS (+ NaCl); 3) PSD 4) PSN; 5) ASN; 6) ASD; 7) PSD (+ NaCl); 8) ASD (+ NaCl); 9) PSN (+ NaCl); 10) ASN (+ NaCl). Concentración de NaCl: 500 mM, en la fase acuosa agregados después de la homogeneización.

3.2.1.3.- Micrografías ópticas de las emulsiones iniciales

El límite de resolución teórico de un microscopio óptico es de aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$, pero en la práctica es difícil observar imágenes claras de partículas de tamaño menor a $1-2 \mu\text{m}$ debido al diseño del instrumento y al movimiento browniano de las gotas. Por lo tanto, las gotas que se observan con mayor facilidad son aquellas pertenecientes a las poblaciones II y III que son las de mayor tamaño y dominan el proceso de cremado. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no son las mayoritarias en número y por lo tanto las micrografías nos brindan una información parcial de la microestructura de las emulsiones. Lo que se puede ver claramente es si las gotas visibles están o no floculadas y las características de los flóculos formados.

Las micrografías de las emulsiones preparadas con todas las muestras en ausencia de NaCl (Figura 19) mostraron tendencia a la formación de flóculos. Las gotas que los forman tienen tamaños variables en el orden de $1-10 \mu\text{m}$. Estos flóculos parecen responder a una forma reticular o abierta, se encuentran interconectados unos a otros en forma de collares. Las emulsiones ASD, CS y PSD (esta última en menor grado) parecieran exhibir la presencia de flóculos con estas características.

La presencia de flóculos se atribuye a un balance entre las interacciones coloidales atractivas y repulsivas entre las gotas (Mc Clements, 1999; Damodaran, 2005). Si hay un predominio de las interacciones atractivas, las gotas se agregan formando flóculos. Dado que los valores de los diámetros promedio ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y $D_{v,0,5}$) no variaron significativamente cuando las determinaciones se realizaron en ausencia y presencia de SDS, los flóculos que se observan por microscopía no fueron detectados por el analizador de tamaño de partícula en las condiciones de medición (dilución y agitación). Este resultado indicaría que los flóculos están formados por interacciones débiles (agregación en un mínimo secundario de energía).

La adición de NaCl en las emulsiones no tuvo un efecto muy marcado sobre el grado de floculación, por el contrario la emulsión ASN pareciera menor floculada. El efecto visible del NaCl fue aumentar el tamaño de gota, acorde con el desplazamiento de los picos de las poblaciones II y III hacia mayores tamaños de partícula, especialmente en las emulsiones ASN y PSN (Figuras 15 y 16). Además, las micrografías ópticas muestran que las emulsiones preparadas con Ultraturrax son claramente polidispersas.

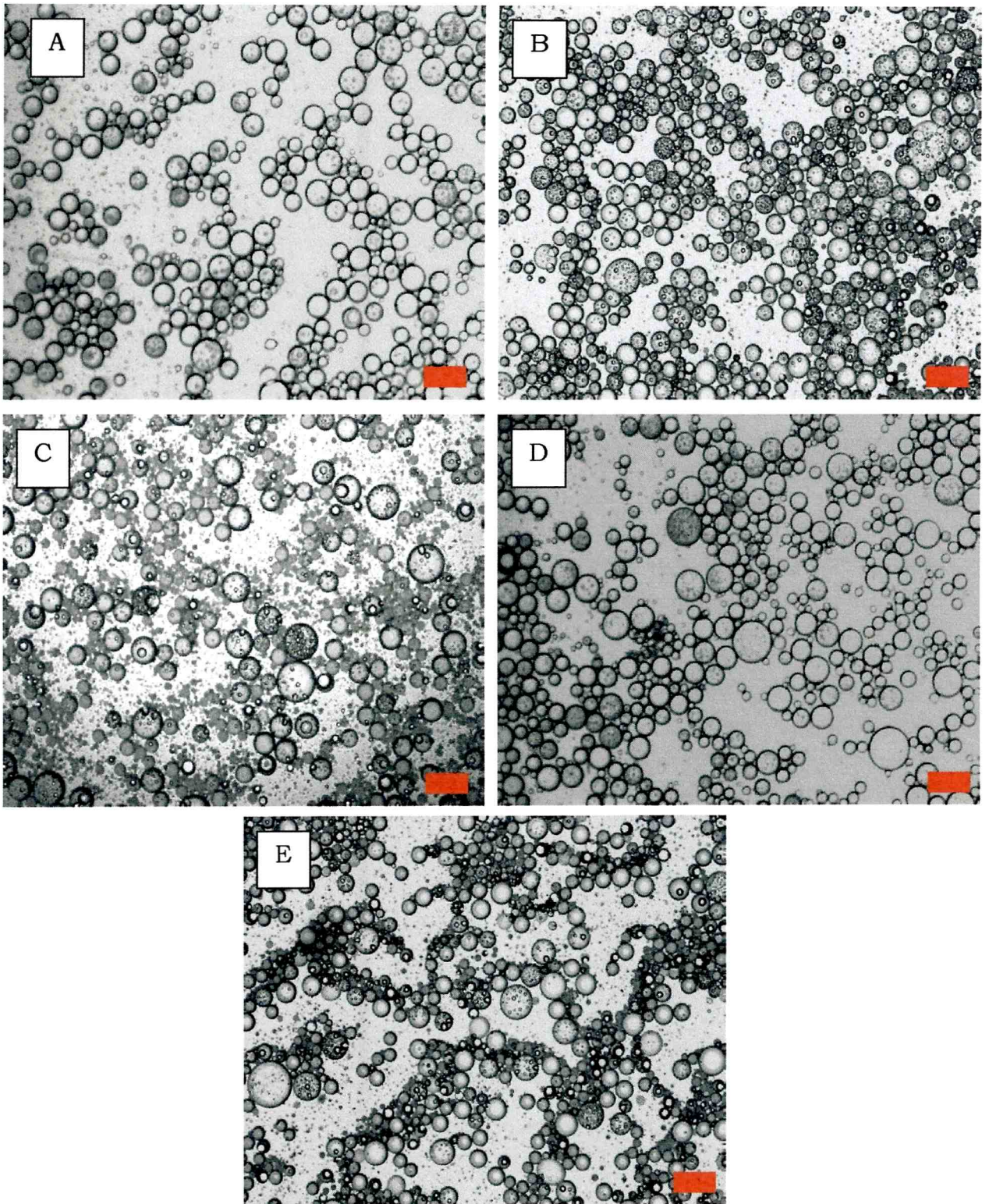


Figura 19: Micrografías ópticas (100 X, sin diluir) de emulsiones o/w preparadas con las distintas muestras; A) ASN; B) ASD; C) PSN; D) PSD y E) CS. Barras rojas: 10 μm

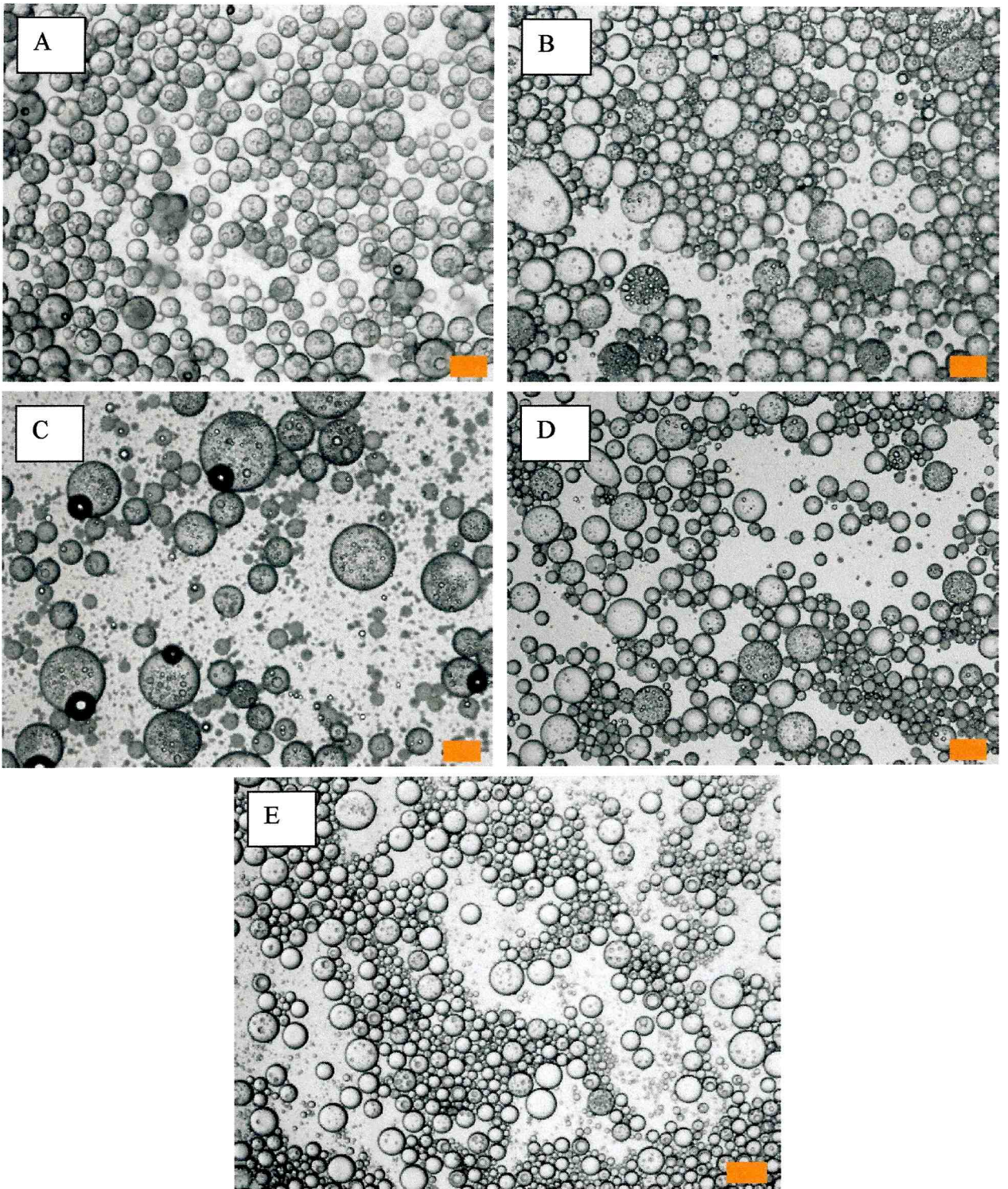


Figura 20: Micrografías ópticas (100 X, sin diluir) de emulsiones o/w preparadas con las distintas muestras en presencia de 500 mM de NaCl; A) ASN; B) ASD; C) PSN; D) PSD y E) CS. El NaCl se agregó a las dispersiones acuosas antes de la homogeneización. Barras rojas: 10 μ m

3.2.1.4.- Análisis de la incorporación de aire en las emulsiones iniciales. Relación con el tipo de muestra y la adición de NaCl

Durante el proceso de homogeneización en un homogeneizador de alta velocidad, la intensa agitación mecánica de las fases inmiscibles en un régimen de flujo laminar y turbulento favoreció la incorporación de aire en las emulsiones resultantes. Por tal motivo, el corto tiempo de homogeneización (1 minuto) fue elegido como una solución de compromiso entre la obtención de una emulsión con el menor tamaño de gota posible y la minimización de la inclusión de aire en el seno de la emulsión. En emulsiones líquidas y de baja viscosidad, como las estudiadas en este trabajo, la velocidad de flotación de las burbujas de aire es muy superior a la de cremado (Wagner y Guéguen, 1999). Por lo tanto, la incorporación de aire en la emulsión se manifestó a través de la presencia de un pico en los perfiles de BS_0 %, en la zona superior del tubo de medida (Figura 17). Este pico se genera debido a la alta capacidad de dispersión de luz de las burbujas de aire. El área de los picos en estos perfiles fue una estimación directa de la cantidad de espuma formada durante la preparación de la emulsión.

Al igual que en las emulsiones, la estabilidad de la espuma, no depende solamente de la capacidad de la proteína de disminuir la tensión superficial; también se relaciona con las propiedades reológicas interfaciales (Phillips, 1981). La Figura 17a muestra que, en ausencia de NaCl, los perfiles de BS_0 % de las emulsiones preparadas con las muestras nativas (ASN y PSN) no evidenciaron la presencia de ningún pico. La desnaturalización térmica de las globulinas 7S y 11S y de las de suero de soja (ASD y PSD) tuvo una influencia positiva en la capacidad de estabilización de la espuma formada durante la preparación de la emulsión. Esto se manifestó por la presencia de picos pronunciados en los perfiles iniciales de BS_0 % para ASD y PSD. Aunque CS mostró la mayor tensioactividad (Tabla 12), la magnitud del pico fue menor que la del perfil BS_0 % de ASD. Graham y Phillips (1980) mostró que la β -caseína, una proteína de alta flexibilidad estructural y uno de los principales constituyentes de CS, posee una alta capacidad de formación de espuma, pero una baja capacidad de estabilización. Por consiguiente, aunque se formen una cantidad importante de burbujas de aire, las mismas colapsan rápidamente en las emulsiones CS.

En presencia de NaCl, la presión superficial de todas las muestras fue mayor. (Tabla 13, en la sección 3.1.2) Sin embargo, las muestras se comportaron de manera diferente. El amplio pico observado en las emulsiones ASN podría ser consecuencia

de la formación de un film resistente, no sólo por aumento de las interacciones hidrofóbicas sino también de la disminución en magnitud de la repulsión electrostática entre las cadenas polipeptídicas de 7S y 11S. Por lo tanto, es probable que durante la preparación de la emulsión, las burbujas de aire se recubran rápidamente con moléculas proteicas y formen un film suficientemente viscoelástico que evite el colapso de la espuma. Para la muestra PSN no se observó ningún pico: el valor de π_s^c de esta muestra aumentó y fue similar al de la dispersión acuosa ASN sin adición de NaCl. Sin embargo, es probable que la presencia en esta muestra de especies de menor peso molecular y poco hidrofóbicas, respecto a las de ASN impida la formación de un film interfacial resistente.

Por otro lado, con la adición de NaCl en las dispersiones acuosas la magnitud del pico en el perfil de BS_0 % decreció en PSD y CS, mientras que no se observó en ASD (Figura 17b). En las condiciones de emulsificación hay una competición de la proteínas por migrar a las interfases a/w y o/w. Teniendo en cuenta el marcado incremento de H_0 con el agregado de NaCl, es probable que las proteínas constituyentes de ASD tengan una afinidad muy elevada por la interfase o/w, debido a que la interacción de los residuos aminoacídicos no polares con la fase lipídica sería un proceso energéticamente muy favorable. En consecuencia, la disminución en la concentración de proteína disponible para adsorberse en la interfase a/w explicaría la menor tendencia a formar y estabilizar las burbujas de aire durante el proceso de emulsificación para las proteínas de soja desnaturalizadas (ASD y PSD) y CS.

3.2.2.- Estabilidad de las emulsiones frente al cremado-floculación

3.2.2.1.- Efecto del tipo de muestra

Para evaluar la cinética de cremado-floculación de las emulsiones se analizaron los perfiles de BS % durante la primera hora de almacenamiento estacionario. La Figura 21 muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de BS % de tres emulsiones: PSN, PSD y CS. Los perfiles fueron registrados en intervalos de 1 minuto durante 60 minutos. Esta figura muestra sólo los perfiles registrados cada 15 minutos para propósitos ilustrativos. En una emulsión o/w la migración de gotas hacia la parte superior, implica a la vez que la parte inferior se empobrece en gotas. Por consiguiente, la cinética de cremado-floculación se evaluó a través de la variación de los valores promedio de BS (BS_{prom} %) en función del tiempo en la parte inferior

del tubo de medida (zona 10-20 mm). Como la coalescencia es un mecanismo de desestabilización más lento que el cremado, la variación de BS está dominada principalmente por un cambio en la fracción volumétrica de la fase dispersa en la zona del tubo elegida, es decir $BS = f(\phi)$.

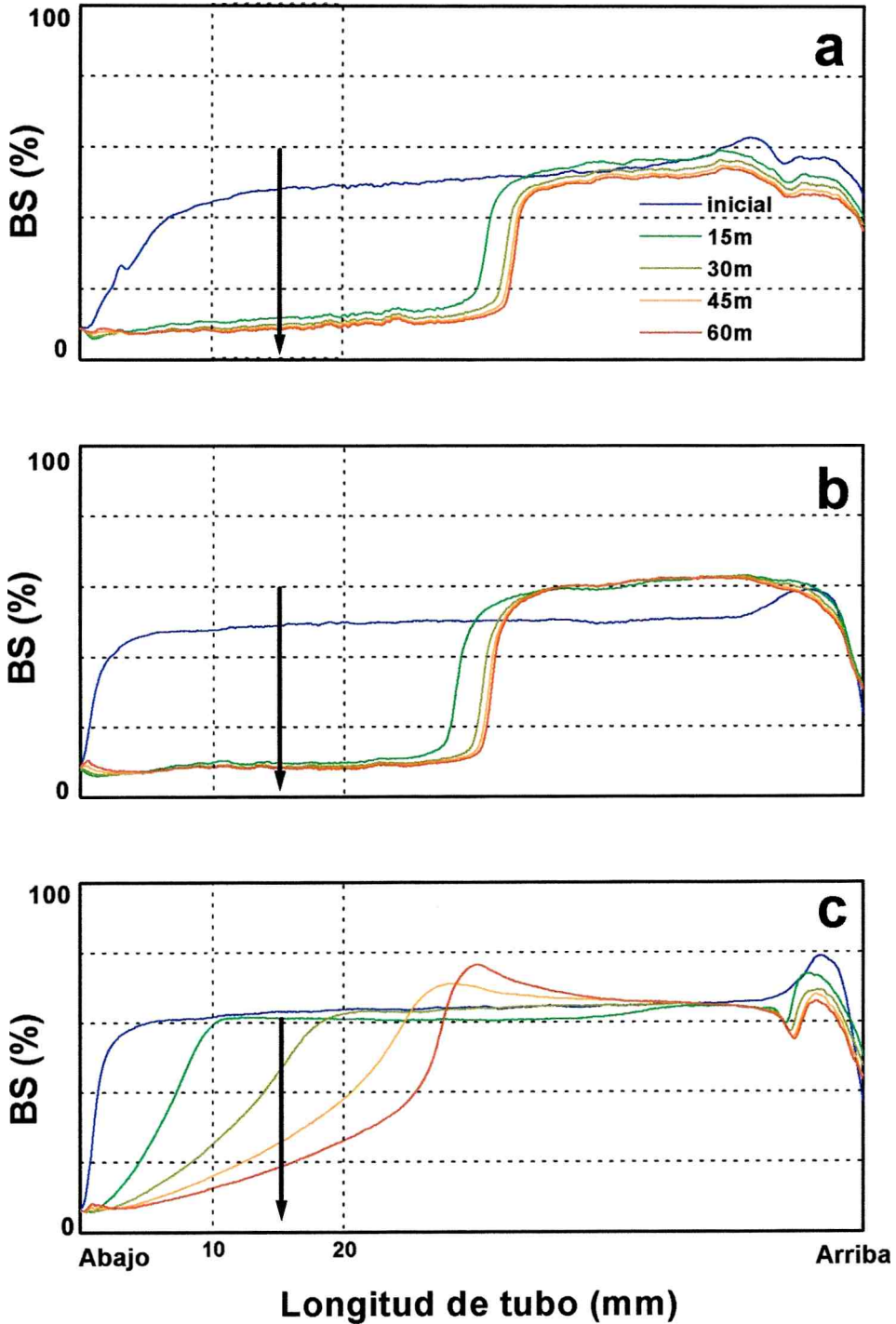


Figura 21: Perfiles de backscattering (BS %) de emulsiones o/w preparadas con: a) PSN, b) ASN; c) CS. Longitud del tubo: 60 mm. Las flechas indican el avance de los perfiles en función del tiempo. La parte inferior del tubo (10-20 mm) se seleccionó para evaluar la cinética de cremado-floculación

La cinética de cremado-floculación puede evaluarse de manera directa a partir de la disminución de $BS_{prom} \%$ (Figura 22) o de manera indirecta mediante el parámetro de desestabilización $D(t) \%$, el cual es una medida relativa de la disminución de $BS_{prom} \%$ (Figura 23). En ambos casos, la información es exactamente la misma. En el primer caso las curvas son decrecientes y sus valores iniciales corresponden a $BS_{0\ prom} \%$, los cuales fueron diferentes para cada emulsión. En cambio las curvas de $D_{inf} \%$ en función del tiempo son crecientes y al tratarse de una medida relativa, tienen el mismo valor inicial para todas las emulsiones ($D_{inf} = 0$ para $t = 0$).

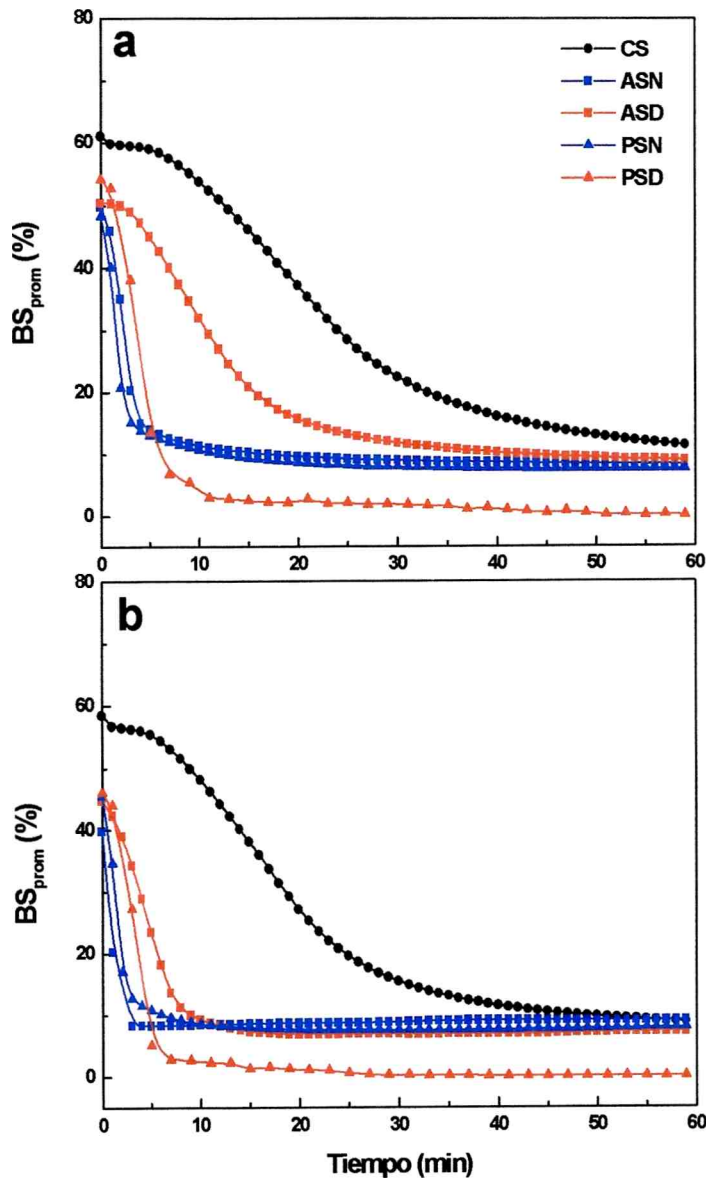


Figura 22: Cinética de cremado-floculación de emulsiones o/w preparadas con CS, ASN, ASD, PSN y PSD evaluada como el decaimiento del BS_{prom} en la parte inferior del tubo (10-20 mm). Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones.

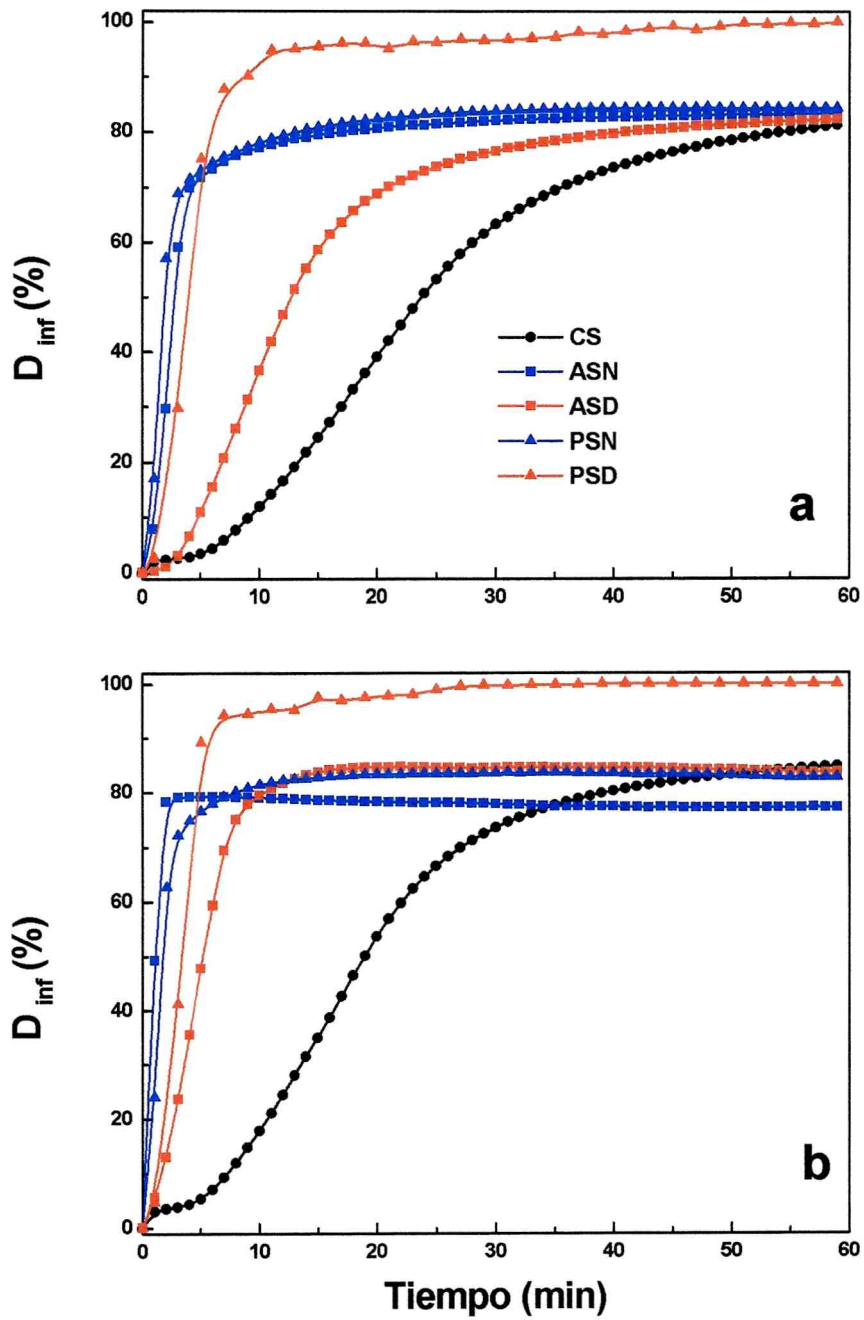


Figura 23: Cinética de cremado-floculación de emulsiones o/w preparadas con CS, ASN, ASD, PSN y PSD evaluada a través de la variación de D_{inf} % en función del tiempo. Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones. Zona de medida: 10-20 mm

Las emulsiones preparadas con ASN y PSN exhibieron el mayor grado de desestabilización, producto de una rápida caída del BS_{prom} % o un rápido incremento de D_{inf} % en función del tiempo, especialmente en los primeros 10 minutos de almacenamiento. La presencia de proteínas desnaturalizadas contribuyó a un considerable aumento de la estabilidad en la emulsión ASD, pero este incremento fue más leve en PSD. Además, en esta última emulsión se observó una marcada clarificación de la fase acuosa inferior que, a tiempos de almacenamiento mayores a 10 minutos, condujo a valores de BS_{prom} cercanos a cero (valores de D_{inf} % cercanos a 100) (Figuras 22 y 23). Por otro lado, la emulsión preparada con CS fue la más estable de todas las emulsiones analizadas.

La estabilidad frente al cremado-floculación se expresó mediante la constante cinética (K), cuyo valor es más elevado cuanto mayor es el grado de desestabilización (Tabla 15). Esta constante cinética también ha sido utilizada en un trabajo previo (Márquez y col., 2005) para el estudio de la estabilidad de emulsiones formuladas con leche de soja, aceite de girasol y grasa láctea.

Tabla 15: Constantes cinéticas de cremado – floculación (K) de emulsiones o/w preparadas con las distintas muestras proteicas. La adición de NaCl (500 mM) se realizó sobre las dispersiones acuosas antes de la homogeneización.

Muestra	NaCl	$K \cdot 10^3$ (min^{-1})
PSN	0 mM	$11,28 \pm 0,14$
PSD		$3,32 \pm 0,01$
ASN		$8,59 \pm 1,5$
ASD		$1,48 \pm 0,11$
CS		$0,68 \pm 0,01$
PSN	500 mM	$12,38 \pm 0,94$
PSD		$3,35 \pm 0,01$
ASN		$27,6 \pm 4,1$
ASD		$3,81 \pm 0,69$
CS		$0,97 \pm 0,01$

El hecho de que no haya correlación entre K y los diámetros promedio ($D_{3,2}$, $D_{4,3}$ y $D_{v,0,5}$) significa que las diferencias en el tamaño de partícula de las distintas emulsiones no es el único factor que afecta la separación gravitacional de las gotas. De acuerdo a McClements (1999), la formación y estructura de los flóculos tienen una importancia fundamental en la estabilidad de las emulsiones frente al cremado.

Según van Aken y col. (2003) en los estadios iniciales de un almacenamiento estacionario y dependiendo de la relación entre las velocidades de floculación (V_{floc}) y de cremado (V_{crem}), pueden presentarse tres casos diferentes (Figura 24).

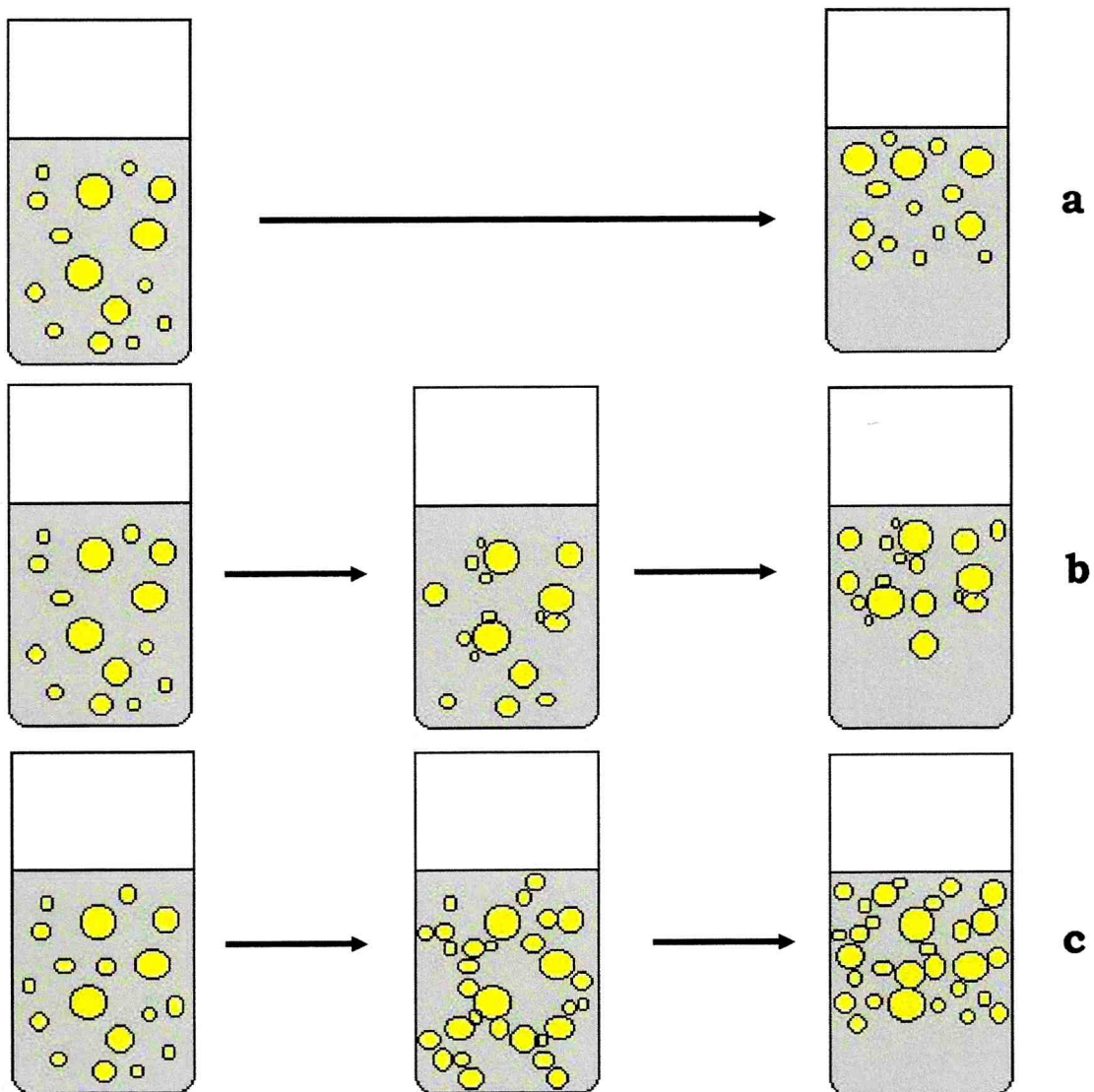


Figura 25: Evolución estructural de emulsiones o/w para diferentes relaciones de velocidades de cremado (V_{crem}) y floculación (V_{floc}): a) $V_{crem} > V_{floc}$, migración de gotas individuales; b) $V_{crem} \approx V_{floc}$, formación de flóculos de estructura cerrada; c) $V_{crem} < V_{floc}$, formación de flóculos de estructura abierta (van Aken y col., 2003)

Cuando $V_{\text{crem}} > V_{\text{floc}}$ se produce predominantemente la migración de las gotas individuales. Si $V_{\text{crem}} \approx V_{\text{floc}}$, se forman flóculos de estructura cerrada, los cuales migran como partículas individuales de mayor tamaño. Finalmente, cuando $V_{\text{crem}} < V_{\text{floc}}$, se favorece la formación de flóculos de estructura más abierta y reticular. La formación de este tipo de flóculos, que es el caso de las emulsiones con proteínas desnaturalizadas de soja y el caseinato de sodio en ausencia de sal, retarda inicialmente el cremado de la emulsión.

La floculación, al igual que la coalescencia, es un proceso de agregación de gotas y está gobernado por la frecuencia y eficiencia de colisión (F_c y E_c , respectivamente). La F_c representa el número de colisiones por unidad de tiempo y por unidad de volumen de emulsión. En cambio la E_c es la probabilidad de que las gotas formen un agregado en el primer evento de colisión. En una emulsión almacenada en ausencia de fuerzas mecánicas externas, las colisiones entre las gotas se atribuyen no sólo al movimiento browniano sino también al movimiento de las gotas debido a la migración por efecto del campo en un campo gravitatorio. Si la magnitud de las interacciones coloidales atractivas son suficientemente importantes como para producir la agregación, la E_c aumenta y los flóculos que se forman son de estructura más abierta porque las gotas no pueden sufrir un reordenamiento posterior. Esto también fue informado por Pinfield y col. (1997) quienes estudiaron el proceso de cremado-floculación de emulsiones mediante simulación computacional.

La pendiente de la recta tangente a cada tiempo en las curvas de cinética de cremado-floculación ($dBS_{\text{prom}} \%/dt$) representa la velocidad instantánea del proceso de separación gravitacional (V_{sg}). En las emulsiones CS y ASD ($K = 0,68$ y $1,48 \text{ min}^{-1}$, respectivamente), la forma sigmoideal de las curvas de $BS_{\text{prom}} \%$ indica un retardo en el proceso de cremado-floculación, ya que la V_{sg} es pequeña en los primeros 5-10 minutos iniciales de almacenamiento (Figura 22). Este resultado está de acuerdo con la formación de flóculos de estructura más abierta y reticular observados por microscopía óptica. Aunque la emulsión PSD mostró una microestructura con cierta similitud a la de las emulsiones CS y ASD, el efecto de retardo fue más leve, lo cual se evidenció por un valor más elevado de K ($3,32 \text{ min}^{-1}$). Por el contrario, en las emulsiones ASN y PSN, la V_{sg} sería muy elevada en los primeros cinco minutos iniciales de almacenamiento.

Como se ha mencionado anteriormente, CS tiene una estructura micelar con un valor elevado de H_0 (Tabla 12). En este caso, la floculación se ve favorecida no sólo por las interacciones hidrofóbicas, sino también por las interacciones de depleción, debido a la presencia de partículas coloidales no adsorbidas de CS.

En las muestras PSD y ASD la exposición de los restos aminoácidos apolares por efecto de la desnaturalización térmica, produjeron un incremento de la hidrofobicidad superficial respecto a las muestras nativas (Tabla 12). Por consiguiente, las interacciones coloidales hidrofóbicas pueden ser muy importantes en estas emulsiones. Por otra parte, las emulsiones PSN altamente inestables ($K = 11.28 \text{ min}^{-1}$), con proteínas de bajo peso molecular y baja H_0 , evidencian una atracción coloidal muy débil entre las gotas, lo que explicaría la baja tendencia a la floculación. A pesar de que la micrografía correspondiente a la emulsión ASN mostró formación de flóculos, éstos no parecen responder a una estructura reticular continua (Figura 19a). Las interacciones coloidales entre gotas serían más débiles, que en las emulsiones ASD, PSD y CS existiendo la posibilidad de que los flóculos formados sufran un reordenamiento o se disocien rápidamente.

3.2.2.2 Efecto de la adición de NaCl

El aumento de la fuerza iónica puede afectar la estabilidad de las emulsiones, debido a que ejerce una influencia importante sobre las interacciones coloidales entre gotas (Mc Clements, 1999). En las emulsiones PSN y CS, la presencia de sal produjo sólo un leve aumento de K y en la preparada con PSD no hubo diferencias significativas en el valor de K respecto a la emulsión en ausencia de NaCl ($p < 0,05$). En cambio, el efecto más pronunciado se observó en las emulsiones preparadas con aislados de soja, ASN y ASD, donde K se incrementó en un factor de 3 y 2, respectivamente (Tabla 15). La presencia de NaCl en la dispersión acuosa antes de la preparación de la emulsión, provoca un aumento en el tamaño de gota de las emulsiones, debido a que favorece la coalescencia de las mismas durante el proceso de homogeneización. La adición de la sal produce un apantallamiento o screening de las interacciones electrostáticas repulsivas y aumenta la magnitud de las interacciones hidrofóbicas atractivas. Durante la intensa agitación mecánica, las gotas que colisionan unas con otras tienen más probabilidad de coalescer. Mitidieri y Wagner (2002) observaron que el índice de actividad emulsionante de emulsiones preparadas con dispersiones diluidas de ASN (1 mg/ml) disminuyó linealmente con el aumento de la concentración de NaCl (0-150 mM). Por consiguiente, el aumento del

tamaño de las gotas es un factor importante para explicar la disminución de la estabilidad de todas las emulsiones frente al cremado-floculación.

Al igual que en ausencia de sal, la curva de $BS_{prom} \%$ en función del tiempo para las emulsiones CS exhibió un comportamiento sigmoideal, con una baja V_{sg} en los primeros 5-10 minutos de almacenamiento estacionario (Figura 22b). La adición de NaCl produce un debilitamiento de la estructura micelar, debido al desplazamiento del Ca^{2+} por el Na^{+} del sitio de unión de las caseínas. El debilitamiento de la estructura micelar, probablemente también podría afectar negativamente las interacciones atractivas de depleción entre las gotas de la emulsión CS. Teniendo en cuenta que la hidrofobicidad superficial fue mayor con la adición de sal en la dispersión acuosa (Tabla 12), es probable que las interacciones hidrofóbicas dominen el comportamiento de las emulsiones CS. Los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ aumentaron sólo un 6 %, respecto a las emulsiones preparadas en ausencia de sal (Tabla 14). Por lo tanto, el leve aumento de K no se atribuiría a cambios apreciables en la microestructura, sino como se mencionó anteriormente, a un cambio en el tamaño de la gota.

En presencia de NaCl, como se mencionó previamente, las distribuciones de tamaño de gota de la emulsión ASN mostraron un corrimiento de los picos correspondientes a las poblaciones II y III hacia tamaños de gota más grandes. Esto se tradujo en un incremento de 25 y 17 % para $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, respectivamente (Tabla 14). En la micrografía correspondiente se observó la presencia de gotas de tamaño uniforme, acorde con el bajo valor de P (0,23). Esta emulsión mostró, además, un grado de floculación muy bajo.

Las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones ASD, al igual que en las formuladas con ASN, un corrimiento de las poblaciones II y III hacia tamaño de gota más altos (Figura 15). El aumento en $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ fue, en este caso, del 20 y 9 %, respectivamente. Además, la cinética de cremado-floculación reveló que en los minutos iniciales de almacenamiento, las V_{sg} fueron más altas que en la emulsión preparada sin NaCl, acorde con el aumento de tamaño de gota.

A diferencia de las emulsiones de aislados de soja, el valor de K para la preparada con PSN aumentó levemente por efecto salino, en tanto que para la PSD, este parámetro no mostró variaciones significativas respecto a la emulsión sin NaCl (Tabla 15, $p < 0,05$). En presencia de sal, las emulsiones PSN no mostraron tendencia a la floculación y exhibieron un considerable aumento en los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ ($\approx 30 \%$, Tabla 14). Por otra parte las emulsiones PSD mostraron una alta tendencia a la floculación, y el incremento de los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ no

fue tan alto en comparación con el de las muestras nativas (Figura 20, Tabla 14) En estas condiciones, al igual que en ausencia de sal, también se observó una clarificación en la parte inferior del tubo, que produjo valores de $BS_{prom} \%$ cercanos a cero ($D_{inf} \% \approx 100$, Figuras 22 y 23).

Analizando más detalladamente los resultados hasta ahora presentados en lo que respecta al comportamiento frente al cremado-floculación, se puede visualizar que las emulsiones PSN y PSD se diferencian del resto, y estas diferencias no son sencillas de explicar en base exclusivamente al tamaño de gota. Esto requiere un análisis más profundo del efecto de las posibles interacciones entre las gotas y las características de los flóculos formados.

Una información adicional sobre la estabilidad al cremado de las emulsiones es el grado de clarificación que ocurre en la fase acuosa inferior (zona 10-20 mm) y que puede evaluarse a partir de los perfiles de transmitancia. En la Figura 26 se observa la cinética de clarificación en los primeros 60 minutos de almacenamiento estacionario de las emulsiones preparadas con las distintas muestras. En ausencia de NaCl, sólo en la emulsión PSD, se observó una clarificación importante con valores de $T_{prom} \%$ cercanos a 30. Este resultado fue acorde con el observado en las cinéticas de cremado-floculación (Figuras 22 y 23) donde esta emulsión exhibió el mayor descenso de $BS_{prom} \%$ e incremento de $D_{inf} \%$. En cambio, las demás emulsiones no mostraron un grado importante de clarificación y no pudieron distinguirse diferencias entre ellas. Para todas las emulsiones, los valores de $T_{prom} \%$ en la parte inferior del tubo de medida fueron menores a 2. Este resultado no se correspondió con el observado en las cinéticas de cremado-floculación y es atribuible al principio de medición del analizador óptico vertical. En este equipo, la luz que no se dispersa por las partículas es detectada en la misma dirección de la fuente. Por consiguiente, en una emulsión una población de gotas puede migrar rápidamente y provocar un descenso importante en $BS_{prom} \%$, mientras que otra población puede permanecer en la parte inferior del tubo, lo cual no produce un importante incremento en $T_{prom} \%$.

En presencia de NaCl, nuevamente la emulsión PSD exhibió nuevamente el mayor grado de clarificación, mientras que en las demás emulsiones $T_{prom} \%$ mostró el orden $ASN > ASD \approx PSN > CS$, el cual nuevamente no estuvo de acuerdo

Después de 24 horas de almacenamiento estacionario, independientemente de la adición de NaCl, las emulsiones PSD mostraron los valores más elevados de $T_{prom} \%$, resultado acorde al observado en las curvas de $BS_{prom} \%$ y $D_{inf} \%$ en función del tiempo (Figuras 22 y 23).

En cambio, las emulsiones preparadas con las dispersiones acuosas de CS, ASN, ASD y PSN, exhibieron valores más bajos de T_{prom} %, los cuales fueron levemente mayores en presencia de NaCl. Esto estaría indicando que una parte de la población I de gotas (Figuras 15 y 16), especialmente aquellas con diámetros menores a $1 \mu\text{m}$, permanecieron durante largos períodos en la parte inferior del tubo por efecto del movimiento browniano.

En las emulsiones PSD, las gotas pequeñas (población I) formarían parte de los flóculos migrando conjuntamente con las gotas de mayor tamaño. A diferencia de lo esperado, el cremado en conjunto de gotas grandes y pequeñas exhibe una leve disminución de la separación gravitacional debido a la interacción entre gotas, lo cual indicaría la formación de flóculos hidratados entre gotas de las poblaciones I, II y III. La no existencia de gotas pequeñas en forma aislada, explicaría la clarificación casi total en la zona 10-20 mm después de los 30 minutos de almacenamiento. En

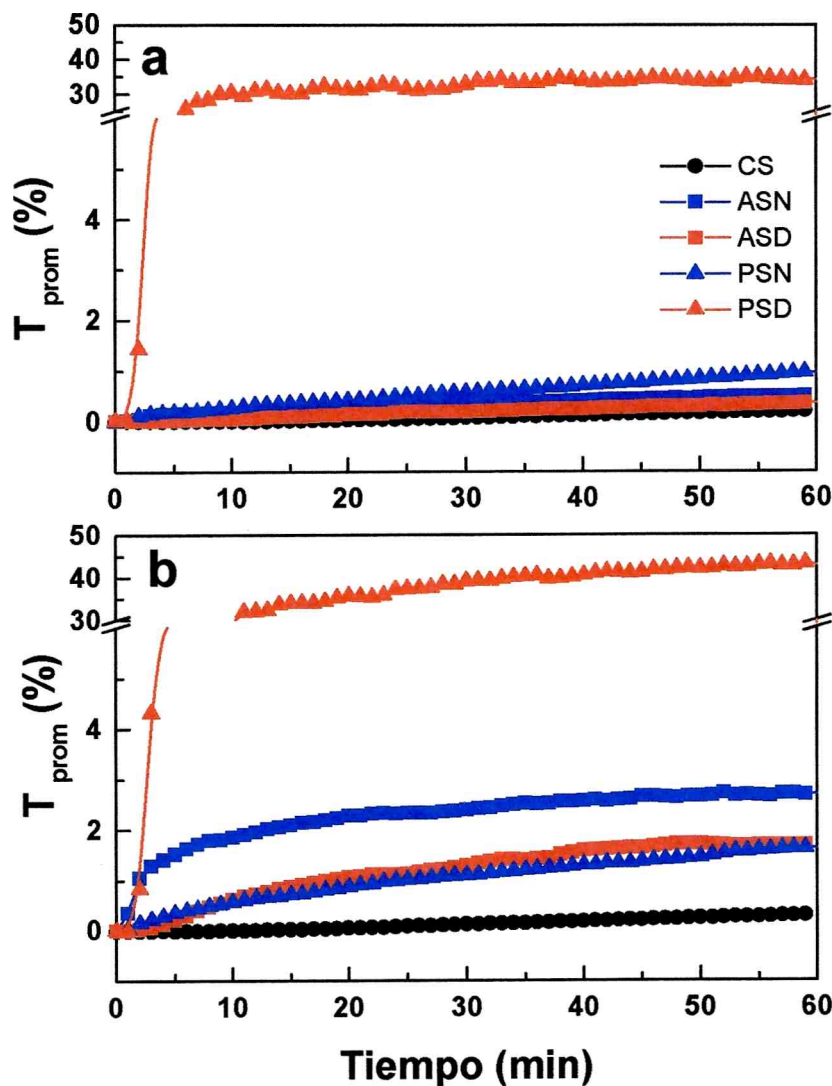


Figura 26: Cinética de clarificación de la fase acuosa (10-20 mm) de las emulsiones preparadas con CS, ASN, ASD, PSN y PSD. a) Sin NaCl, b) con 500 mM NaCl.

cambio, en la emulsión preparada con PSN, las gotas pequeñas no formarían parte de los flóculos. Estas gotas tienen una velocidad individual de cremado muy pequeña, no sólo debido al pequeño tamaño, sino también al movimiento browniano que se opone a la migración de estas gotas hacia la parte superior del tubo. Las gotas grandes individuales o formando parte de flóculos menos hidratados (mas compactos) cremarían con mas facilidad. Este hecho justifica los valores de K para PSN aproximadamente cuatro veces superiores a los observados para PSD y los valores de BS_{prom} % que descienden sólo hasta 10-15 % (Figura 22).

El efecto del movimiento browniano en el cremado de las gotas, el cual no es considerado en la Ley de Stokes (ecuación 37) puede ser muy importante, aún cuando las emulsiones son almacenadas en tiempos prolongados.

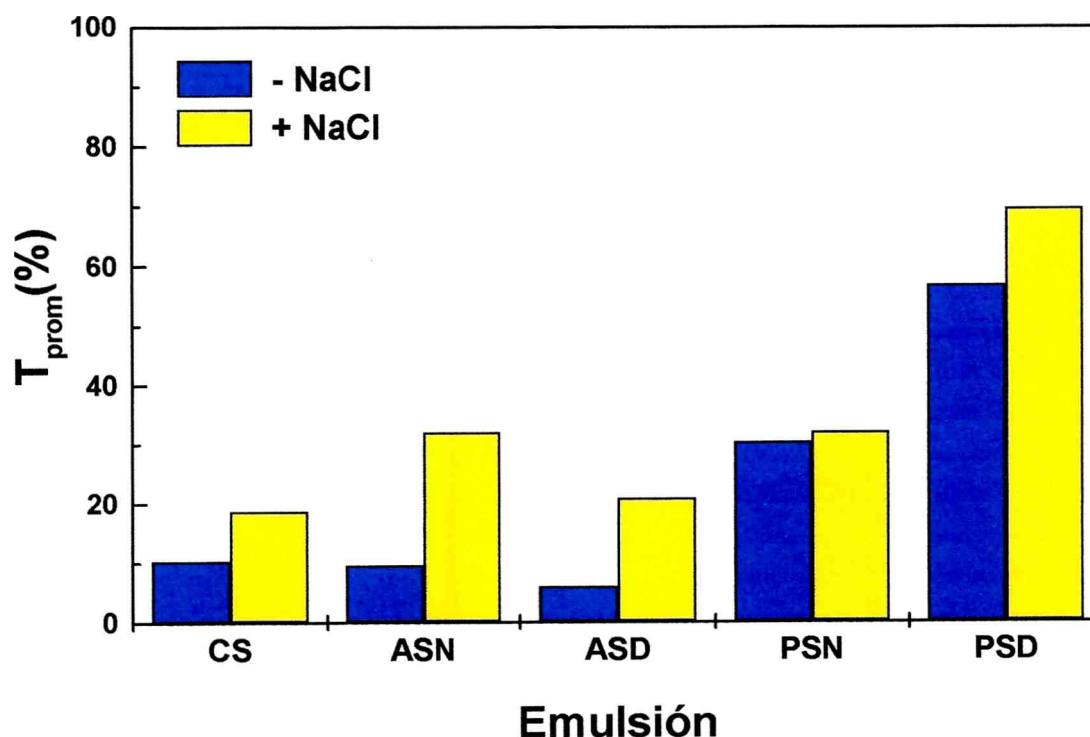


Figura 27: Valores de trasmittancia promedio (T_{prom} %) a las 24 horas de almacenamiento de emulsiones de CS, ASN, ASD, PSN y PSD en presencia y ausencia de NaCl (500 mM en la fase acuosa). Desviación estándar máxima: 5 %. Zona del tubo analizada: 10-20 mm.

3.2.3.- Estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia

3.2.3.1.- Estabilidad global de las emulsiones. Evaluación por dispersión múltiple de luz

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la estabilidad frente a la coalescencia de las emulsiones o/w en condiciones de almacenamiento estacionario implica el estudio de la estabilidad de la emulsión concentrada que se forma después del proceso de separación gravitacional de las gotas, la fase crema. Los perfiles de backscattering (BS %) correspondientes a las emulsiones preparadas con proteínas de suero nativas (PSN), aislado de soja nativo (ASN) y caseinato de sodio (CS) se muestran en las Figuras 28 a, b y c, respectivamente. La zona I corresponde a la desestabilización por cremado-floculación (sección 3.2.1), en tanto que la zona II es la fase crema, resultante de la acumulación de gotas de aceite en la parte superior del tubo.

Como se muestra en la Figura 28, a fin de poder estudiar las fases cremas de las distintas emulsiones, en los perfiles de BS % obtenidos con el analizador óptico vertical se definieron tres zonas: A, B y C, que corresponden respectivamente a las partes inferior, media y superior de la fase crema. En el perfil de la emulsión CS (Figura 28 c, control) se puede observar un pico a los 60 minutos en la parte previa a la zona A, atribuido a la acumulación de gotas muy pequeñas de menor velocidad de cremado. Por otra parte, en la zona C aparece otro pico pronunciado que correspondería a la formación de espuma durante el proceso de homogeneización (sección 3.2.1).

Para analizar el proceso de coalescencia en la fase crema, se hace necesario minimizar la incidencia de ambos procesos descriptos: acumulación de gotas pequeñas y de burbujas de aire. Por consiguiente, en la zona media de la fase crema (zona B) de todas las emulsiones, una disminución del BS % puede interpretarse como una disminución del número de gotas, lo cual es generado fundamentalmente por un proceso de coalescencia o coalescencia mas floculación. Aunque en esta zona siga habiendo migración de gotas por cremado, este proceso estaría minimizado por la alta viscosidad de la fase crema (McClements, 1999). Para la emulsión PSN se observó en la zona B un descenso marcado de BS en el perfil de 24 horas respecto a los perfiles correspondiente a los primeros 60 minutos de desestabilización (Figura 28

b). En cambio, esta disminución no se evidenció en las emulsiones preparadas con ASN y CS. Estos resultados indicarían, en principio, que en la emulsión PSN hubo un incremento del tamaño de gota después de 24 horas de almacenamiento estacionario.

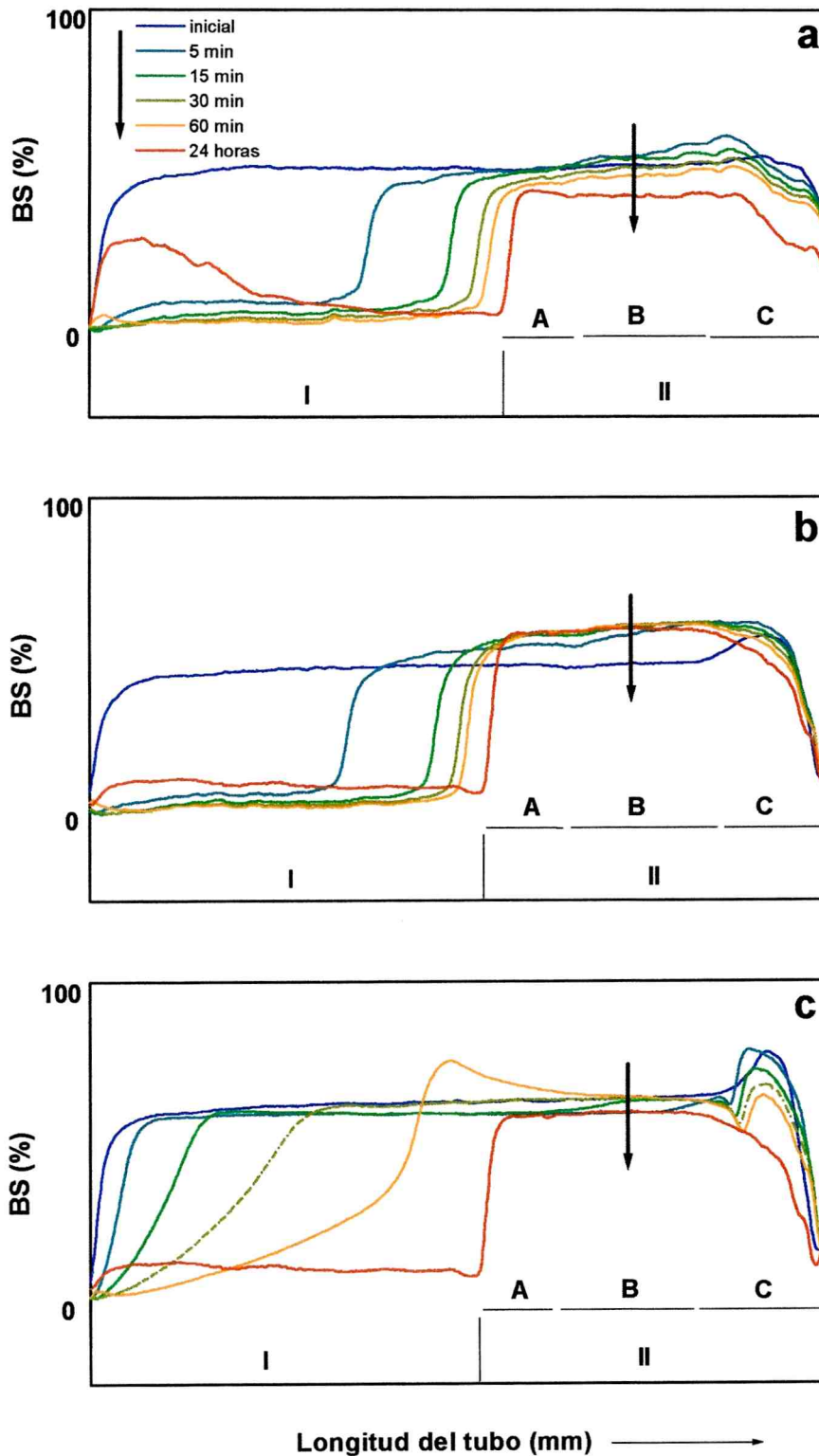


Figura 28: Perfiles de BS % de emulsiones o/w preparadas con: a) PSN; b) ASN y c) CS. La posición de las flechas en el gráfico indica el punto medio de la zona B, seleccionada para el estudio de la desestabilización de la fase crema. Longitud del tubo: 60 mm.

Para evaluar la cinética de desestabilización a partir de los perfiles de BS % de la totalidad de las emulsiones, se registró la variación de los valores promedio de BS % de la zona B ($BS_{\text{prom}} \%$) en función del tiempo (Figura 29). Todos los perfiles mostraron un incremento inicial de $BS_{\text{prom}} \%$ que no se extendió más allá de los 30 minutos. Esto sería atribuible a un aumento del número de gotas de aceite debido a la formación de la fase crema en diferentes periodos de tiempo según la velocidad del proceso de cremado-floculación. El tiempo transcurrido para que $BS_{\text{prom}} \%$ alcance su máximo valor ($BS_{\text{prom max}} \%$) fue mayor cuanto mayor es la estabilidad frente al cremado-floculación.

En el caso particular de la crema de la emulsión con proteínas de nativas de suero (PSN) se puede observar que se alcanzó el $BS_{\text{prom max}} \%$ en un tiempo muy corto, 3 min. (Figura 29 a), debido a que a ese tiempo la velocidad de disminución del número de gotas debido a la coalescencia superó a la de acumulación de gotas. Por encima de este tiempo se observó un descenso sostenido de $BS_{\text{prom}} \%$ hasta las 24 horas, lo cual se traduce en una rápida coalescencia. En cambio, con las proteínas de suero desnaturalizadas térmicamente (PSD), el $BS_{\text{prom max}} \%$ presentó un corrimiento hacia un tiempo mayor (18 min.), a partir del cual el valor $BS_{\text{prom}} \%$ se mantuvo relativamente constante hasta los 60 min. y con una leve disminución a las 24 horas ($BS_{\text{prom 24}} \%$), indicando una mayor estabilidad a la coalescencia respecto a la emulsión PSN (Figura 29 a).

A diferencia de las proteínas nativas de suero de soja, el aislado nativo de soja (ASN) dio una emulsión estable con un $BS_{\text{prom max}} \%$ constante entre 20 minutos y 24 horas (Figura 29 b). La emulsión con aislado desnaturalizado (ASD) no presentó prácticamente diferencias en la estabilidad con respecto al nativo, pero sí un corrimiento de $BS_{\text{prom max}} \%$ a tiempos mayores (≈ 40 min.) debido a su mayor estabilidad frente al cremado-floculación (Tabla 15). La emulsión CS se comportó de manera diferente a las de proteínas de soja; el valor $BS_{\text{prom max}} \%$ se alcanzó recién a los 50 minutos indicando que la formación de la fase crema fue más lenta que en las demás emulsiones (Figura 29 c). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos a partir del análisis de la emulsión en la parte inferior del tubo de medida (zona 10-20 mm) (sección 3.2.1).

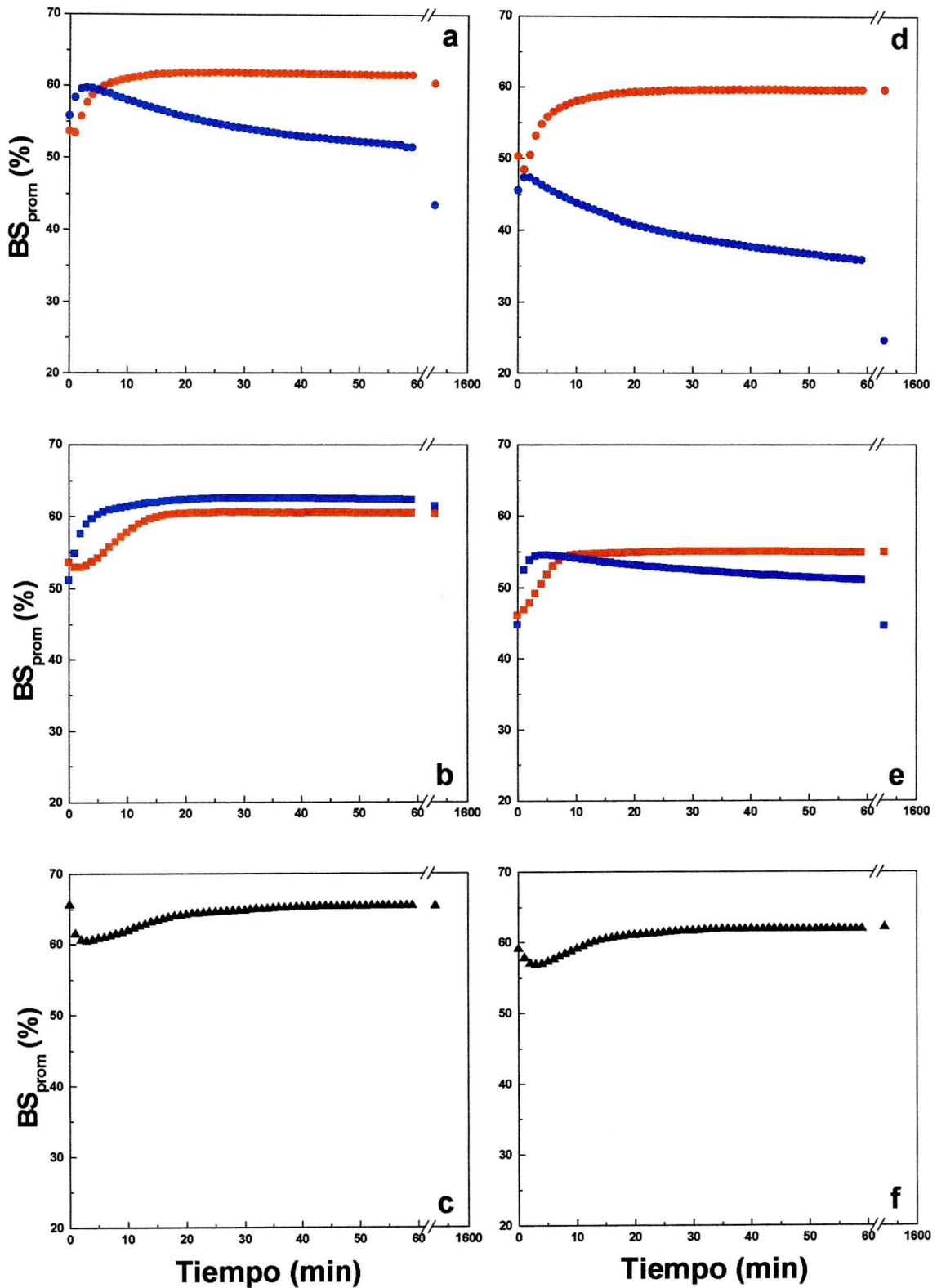


Figura 29: Cinética de desestabilización (BS_{prom} en función del tiempo) de emulsiones preparadas con las distintas muestras: En ausencia de NaCl: a) (●) PSN (●) PSD; b) (■) ASN (■) ASD y c) (▲) SC. En presencia de sal (500 mM en la fase acuosa, antes de la homogeneización): d) (●) PSN (●) PSD; e) (■) ASN (■) ASD y f) (▲) SC.

3.2.3.2.- Efecto de la adición de NaCl

El efecto de la presencia de 500 mM NaCl en las dispersiones acuosas sobre la estabilidad de la fase crema de las emulsiones se puede evaluar al comparar las Figuras 29 d-f con las Figuras 29 a-c. Las emulsiones PSN y ASN se desestabilizaron por la presencia de sal (en mayor grado la primera) resultando en una disminución apreciable de $BS_{prom\ 24}$ %. En cambio, en las emulsiones con proteínas desnaturalizadas (ASD y PSD), la estabilidad prácticamente no se alteró con el aumento de la fuerza iónica. En general, la presencia de NaCl produjo en estas emulsiones un descenso de BS_{prom} % en todo el lapso de tiempo analizado y un corrimiento de $BS_{prom\ max}$ % hacia tiempos más cortos (Figuras 29 d y e respecto de 29 a y b). Ambos cambios se deberían a la aceleración del proceso de cremado-floculación por el mayor tamaño inicial de partícula (Tabla 14). Para el caso de la emulsión CS la presencia de sal disminuyó levemente el valor de BS_{prom} pero no modificó el $BS_{prom\ max}$ (Figura 29 c y f).

A partir de las curvas de BS_{prom} % en función del tiempo fue posible definir y calcular el parámetro D_{med} % (ecuación 58). Este parámetro permite cuantificar la desestabilización global de la fase crema desde su formación hasta las 24 horas de almacenamiento. Por ser una medida de la caída de BS_{prom} % atribuible a un menor número de partículas, este parámetro se puede relacionar con la coalescencia y/o floculación.

En la Tabla 16 se presentan los valores de D_{med} % para todas las emulsiones estudiadas. Se observó que el mayor grado de desestabilización lo exhibe la emulsión PSN, en mayor grado en presencia de NaCl. El aumento de estabilidad dado por la presencia de proteínas desnaturalizadas se vio reflejado en valores bajos de D_{med} % en las emulsiones PSD y ASD, que se comportan de manera similar a la preparada con CS. Se puede observar también que el efecto del NaCl es diferente según el tipo y estado de las proteínas. La presencia de NaCl fue negativa si las proteínas de soja se encuentran en estado nativo (PSN y ASN) y es en un cierto grado estabilizante para las desnaturalizadas térmicamente (PSD y ASD), las cuales se comportaron de manera similar al CS, formado por proteínas de alta flexibilidad estructural.

Tabla 16: Porcentaje de desestabilización de la fase crema, D_{med} (%) de emulsiones o/w preparadas con PSN, PSD, ASN, ASD y CS a las 24 horas de almacenamiento estacionario. Cada valor es el promedio de tres determinaciones. ^(a) NaCl: 500 mM en la fase acuosa, antes de la homogeneización.

Muestra	NaCl ^(a)	D_{med} (%)
PSN	-	27,3 ± 2,9
	+	48,1 ± 4,2
PSD	-	2,4 ± 0,2
	+	0,1 ± (<0,1)
ASN	-	1,7 ± (<0,1)
	+	18,2 ± 2,7
ASD	-	0,4 ± (<0,1)
	+	0,1 ± (<0,1)
CS	-	0,04 ± (<0,1)
	+	0.00

3.2.3.3.- Relación entre coalescencia, microestructura y comportamiento reológico de la fase crema

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 frente a la coalescencia está principalmente gobernada por la resistencia del film interfacial. La frecuencia de colisión total entre las gotas (F_c) en una emulsión recién preparada y almacenada en condiciones estacionarias puede considerarse como la suma de dos factores, uno atribuido al movimiento browniano y el otro correspondiente al movimiento de las gotas en un campo gravitatorio (McClements, 1999). Cuando la fase crema ya se ha formado, la F_c es mínima y el proceso de coalescencia es gobernado principalmente por fluctuaciones en la forma y en el movimiento del film

interfacial debido al contacto prolongado entre las gotas de aceite. La probabilidad de coalescencia es mayor cuando esas fluctuaciones son suficientemente importantes para formar un hueco que se extienda de una gota a la otra. Bajo estas condiciones, las emulsiones pueden estabilizarse cuando el grosor de la fase continua que rodea a las gotas (fase continua intersticial) es suficientemente grande para impedir el contacto entre films, y cuando las fluctuaciones en la interfase no provocan la exclusión de agua intersticial (McClements, 1999; van Aken, 2003; Damodaran, 2005). Según esto, una menor fracción volumétrica de aceite (ϕ) y por ende mayor fase acuosa intersticial en la fase crema, pueden ser condiciones que minimizan la coalescencia. Otros factores importantes que influyen directamente sobre la estabilidad a la coalescencia es 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. Analizaremos en primer lugar esto último.

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 BS % correspondiente a las 24 horas de almacenamiento y mediante la determinación de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ) por el método gravimétrico propuesto por Hill (1996). Aunque el primer método es no invasivo y no destructivo y en el segundo la fase crema debe someterse a un proceso de secado, se observó una importante correlación negativa entre V_r y ϕ , $r = -0,9$ (Figura 30).

El máximo valor de ϕ alcanzable para partículas monodispersas esféricas en un empaquetamiento cerrado es de 0,74. En nuestro caso, estamos muy lejos de esta situación ideal, ya se vio que las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones, independientemente del tipo de muestra empleada y la adición de NaCl, fueron de carácter trimodal (Figuras 15 y 16). La presencia simultánea en una emulsión de gotas de tan variado tamaño, permite que las mismas se acomoden y se alcance en la crema un alto grado de compactación. Además del efecto de la polidispersidad, en la fase crema las gotas pueden sufrir distorsión en su forma esférica, especialmente cuando el grosor de la capa de fase continua que rodea a las gotas se hace más delgado. Por lo tanto, el valor máximo alcanzable de ϕ es mayor al valor teórico 0,74 y puede acercarse a 1 si hay una alta tendencia a la desestabilización por coalescencia (Dagorn-Scaviner y col., 1987; Das y Ghosh, 1990).

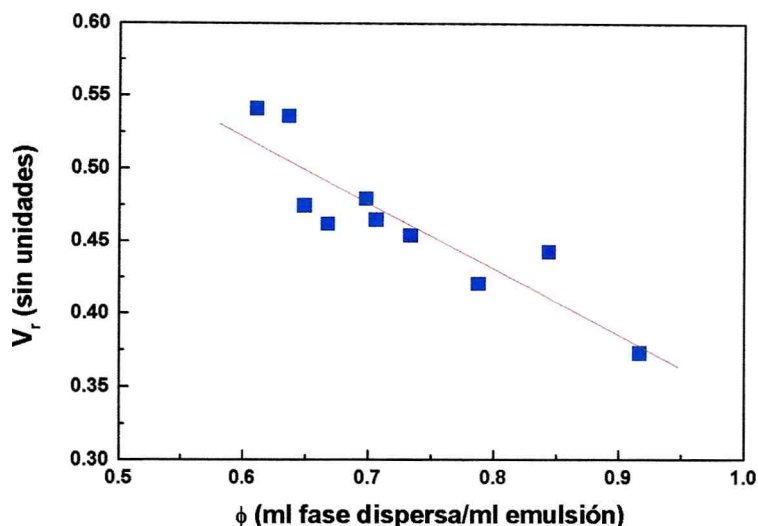


Figura 30: Correlación entre V_r calculado por BS y ϕ calculado por secado de la fase crema.

Como se ve en la Tabla 17 las cremas formadas después de 24 horas de almacenamiento de las emulsiones presentan valores variables de ϕ en el rango 0,61-0,91. Las emulsiones formuladas con proteínas nativas (ASN, PSN) con tendencia a coalescer dieron los valores más elevados de ϕ (crema poco hidratada). Por el contrario, las preparadas con proteínas de soja desnaturalizadas (ASD, PSD) y CS dieron los valores muy bajos de ϕ , inferiores a 0,74. Aun siendo sistemas con distribución trimodal de tamaño de partículas, el grado de compactación de las gotas es bajo, indicando una elevada hidratación. Justamente fueron estas emulsiones las que presentaron mayor resistencia a la coalescencia.

La resistencia del film interfacial en la fase crema sería un factor importante frente a la coalescencia tanto durante su formación (para resistir las colisiones de las gotas durante el cremado) y durante el almacenamiento (en donde las gotas pueden deformarse por un contacto prolongado en la fase crema ya formada).

La debilidad del film interfacial en una emulsión preparada con una dispersión diluida (1 mg/ml) de PSN y sometida a agitación, fue ya informada previamente por Mitidieri y Wagner (2002). Las proteínas nativas del suero de soja, mayoritariamente constituidas por el KTI y lectina, son incapaces de dar un film resistente debido a su bajo peso molecular y baja hidrofobicidad superficial.

Tabla 17: Fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ) y porcentaje de aceite separado (AS %) de la fase crema en las emulsiones o/w preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD Y CS. LSD ($\alpha= 0,05$) = 0,01 ml fase dispersa/ml emulsión.

Muestra	NaCl (a)	ϕ (ml fase dispersa/ml emulsión)	AS (%) (b)
PSN	-	0,788 \pm 0,002	3,27 \pm 0,46
	+	0,917 \pm 0,016	14,35 \pm 3,68
PSD	-	0,611 \pm 0,001	1,67 \pm 0,17
	+	0,637 \pm 0,002	2,06 \pm 0,06
ASN	-	0,734 \pm 0,009	< 1
	+	0,844 \pm 0,014	< 1
ASD	-	0,668 \pm 0,004	1,22 \pm 0,96
	+	0,649 \pm 0,005	1,98 \pm 0,30
CS	-	0,698 \pm 0,004	1,98 \pm 0,17
	+	0,707 \pm 0,004	1,57 \pm 0,08

En el almacenamiento estacionario, en el cual las emulsiones no son sometidas a esfuerzos de corte, igualmente se manifiesta una baja estabilidad de la emulsión PSN (Figura 29 a). Durante la rápida formación de la fase crema en esta emulsión, las gotas se mueven y colisionan libremente. La rápida disminución de BS_{prom} % inmediatamente después de haberse alcanzado el $BS_{prom\ max}$ % indicaría que el proceso de coalescencia en la emulsión PSN comenzaría conjuntamente con el proceso de separación gravitacional.

Esto respondería a la ya mencionada debilidad del film formado por las proteínas nativas de suero de soja. A las 24 horas de estacionamiento estacionario, la fase crema presentó un bajo grado de hidratación (valores bajos de V_r y altos de ϕ), condición que favorece la desestabilización (D_{med} % =27,3%, Tabla 17). De todas maneras, a pesar del grado de coalescencia alcanzado durante el almacenamiento el porcentaje de aceite separado (AS %) fue menor a 4% (Tabla 17).

En presencia de NaCl (Figura 29 d), al verse incrementada la eficiencia de colisión por el apantallamiento de cargas del film interfacial, el grado de desestabilización de la emulsión PSN fue aún mayor (D_{med} % \approx 48). Esta emulsión

mostró la fase crema más compacta: su volumen representó menos del 40 % del volumen total de la emulsión ($V_r < 0,4$), lo cual se tradujo, a su vez, en el mayor valor de ϕ ($> 0,9$). El hecho de que ϕ sea cercano a 1 indicaría que las gotas o flóculos formados en esta emulsión tienen una alta tendencia a la coalescencia (por proximidad de los films interfaciales), la cual puede producir la separación de aceite en la parte superior del recipiente que contiene la emulsión. Como era de esperar, a las 24 horas de almacenamiento, el AS % para la emulsión PSN fue significativamente mayor a la de las demás emulsiones (≈ 14 , Tabla 17).

En el caso de la emulsión ASN, la formación de un film resistente impediría la desestabilización por coalescencia. Ya fue informado que las globulinas 7S (β -conglucina) y 11S (glicina) en estado nativo, aun a bajas concentraciones, forman un film viscoelástico y resistente con un alto grado de estructuración en la interfase aceite/agua, favorecido por sus pesos moleculares elevadas (270 y 360 kDa respectivamente) (Mitidieri y Wagner, 2002). En la fase crema, la resistencia y estructuración del film impediría la deformación de las gotas. Además, la repulsión electrostática y estérica entre las cadenas polipeptídicas adsorbidas se opondría al acercamiento de las gotas, conservándose el grosor de la capa intersticial. En definitiva, la suma de estos efectos explicarían la estabilidad de estas emulsiones ($D_{med} \% < 2$; AS % < 1).

En cambio, la presencia de NaCl favorecería el apantallamiento (screening) de las interacciones electrostáticas y el consiguiente aumento en las interacciones hidrofóbicas, promoviendo el acercamiento entre gotas y una mayor probabilidad de interacción interfilm. Esto se reflejó en las emulsiones ASN en un incremento de ϕ , una disminución de V_r y en un mayor grado de desestabilización ($D_{med} \% = 18,24$, Tabla 16). El hecho de que AS % < 1 , indica que la fase dispersa permaneció en estado emulsificado y el grado de coalescencia no fue tan avanzado como para permitir la separación de aceite.

Como pudo verse en la Tabla 16, las emulsiones con proteínas desnaturalizadas, PSD y ASD, fueron estables frente a la coalescencia independientemente de la fuerza iónica, a semejanza de lo observado con CS. En estas emulsiones, los valores de $BS_{prom\ 24} \%$ de la fase crema fueron mayores a 58 (Figura 29), resultando un muy bajo $D_{med} \%$ ($< 3 \%$, Tabla 16). El alto grado de hidratación de la fase crema de estas emulsiones, mayor en PSD que ASD y CS, se evidenciaron por los bajos valores de ϕ , los cuales no se modificaron apreciablemente con la adición de NaCl.

Por otra parte, como análisis complementario para obtener información acerca de las características de la fase crema se realizó un estudio reológico de esta fase. Según Dickinson y Stainsby (1988) la reología de emulsiones concentradas tiene relación con la naturaleza del film interfacial y determinan el grado de floculación y de coalescencia. El estudio del comportamiento reológico de las cremas se realizó en función de la frecuencia (0,03 a 5 hz) a una deformación constante (3%) dentro del rango de viscoelasticidad lineal. La Figura 31 muestra los reogramas de todas las emulsiones preparadas en ausencia y presencia de NaCl.

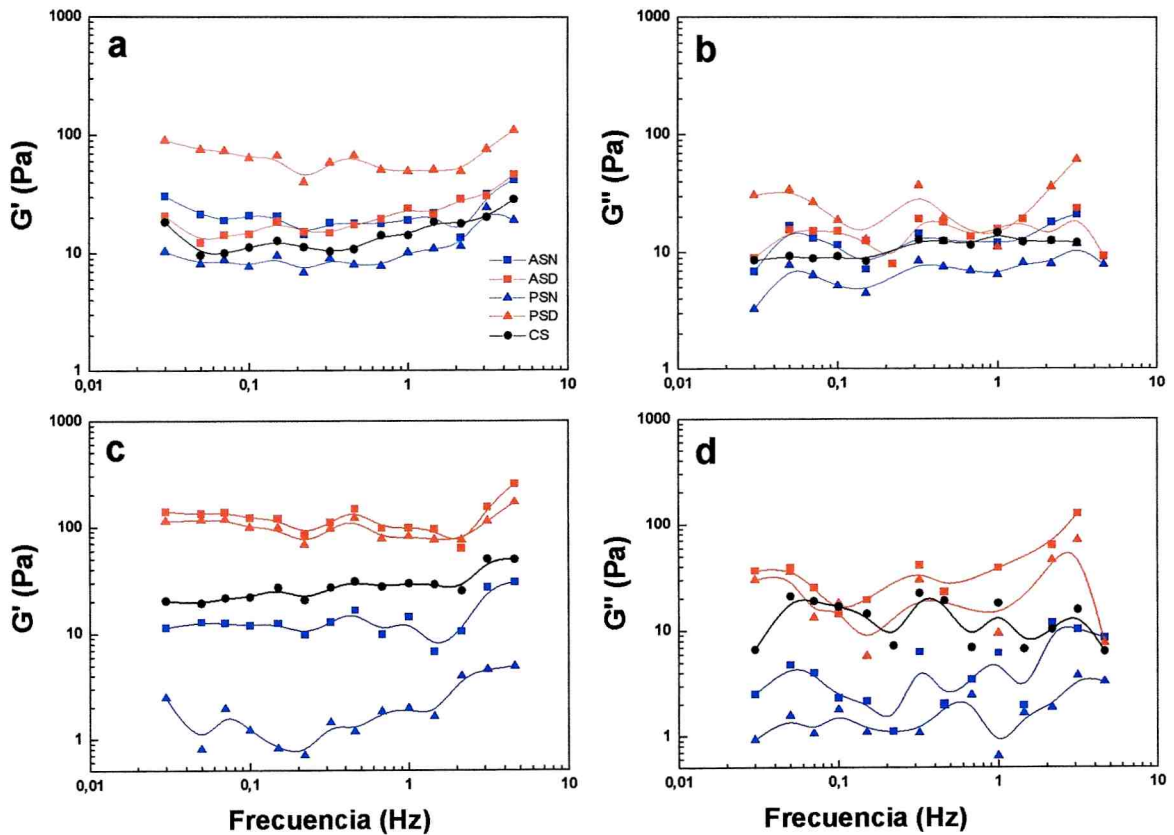


Figura 31: Comportamiento reológico de las fases crema (24 horas de almacenamiento estacionario) de las emulsiones preparadas con ASN, ASD, APN, PSD y CS. a) y b) Emulsiones sin NaCl; c) y d) Emulsiones con 50mM NaCl en la fase acuosa.

De todas las muestras analizadas en ausencia de sal, la fase crema que exhibió mayor elasticidad ($>G'$) fue la de la emulsión PSD (Figura 31 a). Las emulsiones ASD, CS y ASN dieron valores de G' menores y similares, en tanto que la correspondiente a PSN mostró la menor elasticidad. Esta tendencia fue observada en todo el rango de frecuencias de oscilación analizado. En presencia de NaCl, las diferencias en los valores de G' se amplifican entre las emulsiones preparadas con las

proteínas nativas y desnaturalizadas de soja, mostrando el orden $ASD \approx PSD > ASN > PSN$ (Figura 31 a, c). Estas diferencias entre las distintas cremas, aunque menos marcadas, también se evidenciaron en el módulo viscoso G'' (Figura 31 b, d).

A fin de analizar el comportamiento viscoelástico se analizaron conjuntamente los valores G' , G'' (a 1 Hz) y $\tan \delta$ (G''/G'), como se puede observar en la Figura 32. Todas las emulsiones evidenciaron un predominio del componente elástico (G') sobre el viscoso (G''), especialmente marcado para PSD con y sin sal (G' alrededor de 4 veces mayor que G'' en ausencia de sal y aproximadamente 9 veces a fuerza iónica elevada) y para ASD con sal (Figura 32 a, b). Por consiguiente, la relación entre ambos módulos ($\tan \delta = G''/G'$) fue menor que uno para todas las cremas (Figura 32 c) lo que indica un comportamiento cercano al de un gel, más evidente para la fase crema PSD ($\tan \delta < 0,25$). Un resultado similar pero con fases cremas estabilizadas durante 18 días de almacenamiento estacionario fue previamente observado por Mitidieri y col. (2001). Los valores de $\tan \delta$ disminuyeron con la presencia de sal lo que podría atribuirse a una mayor estructuración de la crema dada por la presencia de flóculos, lo cual será analizado en la sección 3.2.3.4.

El diferente comportamiento reológico entre las cremas pareciera corresponder al grado de hidratación y coalescencia de las mismas. Respecto de la hidratación, a mayor V_r (o sea menor ϕ) mayor G' . Las emulsiones PSD y ASD, con altos valores de G' presentan las cremas más hidratadas, mientras que la emulsión PSN, con mínimo valor de G' exhibe una crema muy poco hidratada ($\phi > 0,9$; $V_r < 0,4$) (Tabla 17, Figura 30). La única emulsión que se desestabilizó por coalescencia en forma notoria en ausencia de NaCl, fue la de PSN, la cual exhibió los menores valores de G' y G'' en la fase crema. Este hecho no sólo se relacionaría con el menor grado de hidratación, sino también con la debilidad del film interfacial. Como se mencionó anteriormente, en presencia de NaCl, las emulsiones PSN y ASN coalescen marcadamente bajo almacenamiento estacionario (Tabla 16) e incluso para la preparada con PSN, AS % < 14, resultado acorde a los bajos valores de G' y G'' (Figura 31 b).

3.2.3.4.- Relación entre la desestabilización por dispersión múltiple de luz y la distribución de tamaño de gota

Para analizar si la desestabilización medida en el analizador óptico vertical se atribuye a cambios en el tamaño de gota y/o la formación de flóculos, se midió el diámetro promedio de gota ($D_{4,3}$) de las emulsiones iniciales y de la fase crema (zona

B) en ausencia y presencia de SDS. (Tabla 18). El parámetro $D_{4,,3}$ permite estimar los procesos de coalescencia y floculación con mayor sensibilidad (Relkin y Sourdet, 2005). La dilución y agitación durante la medición en el analizador de partículas disocia los flóculos formados por interacciones débiles dejando intactos los flóculos formados por interacciones fuertes (Dickinson y McClements, McClements, 1999; Anton y col., 2002).

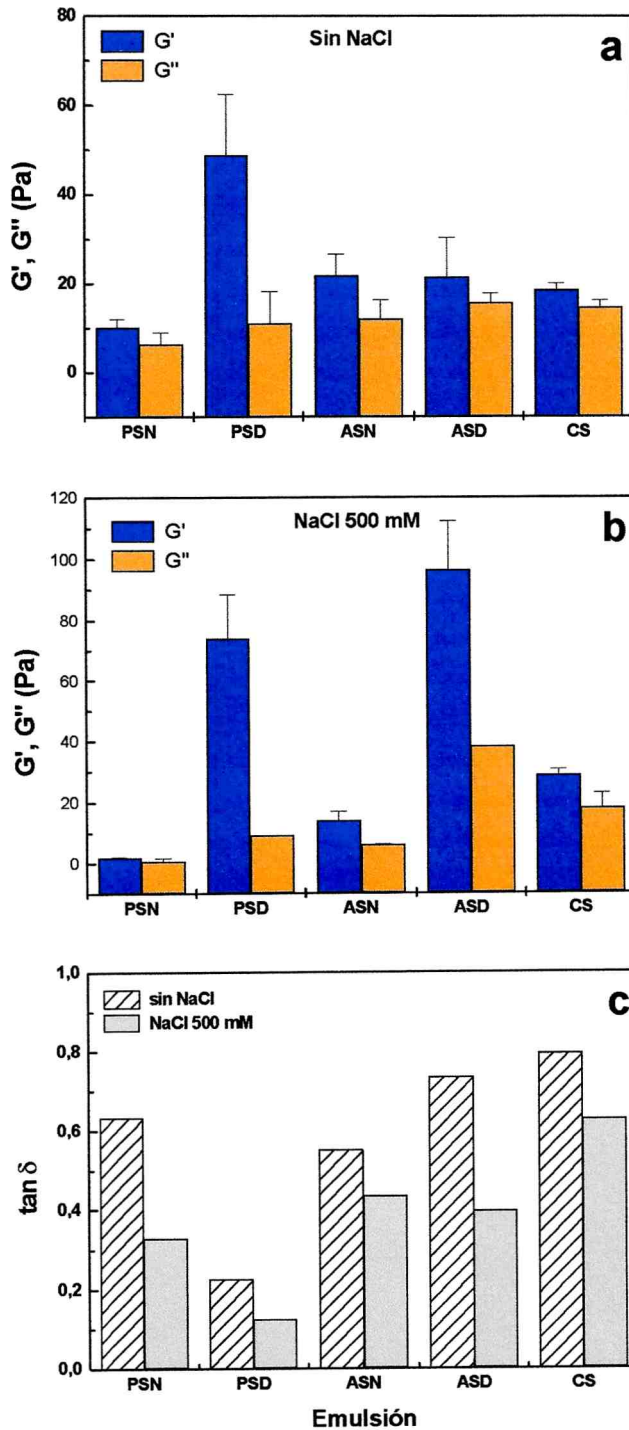


Figura 32: Módulos elástico (G') y viscoso (G'') de la fase crema de las emulsiones o/w preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD y CS: a) en ausencia, b) en presencia de NaCl (500 mM en la fase acuosa, antes de la homogeneización) y c) $\tan \delta = \tan (G''/G')$. Frecuencia de oscilación: 1 Hz. Deformación: 3 %, en el rango viscoelástico lineal.

En emulsiones floculadas, las gotas forman agregados de naturaleza heterogénea, las cuales tienen índices de refracción y forma desconocidos. En consecuencia, la distribución de tamaño de partícula sólo dio una aproximación sobre el verdadero tamaño de los flóculos. Aún cuando los valores de $D_{4,3}$ no son absolutamente fidedignos, un incremento en el valor de diámetro promedio cuando la medición se realiza en ausencia de SDS refleja la asociación de las gotas de las emulsión en flóculos. Este método ha sido ampliamente utilizado para estimar el grado de floculación de diferentes emulsiones (Anton y col., 2002).

El incremento de $D_{4,3}$ por efecto de la adición de NaCl en emulsiones iniciales y por almacenamiento estacionario a las 24 horas se describe en la Tabla 18: En ausencia de NaCl, las emulsiones preparadas con proteínas nativas mostraron un alto grado de desestabilización en comparación con las emulsiones preparadas con ASD, PSD y CS. El efecto fue todavía más evidente en presencia de NaCl. La coalescencia y la floculación ocurren de manera simultánea y esto se reflejó directamente en valores elevados de ICF % e IC %.

Tabla 18: Parámetros de desestabilización para las emulsiones o/w preparadas con PSN, PSD, ASN, ASD y CS en ausencia y en presencia de NaCl. Los índices de coalescencia y floculación (ICF %), de coalescencia (IC %), de floculación (IF %) y el grado de floculación (GF %) se calcularon a partir de las ecuaciones (sección 2.6.4). (*) 500 mM en las dispersiones acuosas, antes de la homogeneización. Máximo desvío estándar: 5 %.

Emulsión	NaCl	ICF	IC	IF	GF
	(*)	(%)	(%)	(%)	(%)
PSN	-	88,6	55,3	33,3	21,5
	+	101,7	79,8	21,9	12,1
PSD	-	5,7	3,8	1,9	1,8
	+	6,1	0	6,1	6,3
ASN	-	27,0	19,8	7,2	6,0
	+	64,5	51,8	12,7	8,3
ASD	-	5,5	5,0	0,5	0,7
	+	0	0	0	0
CS	-	14,3	10,8	3,5	3,1
	+	8,9	6,6	2,3	2,1

La Figura 33 muestra la distribución de tamaño de partículas de emulsiones preparadas con proteínas de soja, en presencia de NaCl, la condición en la que se observó mayor desestabilización. Para las emulsiones preparadas con PSN y ASN las distribuciones de tamaño de gota de la fase crema a las 24 horas se desplazaron hacia mayores diámetros de tamaño de partícula en relación a las emulsiones iniciales (Figuras 33 a y c). Además, las distribuciones de tamaño de gota de la fase crema de la emulsión PSN sin y con SDS fueron diferentes, indicando que hay una desestabilización simultánea por coalescencia y floculación (Figura 33 a). El pico principal ($D_{4,3} > 100 \mu\text{m}$) que se observa en la distribución sin SDS, podría atribuirse a la contribución de gotas coalescidas y flóculos, debido a que el mismo se divide en dos picos secundarios en presencia de SDS. A su vez, la coalescencia fue el principal mecanismo de desestabilización de la fase crema de las emulsiones ASN, debido a la misma forma de la distribución de tamaño de gota en ausencia y presencia de SDS (Figura 33 c). Por otra parte, la alta estabilidad de la fase crema de las emulsiones PSD y ASD a las 24 horas de almacenamiento estacionario, se muestra en las Figuras 33 b y d, lo cual muestra una correspondencia con los bajos valores de ICF % e IC % (Tabla 18).

La Figura 34 muestra que ICF % e IC % exhibieron una buena correlación polinomial con el porcentaje de desestabilización global $D_{\text{med}} \%$, obtenido a partir del analizador óptico vertical. El incremento de $D_{\text{med}} \%$ corresponde a un incremento del tamaño de partícula, tanto por coalescencia como por floculación. Sin embargo, el analizador óptico vertical detectó los cambios en el tamaño de partícula con una menor sensibilidad respecto al medido en el analizador de partículas. El parámetro $D_{\text{med}} \%$ no es medible cuando $\text{ICF} \% < 20$ y da una subestimación de los cambios en el tamaño de partícula por efecto del almacenamiento estacionario ($D_{\text{med}} \% < \text{ICF} \%$ para todas las emulsiones). Esto se podría atribuir a las diferentes condiciones de medición en ambos casos. No obstante, el analizador óptico vertical permite realizar una evaluación de la estabilidad global de la emulsión en condiciones no invasivas y no destructivas, a través del tiempo y en emulsiones sin diluir.

El efecto negativo del NaCl en la estabilidad de la fase crema de las emulsiones ASN y PSN también se puede explicar teniendo en cuenta la microestructura de las mismas. El índice de floculación (IF %) indica la desestabilización de la emulsión por floculación durante el período total de almacenamiento (0 - 24 horas). De acuerdo a la Tabla 18, el efecto principal de la sal fue aumentar el IC % como consecuencia directa de la disminución de la cantidad de flóculos debido a la formación de gotas más grandes. Por otro lado, la floculación de la fase crema medida a las 24 horas (GF

%) para las proteínas nativas fue superior al de las emulsiones ASD, PSD y CS. Los flóculos formados resistirían el efecto de la alta dilución y agitación durante la medición de tamaño de partícula, sugiriendo un mecanismo de floculación por puenteo (bridging flocculation) donde las interacciones entre los film interfaciales no está mediado por una fase acuosa intersticial (McClements, 1999). Este resultado está de acuerdo con el bajo grado de hidratación de la fase crema para las emulsiones ASN y PSN. La Tabla 18 muestra que IF % es mayor que GF % para estas emulsiones, lo cual indica que parte de los flóculos formados coalescieron durante el almacenamiento estacionario.

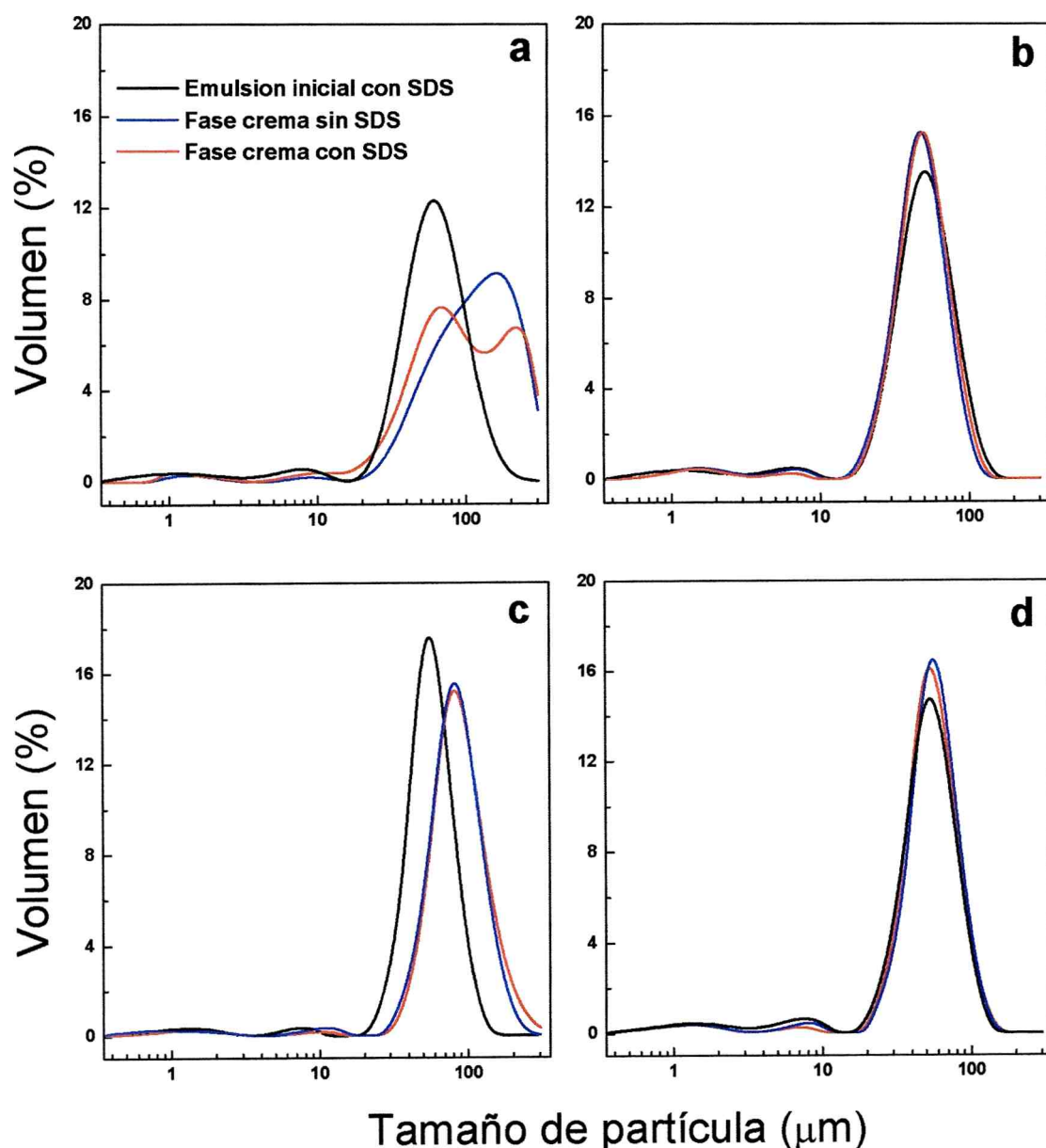


Figura 33: Distribuciones en volumen de tamaño de partícula de emulsiones iniciales y la fase crema después de 24 horas de almacenamiento estacionario, en presencia de NaCl. Las determinaciones se realizaron en ausencia y presencia de 1 % SDS (sección 2.) a) PSN; b) PSD; c) ASN; d) ASD. La adición de NaCl (500 mM) se realizó en las dispersiones acuosas antes de la homogeneización.

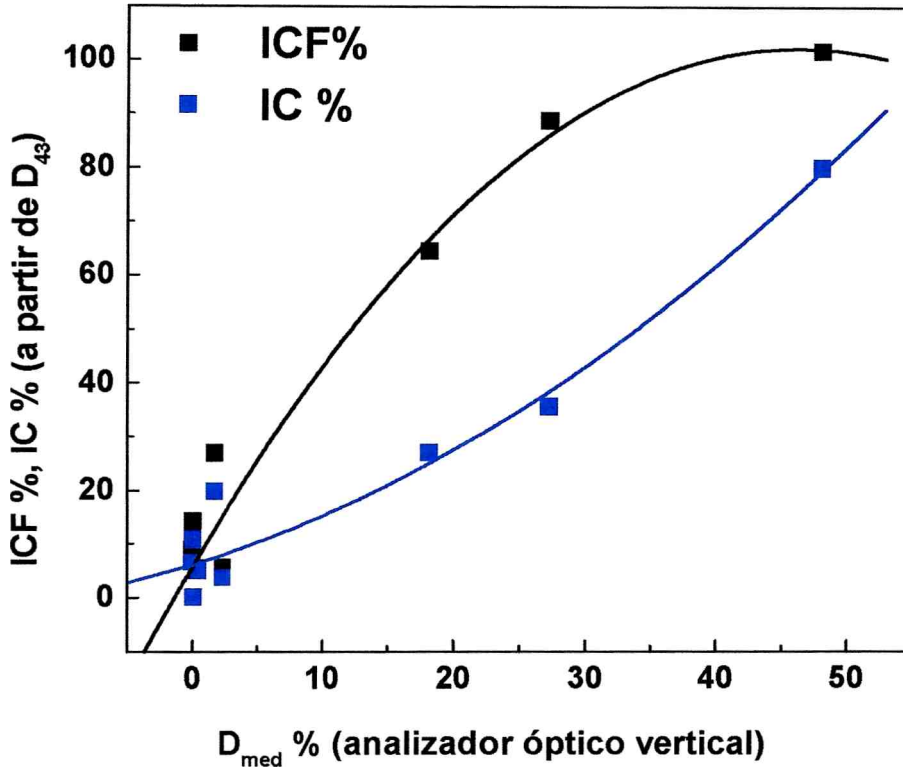


Figura 34: Relación entre los parámetros ICF %, IC % y D_{med} % para las emulsiones preparadas con ASN, ASD, PSN, PSD y CS en ausencia y presencia de NaCl (500 mM en la fase acuosa, antes de la homogeneización). Los parámetros ICF % e IC % se obtuvieron a partir de los diámetros promedio $D_{4,3}$ de la fase crema y la emulsión inicial y D_{med} %, a partir de los valores promedio de la BS en la fase crema.

Por otro lado, la fase crema de las emulsiones ASD y PSD exhibió un alto grado de hidratación en la fase crema a las 24 horas de almacenamiento, que puede explicarse por la formación de flóculos de estructura más abierta. Dado que estos flóculos hidratados no son estables a la turbulencia y la dilución durante la medición de tamaño de partícula, se obtuvo para estas emulsiones un bajo valor de GF % (< 10, Tabla 18). Para estas emulsiones IF % y GF % fueron similares, indicando que estos flóculos no coalescieron después de 24 horas de almacenamiento, debido a la mayor cantidad de agua intersticial (bajos valores de ϕ y altos de V_r).

Conclusiones parciales

- ✓ La formación de flóculos de estructura abierta retardan el cremado de las emulsiones en los primeros estadios de almacenamiento estacionario y se dio principalmente en las emulsiones preparadas con el aislado y las proteínas del suero desnaturalizadas y el caseinato de sodio. Aunque estos flóculos se compactan durante la formación de la fase crema, el contenido de agua intersticial es suficiente para que la misma tenga un alto grado de hidratación.
- ✓ En la mayoría de los casos, la presencia de NaCl disminuyó la estabilidad de las emulsiones frente al cremado, debido principalmente a un aumento de los diámetros promedio de las gotas. La separación gravitacional de las emulsiones de proteínas del suero de soja fue menos afectada por la adición de la sal respecto a las preparadas con aislados de soja.
- ✓ El aumento de la fuerza iónica por adición de NaCl no afectó la estabilidad de la fase crema de las emulsiones preparadas con proteínas de soja desnaturalizadas y caseinato de sodio. En cambio, tuvo un marcado efecto negativo sobre las preparadas con las proteínas de soja nativas.
- ✓ Los flóculos de bajo grado de hidratación son parcialmente estables en las condiciones de medición de tamaño de partícula, debido a que los films interfaciales de las gotas interaccionan fuertemente, probablemente por un mecanismo de puenteo.
- ✓ Durante el almacenamiento estacionario, con la formación de la formación de fase crema, las gotas tienen mayor probabilidad de desestabilizarse por coalescencia, debido precisamente a la baja cantidad de agua intersticial. Una estructura más compactada de las gotas explicaría la baja estabilidad de las emulsiones frente al cremado y la formación de una fase crema de baja viscoelasticidad.
- ✓ Los flóculos de alto grado de hidratación dan emulsiones con fase crema de comportamiento tipo gel. Los flóculos se mantienen unidos por interacciones más débiles, por lo tanto estos flóculos no son estables en las condiciones de medición de los analizadores de partícula. Debido al alto grado de hidratación y por ende, la elevada cantidad de agua intersticial, estos flóculos son más estables a la coalescencia.

3.3. ESTABILIDAD DE EMULSIONES O/W BAJO CONDICIONES DE TRABAJO MECÁNICO.

En emulsiones o/w estabilizadas por proteínas como agente emulsificantes, la coalescencia es un proceso lento de desestabilización comparado con el cremado y la floculación, por eso en muchas ocasiones para evaluarla, o aun detectarla, se recurre a los tests acelerados. (Britten y Giroux, 1991; McClements, 1999). Los ensayos acelerados para la determinación de coalescencia pueden llevarse a cabo de distinta manera: la centrifugación de las emulsiones a alta velocidad aceleran el proceso de cremado y en la fase crema, las gotas son forzadas a entrar en contacto por efecto del campo gravitatorio, lo cual provoca la coalescencia de las gotas y la separación de aceite (oiling off). Por otra parte, las emulsiones pueden someterse a esfuerzos de corte controlados y en este caso el grado de desestabilización puede medirse en función de la magnitud del esfuerzo aplicado en un tiempo fijo o alternativamente en función del tiempo manteniendo constante el esfuerzo aplicado (McClements, 1999).

Para estudiar la estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia en condiciones de trabajo mecánico, se utilizaron como emulsificantes los aislados de soja (ASN y ASD) y el caseinato de sodio (CS). Como se mencionó en la sección 3.1, estas fracciones proteicas exhibieron propiedades estructurales e interfaciales marcadamente diferentes. Las emulsiones o/w se prepararon con las muestras mencionadas en un rango de concentración 1 -10 mg/ml en la fase acuosa hay que asegurarse que, analizando además el efecto de la adición de NaCl (150 mM). En primer lugar se analizará detalladamente las características de las emulsiones iniciales, con el objeto de establecer posteriormente una correspondencia con los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad

3.3.1.- Características de las emulsiones iniciales

3.3.1.1.- Actividad emulsionante y proteína adsorbida

La Figura 35 muestra la variación del índice de actividad emulsionante (IAE) y de la proteína adsorbida (% P_A) en la interfase, en función de la concentración y tipo de muestra. El IAE mostró una tendencia decreciente con el aumento de la concentración de la muestra, independientemente del tipo de proteína utilizada. A concentraciones bajas (1 mg/ml), los valores de IAE fueron mayores en el orden CS >> ASN > ASD. Cuando la concentración de la muestra en la fase acuosa se elevó a 5

mg/ml, los valores de IAE en las emulsiones fueron de 48,1, 37,2 y 41,6 m^2/g para ASN, ASD y CS, respectivamente (Figura 35a). La variación del porcentaje de proteína adsorbida (P_A %) con la concentración de muestra mostró la misma tendencia que el IAE: para todas las emulsiones los valores aproximados de P_A % fueron de 40 cuando las mismas se prepararon con la dispersión acuosa más diluida (1 mg/ml) y de 12 a concentraciones de muestra de 5 mg/ml (Figura 35b).

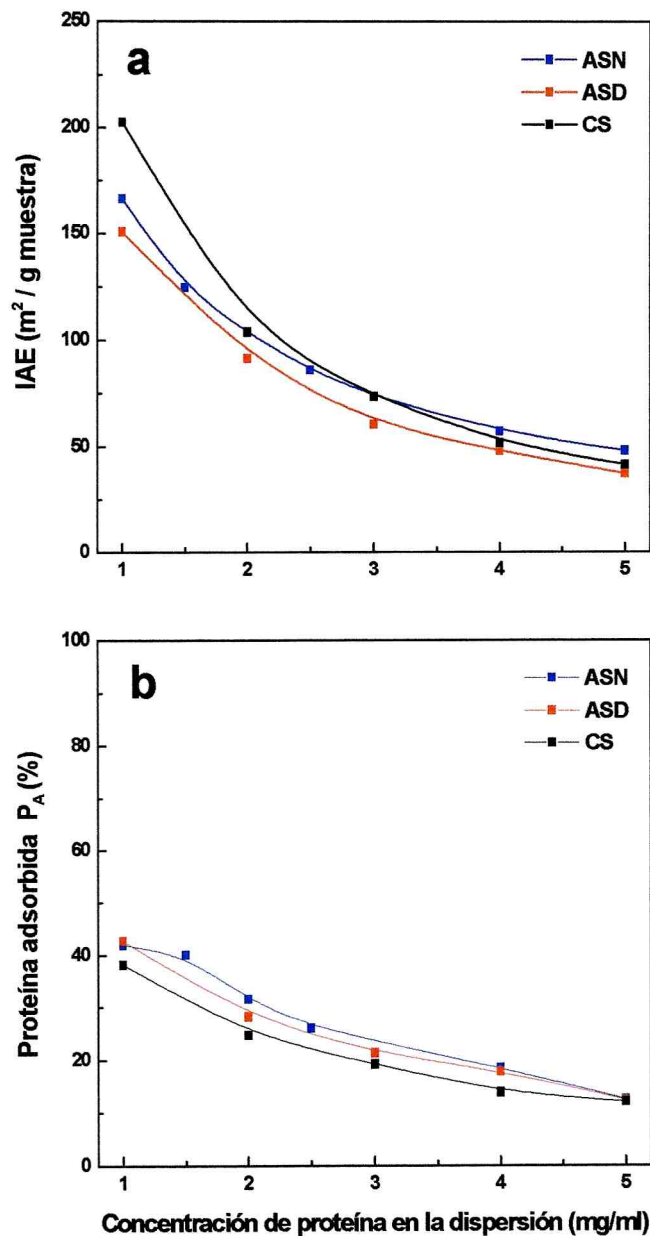


Figura 35: a) Relación entre el índice de actividad emulsionante (IAE) y la concentración de muestra en la dispersión acuosa de las emulsiones preparadas con aislado nativo (ASN), desnaturalizado (ASD) y caseinato de sodio (CS); b) Variación del porcentaje de proteína adsorbida (P_A %) con la concentración de muestra para las mismas emulsiones. Desviación estándar máxima: 5%.

La actividad superficial específica (AIE) de una emulsión o/w está directamente relacionada con el área interfacial creada durante el proceso de homogeneización (Walstra, 1983). Para visualizar más claramente el efecto de la concentración de muestra, la ASE de las emulsiones se expresó tomando como referencia el valor de este parámetro en emulsiones preparadas con dispersiones acuosas más diluidas (1 mg/ml) (Figura 36). En las emulsiones formuladas con aislados de soja se registró un incremento promedio del 20 % en la AIE cuando la concentración de muestra en la fase acuosa se elevó desde 1 a 5 mg/ml (ASN: 0,124 → 0,166 m²/ml emulsión; ASD: 0,113 → 0,139 m²/ml emulsión), mientras que este incremento no se observó en las emulsiones CS (0,152 → 0,156 m²/ml emulsión).

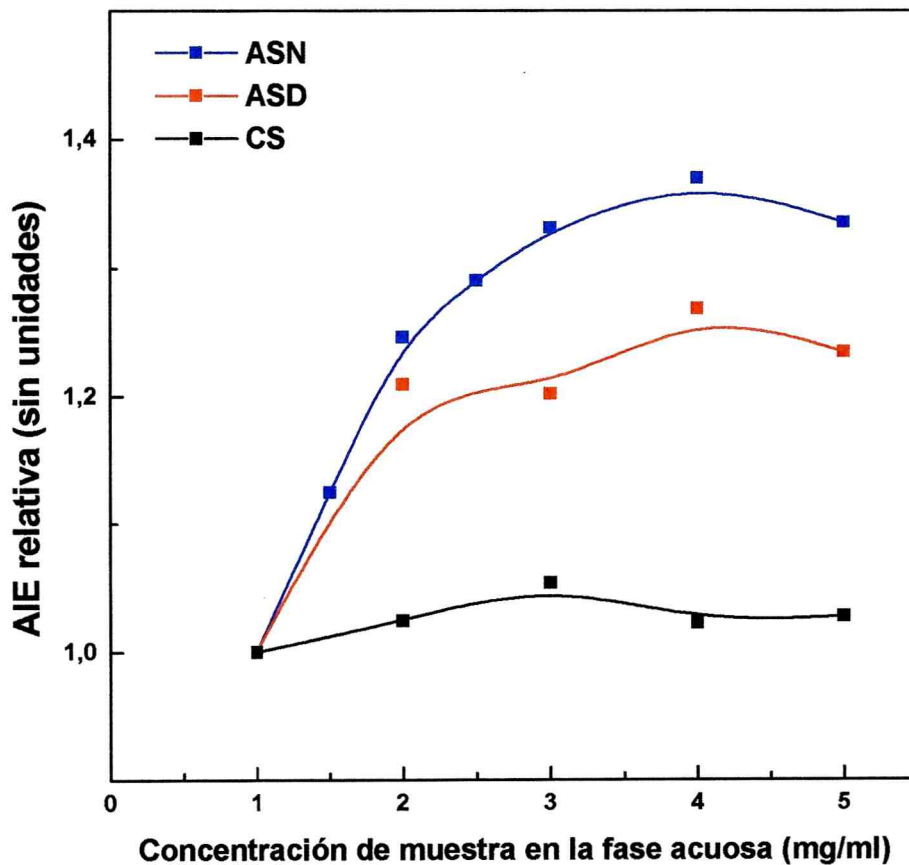


Figura 36: Variación de la actividad interfacial específica relativa (AIE relativa) con la concentración de muestra en la fase acuosa de las emulsiones preparadas con aislado nativo (ASN), desnaturalizado (ASD) y caseinato de sodio (CS). La AIE de las emulsiones formuladas con las dispersiones acuosas más diluidas (1 mg/ml) se tomó como referencia para el cálculo de la AIE relativa. Desviación estándar máxima: 3 %

El hecho de que el IAE y la P_A % hayan mostrado una tendencia decreciente y teniendo en cuenta que las condiciones de preparación de las emulsiones (tiempo y velocidad del rotor) fueron similares en todos los casos, se puede deducir que el área creada durante el proceso de homogeneización no fue suficiente para compensar el aumento de la cantidad de proteína presente en la fase acuosa. Esto se puede visualizar claramente mediante la relación entre proteína/AIE: en todas las emulsiones, esta relación se incrementó con el aumento de la concentración de muestra en las dispersiones acuosas (Figura 37).

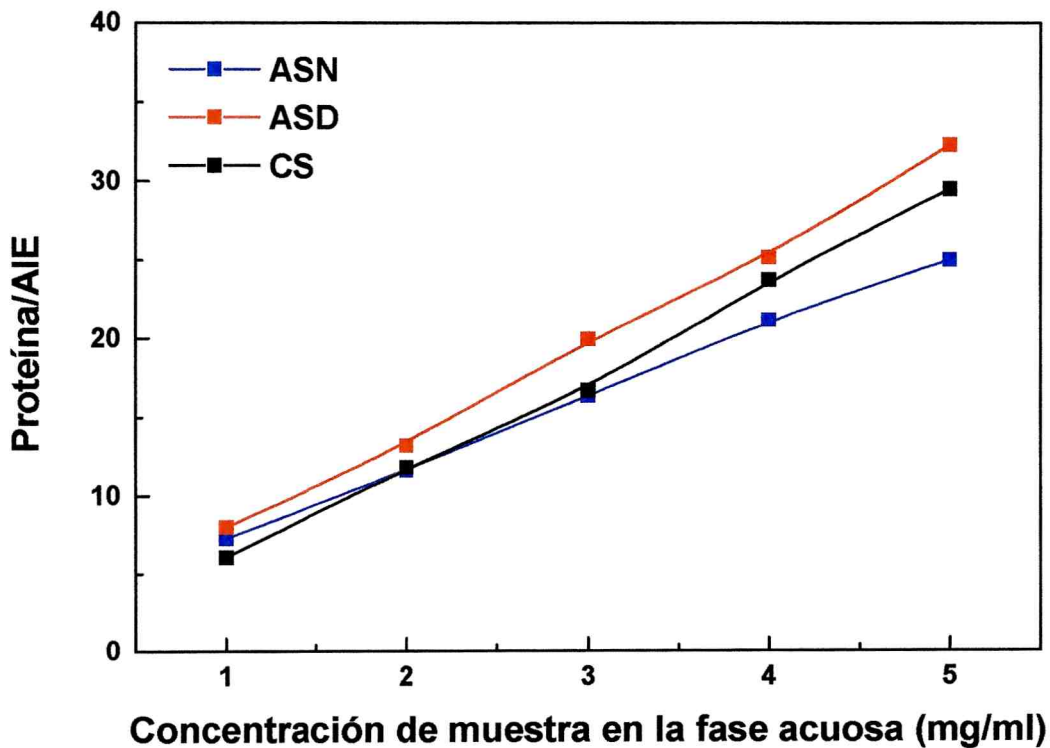


Figura 37: Variación de la relación proteína/actividad interfacial específica con la concentración de muestra en la dispersión acuosa para las emulsiones preparadas con aislado nativo (ASN), desnaturalizado (ASD) y caseinato de sodio (CS). La cantidad de proteína se calculó a partir de la cantidad de muestra a partir del porcentaje de proteína de la muestra (90 % para los aislados, $N \times 6,25$ y 92 % para el CS, $N \times 6,38$). Desviación estándar máxima: 3%

Durante el proceso de homogeneización con un agitador de alta velocidad, las fases acuosa y oleosa son sometidas a una agitación mecánica intensa en un régimen de flujo laminar y turbulento. Por consiguiente, el área interfacial resultante es un balance entre los procesos de ruptura (creación de área interfacial) y coalescencia (reducción de área interfacial) de las gotas (Walstra, 1983; Ford, 1997; McClements, 1999). Las condiciones de homogeneización fueron las mismas para todas las emulsiones, lo cual permite inferir que la variación de la AIE se atribuye en mayor

medida al tipo de muestra empleada, que favorece o inhibe en distinto grado los procesos mencionados. El transporte de las proteínas a la interfase no está mediado por un proceso de difusión sino por convección; por tal motivo, es sumamente importante que las proteínas se desplieguen y ordenen rápidamente en la interfase aceite/agua, formando un film resistente que impida la coalescencia durante el corto tiempo de homogeneización. Aunque el CS tiene una estructura submicelar, está constituido por proteínas con alta flexibilidad estructural, alta tensioactividad e hidrofobicidad superficial (Figura 14, Tabla 12). Por lo tanto, aún a concentraciones bajas (1 mg/ml) su actividad emulsionante es muy elevada, lo cual se refleja en el valor de AIE (Figura 36). En las emulsiones preparadas con ASN y ASD el comportamiento fue diferente. El hecho de que ASN haya mostrado mayor actividad emulsionante que ASD, aún cuando la muestra nativa tiene menor hidrofobicidad aromática superficial y actividad superficial, se atribuiría a la formación de un film interfacial más resistente que impide la coalescencia durante el proceso de homogeneización. Además, el incremento de la AIE a concentraciones más elevadas de muestra para las emulsiones ASN y ASD se puede atribuir a la mayor cantidad de proteína disponible para la adsorción en la interfase agua/aceite durante el corto tiempo de homogeneización. El área creada se cubriría con mayor rapidez, lo cual impide la coalescencia y favorece la formación de emulsiones de tamaño de gota más pequeño.

3.3.1.2 - Concentración proteica interfacial y presión interfacial de equilibrio

La Figura 38 a muestra la relación entre la concentración proteica interfacial aparente (Γ_{ap}) y la concentración de muestra en la dispersión inicial (1-5 mg/ml) para las emulsiones ASN, ASD y CS. Las curvas de Γ_{ap} mostraron un incremento en todo el rango de concentración de muestra para las emulsiones ASD y CS, mientras que en la preparada con ASN alcanzó un plateau para valores mayores a 2 mg/ml. Debido a que la presión interfacial de equilibrio (π_i^e) alcanzó un valor máximo a concentraciones mayores a 1,2 mg/ml para todas las dispersiones (Figura 14), el incremento de Γ_{ap} no fue acompañado por el de π_i^e (Figura 38 b). Como puede observarse en esta figura, tampoco hay una correlación lineal entre π_i^e y Γ_{ap} ; por encima de 2 mg/m² y de 2.8 mg/m² para CS y ASD respectivamente, los valores de π_i^e no variaron de manera significativa. Este comportamiento indicaría una adsorción proteica en multicapas como fue observado por Graham y Phillips (1980) y Phillips (1981) trabajando con proteínas purificadas: albúmina sérica bovina, lisozima y β -caseína. Bajo condiciones de

saturación interfacial, las características de las interacciones intermoleculares entre cadenas polipeptídicas son muy importantes para establecer la formación de multicapas. De esta manera, las interacciones hidrofóbicas deberían prevalecer en las muestras ASD y CS, considerando sus altos valores de hidrofobicidad aromática superficial.

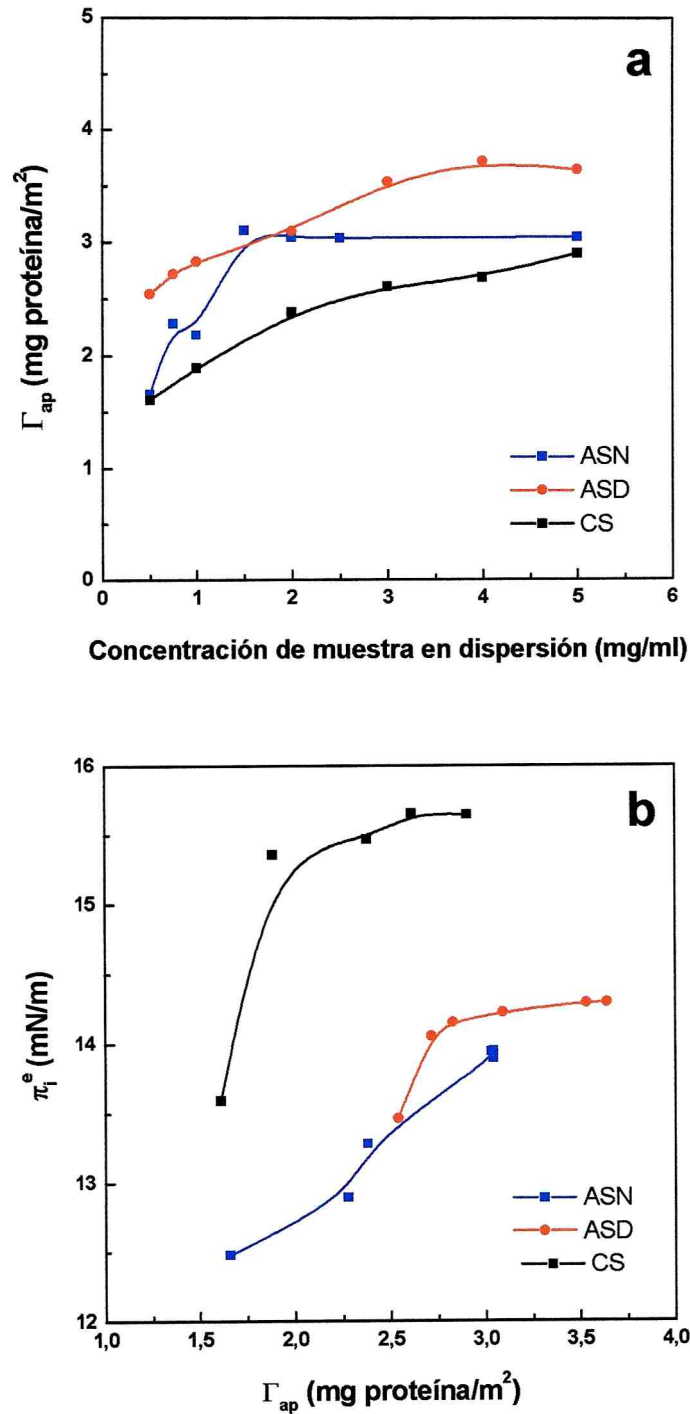


Figura 38: a) Variación de la concentración proteica interfacial aparente (Γ_{ap}) con la concentración de proteína para las emulsiones ASN, ASD y CS. b) Relación entre de la tensión interfacial de equilibrio (π_i^e) de ASN, ASD y CS con Γ_{ap} . Desviación estándar máxima 5%.

En cambio para ASN, la relación prácticamente lineal que se observó entre π_c y Γ_{ap} implicaría que no tuvo lugar una adsorción en multicapas. Las globulinas 7S y 11S en estado nativo presentan una estructura globular y oligomérica, lo que explica el valor relativamente bajo de H_o (98 ± 7) exhibido por ASN. Por consiguiente, es probable que la formación de multicapas de moléculas de 7S y 11S no esté favorecida debido a la repulsión electrostática y estérica y a la baja intensidad de las interacciones hidrofóbicas que las proteínas adsorbidas en la interfase ejercen con las moléculas de proteína no adsorbida en la fase acuosa.

3.3.1.3 Distribuciones de tamaño de partícula y correspondencia con el método turbidimétrico

Con el objeto de complementar la información de las emulsiones iniciales obtenidas con el método turbidimétrico, se determinaron las distribuciones de tamaño de partícula a baja y alta concentración de muestra en las dispersiones acuosas, 1 y 5 mg/ml.

En todos los casos, las distribuciones de tamaño de partícula mostraron un carácter bimodal con dos poblaciones de gotas bien definidas: I) gotas de diámetro inferior a $6 \mu\text{m}$ y II) gotas cuyo diámetro está comprendido en el intervalo $6\text{-}60 \mu\text{m}$ (Figura 39). El carácter bimodal de las distribuciones se atribuyó al dispositivo utilizado para la preparación de la emulsión y al tiempo de homogeneización relativamente corto (Mitidieri y Wagner, 2002). La mayor parte del volumen de la fase dispersa se encuentra distribuida en la población II. Sin embargo, si se analiza la distribución de tamaño de gota expresada en superficie, la población I contribuye mayoritariamente al área interfacial creada durante el proceso de homogeneización. Las distribuciones en número de tamaño de gota fueron similares para todas las emulsiones (datos no mostrados) con diámetros promedio ($D_{1,0}$) en el rango $0,62 - 0,65 \mu\text{m}$. El percentil del 90 % de las distribuciones en número ($D_{n,0,5}$) fue, en promedio de $1,1 \mu\text{m}$, lo cual significa que el 90 % de las gotas de las emulsiones analizadas tienen un diámetro igual o menor a ese valor. En concordancia con las distribuciones mostradas en la Figura 39, es importante destacar que las gotas de diámetro $< 1,1 \mu\text{m}$, al formar parte de la población I, no contribuyen de manera importante al volumen total de la fase dispersa, pero si al área total creada.

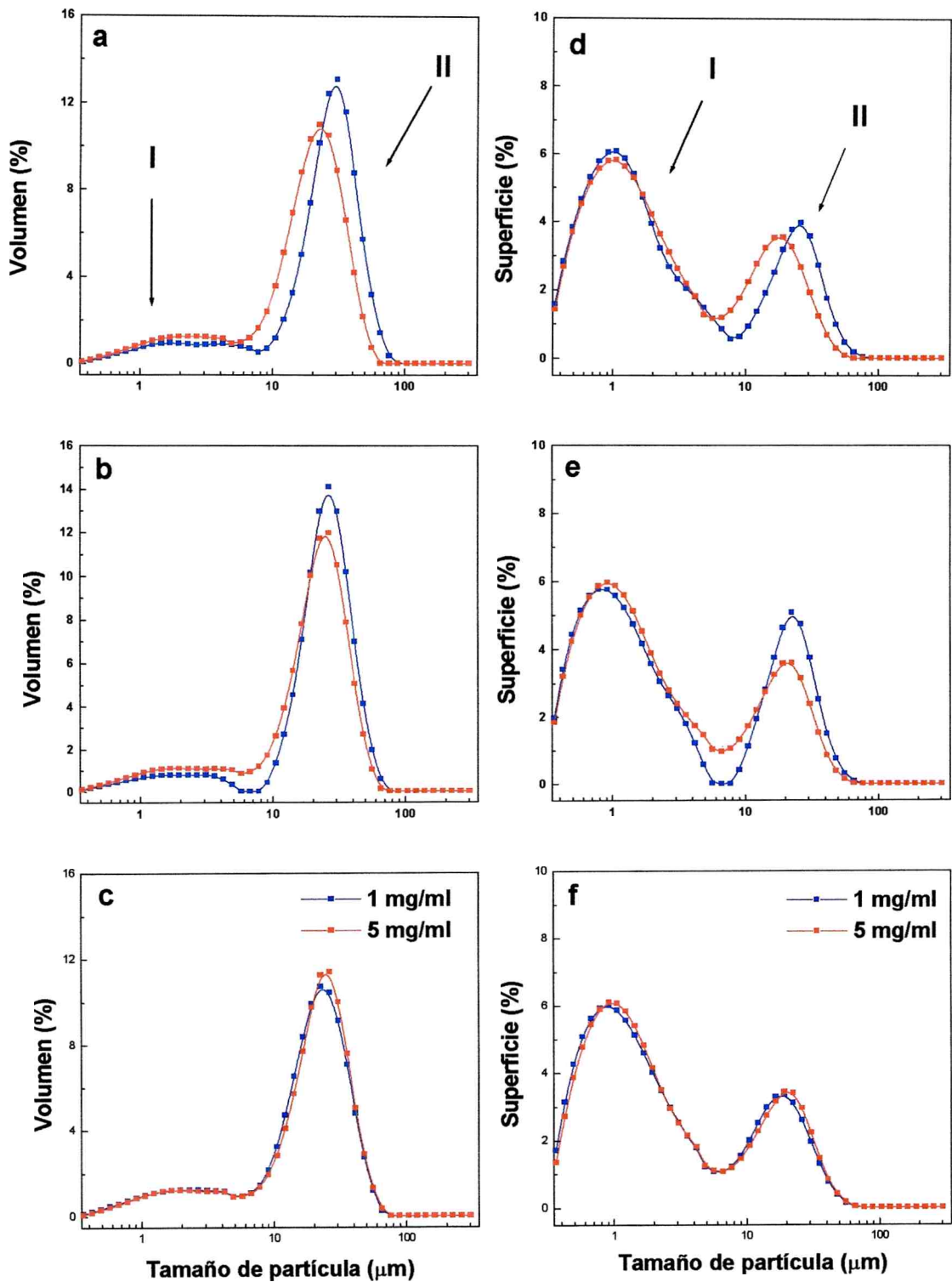


Figura 39: Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones preparadas con aislados nativos (ASN), desnaturalizados de soja (ASD) y caseinato de sodio (CS) a distintas concentraciones de muestra (1 y 5 mg/ml). Distribuciones en volumen: a) ASN; b) ASD; c) CS. Distribuciones en superficie: d) ASN; e) ASD; f) CS

En las emulsiones preparadas con proteínas de soja (ASN y ASD), el aumento de la concentración de muestra en la dispersión acuosa provocó un desplazamiento de las distribuciones en volumen y superficie (tanto la población I como la población II) hacia tamaño de gotas más bajos; en cambio en las emulsiones CS las distribuciones fueron similares y no se observó tal desplazamiento. Este resultado está de acuerdo con el obtenido por el método turbidimétrico, con el cual se observó un aumento de la AIE a concentraciones elevadas de muestra sólo en las emulsiones preparadas con aislados de soja.

Las tablas 19 y 20 muestran los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las emulsiones iniciales. El diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$) está ligado a la distribución de tamaño de gota en superficie y por ende, es un parámetro inversamente proporcional al área creada durante el proceso de homogeneización (ecuación, $6\phi/D_{3,2}$ se cambiaron los números en la introducción). El procedimiento experimental de la determinación de la ASE por el método turbidimétrico requiere que la dilución de la emulsión se lleve a cabo en una solución reguladora que contiene SDS para que el detergente desplace totalmente a la proteína de la interfase, produciendo la disociación de los flóculos formados (sección 2.). Por consiguiente, para establecer una correspondencia con el ASE calculada a partir del diámetro promedio de Sauter, la distribución de tamaño de partícula debe también determinarse en presencia de SDS.

A concentraciones de muestra de 1 mg/ml, los valores de $D_{3,2}$ siguieron el orden CS > ASN > ASD, mientras que a 5 mg/ml, $D_{3,2}$ disminuyó para las emulsiones ASN y ASD y fue similar para la emulsión preparada con CS. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos con el método turbidimétrico.

Los valores de AIE calculados a partir de $D_{3,2}$ fueron del mismo orden de magnitud, pero superiores (50 % en promedio) a los obtenidos por el método turbidimétrico (Figura 40). La subestimación del área interfacial al emplear el método turbidimétrico se ve reflejada en la regresión lineal entre los resultado alcanzados con ambos métodos. Si bien el coeficiente de correlación es muy bueno, tanto la pendiente como la ordenada al origen son mayores a 1. Según Dickinson y Stainsby (1988), un inconveniente del método de Pearce y Kinsella (1978) es que la relación entre la turbidez y el diámetro de tamaño de gota (y por lo tanto, el área creada) no es tan simple como la que estos autores sugieren. En emulsiones o/w, a igual fracción volumétrica, la turbidez aumenta con el incremento del área creada cuando el tamaño de las gotas es igual o superior a 3 μm . En cambio, las gotas menores de 3

μm , que pueden contribuir de manera importante al AIE, dispersan menor cantidad de luz.

Tabla 19: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouker ($D_{4,3}$) de las emulsiones iniciales preparadas con aislado nativo de soja (ASN), aislado desnaturalizado de soja (ASD) y caseinato de sodio (CS). Concentración de muestra en la dispersión: 1 mg/ml. ^(a) NaCl: 150 mM en la fase acuosa, agregados después de la homogeneización; ^(b) SDS: 1 % en buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0. Cada medición es el promedio de al menos dos determinaciones independientes.

Emulsión	NaCl ^(a)	$D_{3,2}$ (μm)		$D_{4,3}$ (μm)	
		- SDS	+ SDS ^(b)	- SDS	+ SDS ^(b)
ASN	-	7,7 \pm 0,1	7,6 \pm 0,2	32,6 \pm 0,5	26,2 \pm 0,2
	+	8,0 \pm 0,3	8,0 \pm 0,3	32,4 \pm 0,1	27,3 \pm 0,1
ASD	-	8,2 \pm 0,1	8,5 \pm 0,2	24,6 \pm 1,3	25,2 \pm 0,2
	+	8,6 \pm 0,3	8,7 \pm 0,1	23,7 \pm 0,5	25,5 \pm 0,2
CS	-	6,5 \pm 0,1	6,3 \pm 0,2	19,0 \pm 0,1	18,8 \pm 0,1
	+	6,6 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	19,1 \pm 0,1	19,1 \pm 0,1

Tabla 20: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), y de De Brouker ($D_{4,3}$) de las emulsiones iniciales preparadas con aislado nativo de soja (ASN), aislado desnaturalizado de soja (ASD) y caseinato de sodio (CS). Concentración de muestra en la dispersión: 5 mg/ml. ^(a) NaCl: 150 mM en la fase acuosa, agregados después de la homogeneización; ^(b) SDS: 1 % en buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0. Cada medida es el promedio de al menos dos determinaciones independientes

Emulsión	NaCl ^(a)	$D_{3,2}$ (μm)		$D_{4,3}$ (μm)	
		- SDS	+ SDS ^(b)	- SDS	+ SDS ^(b)
ASN	-	6,6 \pm 0,1	6,7 \pm 0,1	19,7 \pm 0,1	19,9 \pm 0,1
	+	6,7 \pm 0,4	6,5 \pm 0,1	20,6 \pm 0,2	20,7 \pm 0,2
ASD	-	6,6 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	20,1 \pm 0,3	20,4 \pm 0,1
	+	6,5 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2	19,8 \pm 0,2	20,4 \pm 0,2
CS	-	6,5 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1	19,6 \pm 0,2	19,2 \pm 0,1
	+	6,5 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	18,8 \pm 0,3	19,0 \pm 0,1

En relación a lo informado por Dickinson y Stainsby (1988) y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, es probable que el método de Pearce y Kinsella (1978) esté brindando una subestimación del AIE, al no tener en cuenta una parte

importante de la población de gotas (gotas < 3 μm , población I). El buen coeficiente de correlación obtenido entre los valores de AIE determinados por los dos métodos, se atribuye a que todas las emulsiones mostraron distribuciones de tamaño de gota bimodales, con las dos poblaciones de gotas distribuidas en rangos de tamaño similares. En conclusión, los datos obtenidos a partir del diámetro promedio de Sauter, $D_{3,2}$, permiten determinar el valor de AIE con mayor exactitud que con el método de Pearce y Kinsella (1978).

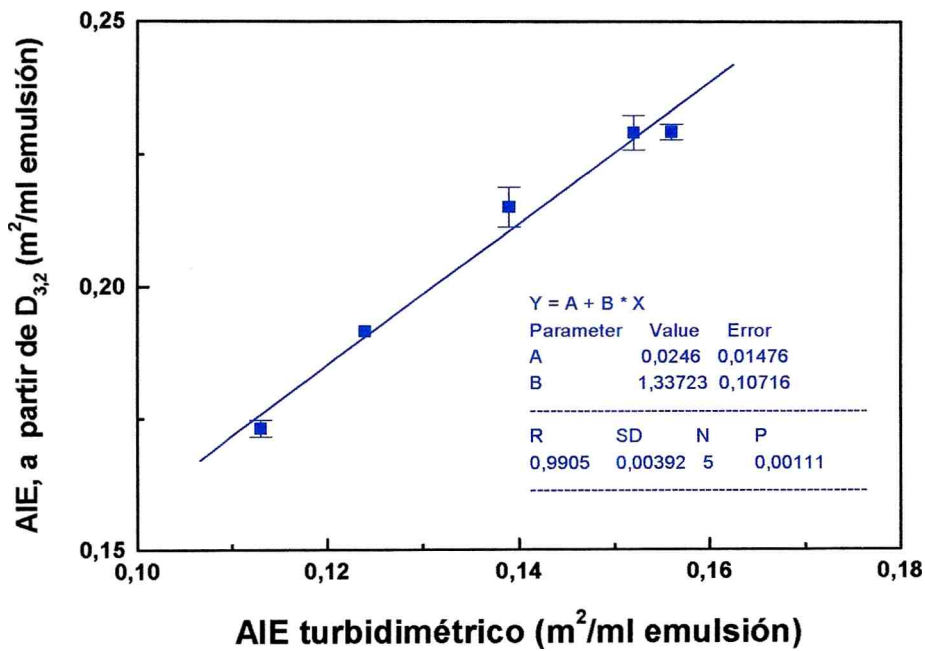


Figura 40: Regresión lineal entre AIE determinada a partir de $D_{3,2}$ y por turbidimetría.

3.3.1.4 Distribución de tamaño de partícula y relación con la microestructura de las emulsiones

La determinación de tamaño de partícula por light scattering, requiere una dilución previa de la emulsión ($\phi < 0,05$) para impedir el fenómeno de dispersión múltiple de luz durante la medida, el cual podría conducir a errores sistemáticos. Además de la dilución, la circulación de la emulsión por el dispositivo requiere un proceso de agitación para asegurar que las gotas de la emulsión se dispersen de manera uniforme. Por consiguiente, el analizador de partículas detecta las gotas individuales más sólo aquellos flóculos que no se disocian o se disocian parcialmente

en las condiciones de medición. Estos flóculos resistentes se forman fundamentalmente por un mecanismo de puenteo (“bridging flocculation”). Por otro lado, la microscopía óptica es un método que también permite evaluar cualitativa y/o cuantitativamente el grado de floculación de una emulsión. La cuantificación del grado de floculación requiere del análisis digital de un número muy grande de fotos para dar resultados exactos, por lo que en este trabajo la técnica se utilizará de manera cualitativa para el análisis de la microestructura de la emulsiones. Además, aunque el límite de resolución teórico de un microscopio óptico es de aproximadamente 0,2 μm , en la práctica es difícil observar imágenes claras de partículas de tamaño menor a 1 μm debido al diseño del instrumento y al movimiento browniano de las gotas. Por lo tanto, las gotas que se observan con mayor facilidad son aquellas de tamaño mayor a 1-2 μm , que en nuestro caso representa, en número, menos del 10 % de la población total de gotas.

Como se mencionó en la sección 1.8.3, los diámetros promedio obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula dan una información complementaria (Rawle, 2005). El diámetro promedio de De Brouker ($D_{4,3}$), al tener dimensiones D^4/D^3 (Tabla) es más sensible a la presencia de gotas de mayor tamaño en la emulsión. Por lo tanto el $D_{4,3}$ se utiliza comúnmente para detectar la presencia de flóculos o para el estudio de los mecanismos de desestabilización de emulsiones que involucren cambios en el tamaño de partícula (floculación^E), coalescencia total o parcial y desproporción de Ostwald).

Con la única excepción de la emulsión preparada con 1 mg/ml de ASN en la dispersión (en ausencia y presencia 150 mM de NaCl) no hubo diferencias significativas entre los diámetros promedio $D_{4,3}$ de las emulsiones medidas sin y con 1 % de SDS (Tablas 19 y 20). En cambio, las micrografías revelan que en la mayoría de las condiciones las emulsiones ASN, ASD y CS mostraron tendencia a la formación de flóculos (Figuras 41, 42 y 43).

A concentraciones de muestra de 1 mg/ml los valores de $D_{4,3}$ de la emulsiones ASN en ausencia de SDS fueron levemente superiores que en presencia del detergente. Por tanto, aunque no en gran extensión, es probable que se formen flóculos por un mecanismo de puenteo. Cuando las proteínas actúan como agentes emulsificantes, la floculación por puenteo está favorecida cuando la cantidad de agente emulsificante no logra compensar el aumento del área creada durante el

^E Aunque en la floculación las gotas mantienen su integridad individual, un flóculo puede comportarse efectivamente como una gota de mayor tamaño

proceso de homogeneización, pero también depende de las características estructurales de las proteínas (Tornberg y Ediweera, 1988; Tornberg y col., 1997).

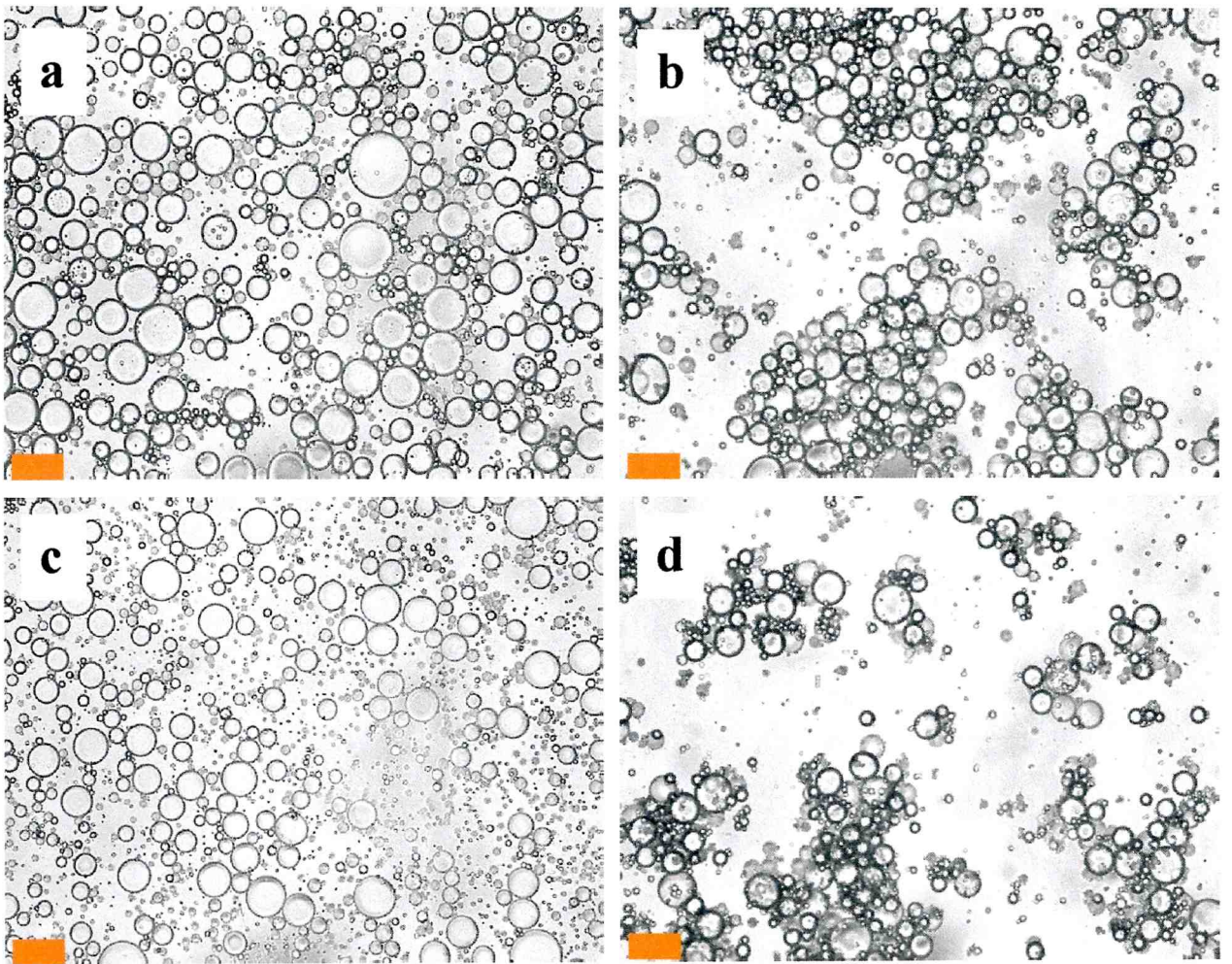


Figura 41: Micrografías ópticas (200X) de emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de ASN (1 y 5 mg/ml): a) 1 mg/ml; b) 1 mg/ml en presencia de NaCl; c) 5 mg/ml; d) 5 mg/ml en presencia de NaCl. El NaCl se adicionó después de la homogeneización a una concentración de 150 mM en la fase acuosa. Los flóculos están marcados con círculos y las barras indican 10 µm.

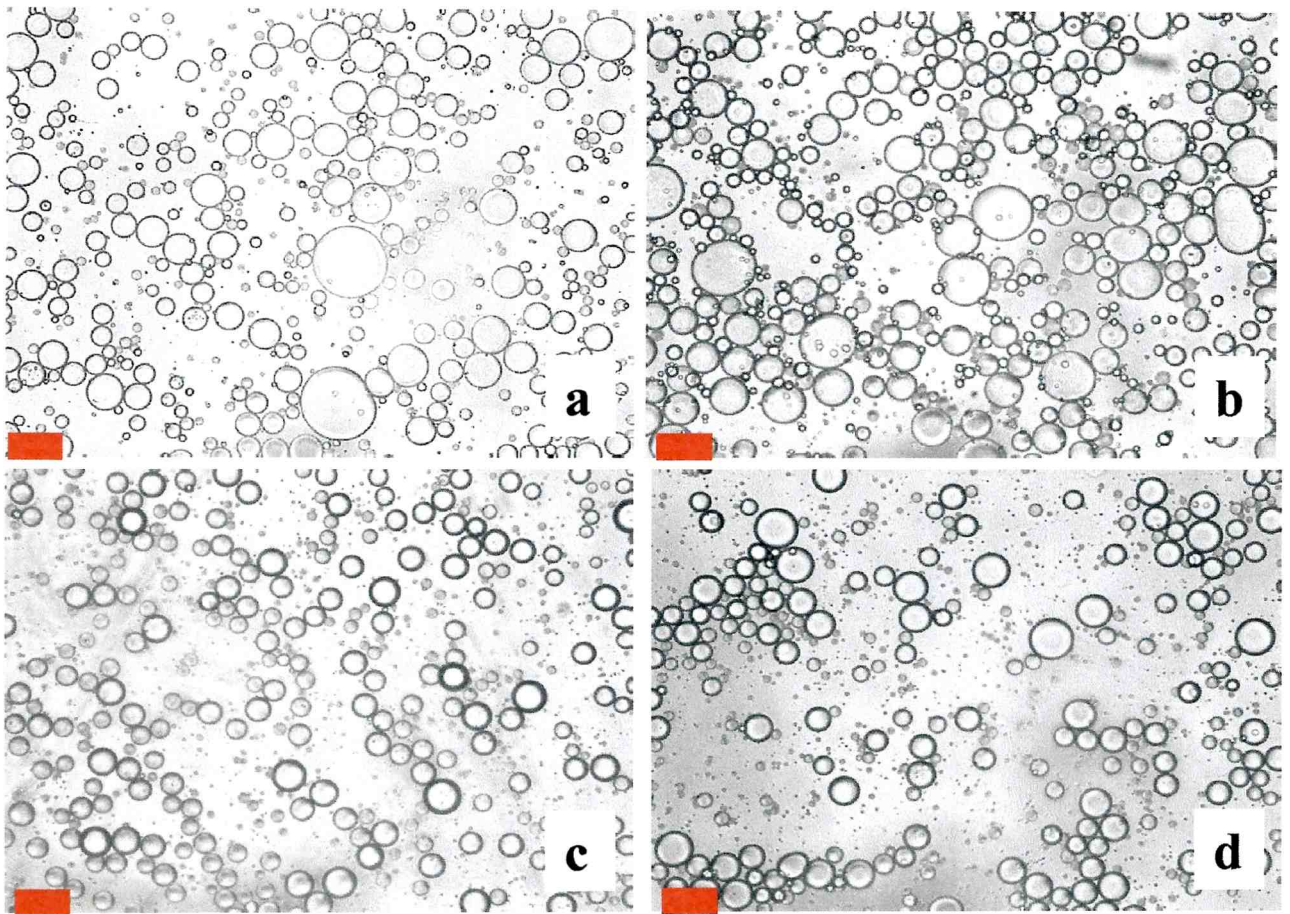


Figura 42: Micrografías ópticas (200X) de emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de ASD (1 y 5 mg/ml): a) 1 mg/ml; b) 1 mg/ml en presencia de NaCl; c) 5 mg/ml; d) 5 mg/ml en presencia de NaCl. El NaCl se adicionó después de la homogeneización a una concentración de 150 mM en la fase acuosa. Los floculos están marcados con círculos y la deformación de gotas con flechas. Las barras indican 10 μm .

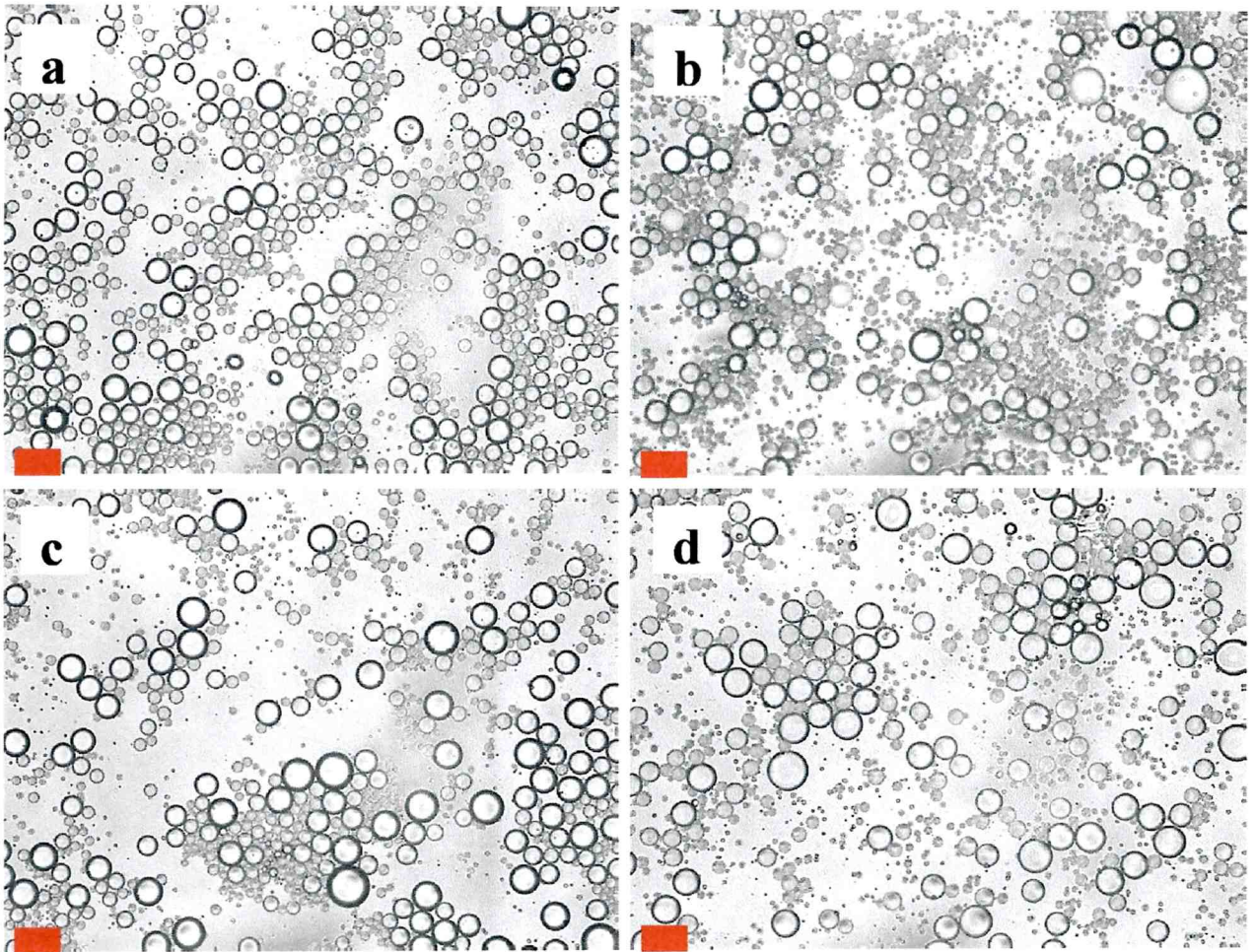


Figura 43: Micrografías ópticas (200X) de emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de CS (1 y 5 mg/ml); a) 1 mg/ml; b) 1 mg/ml en presencia de NaCl; c) 5 mg/ml; d) 5 mg/ml en presencia de NaCl. El NaCl se adicionó después de la homogeneización a una concentración de 150 mM en la fase acuosa. Los flóculos están marcados con círculos y las barras indican 10 μm .

Aunque a concentraciones de ASN de 1 mg/ml, el P_A % es sólo 40, las globulinas 7S y 11S nativas, de estructura globular y oligomérica, no se despliegan lo suficientemente rápido en el corto tiempo de homogeneización, lo cual podría explicar la diferencia observada en los valores de $D_{4,3}$ en ausencia y presencia de SDS. La floculación por puenteo es más común y se da en mayor extensión en los dispositivos de alta densidad de energía como los homogeneizadores a válvula y ultrasónicos (Tornberg y col., 1997). Cuando la concentración de muestra se eleva (5 mg/ml), el mecanismo de floculación por puenteo se inhibe debido al aumento de Γ_{ap} y de la cantidad de proteína no adsorbida ($100 - P_A$ %), reflejándose en la obtención de valores similares de $D_{4,3}$ en ausencia y presencia de SDS. De manera cualitativa, en las micrografías también se observa la presencia de gotas más pequeñas en la emulsión preparada con la dispersión acuosa más concentrada (5 mg/ml), resultado acorde con el desplazamiento hacia tamaño de gota más pequeños observado en las distribuciones de tamaño de partícula (Figuras 39 a y c)

Con la adición de NaCl después de la homogeneización, los valores de $D_{4,3}$ (tanto en ausencia como en presencia de SDS) fueron similares a los de las emulsiones sin NaCl, aunque la microestructura fue totalmente diferente (Figuras 41 b y d). A concentraciones de muestra de 1 y 5 mg/ml, se observó cualitativamente un mayor grado de floculación. En general, las interacciones coloidales de Van der Waals (atractivas), electrostáticas y estéricas (repulsivas), dominan el comportamiento de una emulsión preparada con proteínas de estructura globular. La adición de NaCl altera el balance entre estas interacciones coloidales, dado que produce el apantallamiento o "screening" de las interacciones electrostáticas repulsivas. Al disminuir la influencia de estas interacciones, la gotas tienden a agregarse pero la magnitud de la interacción no es lo suficientemente importante para que los flóculos formados sean estables en las condiciones de alta dilución y agitación de la determinación de tamaño de partícula.

En las emulsiones ASD, independientemente de la concentración de muestra y la adición de NaCl, los diámetros promedio $D_{4,3}$ fueron similares en ausencia y presencia de SDS. A concentraciones bajas de muestra (1 mg/ml) las micrografías no mostraron diferencias apreciables en la microestructura (Figuras 42 a y b). La presencia de gotas deformadas sería indicativa de la formación de un film interfacial poco resistente al esfuerzo de corte en las condiciones de homogeneización. Esto podría explicar los menores valores de AIE y de $D_{3,2}$ de la emulsión ASD en relación con la preparada con el aislado de soja nativo.

A concentraciones de muestra de 5 mg/ml, las emulsiones también evidenciaron la presencia de gotas más pequeñas que las preparadas con la dispersión acuosa más diluida, lo que está de acuerdo con el desplazamiento hacia menores tamaños de gota en las distribuciones de tamaño de partícula. Además en estas emulsiones no se evidenció la presencia de gotas deformadas, probablemente como consecuencia de un considerable aumento en la Γ_{ap} y la formación de multicapas (Figura 38). En presencia de NaCl, la emulsión ASD mostró un mayor grado de floculación. La desnaturalización térmica de las globulinas 7S y 11S provocan la exposición de los restos aminoácidos hidrofóbicos ocultos en la estructura nativa de estas proteínas, aumentando la hidrofobicidad superficial, la cual es aún mayor en presencia de NaCl (Tabla) (Mitidieri y Wagner, 2002). Por tal motivo, las interacciones coloidales hidrofóbicas atractivas dominarían el comportamiento de estas emulsiones, lo cual explica la existencia de flóculos.

Por otra parte, la microestructura de las emulsiones CS fue similar en todas las condiciones y no se observó variaciones apreciables en el tamaño de las gotas, lo cual está de acuerdo con las distribuciones de tamaño de partícula. Los diámetros promedio $D_{4,3}$ no mostraron diferencias significativas en ausencia y presencia de SDS, indicando que los flóculos se disociaron fácilmente durante la medida de tamaño de partículas. La gran estabilidad de las emulsiones preparadas con CS, se atribuye a las interacciones de repulsión electrostática y estérica que ejercen los restos aminoacídicos cargados negativamente y los restos glicosídicos de la κ -caseína. (Damodaran, 2005). Estas interacciones dominan a las interacciones hidrofóbicas atractivas entre los restos no polares de las proteínas constituyentes de CS, lo cual impide que las gotas se formen agregados. Sin embargo, cuando hay partículas submicelares de CS no adsorbidas en la fase acuosa, por encima de una concentración crítica, se pueden formar flóculos por un mecanismo de depleción (Dickinson y col., 1997; Ye y Singh, 2001). Como se mencionó en la introducción de este trabajo, la interacción coloidal de depleción es atractiva y surge como consecuencia de un efecto de volumen de exclusión. A concentraciones de muestra de 1 y 5 mg/ml el porcentaje de proteína no adsorbida ($100 - P_A$ %) fue de 60 y 90 respectivamente. Teniendo en cuenta esto, es altamente probable que los flóculos observados en las micrografías estén formados por un mecanismo de depleción.

Según Dickinson y col. (1997), la formación de flóculos por depleción es reversible, lo cual explica que los mismos no hayan sido detectados durante las medidas de tamaño de partícula. Además, parece menos probable que los iones Ca^{2+} , los cuales tienen una alta tendencia a interactuar con los residuos de fosfoserina

cargados negativamente de las proteínas constituyentes de CS, tengan importancia en la formación de flóculos, precisamente porque la concentración de iones Ca^{2+} (0,7 % p/p) no es suficientemente alta para producir floculación por puenteo. En cambio, la presencia de Ca^{2+} sería importante para mantener la estructura de las partículas submicelares del CS y posiblemente contribuya con un mayor grado de estructuración del film interfacial.

La adición de NaCl, después de la homogeneización, no afectó en gran medida la microestructura de las emulsiones CS (Figuras 43 b y d). Tanto a concentraciones bajas como elevadas de CS, el efecto de la adición de NaCl aumenta la influencia de las interacciones hidrofóbicas atractivas entre las gotas. Por tal motivo, es probable que las estas interacciones sean importantes para explicar la formación de flóculos en estas condiciones.

3.3.2. Estabilidad frente a la coalescencia durante la agitación

De acuerdo a McClements (1999), la frecuencia de colisión entre las gotas en una emulsión o/w bajo condiciones de trabajo mecánico aumenta con el incremento de la magnitud del esfuerzo de corte, con el aumento de la fracción volumétrica de la fase dispersa y con la disminución del tamaño de las gotas. En los ensayos de agitación orbital realizados, fueron similares tanto el esfuerzo de corte aplicado como la fracción volumétrica de la fase dispersa en la emulsión ($0,251 \pm 0.013$). Además, si se considera que el 90 % de las gotas en todas las emulsiones tiene un tamaño menor a $1,1 \mu\text{m}$ es altamente probable que la frecuencia de colisión no difiera considerablemente entre las distintas emulsiones. En condiciones de almacenamiento estacionario (sección 3.2), la frecuencia de colisión entre las gotas se atribuye principalmente al movimiento browniano y al movimiento en un campo gravitatorio, especialmente durante la etapa de cremado. En el caso del ensayo con agitación orbital, la frecuencia de colisión se atribuye exclusivamente al esfuerzo de corte aplicado sobre las emulsiones, en tanto que la desestabilización por cremado se ve impedida.

Teniendo en cuenta los comentarios anteriores, la coalescencia en condiciones de agitación debería atribuirse a diferencias en la eficiencia de colisión entre las gotas. La eficiencia de colisión se define como la probabilidad de que los films interfaciales que rodean a las gotas interaccionen íntimamente, se deformen y sufran una ruptura durante una colisión.

Este parámetro está gobernado por la magnitud y tipo de interacciones coloidales y la viscoelasticidad del film interfacial, lo cual está influenciado por la concentración y tipo de emulsificante y por el medio (Lucassen-Reynders, 1993). La eficiencia de colisión de una emulsión es mayor con el incremento del tamaño de las gotas. Por lo tanto, la estabilidad frente a la coalescencia de las emulsiones probablemente esté gobernada por el comportamiento la población de gotas más grandes de la emulsión (población II en las distribuciones de tamaño de partícula, Figura 39).

3.3.2.1 Efecto del tipo y concentración de muestra

En la Figura 44 a se observa el porcentaje de coalescencia (C%) en función de la concentración de muestra en ausencia de NaCl para las tres fracciones proteicas ensayadas. En todo el rango de concentración evaluado, las emulsiones ASN fueron las más estables a la coalescencia ($C\% < 12$), mientras que las preparadas con CS mostraron un comportamiento similar al de ASN aunque con un grado de desestabilización levemente superior en el rango de concentración de muestra 1,5 - 3 mg/ml. En cambio, las emulsiones ASD evidenciaron un mayor grado de desestabilización que las anteriores mostrando una tendencia a disminuir con el aumento de la concentración de muestra. Aún a concentraciones extremas (10 mg/ml) de ASD no se alcanzó una estabilización total ($C\% = 32$).

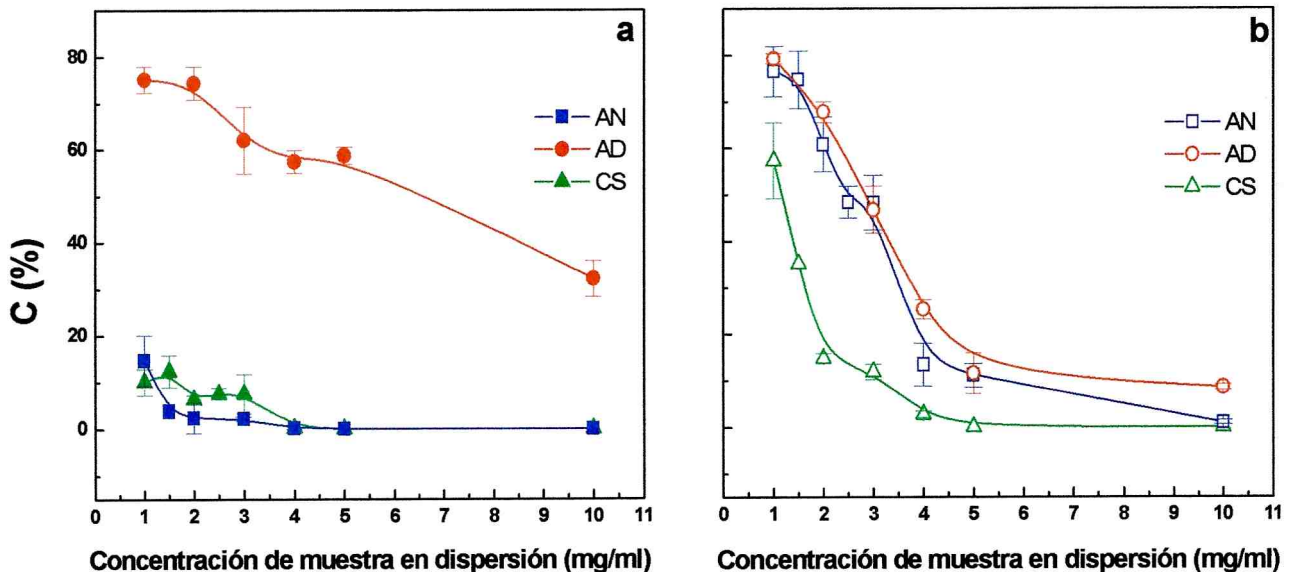


Figura 44: Efecto de la concentración de muestra y la adición de NaCl sobre el porcentaje de coalescencia (C %) de emulsiones o/w preparadas con ASN, ASD y CS (1-10 mg/ml, buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0): a) en ausencia de NaCl; b) con la adición de 150 mM NaCl en la fase acuosa (después de la homogeneización). C % fue determinado en las emulsiones agitadas durante 60 minutos. Máxima desviación estándar: 5 %

La mayor estabilidad de las emulsiones ASN y CS, así como la disminución de la coalescencia en las emulsiones ASD con el aumento de la concentración de muestra, no pueden atribuirse a cambios en la presión interfacial, ya que a concentraciones superiores a 1.2 mg/ml, π^e alcanzó valores máximos para las tres muestras (saturación interfacial). Además, los valores de π^e en estas condiciones no correlacionan con los de coalescencia. Esto se puede visualizar claramente analizando el comportamiento interfacial de las emulsiones ASN y ASD. A concentraciones mayores de 1,2 mg/ml, la actividad interfacial de ASD fue mayor que la de ASN (Figura 14); sin embargo, las emulsiones preparadas con el aislado desnaturalizado fueron más inestables.

Según Lucassen-Reynders (1993), la función de una proteína como agente emulsificante no sólo es producir una tensión interfacial de equilibrio sino impartir una propiedad reológica dinámica en la interfase, la cual pueda incrementar su resistencia a los esfuerzos de corte. Por consiguiente, la reducción de la tensión interfacial como único mecanismo no puede explicar la formación de emulsiones que sean estables en condiciones de trabajo mecánico. Como se mostró en la Tabla 19, sólo a concentraciones bajas de muestra (1 mg/ml) los valores de $D_{3,2}$ fueron mayores en el orden : ASD > ASN > CS, mientras que a concentraciones elevadas (5 mg/ml) se hicieron significativamente similares (Tabla 20). De acuerdo a estos datos, las diferencias en la estabilidad frente la coalescencia bajo agitación, no están tampoco relacionadas con el diámetro promedio de las gotas.

La pobre correlación entre C %, el tamaño de gota ($D_{3,2}$; $D_{4,3}$) y el comportamiento interfacial sugiere que la resistencia a la coalescencia bajo condiciones de agitación estaría relacionada a las propiedades reológicas del film interfacial, según lo informado en trabajos previos (Britten y Giroux, 1991; Lucassen-Reynders, 1993; Mitidieri y Wagner, 2002). Phillips (1981) ha informado que las proteínas globulares forman films más rígidos y viscoelásticos que las proteínas de alta flexibilidad y estructuras típicas random coil como la β -caseína. La estructura oligomérica y el alto peso molecular de las proteínas constitutivas de ASN (globulinas 7S y 11S) y de las submicelas de CS (formadas no sólo por β -caseína) imparten características reológicas adecuadas al film que dan estabilidad a las emulsiones frente a la coalescencia bajo agitación. Este grado de estructuración interfacial no se encontraría en la muestra ASD, formada por las globulinas 7S y 11S totalmente desnaturalizadas y parcialmente dissociadas (Figura FPLC). De esta manera, ASD se comportaría similarmente a la β -caseína.

Al analizar la microestructura de las emulsiones (sección 3.1.1) a fin de relacionarla con la estabilidad de las mismas, se observó que en ausencia de NaCl, las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas de CS (1 y 5 mg/ml) mostraron

una microestructura similar con un alto grado de floculación por un mecanismo de depleción o agotamiento. Aunque estas emulsiones mostraron valores bajos de C % en todo el rango de concentración, la mayor estabilización podría atribuirse a aumento en la rigidez del film por la presencia de multicapas (Figura 38). En este sentido, dada la estructura submicelar propuesta para el CS (Creamer y Berry, 1975; Dickinson y col., 1997; Fukushima, 2004) parece probable que durante la adsorción secundaria en multicapas, no haya un grado de desestructuración micelar importante, lo cual es una condición necesaria para formar film más rígidos y resistentes a los esfuerzos de corte (Graham y Phillips, 1980; Phillips, 1981).

Por otra parte, la baja estabilidad de las emulsiones ASD a concentraciones bajas y la incompleta estabilización a concentraciones más elevadas (5 mg/ml) se debería a la formación de un film de escasa resistencia al esfuerzo de corte, tal como fue propuesto previamente por Mitidieri y Wagner (2002). Aunque en este trabajo la viscoelasticidad del film interfacial en las emulsiones no fue determinada, la microestructura de las emulsiones preparadas con la dispersión acuosa más diluida de ASD evidenció la presencia de gotas deformadas, lo cual podría ser un indicador cualitativo de un film interfacial de baja viscoelasticidad. La disminución de C % a medida que se incrementa la concentración de ASD podría atribuirse a la suma de dos factores: 1) la disminución de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (Tablas 19 y 20); de acuerdo a Mc Clements, (1999), las gotas de menor tamaño tienen menos tendencia a coalescer debido a una disminución en la eficiencia de colisión en condiciones de agitación. 2) la formación de multicapas debido el incremento de Γ_{ap} no correspondido por π_i^e (Figura 38b). Como se mencionó previamente, el alto valor de H_o para ASD (Tabla 12) sugiere que las interacciones de carácter hidrofóbico entre las moléculas de proteínas adsorbidas y las no adsorbidas en la fase acuosa favorecerían la formación de multicapas. Sin embargo, aunque en las micrografías no se observa deformación de gotas (Figura 42), aún en estas condiciones el film no sería suficientemente rígido para impedir la coalescencia bajo condiciones de agitación. Por el contrario, para el ASN y teniendo en cuenta la baja tensioactividad, H_o y el alto grado de estructuración (Figuras 12 y 14, Tabla 12) no hay tanta tendencia a formar multicapas (Figura 38b) resultando ser el comportamiento reológico del film monocapa el factor fundamental por el cual estas emulsiones son estables en todo el rango de concentración estudiado. A concentraciones elevadas de ASN, se observó una disminución de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, acorde al aumento observado en la AIE (Tablas 19 y 20, Figura 36) Aunque la formación de multicapas se da en menor extensión que en ASD (Figura 38) el alto grado de estructuración del film interfacial y el menor tamaño

de gota respecto a las emulsiones preparadas con dispersiones más diluidas, contribuye aún en mayor medida a la estabilidad de las emulsiones ASN cuando se incrementa la concentración de muestra.

3.3.2.2 Efecto de la adición de NaCl sobre la estabilidad de las emulsiones

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica, se optó por agregar NaCl a las emulsiones después del proceso de homogeneización para dar una concentración de 150 mM en la fase acuosa. El hecho de que este agregado se haga después y no antes de la homogeneización es indiferente ya que no modifica significativamente el grado de coalescencia alcanzado, indicando que la tendencia de las mismas a desestabilizarse o no por este mecanismo está determinada por la naturaleza del film y el medio que rodea a las gotas, no así a su dificultad de formarse (Mitidieri y Wagner, 2002). La presencia de electrolitos puede tener una profunda influencia sobre la magnitud y rango de las interacciones coloidales, lo cual afecta a estabilidad de las emulsiones (Mc Clements, 1999). La Figura 44 b muestra el efecto del agregado de NaCl para las tres emulsiones estudiadas. A concentraciones bajas de muestra (1 mg/ml) se observó una marcada desestabilización de las emulsiones ASN, lo cual se refleja en un valor %C=80 en comparación con el 18% alcanzado sin sal (Figura 44 b). El NaCl puede desestabilizar las emulsiones por dos mecanismos: 1) la sal reduce la magnitud de las interacciones electrostáticas repulsivas (fenómeno de “screening” o apantallamiento de cargas), hecho que favorece el contacto entre gotas; 2) las concentraciones elevadas de electrolitos alteran la organización estructural de las moléculas de agua, alterándose a su vez la magnitud de las interacciones hidrofóbicas entre restos aminoácidos no polares (McClements, 1999). En este caso, la presencia de iones Na^+ y Cl^- , aumenta notablemente la magnitud de las interacciones hidrofóbicas, lo cual se evidenció por un aumento en H_o (casi dos veces mayor que en ausencia de NaCl), y en π_s^e y π_l^e (Figuras 13 y 14). En este contexto, en presencia de sal hay una marcada tendencia a la floculación (Figura 41c), favorecida a su vez por un aumento en la eficiencia de colisión entre gotas, como fue descrito previamente (Mitidieri y Wagner, 2002). Además, el hecho de que el valor Γ_{ap} sea bajo, sugiere que los flóculos, una vez formados, tienen una alta tendencia a coalescer bajo condiciones de trabajo mecánico. Con el incremento de la concentración proteica, (> 3 mg/ml) se observó una estabilización de las emulsiones (descenso de %C), aún cuando la tendencia a flocular es elevada (Figura 41d). Esto implicaría que el efecto desestabilizador salino, sería contrarrestado por el efecto de la concentración proteica

que le otorga resistencia al film y a los flóculos formados, debido principalmente a un aumento de Γ_{ap} .

Para CS, igual que para ASN, cuando la concentración de proteína es baja (1 mg/ml), las emulsiones se desestabilizaron marcadamente (Figura 43 b). La presencia de Ca^{2+} y de otros iones bivalentes como el Mg^{2+} , aún a bajas concentraciones, tiene una influencia significativa sobre el grado de floculación en esta muestra debido a la formación de puentes que mantienen unidas las gotas por interacciones de tipo electrostático (Ye y Singh, 2002). En presencia de NaCl, en cambio, las mismas se ven reducidas (Ye y Singh, 2002), generando la disociación submicelar. Estos factores contribuirían al debilitamiento de la multicapa. En base a esto, es probable que bajo la acción de la agitación, las emulsiones con bajas concentraciones de CS y en presencia de NaCl, los flóculos formados no posean una estructura suficientemente rígida para impedir la coalescencia. Sin embargo, cuando la concentración proteica se eleva, las emulsiones CS se estabilizan y a concentraciones mayores a 5 mg/ml no hay diferencias significativas entre el porcentaje de coalescencia en ausencia y en presencia de NaCl. Este resultado sugiere que el aumento de la relación CS/NaCl (y por ende un aumento de la relación $Ca^{2+}\text{-}Mg^{2+}/Na^+$) en la fase acuosa, contrarresta el efecto salino permitiendo la formación de multicapas integradas por submicelas, lo que aumentaría la rigidez del film.

En el caso particular de ASD, a una concentración proteica de 1 mg/ml no hubo diferencias significativas entre C % en presencia y en ausencia de sal (Figuras 42 a y b). Sin embargo, cuando la concentración alcanzó los 3 mg/ml se evidenció una marcada estabilización de las emulsiones ASD en presencia de NaCl, llegando a 10 mg/ml a un C% < 10. En la misma concentración las emulsiones ASD sin sal dieron un C% > 35. Este comportamiento fue muy diferente al que exhiben las emulsiones ASN y CS, las cuales tienen mayor tendencia a coalescer con el agregado de NaCl. Un resultado que podría explicar el comportamiento observado de las emulsiones ASD es la alta tendencia a flocular en presencia de NaCl (Figura 42d) probablemente inducida por la alta hidrofobicidad superficial en estas condiciones (Tabla 12).

Con el objeto de estudiar en forma cuantitativa si la formación y estructura de los flóculos tiene incidencia sobre la coalescencia de estas emulsiones sometidas a esfuerzo tangencial, se analizó el porcentaje de floculación (F %) a diferentes tiempos de agitación. En la Figura 45, la disminución de la absorbancia a medida que aumenta el tiempo de agitación fue indicativo del grado de coalescencia de la

emulsión; en cambio la disminución de este parámetro en ausencia de SDS indicó su tendencia a flocular, evidenciando que la formación de flóculos estables se favorece con el agregado de NaCl y el aumento la concentración de muestra, conjuntamente con una mayor estabilidad frente a la coalescencia.

En este contexto, todas las emulsiones ASD estudiadas mostraron valores de F % variando del 25 al 40 % (Figura 46). Sin embargo, la emulsión ASD (5 mg/ml) sin sal, mostró el menor F % inicial ($t = 0$ min., 26 %), que fue aumentando con el tiempo de agitación ($t = 60$ min., 38%). En presencia de NaCl y al aumentar la concentración proteica (10 mg/ml) el porcentaje de agregados inicial ($t = 0$) fue siempre mayor al 30 %, con una tendencia a ser independiente del tiempo de agitación. Este resultado sugeriría la existencia de flóculos muy estables e implicaría que la estructura de los flóculos (y no sólo su formación) tiene incidencia en el porcentaje de coalescencia. Según McClements (1999), cuando las interacciones coloidales entre las gotas se incrementan, la probabilidad de que las gotas se unan fuertemente en el primer evento de choque es mayor, y también es menor la posibilidad de que haya un reordenamiento posterior. Por lo tanto se forman flóculos de estructura más rígida, en donde las gotas se encuentran unidas en uno o pocos puntos y atrapan un volumen elevado de fase continua. Esta estructura resultaría ser muy resistente al esfuerzo tangencial. En ausencia de sal, las interacciones coloidales atractivas comienzan a ser suficientemente importantes sólo a concentraciones muy elevadas de ASD como para producir flóculos resistentes y estables frente a la coalescencia. En cambio, en presencia de NaCl se produce un incremento de las interacciones hidrofóbicas y la formación de flóculos resistentes al esfuerzo tangencial requeriría concentraciones más bajas de muestra.

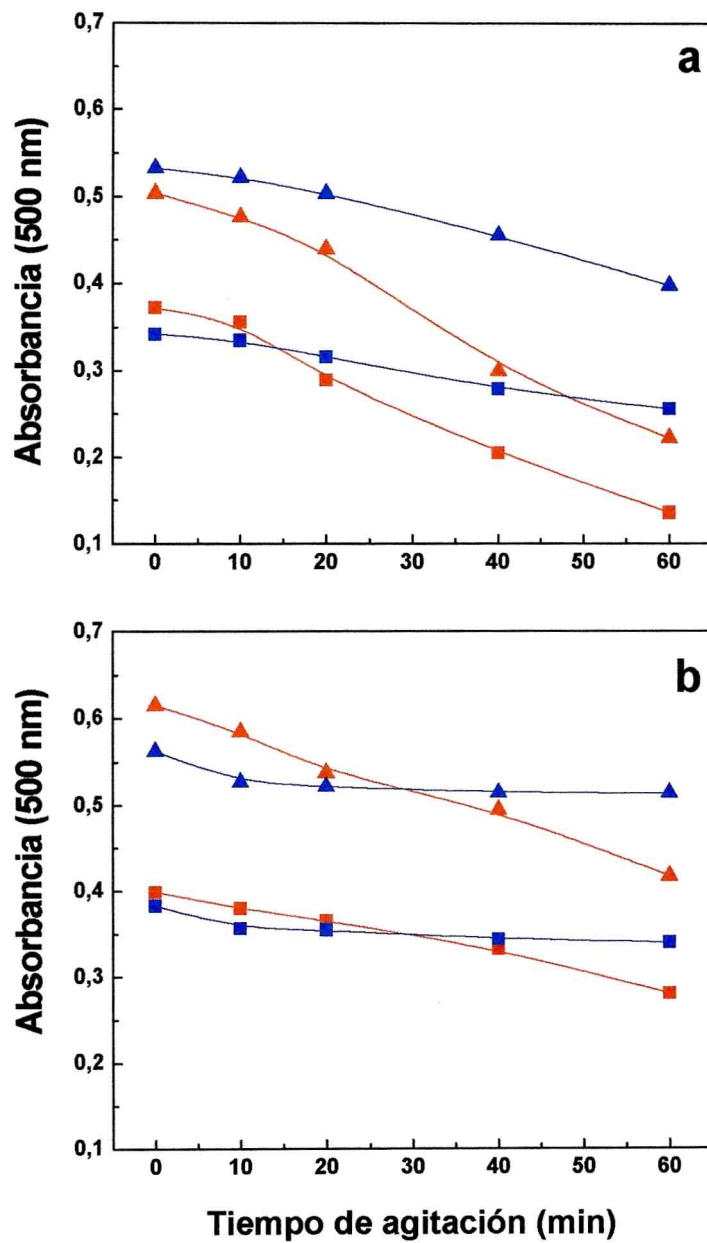


Figura 45: Efecto de la agitación orbital (150 r.p.m., 30° C) y la concentración de proteína en dispersión sobre la absorbancia de las emulsiones ASD diluidas (1:200). a) 5 mg/ml b) 10 mg/ml. En ausencia de sal: (■) sin SDS, (▲) con SDS 0,1 %. En presencia de 150 mM NaCl: (■) sin SDS, (▲) con SDS 0,1 %. Desviación estándar máxima: 5%

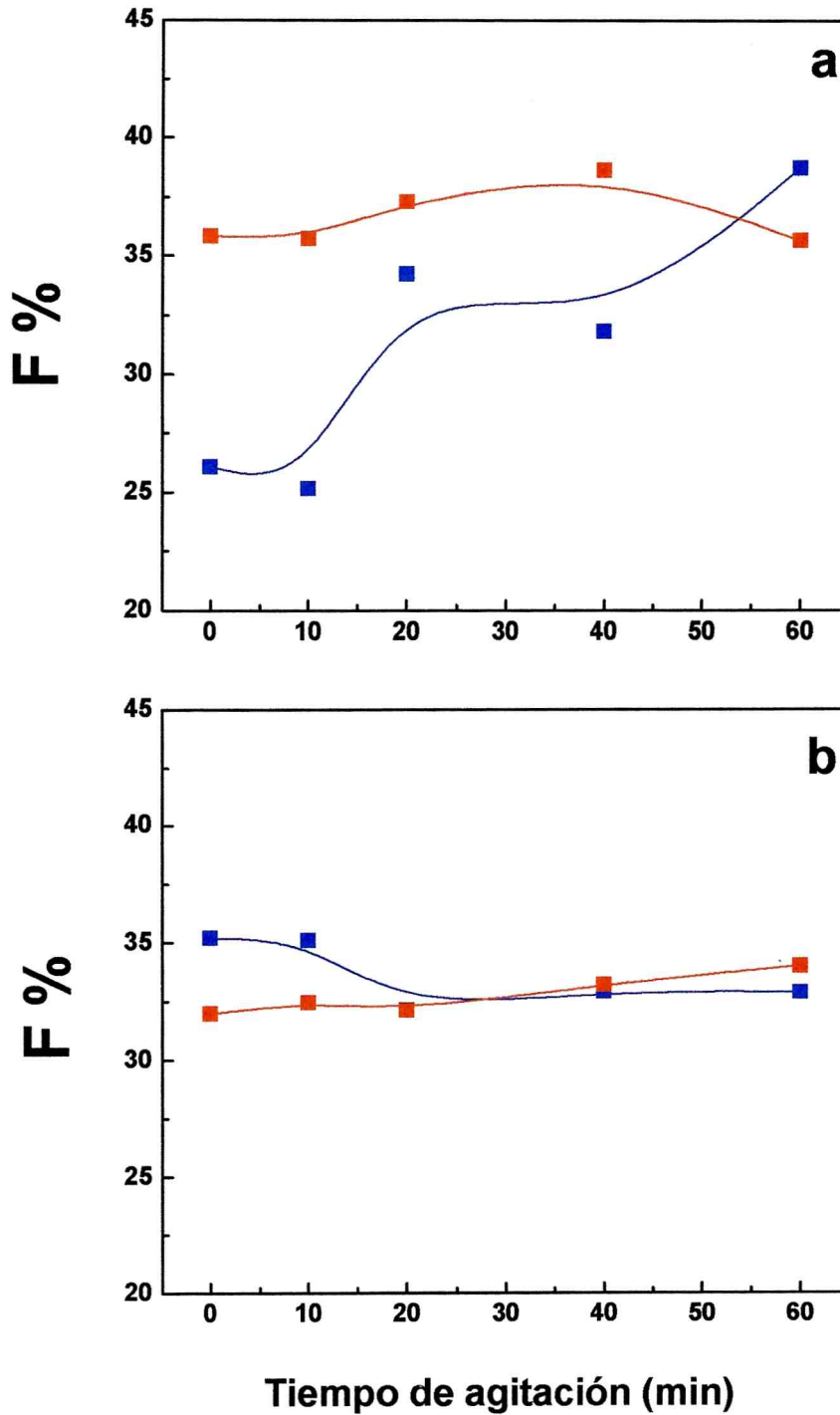


Figura 46: Efecto del tiempo de agitación orbital (150 r.p.m, 30° C) y la concentración proteica en dispersión sobre el porcentaje de floculación (F %) de emulsiones o/w preparadas con dispersiones ASD. a) 5 mg/ml b) 10 mg/ml. (■) sin NaCl, (■) con 150 mM NaCl agregados en la fase acuosa después de la emulsificación. Máxima desviación estándar: 5 %

Conclusiones parciales

- ✓ Las emulsiones o/w preparadas con aislado nativo de soja y caseinato de sodio en ausencia de sal, al ser sometidas a una agitación controlada, resultaron estables frente al fenómeno de coalescencia en todo el rango de concentración proteica estudiado. Este comportamiento difiere del observado en las emulsiones de aislados desnaturalizados de soja-
- ✓ El mecanismo de estabilización para las emulsiones de aislado nativo de soja y caseinato de sodio está relacionado con la reología del film a pesar del diferente comportamiento interfacial de ambas muestras.
- ✓ En general, la adición de NaCl tiene un efecto negativo sobre la estabilidad de estas emulsiones, aún cuando la sal es adicionada después de preparar la emulsión.
- ✓ La concentración de proteína tiene un efecto estabilizante en las emulsiones frente a la coalescencia bajo condiciones de esfuerzo de corte, debido probablemente a la formación de un film resistente y viscoelástico como consecuencia de la existencia de multicapas, contrarrestando el efecto salino sólo en condiciones de concentración proteica elevada.
- ✓ Para la emulsión preparada con aislado desnaturalizado de soja, en ausencia de NaCl y a concentración proteica elevada, el efecto estabilizante no es completo pero puede lograrse con el aumento de la fuerza iónica.
- ✓ La formación de flóculos resistentes a la agitación puede explicar la estabilidad de las emulsiones de aislados desnaturalizados de soja en estas condiciones. Estos resultados indican que el estado de desnaturalización proteica y la concentración salina afectan la estabilidad frente a la coalescencia.
- ✓ En este trabajo, los ensayos acelerados se llevaron a cabo en función de tiempo, manteniendo constante el esfuerzo de corte.
- ✓ Los ensayos acelerados para la medición de la coalescencia no siempre dan una buena indicación de la estabilidad “a largo término” de la emulsión. En muchos casos las emulsiones que son almacenadas durante largo tiempo pueden sufrir cambios químicos o bioquímicos, que eventualmente pueden producir la desestabilización de las emulsiones por mecanismos físicos. Estos cambios no son detectados en los tests acelerados para determinar estabilidad frente a la coalescencia.

3.4. ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES O/W FRENTE A LA CONGELACIÓN

El almacenamiento congelado es uno de los más importantes métodos de preservación para mantener la estabilidad microbiológica, química y aumentar la vida útil de los productos alimenticios (Xiong, 1997). Sin embargo, este método de preservación no es aplicable a la mayoría de las emulsiones debido a la baja estabilidad que presentan (Berger, 1997). La estabilidad fisicoquímica de una emulsión o/w frente al almacenamiento congelado está gobernada principalmente por el grado de cristalinidad de la fase dispersa y el comportamiento de la fase acuosa (Hartel, 2001; Cramp y col., 2004; Thanasukarn y col., 2004). Los antecedentes más importantes sobre la congelación de emulsiones se refieren a la estabilidad de las cremas heladas, las cuales constituyen sistemas muy complejos debido no sólo a su composición sino también a la inclusión de aire en el seno de la emulsión, transformándola en una emulsión aireada o espumada (Berger, 1997). Sin embargo, como se mencionó en la sección 1.11 existen muy pocos estudios sistemáticos sobre el efecto de la congelación y los factores que determinan la desestabilización de emulsiones de composición más simple y formuladas con proteínas de soja como únicos agentes emulsificantes.

En este trabajo se estudiará el efecto de la congelación sobre la estabilidad de las emulsiones preparadas con aislado de soja nativo (ASN) y desnaturalizado (ASD) y caseinato de sodio (CS), evaluándose el efecto de la concentración de muestra en las dispersiones y la adición de crioprotectores.

3.4.1.- Características de las emulsiones iniciales

La caracterización de las emulsiones iniciales es sumamente importante porque permite establecer una correspondencia con la estabilidad de las mismas frente a la congelación y el almacenamiento congelado. Por consiguiente, en primer lugar se llevará a cabo un análisis general de las emulsiones de partida correspondientes a las distintas muestras proteicas, las cuales fueron preparadas por medio de un homogeneizador a válvula de alta presión (Sección 2.4.3)

Las Figuras 47 y 48 muestran las distribuciones de tamaño de gota en volumen y en superficie, en ausencia y presencia de 1 % de SDS, de las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de ASN, ASD y CS.

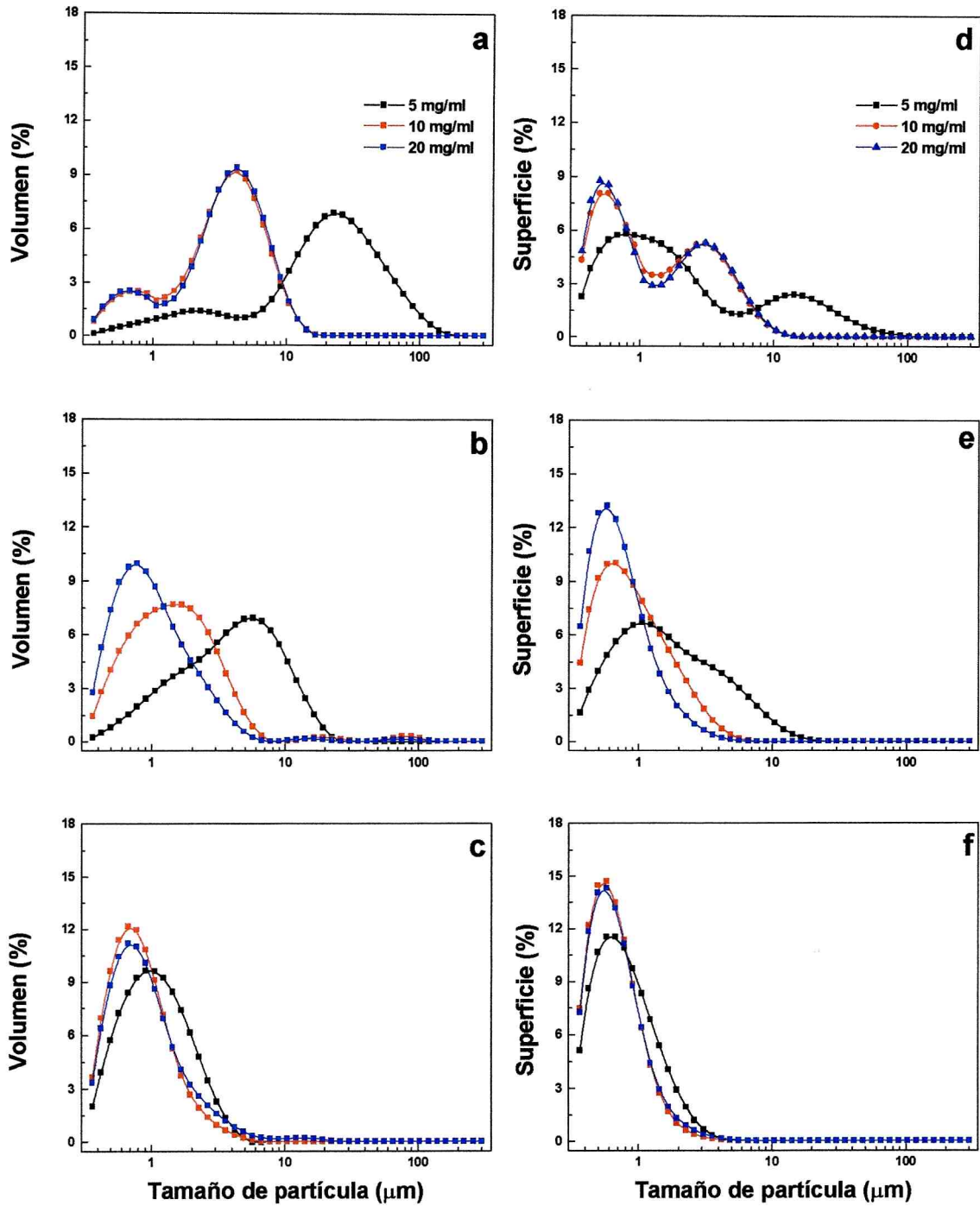


Figura 47: Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de ASN, ASD y CS, a 5, 10 y 20 mg/ml. Distribuciones en volumen: a) ASN; b) ASD; c) CS. Distribuciones en superficie: d) ASN; e) ASD; f) CS.

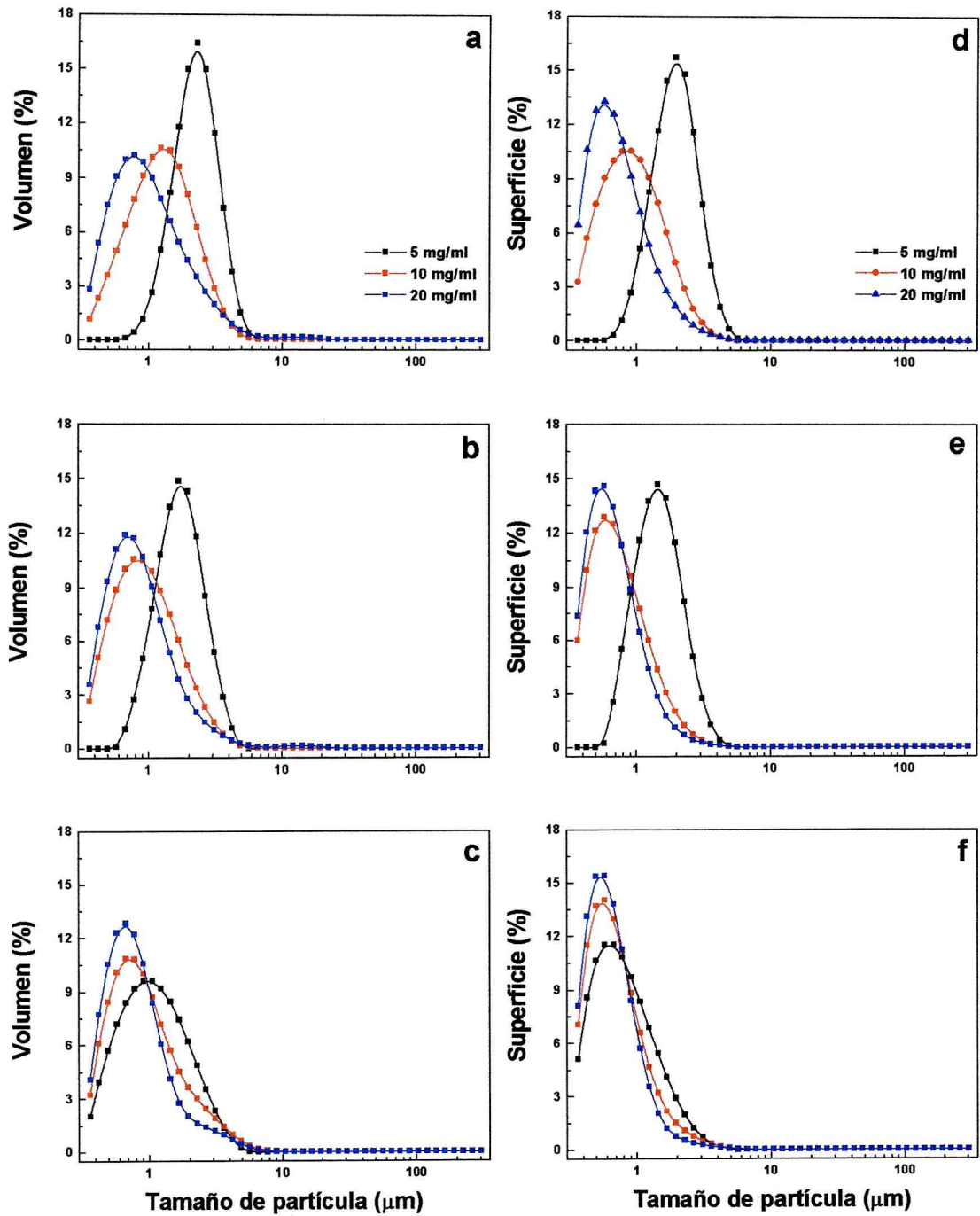


Figura 48: Distribuciones de tamaño de partícula en presencia de 1% SDS para emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de ASN, ASD y CS, a 5, 10 y 20 mg/ml. Distribuciones en volumen: a) ASN; b) ASD; c) CS. Distribuciones en superficie: d) ASN; e) ASD; f) CS.

Tanto las distribuciones en volumen como en superficie, cuando fueron realizadas sin SDS, exhibieron un carácter bimodal para las emulsiones ASN. Para las preparadas con las dispersiones más diluidas (5 mg/ml), se observó que las dos poblaciones de partículas tienen tamaños bien diferenciados: la primera constituida por partículas con diámetro $<$ a 5 μm , la cual contribuye mayoritariamente al área interfacial total (pico mayoritario en la distribución en superficie) y una segunda población a 5-110 μm , la cual contiene la mayor parte del volumen de fase dispersa (pico mayoritario en la distribución en volumen). Con el aumento de concentración de muestra (10 y 20 mg/ml), los picos de las distribuciones en volumen y en superficie se desplazaron hacia menores tamaños de partícula (Figura 47). Cuando las distribuciones en volumen y en superficie se determinaron en presencia de detergente exhibieron un único pico, independientemente de la concentración de muestra. Al igual que en las emulsiones preparadas en ausencia de SDS, estos picos se desplazaron hacia menores tamaños de partícula, a medida que aumenta la concentración de muestra con la que se prepara la emulsión.

En las emulsiones ASD preparadas con las dispersiones acuosas más diluidas (5 mg/ml), las distribuciones en volumen y en superficie en ausencia de SDS fueron también bimodales, pero a diferencia de las preparadas con ASN, los picos aparecieron parcialmente superpuestos. El aumento de la concentración de muestra produjo no sólo un corrimiento de los picos hacia menores tamaños de partícula sino además una superposición de los mismos casi total. Las distribuciones de tamaño de partícula en presencia de SDS de las emulsiones ASD, a cualquiera de las concentraciones ensayadas, mostraron la presencia de un único pico, con un tamaño de partículas menor que los obtenidos sin SDS.

Por otra parte, las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones CS fueron monomodales, independientemente de la concentración de muestra y de la presencia o ausencia de SDS durante la medición (Figuras 47 y 48, c y f). En este caso, a diferencia de las emulsiones preparadas con aislados de soja, las distribuciones en volumen y en superficie de las emulsiones CS preparadas con las dispersiones acuosas de 10 y 20 mg/ml de CS fueron similares, mientras que sólo los picos correspondientes a las emulsiones CS (5 mg/ml) evidenciaron un desplazamiento hacia mayores tamaños de partícula.

A partir de las distribuciones en volumen y superficie se obtuvieron los correspondientes diámetros promedio, ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) y el área interfacial específica (AIE) (Tabla 21).

Tabla 21: Diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$), de De Brouker ($D_{4,3}$) y área superficial específica (AIE) de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de ASN, ASD y CS. ^(a) SDS: 1 % en buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0. ^(b) El AIE, expresada en m²/ml emulsión se calculó a partir de $D_{3,2}$ en presencia de SDS.

Emulsión	Concentración (mg muestra/ ml)	$D_{3,2}$		$D_{4,3}$		AIE ^(b) (m ² /ml)
		-SDS (μm)	+SDS (μm) ^(a)	-SDS (μm)	+SDS (μm) ^(a)	
ASN	5,0	4,8 ± 0,4	1,9 ± 0,1	17,1 ± 1,0	2,2 ± 0,2	0,78 ± 0,02
	10,0	1,9 ± 0,1	1,0 ± 0,0	3,8 ± 0,3	1,3 ± 0,0	1,51 ± 0,01
	20,0	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0	2,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,96 ± 0,09
ASD	5,0	2,7 ± 0,5	1,4 ± 0,0	5,4 ± 1,0	1,7 ± 0,1	1,02 ± 0,01
	10,0	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,92 ± 0,01
	20,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,11 ± 0,00
CS	5,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,5	1,3 ± 0,1	1,64 ± 0,09
	10,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,11 ± 0,09
	20,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,15 ± 0,08

En las emulsiones preparadas con ASN y ASD, tanto en ausencia como en presencia de SDS, los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ disminuyeron significativamente con el aumento de la concentración de muestra, acorde al desplazamiento de los picos hacia menores tamaños de partícula en las distribuciones correspondientes (Figuras 47 y 48). Para las emulsiones CS, $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ exhibieron una disminución cuando la concentración de muestra en las dispersiones acuosas se elevó de 5 a 10

mg/ml, en tanto que estos parámetros no mostraron una variación significativa con el incremento de concentración de muestra de 10 a 20 mg/ml.

El área superficial específica (AIE), la cual refleja el área total creada durante el proceso de homogeneización (Walstra, 1983) se obtuvo a partir del diámetro promedio $D_{3,2}$ en presencia de SDS (ecuación 28), exhibiendo el orden $CS > ASD > ASN$. Si se analizan comparativamente estos resultados con los obtenidos para las emulsiones preparadas con el homogeneizador de alta velocidad (Ultraturrax T-25), a igual ϕ y concentración de muestra (5 mg/ml) (sección 3.3.1), se observó que en este caso el AIE fue aproximadamente de 1 orden de magnitud superior. Esta diferencia se atribuyó, como era de esperar, a la utilización de un dispositivo de homogeneización de alta densidad de energía. A concentraciones mayores de muestra (10 y 20 mg/ml) se observó un aumento del AIE, independientemente de la muestra utilizada. Sin embargo, en las emulsiones preparadas con las dispersiones más concentradas (20 mg/ml), la diferencia en la AIE entre las tres emulsiones fue menos evidente (Tabla 21). A pesar de las diferencias observadas en los diámetros promedio el porcentaje de proteína adsorbida (P_A %) fue similar a igual concentración de muestra (ASN, ASD, CS) en la fase acuosa: P_A % \approx 90, 80 y 70 a 5, 10 y 20 mg muestra/ml, respectivamente.

La diferencia entre los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ obtenidos a partir de las distribuciones de tamaño de partícula sin y con SDS, las cuales fueron más evidentes en las emulsiones ASN y ASD preparadas con las dispersiones acuosas más diluidas (5 mg/ml) es una medida de la formación de flóculos estables en las condiciones de medición del analizador de tamaño de partícula.

Como se mencionó con anterioridad (sección 3.2, ecuación 53), a partir de los diámetros promedio $D_{4,3}$ sin y con SDS puede determinarse el grado de floculación (GF %). En este contexto, cabe señalar que la presencia de flóculos no está necesariamente relacionada con el carácter bimodal de una distribución. Por ejemplo, si una distribución de tamaño de partícula en ausencia de SDS es monomodal no significa la ausencia de flóculos. De la misma manera, una distribución bimodal o multimodal no siempre indica que en la emulsión haya flóculos; los picos pueden corresponder a distintas poblaciones de gotas individuales, las cuales se logran generalmente con dispositivos de homogeneización de baja energía. Sólo a partir de la comparación entre las distribuciones determinadas en ausencia y presencia de SDS es posible evaluar la existencia de flóculos. En este caso, nuevamente hay que destacar que los flóculos detectados son estables en las condiciones de medición (dilución y agitación) del analizador de tamaño de partícula, en donde el potencial

intergotas (W (h)) cae en un mínimo primario de energía o están formados por un mecanismo de puenteo.

Con el objeto de visualizar más claramente la presencia de flóculos en las distintas emulsiones, en la Figura 49 se observa simultáneamente las distribuciones en volumen de tamaño de partícula en ausencia y presencia de SDS.

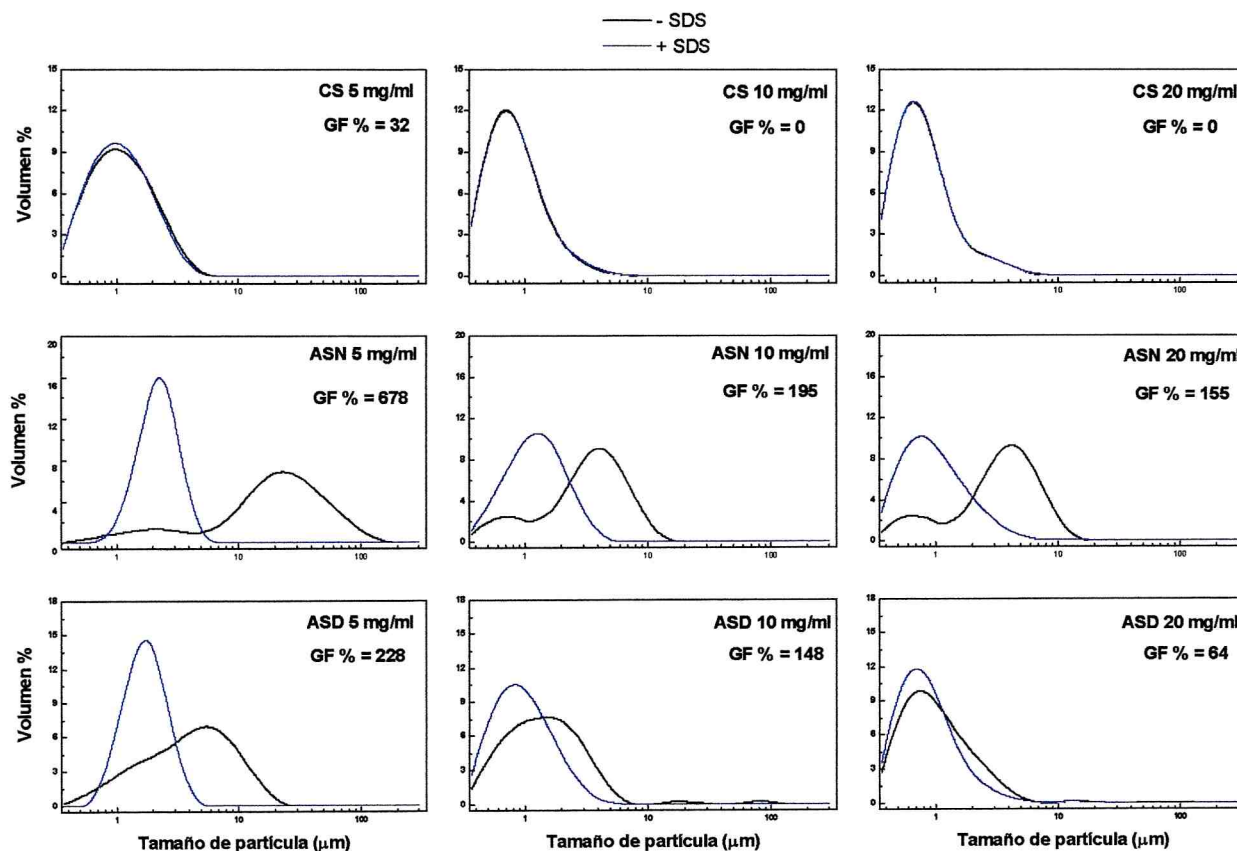


Figura 49: Distribuciones en volumen de tamaño de partícula, en ausencia y presencia de 1 % SDS, de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de ASN, ASD y CS. La concentración de muestra en las dispersiones acuosas fue de 5, 10 y 20 mg/ml.

En las emulsiones preparadas con ASN (5 mg muestra/ml), el pico correspondiente a la población de gotas $> 5 \mu\text{m}$ no se observó cuando la distribución se determinó en presencia de SDS; por ende, el pico mencionado se atribuye a la presencia de flóculos. La diferencia en la forma de las distribuciones medidas con y sin el detergente fue muy evidente, lo cual se tradujo en un GF % > 650 (Figura 50). El aumento de la concentración de muestra en la dispersión acuosa (10 y 20 mg/ml) provocó una disminución del GF % de las emulsiones resultantes (Figura 50).

Las emulsiones ASD mostraron un GF %, que al igual que las preparadas con ASN, disminuyó cuando la concentración de muestra en las dispersiones acuosas se elevó desde 5 a 20 mg/ml (Figura 50). La distribución de tamaño de partícula de la emulsión en ausencia de SDS fue monomodal, pero aún así el desplazamiento de este pico hacia menores tamaños de partícula en presencia de SDS indica la presencia de flóculos. El GF % en este caso fue el más bajo de todas las emulsiones preparadas con aislados de soja (≈ 64) (Figuras 49 y 50).

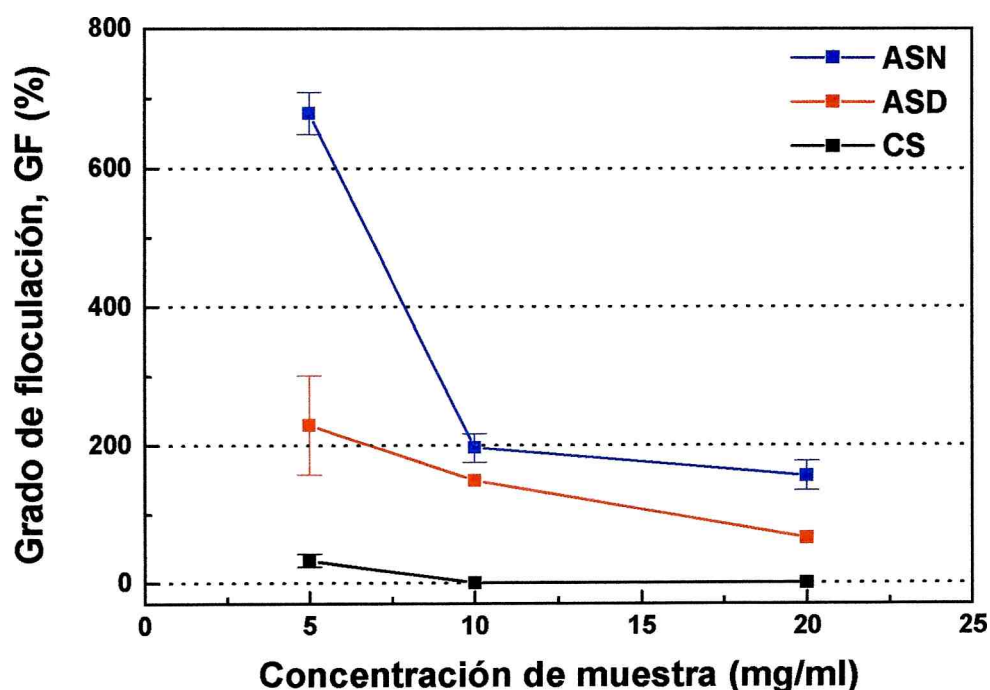


Figura 50: Grado de floculación de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de ASN, ASD y CS. El grado de floculación se calculó a partir de los diámetros promedio $D_{4,3}$ en ausencia y presencia de SDS (ecuación 50).

Analizando comparativamente los GF % entre las emulsiones preparadas con aislados de soja, se observa que independientemente de la concentración de muestra en las dispersiones, el GF % fue siempre menor en las emulsiones preparadas con ASD (Figura 50)

Por otra parte, las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones CS fueron monomodales, independientemente de la concentración de muestra y de la

presencia o ausencia de SDS durante la medición. Para las emulsiones con las dispersiones acuosas más diluidas (5 mg/ml) las distribuciones sin y con SDS fueron prácticamente similares, lo que se ve reflejado en el valor muy bajo de GF %. (≈ 32). A mayores concentraciones de muestra las distribuciones mostraron superposición total. Por lo tanto, en estas emulsiones no se formaron flóculos estables en las condiciones de medición del analizador de tamaño de partícula (GF % = 0).

Los flóculos que son estables en las condiciones de medición del analizador de tamaño de partículas se forman por un mecanismo de puenteo. Este mecanismo de floculación puede tener lugar por la ocurrencia de distintos factores de manera separada o conjunta: i) El potencial entre gotas, consecuencia del balance entre las interacciones coloidales entre las mismas, cae en un mínimo primario de energía por adición de electrolitos o polisacáridos que interaccionan fuertemente con las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase; ii) la cantidad de agente emulsificante en la fase acuosa no es suficiente para cubrir el área creada durante el proceso de homogeneización; iii) el anclaje y reordenamiento de la molécula de proteína en la interfase no es lo suficientemente rápido en comparación a la velocidad de creación de área por parte del homogeneizador (Tornberg y Ediriweera, 1988; Tornberg y col., 1997; McClements, 1999; Anton, 2002; Damodaran, 2005).

En este contexto, Tornberg y Ediriweera (1988) estudiaron el grado de floculación de emulsiones preparadas con distintas muestras proteicas (caseinato de sodio, concentrado proteico de lactosuero, proteínas cárnicas y aislados de soja), estableciendo la gran influencia de la estructura de las proteínas constituyentes de las muestras en el grado de floculación. El ASN, formado por proteínas de estructura globular y oligomérica, de peso molecular elevado (Figura 12), favoreció la formación de emulsiones floculadas. Esto se atribuyó directamente a la estructura de las globulinas 7S y 11S, cuyo anclaje y reordenamiento en la interfase es más lento o está en la misma escala de tiempo que la velocidad de creación de área interfacial por parte del dispositivo de homogeneización, acorde a lo informado previamente por Tornberg y Ediriweera (1988).

Cuando los aislados de soja se desnaturalizan térmicamente a concentraciones relativamente bajas, las globulinas 7S y 11S se disocian, se forman agregados solubles y las subunidades constituyentes adoptan una estructura más laxa y desplegada (Yamauchi y col., 1991). La presencia de especies de menor peso molecular y de mayor hidrofobicidad superficial, más allá de la formación de agregados solubles (Figura 12) favorecería el anclaje y reordenamiento más rápido de las moléculas desnaturalizadas de proteína en la interfase durante el proceso de

homogeneización, lo cual explica la obtención de emulsiones de menor GF % respecto al de las emulsiones preparadas con ASN (Figuras 49 y 50).

Aunque el caseinato de sodio está formado por partículas submicelares de peso molecular elevado, la alta capacidad de adsorción interfacial de las proteínas constituyentes de esta muestra, aún a concentraciones de muestra de 5 mg/ml, inhibió casi por completo la floculación por puenteo, en concordancia con el valor muy bajo de GF observado (Figuras 49 y 50). Este resultado fue similar al obtenido por Carrera Sánchez y Rodríguez Patino (2005) trabajando con emulsiones CS de fracción volumétrica (ϕ) y condiciones de homogeneización similares.

Dado que la floculación por puenteo acelera el proceso de separación gravitacional de las emulsiones, se analizó comparativamente la estabilidad frente al cremado-floculación en condiciones de almacenamiento estacionario durante 1 semana. Las emulsiones se sometieron al proceso de congelación y almacenamiento congelado, inmediatamente después de preparadas. Por lo tanto, en este caso el estudio de la separación gravitacional a un tiempo más prolongado se llevó a cabo sólo para establecer una correspondencia con el GF % observado en las emulsiones. De la misma manera que en la sección 3.2, la cinética de cremado-floculación se evaluó utilizando el analizador óptico vertical (Quick Scan).

La Figura 51 muestra la variación del porcentaje de desestabilización (D_{inf} %) en función del tiempo. A bajas concentraciones de muestra en las dispersiones acuosas (5 mg/ml), la emulsión ASN exhibió el mayor grado de desestabilización, con los valores de D_{inf} % más altos entre todas emulsiones, en los primeros cuatro días de almacenamiento. Esto se atribuye al elevado GF % inicial (> 650). Después de 24 horas (≈ 1500 minutos), el D_{inf} % fue superior a 20, en comparación con los valores casi nulos de este parámetro en las demás emulsiones (ASD y CS). Se debe tener en cuenta que estas emulsiones serán sometidas a congelación y es deseable que en ese proceso no se produzca separación gravitacional. Como se verá en la próxima sección (Figura 52, sección 3.4.2) las emulsiones congeladas a -20° C tardan cerca de 180 minutos para alcanzar esta temperatura. Aun en el caso más desfavorable, o sea la emulsión ASN 5 mg/ml, alcanzaría a 180 minutos una desestabilización muy incipiente (D_{inf} % < 8), pero teniendo en cuenta que a temperatura bajas el cremado se reduce por la baja movilidad de las gotas y aumento de la viscosidad, el grado de separación gravitacional puede considerarse despreciable. De este modo, se puede decir que no se incluye, como otro factor que pueda influir en los resultados, un cambio de ϕ en alguna zona de la emulsión por formación de fase crema

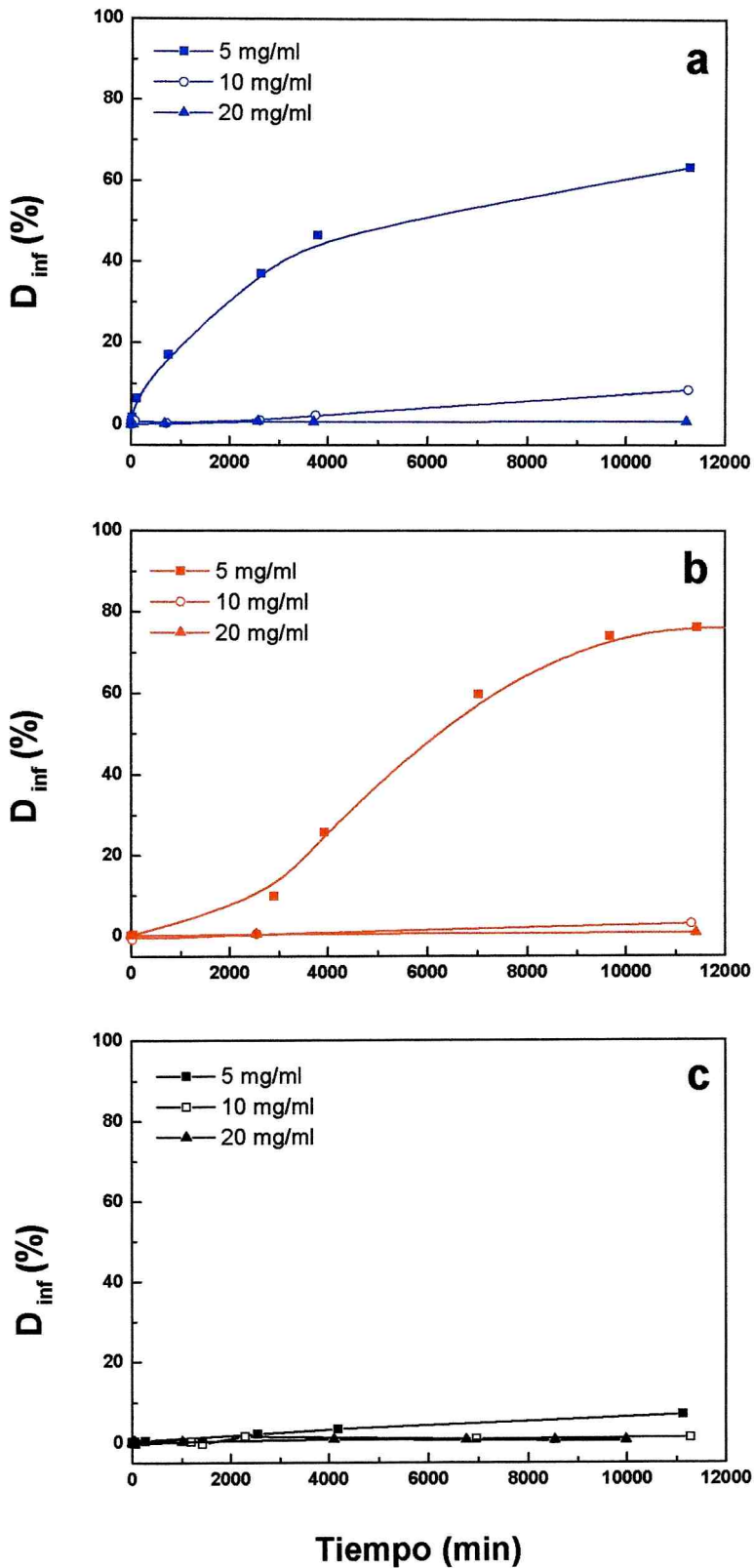


Figura 51: Cinética de cremado-floculación de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de: a) ASN; b) ASD; c) CS, evaluada a través de la variación de D_{inf} % en función del tiempo. Tiempo de almacenamiento: 7 días. Temperatura: $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. Zona elegida del tubo de medida: 10-20 mm.

Continuando con el análisis del cremado de las demás emulsiones, se vio que la emulsión ASD exhibió inicialmente una baja velocidad de separación gravitacional, que se incrementó a partir del tercer día. Este comportamiento sigmoidal de $D_{inf} \%$ con el tiempo, con un evidente período de inducción, parecería responder a un proceso lento de floculación en el cual los se forman nuevos flóculos o los formados inicialmente van sufriendo cambios en su microestructura (tamaño y grado de compactación) en el transcurso del almacenamiento. Generalmente, la adsorción de las proteínas en la interfase durante la homogeneización es un proceso muy rápido, de manera tal que después de la preparación hay un reordenamiento de las proteínas adsorbidas tratando de llegar a la conformación de menor energía libre. En este caso, es probable que la alta hidrofobicidad de ASD (Tabla 12) promueva la formación de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de proteínas adsorbidas. Además, los flóculos formados adquirirían características de alta compactación de gota ya que se a las 24 horas de almacenamiento estacionario se alcanzó $D_{inf} > 70$, incluso mayor que las emulsiones ASN, tan inestables inicialmente. En ambas emulsiones (ASN y ASD), después del tercer día de almacenamiento, la clarificación en la parte inferior del tubo de medida (zona 10-20 mm) fue suficiente importante como para ser detectada visualmente.

Por otro lado, la emulsión CS exhibió el menor grado de desestabilización: al cabo de una semana de almacenamiento el $D_{inf} \% < 5$. Este resultado está acorde no sólo al muy bajo GF % sino también a los menores valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de estas emulsiones CS en relación a las preparadas con aislados de soja (ASN y ASD).

A mayores concentraciones de muestra (10 y 20 mg muestra/ml), las emulsiones ASN y ASD exhibieron un grado de desestabilización mucho menor que las preparadas con dispersiones más diluidas (5 mg muestra/ml), acorde no sólo al menor tamaño de las gotas individuales sino también a la disminución del GF %. Los porcentajes de desestabilización ($D_{inf} \%$) de las emulsiones ASN y ASD, preparadas con la dispersión acuosa más concentrada (20 mg/ml) después de 1 semana de almacenamiento estacionario fueron sólo de 0,75 y 0,55, respectivamente.

Las emulsiones CS (10 y 20 mg/ml) fueron estables frente al cremado-floculación durante todo el lapso de tiempo estudiado. Para estas emulsiones, no se observó una disminución de $BS_{prom} \%$ en la parte inferior del tubo de medida ($D_{inf} \% = 0$) después de 1 semana de almacenamiento estacionario. Dickinson y col., (1997), utilizando el método ultrasónico de baja intensidad, estudiaron la cinética de cremado-floculación de las emulsiones CS en un amplio rango de concentraciones de muestra (5 – 60 mg/ml). Estos autores encontraron que la estabilidad, inicialmente

muy baja debido a la floculación por puenteo, aumenta notablemente hasta llegar a una concentración crítica a partir de la cual se produce una nueva disminución de la estabilidad, esta vez atribuible a la floculación por depleción o agotamiento. Este fenómeno, también observado por otros autores (Ye y Singh, 2001; Dickinson y Golding, 1997) se debe a la presencia de partículas coloidales no adsorbidas de CS. El hecho de que las emulsiones preparadas con la dispersión acuosa más concentrada (20 mg/ml) de CS hayan sido estables después de una semana de almacenamiento estacionario, indica que la concentración de muestra en la dispersión no fue suficiente para producir la floculación por agotamiento.

Por otra parte, todas las emulsiones estudiadas, independientemente del tipo y concentración de muestra en la dispersión acuosa fueron estables frente a la coalescencia y no evidenciaron aceite separado (AS % = 0) después del almacenamiento. Este resultado se atribuye a que, en condiciones estacionarias, la coalescencia es un mecanismo más lento que el cremado y la floculación y se favorece en emulsiones donde las gotas están en íntimo contacto durante períodos prolongados o expuestos a elevados esfuerzos de corte (Dickinson y Stainsby, 1988; Britten y Giroux, 1991; McClements, 1999; Mitidieri y Wagner, 2002). En las emulsiones analizadas anteriormente, sólo en algunas condiciones el GF % fue suficientemente importante para producir la separación gravitacional en las emulsiones. Dado que tanto la floculación como la coalescencia son mecanismos de agregación de gotas, sería probable que en un período más prolongado de almacenamiento, las emulsiones que mostraron mayor GF % también sean las más inestables frente a la coalescencia; pero sabemos ya que esto también depende de la estabilidad de esos flóculos y de la resistencia del film interfacial.

En conclusión, el aumento de la concentración de muestra en las dispersiones acuosas de aislados de soja permitió la preparación de emulsiones no sólo de menor tamaño de gota sino también con menor GF %. La desnaturalización térmica de las proteínas del aislado nativo de soja tuvo un efecto positivo sobre las características de las emulsiones resultantes, con menor floculación y tamaño de gota. Por otro lado, las emulsiones preparadas con caseinato de sodio fueron las que presentaron menores diámetros promedio, con grados de floculación nulos. Dado que las condiciones de homogeneización fueron similares para todas las emulsiones, las diferencias mencionadas se atribuyen a las diferencias estructurales y de tensioactividad de las muestras.

3.4.2. Efecto de la congelación sobre las emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de aislados de soja y caseinato de sodio

Las emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas de ASN, ASD y CS (5, 10 y 20 mg/ml) se sometieron a tratamientos de congelación a -20°C y -80°C , almacenamiento congelado durante 24 horas y descongelación a 20°C . Como ejemplo para visualizar las historias térmicas registradas durante estos procesos se muestra el caso de una emulsión preparada con dispersiones acuosas de CS (Figura 52); las demás emulsiones exhibieron gráficos similares. La congelación de las emulsiones a -80°C asegura una congelación más rápida (de 0°C a -10°C en 15 minutos, $\approx 0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en comparación con la congelación a -20°C , en la cual se tarda 10 veces más de tiempo para cubrir el mismo rango ($\approx 0,06^{\circ}\text{C}/\text{min}$). En la curva de enfriamiento en la congelación lenta se observa claramente un subenfriamiento después del cual se alcanza la temperatura de congelación de la fase acuosa de la emulsión, que resultó ser de $-0,84^{\circ}\text{C}$. A partir de este dato se estimó el porcentaje de agua congelada al alcanzar las temperaturas de -20°C y -80°C empleando la fórmula de cálculo general (Mascheroni y Calvelo, 1978). La fracción de agua congelada resultó ser de 0,96 y 0,99 para -20°C y -80°C respectivamente. Estos cálculos aunque aproximados nos permitirían presumir que si hay cambios entre las dos condiciones de congelación pueden tanto deberse a diferencias en la morfología y tamaño de los cristales de hielo (debido a la velocidad de congelación) como a la cantidad de hielo formado (atribuible a la temperatura subcero alcanzada).

La estabilidad de las emulsiones después de estos procesos de congelación y descongelación se analizó a través de los parámetros de desestabilización, calculados a partir de los diámetros promedio $D_{4,3}$ determinados en ausencia y presencia de SDS sobre las emulsiones antes y después de la congelación/descongelación

A fin de comprender fácilmente esta sección, se debe recordar el significado de los índices de desestabilización:

Los índices de coalescencia (IC %), de coalescencia/floculación (ICF %) y de floculación (IF %) representan la variación de $D_{4,3}$ respecto a la emulsión inicial por efecto de la coalescencia, de la coalescencia/floculación y de la floculación atribuible al tratamiento de congelación/descongelación. Estos parámetros toman como referencia el diámetro promedio de las gotas individuales ($D_{4,3}$ medido en presencia de 1 % de SDS) en las emulsiones iniciales (ecuaciones 49-51, sección 2.6.4).

En cambio, el GF % de una emulsión, representa la variación de $D_{4,3}$ dada por la ausencia o presencia de SDS en su determinación, y puede calcularse tanto en las

emulsiones iniciales (sección 3.3.1) como en las emulsiones sometidas a los tratamientos de congelación/descongelación, en estas últimas independientemente de cuales hayan sido los valores iniciales (ecuaciones 52 y 53, sección 2.6.4).

Para las emulsiones congeladas/descongeladas, si no hay coalescencia ($IC \% = 0$) y el índice de coalescencia y floculación es igual al de floculación ($ICF \% = IF \% > 0$), la desestabilización de la emulsión se atribuye únicamente a la floculación, resultando en este caso $ICF \% = IF \% = GF \%$. En cambio, si $IC \% > 0$ e $ICF \% > IF \%$ ($ICF \% = IF \% + IC \%$), el índice de floculación no es igual al grado de floculación ($IF \% > GF \%$ o el cociente entre $GF \%$ e $IF \%$ menor a 1), lo que significa que parte de los flóculos formados se desestabilizaron por coalescencia durante el tratamiento de congelación/descongelación.

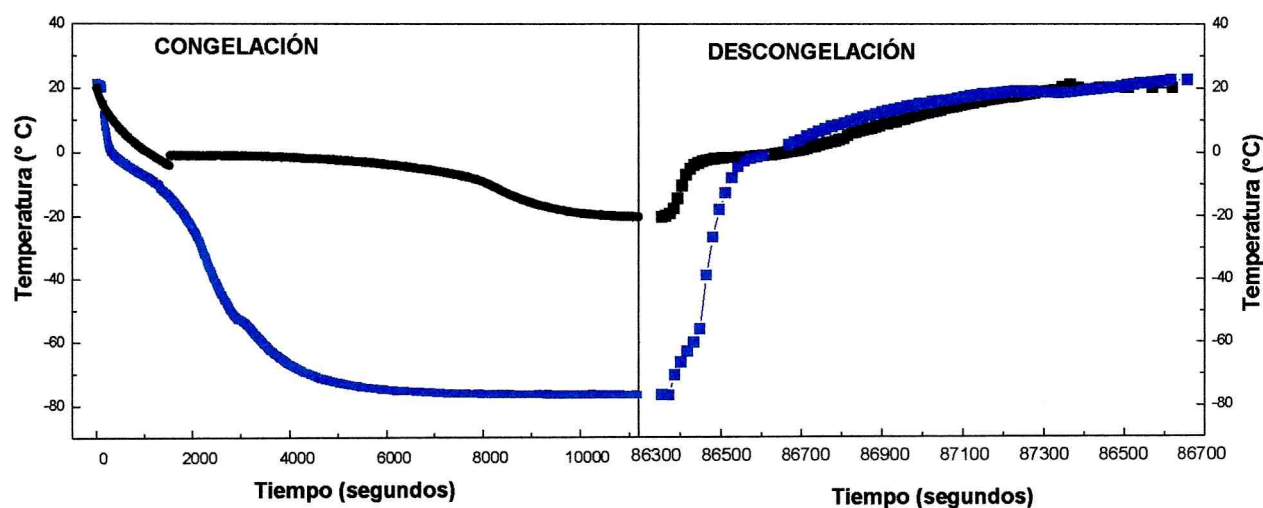


Figura 52: Historia térmica de los procesos de congelación (a -20°C y -80°C) y descongelación de una emulsión preparadas con dispersión acuosa de CS (10 mg/ml).

3.4.2.1. Congelación de emulsiones en ausencia de crioprotectores

En una primera etapa se llevó a cabo el estudio del efecto de la congelación sobre emulsiones en ausencia de crioprotectores. La Figura 53 muestra las distribuciones en volumen de tamaño de partícula, en ausencia de SDS, de las emulsiones ASN, ASD y CS iniciales y sometidas a congelación y almacenamiento congelado durante 24 horas a 20°C y -80°C .

Independientemente de la concentración de muestra en las dispersiones acuosas y de la temperatura de congelación, las emulsiones preparadas con aislados de soja (ASN y ASD) se desestabilizaron marcadamente, observándose separación gravitacional inmediatamente después del proceso de descongelación. En el suero o fase acuosa inferior se observó la presencia de gotas muy pequeñas de emulsión, que

de acuerdo a las distribuciones de tamaño de partícula, representa una fracción muy pequeña, casi despreciable del volumen total de fase dispersa. Las fases crema presentaron visualmente las siguientes características:

- Formación de agregados proteicos insolubles, que enturbian la fase acuosa y sedimentan al ser la fase crema diluida en agua.
- Formación de agregados proteicos insolubles pero con gotas de aceite ocluidas. Estos agregados migran hacia la zona superior del recipiente al ser la fase crema diluida en agua.
- Una capa de aceite separado en la parte superior de la fase crema, el cual es consecuencia de un proceso extensivo de coalescencia.

La presencia de estos agregados proteicos insolubles, se evidenció a través de un desplazamiento de los picos de las distribuciones hacia mayores tamaños de partícula. El incremento de la concentración de muestra en las emulsiones ASN pareció tener un leve efecto estabilizante, dado que el desplazamiento mencionado de los picos se dio en menor magnitud. Este efecto prácticamente no se observó en las emulsiones ASD. Independientemente de la temperatura de congelación y de la concentración de muestra, los picos principales de las distribuciones se desplazaron hacia tamaños de partícula mayores a 100 μm (Figura 53).

Por otra parte, las emulsiones preparadas con CS también se desestabilizaron, y exhibieron separación gravitacional una vez descongeladas, pero en la fase crema no se observó la presencia de agregados proteicos insolubles ni aceite separado en la parte superior del recipiente que contiene a las emulsiones. Para las preparadas con las dispersiones más diluidas (5 mg/ml), con el tratamiento a -20°C , las distribuciones en ausencia de SDS exhibieron un carácter bimodal con dos picos solapados, en tanto que las emulsiones tratadas a -80°C presentaron además un pico adicional con tamaño de partícula superior a 50 μm . Con el aumento de la concentración de muestra en las dispersiones acuosas (10 y 20 mg muestra/ml) las distribuciones de las emulsiones congeladas también mostraron picos con un desplazamiento hacia mayores tamaños de partícula respecto de la emulsión inicial y estos se dieron en mayor magnitud cuando la temperatura de congelación y almacenamiento congelado fue de -80°C . Con las emulsiones preparadas con CS 10 mg/ml, las distribuciones de tamaño de partícula mostraron un volumen mayor de fase dispersa con gotas o flóculos mayores de 10 μm .

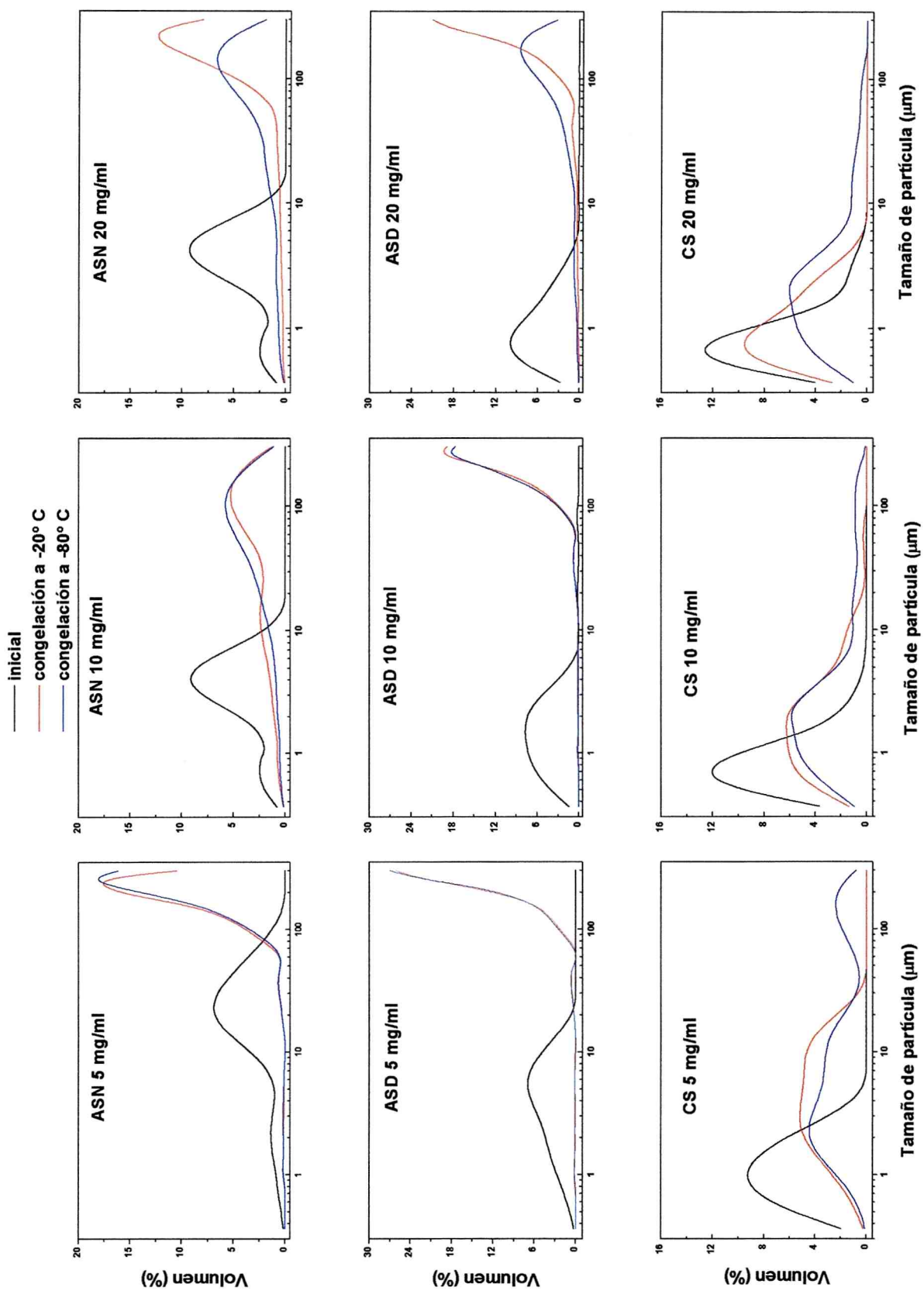


Figura 53: Distribuciones de tamaño de partícula de emulsiones ASN, ASD y CS iniciales y congeladas a -20°C y -80°C, determinadas sin SDS

En las emulsiones con dispersiones acuosas más concentradas de CS (20 mg/ml) la distribución de la emulsión congelada a -20°C se desplazó hacia mayores tamaños de partícula respecto a la emulsión inicial, aunque exhibió un carácter prácticamente monomodal. En cambio, la emulsión congelada a -80°C mostró un carácter bimodal con gotas y/o flóculos formando parte de poblaciones de mayor tamaño de partícula, en el rango 10-100 μm .

Realizando un análisis comparativo de las distribuciones y los valores resultantes de $D_{4,3}$ entre las emulsiones iniciales y congeladas se puede observar que la magnitud de la desestabilización de las emulsiones CS fue muy inferior (Tabla 22). En estas emulsiones se hace visible el efecto estabilizante del aumento de la concentración, efecto no observado en las emulsiones ASN y ASD. Estos resultados concuerdan con las diferentes características que mostraron las emulsiones una vez descongeladas.

Tabla 22: Diámetros promedio ($D_{4,3}$) de emulsiones ASN, ASD y CS iniciales y sometidas a congelación. Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones independientes.

Emulsión	Temperatura de congelación ($^{\circ}\text{C}$)	$D_{4,3}$ (μm)		
		5,0 mg/ml	10,0 mg/ml	20,0 mg/ml
ASN	Sin congelar	17,1	3,8	2,9
	-20	148,7	68,3	145,4
	-80	161,8	71,9	85,8
ASD	Sin congelar	5,4	2,6	1,7
	-20	203,5	185,3	180,7
	-80	204,9	183,3	107,6
CS	Sin congelar	1,8	0,9	0,9
	-20	5,9	3,2	1,2
	-80	29,6	12,9	6,2

Las distribuciones de tamaño de partícula también se llevaron a cabo en presencia de 1 % SDS lo que permite detectar la presencia y naturaleza de los flóculos y agregados generados. En la Figura 54 se observa de manera comparativa las distribuciones de tamaño de gota en volumen y superficie de las emulsiones ASN, ASD y CS congeladas a -20°C y -80°C . A modo de ejemplo, se observan sólo las preparadas con las dispersiones acuosas más diluidas (5 mg/ml).

En la emulsiones ASN, al ser las medidas realizadas en presencia de SDS, se observó una disminución de las poblaciones de mayor tamaño de partícula con aparición de picos a menor tamaño de partícula, respecto a los ensayos sin SDS. Estas observaciones fueron más evidentes cuando se analizan las distribuciones en superficie. Los resultados estarían indicando no sólo la disociación de flóculos, sino también de agregados proteicos formados por interacciones no covalentes. El hecho de que los picos de las distribuciones con y sin SDS aparezcan parcialmente superpuestos indicaría la presencia de agregados proteicos no disociables en presencia de SDS o gotas de mayor tamaño debido a la coalescencia durante la congelación. Para las emulsiones ASD, las distribuciones en volumen sin o con SDS no exhiben diferencias apreciables, sin embargo las expresadas en superficie evidencian cambios similares a los observadas con las emulsiones ASN.

Por otro lado, en las emulsiones CS, las diferencias entre -20°C y -80°C fueron más claramente detectadas en las distribuciones en volumen. Las emulsiones CS congeladas a -80°C presentaron al ser analizadas sin SDS un pico con tamaños de partícula mayores a $50\ \mu\text{m}$ el cual no desapareció cuando la determinación se llevó a cabo en presencia de SDS. Aunque, como se mencionó, no se hayan observado visualmente agregados proteicos en estas emulsiones, es muy probable que haya habido agregación proteica pero en un grado menor que en las emulsiones con aislados de soja. No puede descartarse que a esta población de partículas contribuyan gotas de gran tamaño debido a la coalescencia por congelación. En cambio, en las emulsiones CS congeladas a -20°C , no se observó el pico a $>50\ \mu\text{m}$, indicando un menor efecto sobre el estado de agregación-floculación de la emulsión. Sin embargo hubo un efecto de la Las distribuciones de tamaño de partícula también se llevaron a cabo en presencia de 1 % SDS lo que permite detectar la presencia y naturaleza de los flóculos y agregados generados. En la Figura 54 se observa de manera comparativa las distribuciones de

tamaño de gota en volumen y superficie de las emulsiones ASN, ASD y CS congeladas a -20°C y -80°C . A modo de ejemplo, se observan sólo las preparadas con las dispersiones acuosas más diluidas (5 mg/ml).

En la emulsiones ASN, al ser las medidas realizadas en presencia de SDS, se observó una disminución de las poblaciones de mayor tamaño de partícula con aparición de picos a menor tamaño de partícula, respecto a los ensayos sin SDS. Estas observaciones fueron más evidentes cuando se analizan las distribuciones en superficie. Los resultados estarían indicando no sólo la disociación de flóculos, sino también de agregados proteicos formados por interacciones no covalentes. El hecho de que los picos de las distribuciones con y sin SDS aparezcan parcialmente superpuestos indicaría la presencia de agregados proteicos no disociables en presencia de SDS o gotas de mayor tamaño debido a la coalescencia durante la congelación. Para las emulsiones ASD, las distribuciones en volumen sin o con SDS no exhiben diferencias apreciables, sin embargo las expresadas en superficie evidencian cambios similares a los observadas con las emulsiones ASN.

Por otro lado, en las emulsiones CS, las diferencias entre -20°C y -80°C fueron más claramente detectadas en las distribuciones en volumen. Las emulsiones CS congeladas a -80°C presentaron al ser analizadas sin SDS un pico con tamaños de partícula mayores a $50\ \mu\text{m}$ el cual no desapareció cuando la determinación se llevó a cabo en presencia de SDS. Aunque, como se mencionó, no se hayan observado visualmente agregados proteicos en estas emulsiones, es muy probable que haya habido agregación proteica pero en un grado menor que en las emulsiones con aislados de soja. No puede descartarse que a esta población de partículas contribuyan gotas de gran tamaño debido a la coalescencia por congelación. En cambio, en las emulsiones CS congeladas a -20°C , no se observó el pico a $>50\ \mu\text{m}$, indicando un menor efecto sobre el estado de agregación-floculación de la emulsión. Sin embargo hubo un efecto de la congelación manifestado por la presencia de poblaciones de partículas solapadas en un único pico de amplio rango ($0.3 - 40\ \mu\text{m}$). La diferencia observada entre las

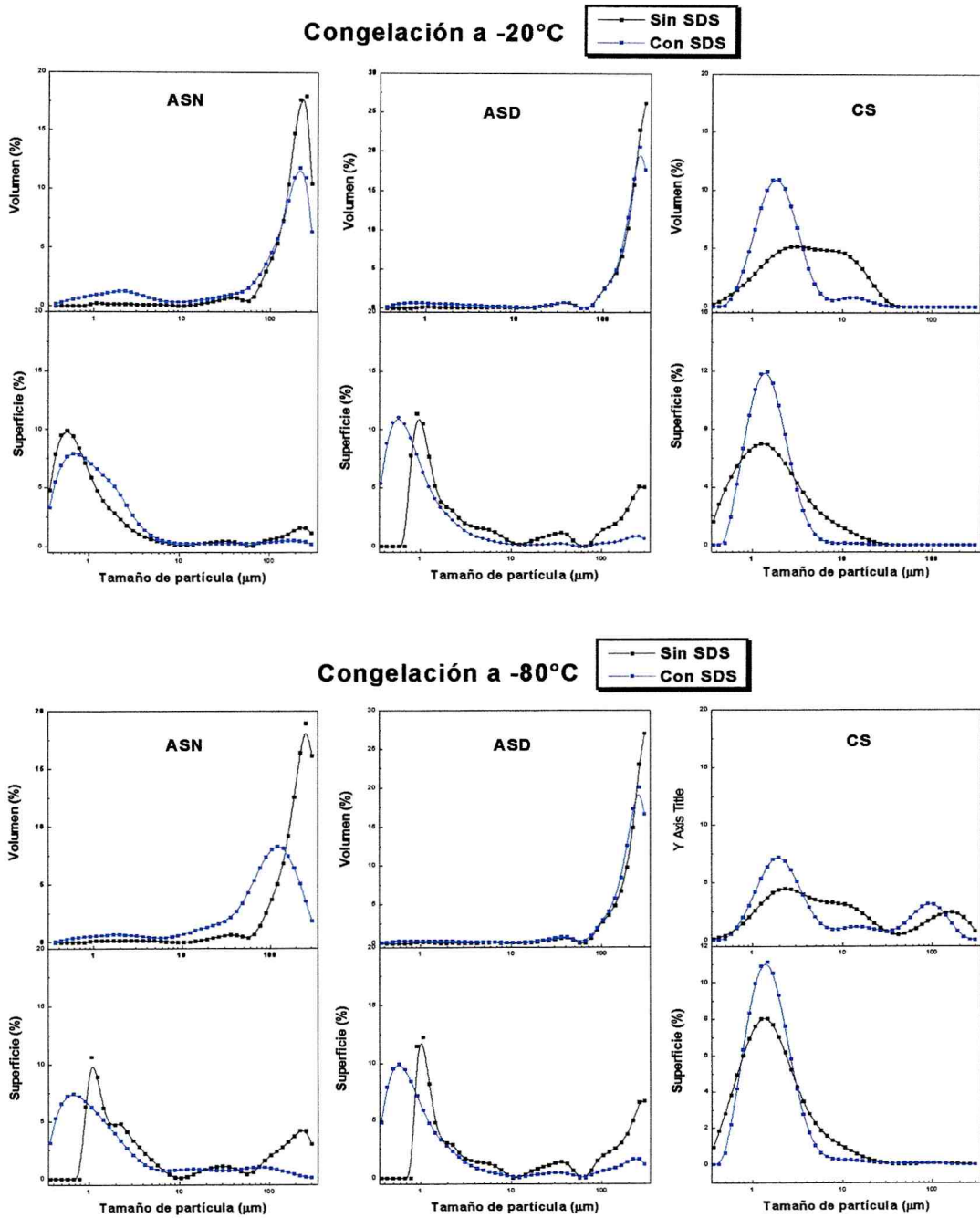


Figura 54: Distribuciones de tamaño de partícula en presencia y ausencia de SDS de emulsiones preparadas con dispersiones acuosas (5 mg/ml) de ASN, ASD y CS, congeladas a -20°C y -80°C .

distribuciones medidas con y sin SDS se debería principalmente a la formación de flóculos entre gotas, dado que se observó en presencia de SDS la desaparición de partículas con tamaño mayor a 5 μm .

Como se dijo anteriormente, las emulsiones CS mostraron características totalmente diferentes a las de aislados de soja, al ser descongeladas. Dado que no se observó visualmente aceite separado ni agregados proteicos insolubles con aceite ocluido, podría afirmarse que gran parte de la fase dispersa en estas emulsiones permaneció en estado emulsificado después del tratamiento de congelación/descongelación, lo cual se corresponde perfectamente con las distribuciones analizadas.

A partir de las distribuciones de tamaño de partícula y de los correspondientes diámetros promedio ($D_{4,3}$) en ausencia y presencia de SDS, se calcularon los correspondientes parámetros de desestabilización (Figura 55).

En las emulsiones preparadas con proteínas de soja los valores de IC % e ICF % fueron extremadamente elevados con valores siempre superiores a 10^3 , lo cual es una consecuencia directa de la suma de más de un proceso de desestabilización por congelación que conduce a un elevado tamaño de partícula: coalescencia, floculación más la formación de agregados proteicos.

El hecho de que en la mayoría de los casos, los valores de ICF % fueran siempre mayores a los de IC % indican que parte de los agregados proteicos y flóculos se disociaron en presencia de SDS. En las emulsiones ASN y ASD congeladas no se observó ninguna tendencia en los parámetros de desestabilización en función de la concentración de muestra y de la temperatura de congelación. En cambio, en las emulsiones CS, la mayor parte del aceite se encuentra emulsionado. En este caso, IC % e ICF %, disminuyeron significativamente con el aumento de la concentración de muestra. Respecto a la temperatura de congelación y almacenamiento congelado, los parámetros de desestabilización fueron siempre superiores a -80°C .

Una forma de analizar los grados de floculación y coalescencia alcanzados como consecuencia del proceso de congelación y diferenciarlo de la floculación inicial de las emulsiones es a través de la relación entre los valores de GF % e IF % (GF/IF).

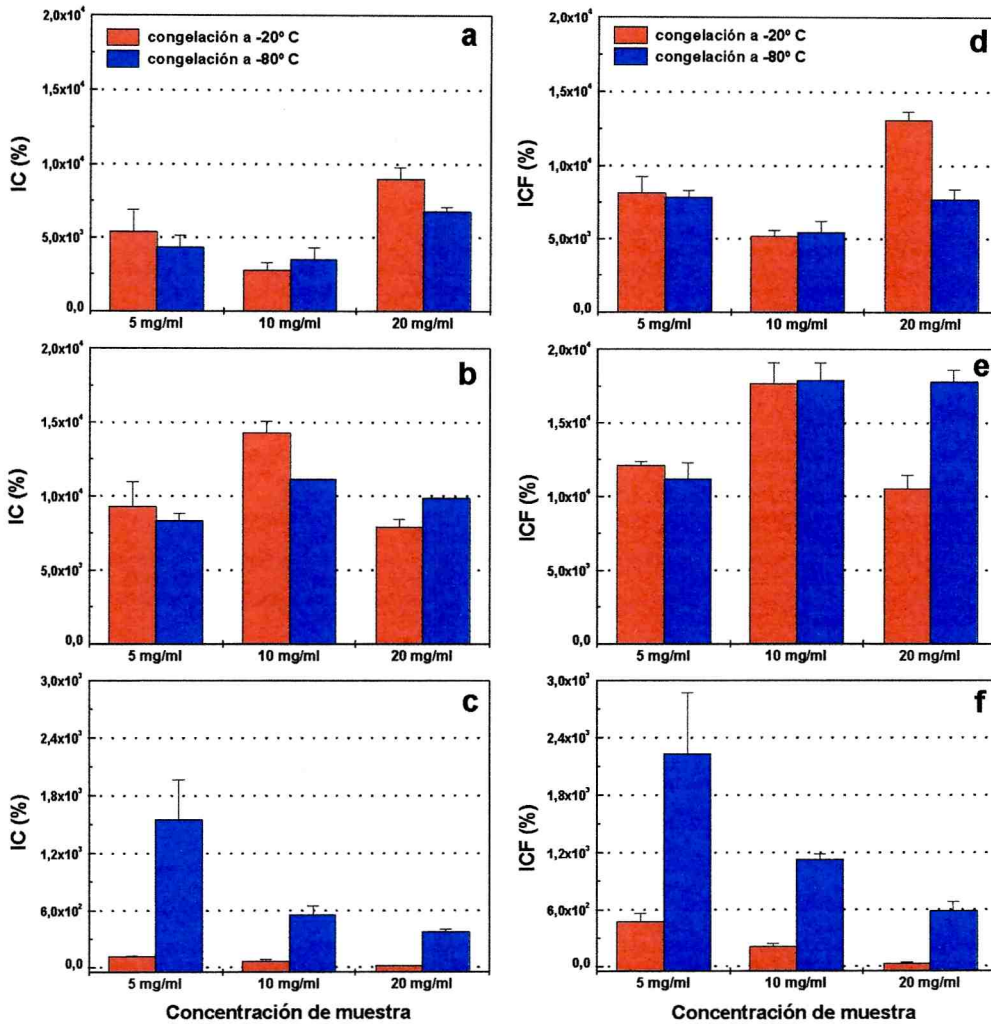


Figura 55: Índices de coalescencia (IC %), y coalescencia-floculación (ICF %) para las emulsiones ASN, ASD y CS sometidas al proceso de congelación a -20°C y -80°C .

Para las emulsiones preparadas con ASN y ASD, independientemente de la concentración de muestra, GF/IF fue cercano a 0 (Tabla 22); este resultado está de acuerdo con el alto grado de desestabilización de las emulsiones.

En las emulsiones CS el valor de GF/IF se incrementó con el aumento de la concentración de muestra en la dispersión, lo cual indica que una mayor proporción de los flóculos permanecen como tales sin desestabilizarse por el proceso de congelación. Este cociente mostró los mayores valores en las emulsiones congeladas a -20°C , condición en la que fueron más estables.

El principio de medición del analizador de tamaño de partícula requiere el conocimiento del índice de refracción de la fase dispersa. En las emulsiones preparadas con ASD y ASN, una fracción muy importante de aceite se libera y permanece ocluida dentro de los agregados proteicos. En este caso, el índice de refracción de los agregados proteicos formados durante la congelación y el almacenamiento congelado no se conoce con exactitud. Por consiguiente, los valores de IC %, ICF %, IF % y GF %) y las diferencias observadas en los parámetros entre distintas concentraciones de muestras y temperaturas de congelación deben ser tomadas con suma precaución en las emulsiones ASN y ASD congeladas.

Tabla 23: Relación entre GF % e IF % (GF/IF) de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de ASN, ASD y CS.

Emulsión	Temperatura de congelación (° C)	GF/IF		
		5,0 mg/ml	10,0 mg/ml	20,0 mg/ml
ASN	-20	0,022	0,027	0,012
	-80	0,019	0,034	0,007
ASD	-20	0,011	0,008	0,009
	-80	0,011	0,006	0,005
CS	-20	0,464	0,603	0,762
	-80	0,063	0,152	0,145

Sin embargo, el objetivo principal de este estudio fue disponer de parámetros que cuantifiquen cualquier cambio negativo en las características de la emulsión por efecto del tratamiento de congelación/descongelación y que estén en concordancia con las observaciones visuales y modificaciones de la estabilidad medidas por otros métodos. Una búsqueda bibliográfica exhaustiva permitió comprobar que no se realizaron estudios que permitan diferenciar los procesos que producen modificaciones en la

distribución de tamaño de partícula durante la congelación de emulsiones. Un análisis sólo cualitativo de los cambios en las distribuciones de tamaño de partícula fue recientemente utilizado por Thanasukarn y col. (2004) y les permitió detectar el efecto del almacenamiento congelado de emulsiones formuladas con proteínas del lactosuero, Tween 20 y aceite de palma hidrogenado.

Como se mencionó con anterioridad, en las emulsiones ASN y ASD una vez descongeladas se observó aceite separado en la parte superior de la fase crema. La Tabla 23 muestra que, independientemente de la concentración de muestra y la temperatura de congelación, el AS % de las emulsiones ASN y ASD estuvieron en el rango 28-36 %. El hecho de que no haya habido mayor cantidad de aceite separado se atribuiría probablemente a que parte del aceite permanece ocluida en los agregados proteicos, tal como fue descrito anteriormente en esta sección.

Tabla 23: Porcentaje de aceite separado (AS %) de emulsiones o/w formuladas con dispersiones acuosas (5, 10 y 20 mg/ml) de ASN, ASD y CS. AS % fue determinado por el método de dilución del colorante (sección 2.6.9).

Emulsión	Temperatura de congelación (° C)	AS %		
		5,0 mg/ml	10,0 mg/ml	20,0 mg/ml
ASN	-20	28,7 ± 3,0	28,0 ± 1,8	31,2 ± 3,0
	-80	35,2 ± 3,0	32,0 ± 2,7	30,8 ± 0,5
ASD	-20	33,0 ± 0,8	36,2 ± 4,0	33,7 ± 0,7
	-80	36,9 ± 4,8	32,2 ± 2,3	29,2 ± 2,0
CS	-20	2,2 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4
	-80	5,0 ± 1,8	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,6

Por otro lado, las emulsiones CS liberaron cantidades muy bajas de aceite por el tratamiento de congelación, con excepción de la emulsión CS (5 mg muestra/ml) congelada a -80° C, donde AS % ≈ 5. Aún así, en la condición más desfavorable, AS % fue casi seis veces inferior al de las emulsiones preparadas con aislados de soja.

La liberación de aceite y su determinación a través de AS % por el método de dilución del colorante es un importante indicador de desestabilización que permite evaluar el efecto de la congelación. Además, es un método complementario a los de dispersión de luz, ya que éstos no son capaces de medir aceite libre.

De acuerdo a trabajos previos de otros autores, hay varios procesos relacionados entre sí que pueden tener lugar durante la congelación de emulsiones. En primer lugar, durante la congelación se forman cristales de hielo y las gotas de la emulsión son forzadas a entrar en contacto en la fase acuosa no congelada, promoviendo su agregación (Dickinson y Stainsby, 1988; Berger, 1997; Saito y col., 1999; Hartel, 2001; Cramp y col., 2004; McClements, 2004).

En segundo lugar, durante la congelación se produce la crioconcentración de todos los componentes presentes en la fase acuosa no congelada. Este efecto produce un marcado aumento de la fuerza iónica y cambios en el pH dependiendo de la concentración y naturaleza de las sales presentes inicialmente en la fase acuosa (Berger, 1997; Thiebaud y col., 2002; Thanasukarn, 2004). Además, la formación de hielo produce la remoción continua de moléculas de agua disponibles para la hidratación de los restos aminoacídicos de la proteína adsorbidas en la interfase. La pérdida de agua por efecto de la deshidratación, produce una ruptura de las interacciones proteína-solvente y las moléculas de proteínas son expuestas a un medio menos polar que el agua, lo cual aumenta el efecto de las interacciones hidrofóbicas e iónicas entre las mismas. El conjunto de fenómenos descritos promueve la formación de agregados proteicos (Xiong, 1997). Probablemente también, los cristales de hielo formados durante la congelación de la emulsión pueden penetrar en las gotas de aceite y producir la ruptura del film interfacial, haciendo a la emulsión más propensa a la coalescencia una vez que es descongelada (McClements, 2004). Si la fase dispersa (en nuestro caso, aceite) cristaliza parcialmente durante el proceso de congelación, las gotas de la emulsión pueden formar agregados por coalescencia parcial, lo cual podría constituir un factor de desestabilización adicional (ver Figura 7). La deshidratación del film interfacial y la agregación proteica en la interfase durante la congelación y el almacenamiento congelado, podría inducir cambios negativos e irreversibles irreversiblemente en la reología del film interfacial conduciendo a su colapso y ruptura. Como se dijo antes, la ruptura puede verse también favorecida por la presencia de cristales de hielo y de aceite dentro de las gotas de la emulsión.

En este contexto, Thanasukarn y col. (2004) observaron que el grado de desestabilización de las emulsiones de proteína del lactosuero y caseína bovina almacenadas a distintas temperaturas subcero y en ausencia de agentes crioprotectores era muy alto sólo a temperaturas suficientes como para producir la formación de hielo. Por lo tanto, concluyeron que la cristalización del agua, más que la de la fase dispersa, es un factor fundamental para promover la desestabilización de las emulsiones.

En base a los estudios previamente mencionados y a los resultados obtenidos en el presente trabajo se postula como hipótesis un esquema que representaría la serie de eventos que pueden tener lugar durante la congelación de una emulsión (Figura 56).

Dado que se está estudiando la congelación de emulsiones estabilizadas por proteínas como único agente emulsificante, y que éstas se encuentran distribuidas entre la fase acuosa y el film interfacial, es de interés analizar que cambios sufren las proteínas frente a la congelación. Uno de los cambios más importantes que pueden ocurrir cuando se congela una solución proteica es la pérdida de solubilidad. Anteriormente, hemos mencionado que las emulsiones al ser congeladas y descongeladas presentaban agregados proteicos insolubles en especial en el caso de las preparadas con los aislados de soja. Los cambios de solubilidad de dispersiones acuosas de las proteínas empleadas por efecto de la congelación, puede servir de orientación para comprender lo que ocurre a nivel de la fase acuosa en la emulsión y en la interfase en un tratamiento de congelación equivalente.

Ya se informó en la sección 3.4.1 que el porcentaje de proteína adsorbida en la interfase estuvo en el rango del 70 a 90% para todas las emulsiones. Por consiguiente, se debe tener en cuenta que el aumento de concentración proteica es muy alto: el volumen interfacial puede considerarse como el producto del área interfacial total y espesor del film interfacial, el cual siempre es submicrónico. En este caso el volumen interfacial es muy inferior al volumen de la fase continua, con lo cual es esperable que la tendencia a la agregación proteica por efecto de la congelación se vea considerablemente incrementada.

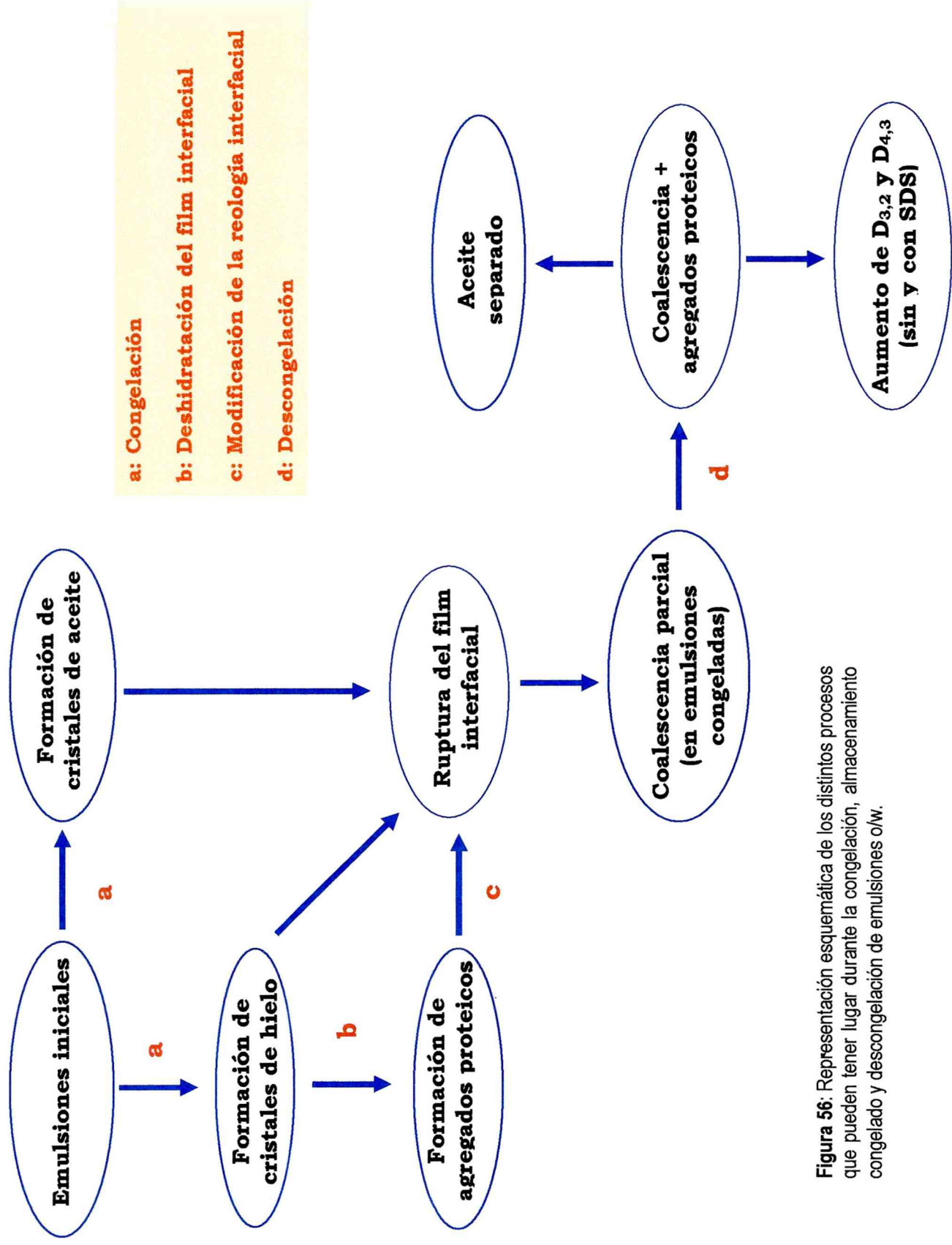


Figura 56: Representación esquemática de los distintos procesos que pueden tener lugar durante la congelación, almacenamiento congelado y descongelación de emulsiones o/w.

Esto llevó a la necesidad de realizar ensayos de congelación de las dispersiones acuosas de las muestras ASN, ASD y CS a las concentraciones utilizadas para preparar las emulsiones. La Figura 57 muestra la solubilidad de las dispersiones acuosas sin congelar y congeladas a -20°C y -80°C . La pérdida de solubilidad después de congelar la dispersión acuosa de ASN, tanto a -20°C como a -80°C fue de aproximadamente un 15 %, para las dispersiones acuosas más diluidas y un 10 % para las más concentradas. Estos resultados responden a la conocida capacidad que tiene la globulina 11S de soja de formar agregados a temperaturas de refrigeración y congelación con pérdida de solubilidad (Wolf y Sly, 1967; Hashizume y col., 1971).

De acuerdo a este resultado es probable que las moléculas de globulina 11S que se encuentran solubles en la fase acuosa de la emulsión tengan tendencia a formar agregados de un modo similar a lo ocurrido en la solución congelada. Sin embargo, en el caso de las moléculas de 11S adsorbidas en la interfase, es esperable que la tendencia a la agregación sea muy superior debido a la mayor concentración proteica a nivel interfacial.

Las dispersiones acuosas de ASD fueron más solubles que las ASN a todas las concentraciones de muestra ensayadas. La pérdida de solubilidad de las dispersiones acuosas de ASD fue en promedio del 5 %. El hecho de que se observen agregados proteicos y por ende, una baja estabilidad de las emulsiones ASD sometidas a congelación/descongelación podría atribuirse ya no a la alta capacidad de agregación de la globulina 11S nativa, sino a la alta hidrofobicidad superficial de esta muestra (Tabla 12) y al efecto inductor de la concentración proteica interfacial ($\approx 90\%$ de las proteínas adsorbidas). En cambio, en las dispersiones acuosas de CS no se observó variaciones significativas en la solubilidad por el tratamiento de congelación, tanto a -20 como a -80°C . La solubilidad de estas dispersiones fue siempre cercana a 100 %, independientemente de la concentración de muestra. La hidrofobicidad superficial de esta muestra antes del tratamiento de congelación fue inferior a la de ASD, pero superior a las de ASN (Tabla 12); por lo tanto el hecho de que la muestra CS no haya perdido solubilidad por efecto de la congelación se atribuiría a las características de sus proteínas constituyentes.

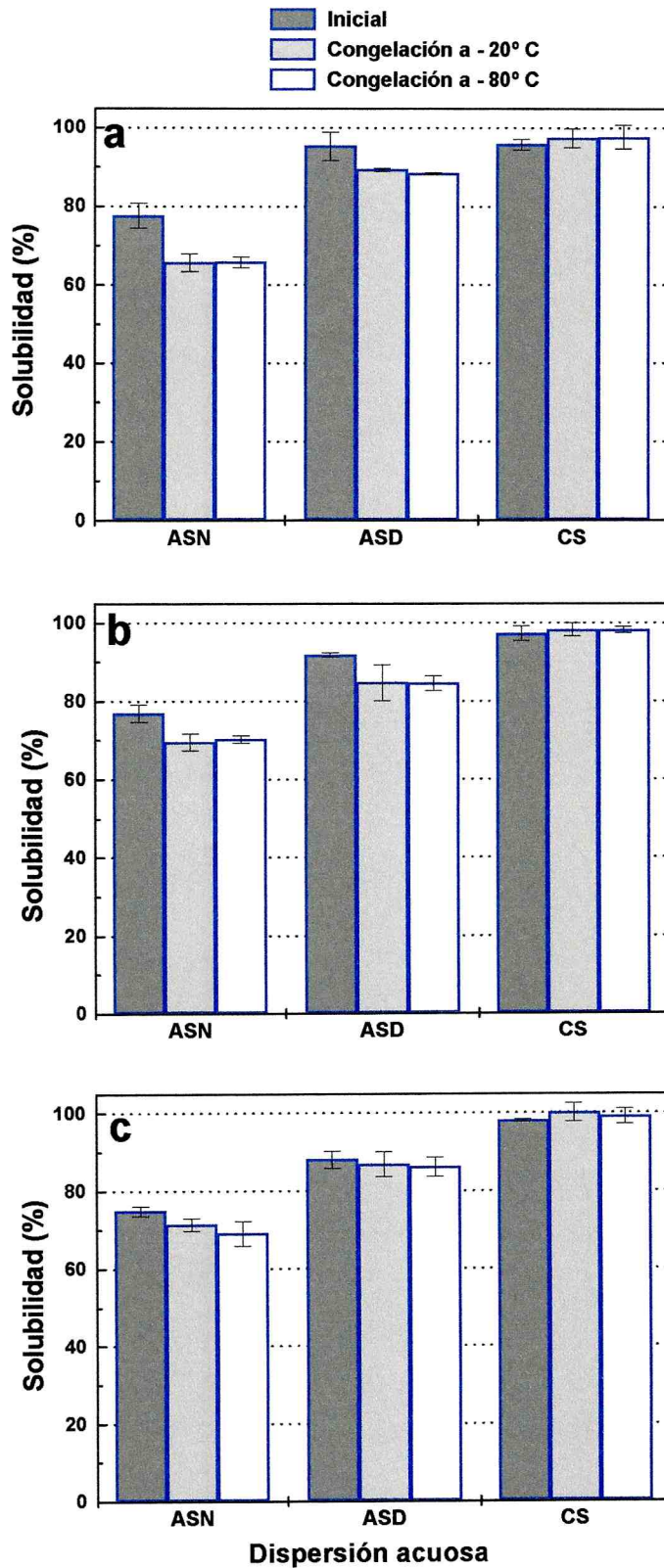


Figura 57: Solubilidad de dispersiones acuosas de ASN, ASD y CS en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 iniciales y sometidas a congelación y almacenamiento congelado (24 horas) a -20° C y -80° C: a) 5 mg/ml; b) 10 mg/ml y c) 20 mg/ml de muestra en la dispersión.

Las α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas presentan un alto número de restos de fosfoserina (cargados negativamente), mientras que la κ -caseína contiene restos glicosídicos en el extremo C-terminal (Fox y Kelly, 2004). Los restos de fosfoserina cargados negativamente no se encuentran homogéneamente distribuidos en la secuencia primaria de las proteínas sino formando “clusters”. Estos restos cargados negativamente, conjuntamente con los restos glicosídicos impedirían no sólo la pérdida de solubilidad de las dispersiones acuosas, sino también la deshidratación del film interfacial y la formación de agregados proteicos en las emulsiones durante la congelación y el almacenamiento congelado, debido a la repulsión electrostática y estérica.

El efecto de las repulsiones electrostáticas en la estabilidad de las emulsiones CS congeladas, se puede evaluar si a la fase acuosa de estas emulsiones se le adiciona Ca^{2+} antes del tratamiento de congelación. Las proteínas constituyentes de CS, especialmente las α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas tienen una alta afinidad por los iones Ca^{2+} (Ye y Singh, 2001). La presencia de iones Ca^{2+} producen el apantallamiento de cargas (“screening”) entre las moléculas de proteína adsorbidas y pueden promover la floculación por puenteo de acuerdo a lo observado previamente (Ye y Singh, 2001). Este apantallamiento de cargas es mucho más efectivo para iones multivalentes respecto a los iones monovalentes (McClements, 1999, 2004).

Cuando las emulsiones preparadas con dispersiones 5 mg/ml de CS en presencia de 5 mM de CaCl_2 , fueron congeladas, se produjo una marcada desestabilización, con la formación de agregados proteicos y separación de aceite en la parte superior de la fase crema, al igual que las emulsiones ASN y ASD. La Figura 58 muestra que el pico principal de la distribución de la emulsión CS congelada en presencia de 5 mM de CaCl_2 se desplazó hacia mayores tamaños de partícula respecto a la congelada sin la sal. El aumento de la fuerza iónica que se produciría como consecuencia de la crio-concentración de los iones de la sal agregada en la fase acuosa no congelada podría contribuir aún en mayor medida a la desestabilización.

Como se mostró en la Figura 56, la estabilidad de las emulsiones o/w frente a la congelación, puede estar afectada por la cristalización de la fase oleosa. En las emulsiones estudiadas en este trabajo, la fase dispersa es aceite de girasol refinado, el cual tiene una temperatura de solidificación de -17°C (Roos, 1995). Sin embargo, la temperatura de solidificación del aceite disperso en las gotas de una emulsión puede ser muy diferente al del aceite libre. Generalmente, en una emulsión el aceite puede enfriarse a una temperatura significativamente menor a la de solidificación

antes de que la cristalización tenga lugar de manera efectiva (Dickinson y McClements, 1995), a esto se lo conoce como subenfriamiento.

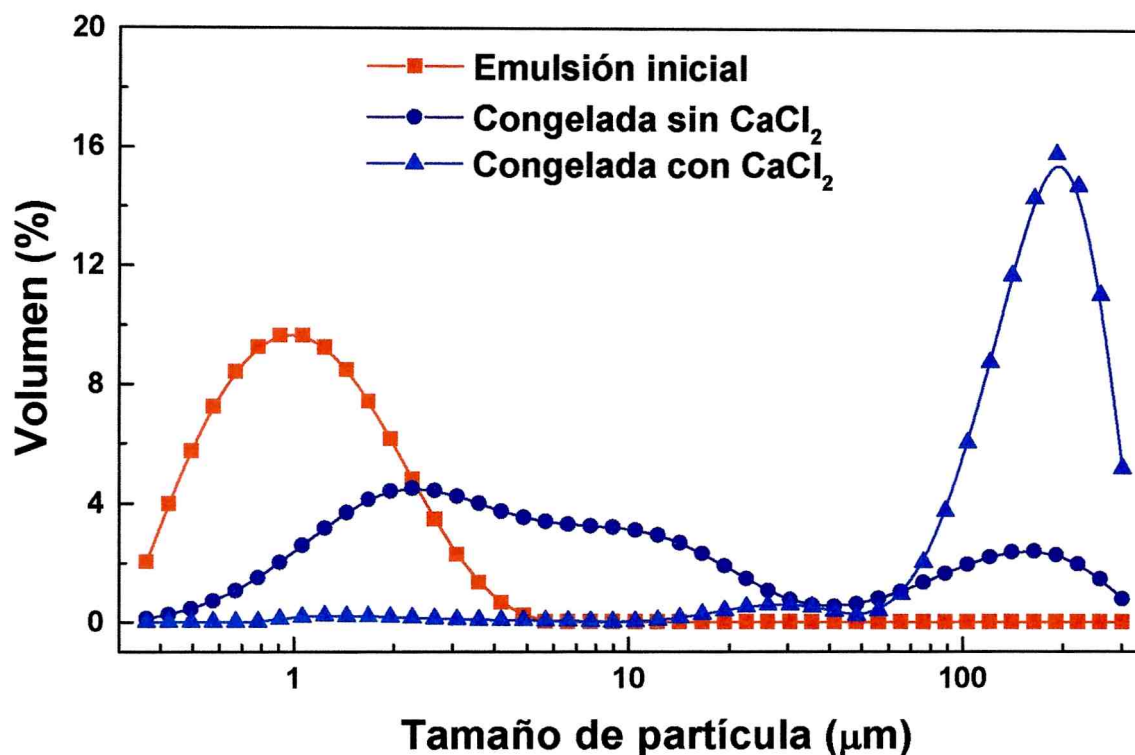


Figura 58: Distribuciones en volumen de tamaño de partícula de emulsiones o/w preparadas con dispersiones acuosas (5 mg/ml) de CS sin y con agregado de CaCl₂ (5 mM en la fase acuosa), sin congelar y congeladas a -80° C. Las distribuciones fueron determinadas en ausencia de SDS y el CaCl₂ se agregó a emulsión recientemente preparada antes del tratamiento de congelación.

El aceite libre no puede ser subenfriado a temperaturas mucho más bajas que la de solidificación debido a que tiene lugar el fenómeno de nucleación heterogénea volumétrica, ya sea por irregularidades en la superficie del recipiente que contiene el aceite o por la presencia de impurezas catalíticas en el seno del aceite; una vez que comienza la nucleación, la cristalización se expande rápidamente a todo el seno del aceite debido a los procesos de nucleación secundaria y crecimiento cristalino. Después de la homogeneización, las gotas de aceite en la emulsión formada permanecen aisladas por el film interfacial y el número de gotas por unidad de volumen de fase dispersa puede ser mucho mayor al número de impurezas catalíticas, aumentando la probabilidad de que existan gotas sin impurezas. Esto es especialmente válido cuando el tamaño de las gotas es muy pequeño, como las emulsiones preparadas con dispositivos de homogeneización de alta energía.

Aunque este fenómeno de nucleación homogénea se ha observado en muchos sistemas, en otros casos se ha reportado la dependencia de la nucleación con el tipo de emulsificante empleado (nucleación heterogénea superficial) y también en gotas con fase dispersa subenfriada en contacto con gotas parcialmente cristalizadas de la misma emulsión (nucleación heterogénea intergotas). Todos estos fenómenos tienen una marcada influencia sobre el grado de subenfriamiento de la fase dispersa (Dickinson y McClements, 1996).

En vista de lo expuesto, es altamente probable que la fase dispersa no cristalice apreciablemente cuando la temperatura de congelación y almacenamiento congelado es -20°C (sólo 3°C por debajo de la temperatura de solidificación del aceite de girasol refinado). La cristalización del aceite de girasol podría darse en mucha mayor extensión cuando la temperatura de congelación y almacenamiento congelado es inferior a -20°C y podría promover un grado de desestabilización adicional. Esto podría explicar la mayor desestabilización de las emulsiones CS al ser congeladas a -80°C (Figura 55). Sin embargo, es muy importante resaltar que a esta temperatura además de la cristalización de aceite hay una mayor formación de hielo que a -20°C y es probable que ambos fenómenos contribuyan a ese grado de desestabilización. Según Thanasukarn y col. (2004), la cristalización del agua sería el principal factor promotor de desestabilización en emulsiones preparadas con proteínas como único agente emulsificante.

3.4.2.2- Efecto de la adición de crioprotectores

El estudio del efecto de crioprotectores sobre la estabilidad de las emulsiones ASN, ASD y CS frente a la congelación a -20 y -80°C se llevó a cabo con emulsiones que contienen glucosa o sorbitol a concentraciones de 1, 3 y 5 % p/v en su fase acuosa. Los crioprotectores no se agregaron a las dispersiones acuosas sino a las emulsiones recién preparadas. La glucosa y el sorbitol no tienen propiedades interfaciales, pero pueden aumentar la viscosidad de las dispersiones, siendo este efecto dependiente de la concentración. Un cambio en la viscosidad de la fase acuosa tiene un efecto importante sobre la magnitud de las fuerzas interfaciales y de ruptura durante el proceso de homogeneización (Walstra, 1983; Ford, 1997; McClements, 1999). Por ende, la adición de crioprotectores después de la homogeneización, asegura que todas las emulsiones iniciales preparadas con una muestra dada tengan la misma distribución de tamaño de partícula, independientemente del tipo y concentración del crioprotector o ausencia del mismo.

Del mismo modo que en ausencia de crioprotectores, se registró la historia térmica durante la congelación y la descongelación de las emulsiones conteniendo glucosa y sorbitol como crioprotectores (Figura 59).

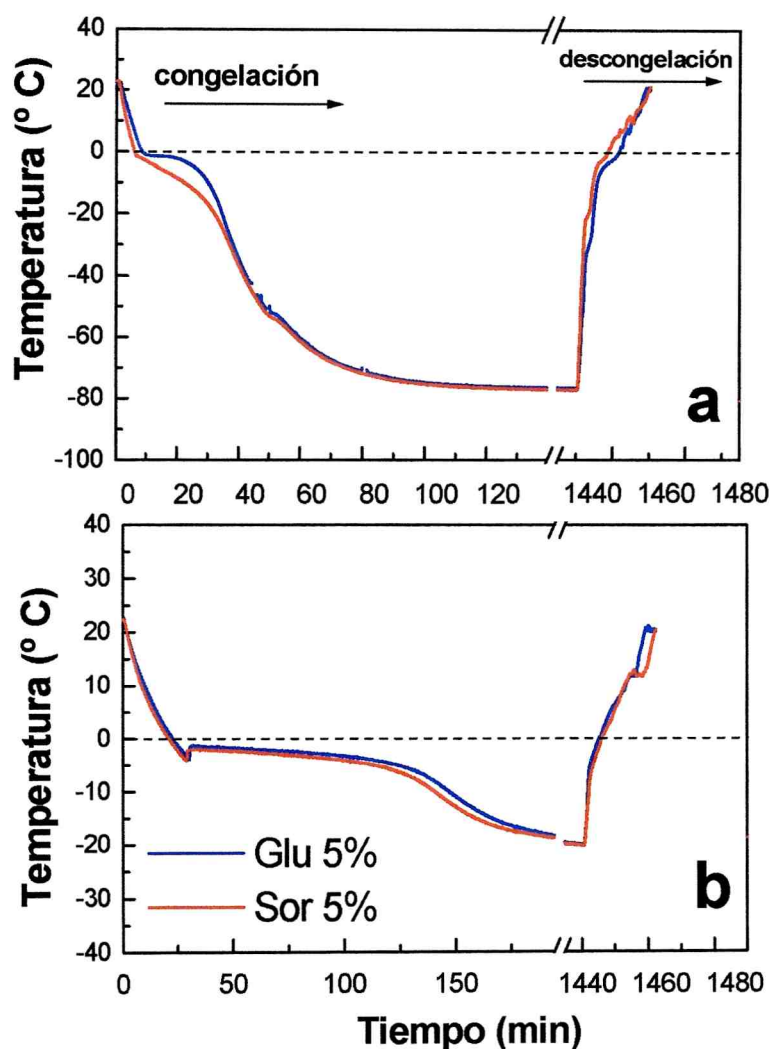


Figura 59: Historia térmica de la congelación y descongelación de una emulsión preparada con dispersiones acuosas de CS (10 mg/ml) en presencia de glucosa o sorbitol (5 % p/v en la fase acuosa). Los crioprotectores se agregaron a las emulsiones recién preparadas

Durante el tratamiento a ambas temperaturas se observó una influencia del tipo de crioprotector sobre la velocidad de enfriamiento tanto durante la congelación como previamente a ella. El enfriamiento realizado a menor velocidad (tratamiento a -20°C Figura 59 b), mostró un subenfriamiento después del cual comienza la congelación propiamente dicha, observándose un descenso crioscópico muy superior al registrado en las emulsiones sin crioprotector. Las temperaturas de comienzo de la formación de hielo fueron $-1,5^{\circ}\text{C}$ y $-1,9^{\circ}\text{C}$ para las emulsiones en presencia de

glucosa y sorbitol, respectivamente. En base a estas temperaturas se calculó el valor de la fracción de agua congelada al alcanzarse los -20°C , la cual resultó ser de 0,93 y 0,90 para las emulsiones con glucosa y sorbitol, respectivamente. A partir de estos valores se pudo corroborar que la crioconcentración alcanzada en la fase acuosa fue prácticamente la máxima esperada, 80% para la glucosa y 82 % para el sorbitol. Las emulsiones congeladas hasta -80°C contienen por lo tanto la misma cantidad de hielo formado pero adquieren un estado vítreo por haberse enfriado por debajo de la temperatura de transición vítrea de la solución máximamente crioconcentrada ($T'_g = -43^{\circ}\text{C}$ y -57°C para soluciones de glucosa y sorbitol, respectivamente; Roos, 1995; Matveev, 2004).

Las distribuciones de tamaño de partículas de las emulsiones congeladas cuando éstas contienen glucosa o sorbitol, fueron muy diferentes a las correspondientes emulsiones sin crioprotector. A fin de visualizar este efecto en la Figura 60 se muestra a modo de ejemplo las distribuciones de las emulsiones ASN (20 mg/ml de muestra en la dispersión acuosa) iniciales y congeladas a -20°C , en ausencia y presencia de glucosa (1, 3, 5 % p/v).

En las distribuciones sin SDS (Figura 60 a) se puede observar que la presencia de glucosa, más aún a altas concentraciones (3 - 5% p/v) impidió en parte, que en las emulsiones congeladas se formen partículas de tamaño mayor a $50\mu\text{m}$., exhibiendo a la vez un incremento de la población de gotas originalmente presentes en la emulsión sin congelar. Los ensayos con SDS (Figura 60 b) mostraron que el pico atribuible a agregados proteicos y/o flóculos formados por interacciones covalentes o por gotas coalescidas que aparece en las emulsiones congeladas sin crioprotector, se vio apreciablemente reducido cuando las mismas contienen glucosa. En el caso particular de la emulsión ASN con mayor concentración de crioprotector, la desaparición del pico mencionado fue total.

Aunque se han postulado distintas hipótesis, se cree que los crioprotectores ejercen su efecto estabilizante por una influencia directa sobre la formación de cristales de hielo y el grado de hidratación de las moléculas de proteínas.

- La adición de azúcares y polioles incrementa la viscosidad de la fase continua, disminuye el punto de congelación por debajo de 0°C (Figura 59) y modifica tanto la cantidad de agua congelada a una determinada temperatura como la temperatura de transición vítrea (T'_g). Durante la congelación el agua cristaliza y la fase acuosa se vuelve más concentrada y viscosa. En un punto dado, la difusión de solutos presentes en la fase acuosa desde la superficie de los cristales

de hielo en crecimiento se torna más difícil, lo cual tiene una influencia directa sobre el crecimiento de los cristales de hielo. Por consiguiente, los azúcares y polioles inhiben el crecimiento cristalino (Saito y col., 1999; Thiebaud y col., 2002).

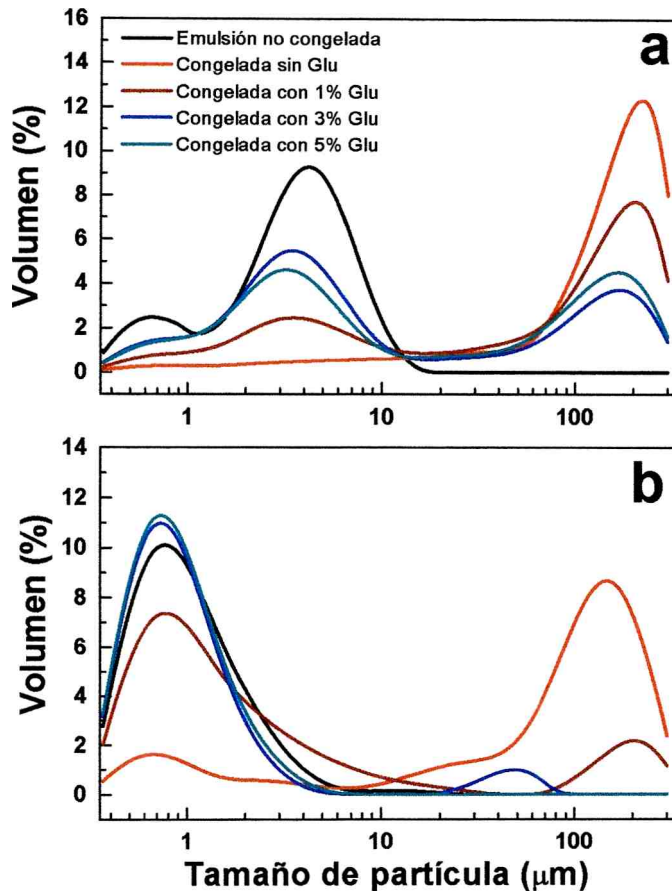


Figura 60: Distribuciones de tamaño de partícula medidas sin SDS (a) y con SDS (b) en emulsiones iniciales y sometidas a congelación (-20°C) con previo agregado de glucosa (1, 3, 5% p/v) o sin crioprotector.

- Como se mencionó con anterioridad, los valores de T'_g (temperaturas de transición vítrea de la solución máximamente crioconcentrada) son de -43°C para la glucosa y -57°C para el sorbitol (Ross, 1995; Matveev, 2004). Las dos temperaturas empleadas para congelar y almacenar las emulsiones, -20°C y -80°C , están por encima y por debajo de ambas T'_g , respectivamente. A una temperatura menor a las T'_g la fase acuosa de las emulsiones está en estado vítreo. Por ende, todos los procesos que involucran difusión y migración de moléculas, entre los que se encuentran la cristalización y recristalización de hielo,

se ven desfavorecidos. Este sería el caso de las emulsiones congeladas a -80° C. Además, sería esperable que las emulsiones congeladas a -20° C presenten mayores modificaciones de estructura dado que durante el almacenamiento congelado, las gotas se encuentran inmersas en una dispersión crioconcentrada no vítrea (estado gomoso) y por ende con mayor posibilidad de alteración.

- La formación de hielo produce la remoción continua de las moléculas de agua de hidratación de las proteínas, favoreciendo las interacciones proteína-proteína y la formación de agregados proteicos (Xiong, 1997). Arakawa y Timasheff (1982) empleando proteínas globulares (β -lactoglobulina, lisozima, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina y ribonucleasa A) utilizaron un sofisticado método de equilibrio de diálisis para determinar la afinidad de una proteína en particular por especies de bajo peso molecular o cosolutos (sales, azúcares, polioles). Cuando el cosoluto se concentra en la bolsa de diálisis respecto al medio externo, se dice que el mismo se une o interacciona preferencialmente con la proteína. En cambio, en aquellos casos donde la concentración del cosoluto es menor respecto al exterior, hay una hidratación preferencial. Estos autores determinaron que los azúcares y polioles son preferencialmente excluidos de la superficie de la molécula de proteína manteniendo el agua de hidratación en las moléculas de proteína. La hidratación preferencial fue inicialmente postulada para explicar el efecto estabilizante de los azúcares y polioles sobre la estructura nativa de las proteínas cuando se almacenan congeladas y también ampliamente aceptada para explicar el efecto crioprotector de algunos azúcares durante la congelación de proteínas de estructura más compleja, como las miofibrilares. Al mantener la hidratación de la superficie proteica, las interacciones proteína-proteína son desfavorecidas impidiendo la agregación (Carpenter y Crowe, 1988).
- Por otro lado, los grupos oxhidrilo de moléculas de azúcar o de polioles interaccionan a través de enlaces de hidrógeno con los restos laterales de los restos aminoácidos orientados hacia la fase acuosa y también a su vez con las moléculas de agua. Por consiguiente, se crea una capa de hidratación protectora alrededor de la molécula de proteína, impidiendo la agregación. La diferencia con el mecanismo anterior es que en este caso se establecería una interacción entre las moléculas de los crioprotectores y la superficie de la proteína. (Xiong, 1997; Saito y col., 1999).

Independientemente del mecanismo por el cual la glucosa y el sorbitol ejercen su efecto crioprotector, lo que nos interesa cuantificar es el peso de cada uno de los procesos que llevan a la desestabilización de la emulsión. Una forma de alcanzar este objetivo es mediante un análisis comparativo de los parámetros IC % e ICF % previamente definidos.

A partir de las distribuciones de tamaño de partícula sin y con SDS de las emulsiones iniciales y las congeladas en ausencia y presencia de crioprotectores, se calcularon los correspondientes parámetros de desestabilización.

En primer lugar cabe aclarar que las emulsiones preparadas con CS en ausencia de crioprotector, las cuales mostraron una alta estabilidad en ausencia de crioprotectores (Figura 55), exhibieron una estabilidad mucho mayor con la adición de glucosa o sorbitol. Los IC % e ICF % fueron cercanos a cero, independientemente de la concentración de muestra y la temperatura de congelación. Por consiguiente, el análisis comparativo de los parámetros de estabilidad de las emulsiones se llevó a cabo sólo con aquellas preparadas con aislados de soja ASN y ASD.

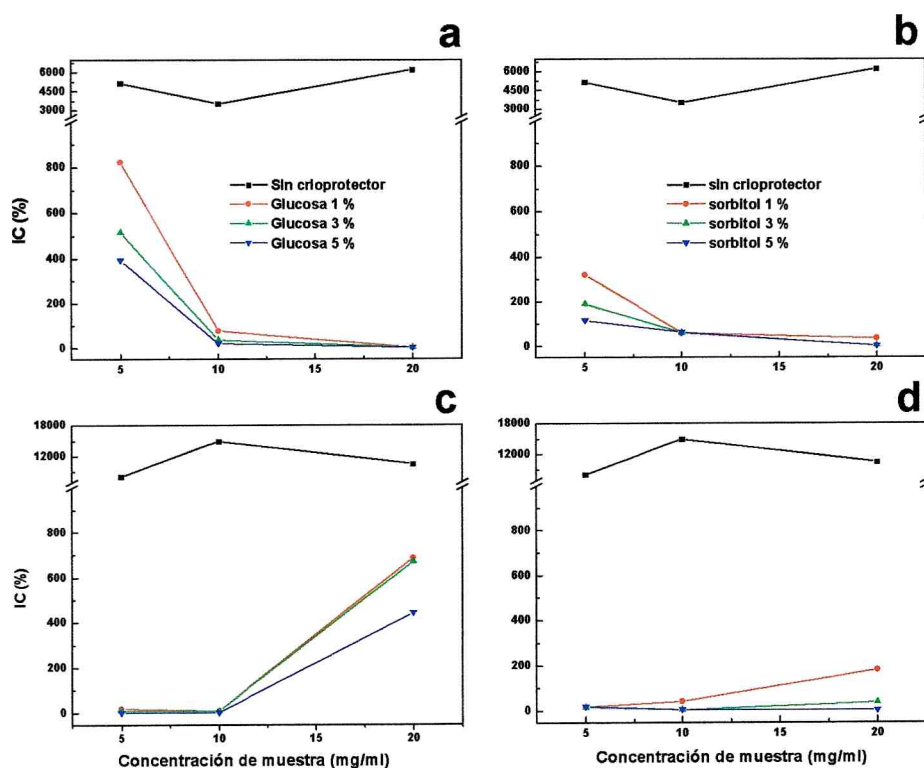


Figura 61: Índice de coalescencia (IC %) de emulsiones congeladas con ausencia y presencia de crioprotector (1%, 3% y 5% p/v). a) ASN – glucosa, b) ASN - sorbitol, c) ASD – glucosa, d) ASD – sorbitol.

La Figura 61 muestra la variación de IC % en las emulsiones congeladas a -80°C en presencia de glucosa o sorbitol (1, 3 y 5 % p/v en la fase acuosa). En presencia de crioprotector a cualquier concentración, los valores de IC % fueron mas de 5 veces menores a los de las emulsiones sin crioprotector (Figura 61 a, b). En el caso de las emulsiones ASN, se observa que a baja concentración de muestra (5 mg/ml) se obtienen los valores de IC % mayores, y con una tendencia decreciente con el aumento de la concentración de glucosa (IC % en el orden $1\% > 3\% > 5\%$). Al aumentar la concentración proteica los valores de IC % se hacen similares y cercanos a cero a 20 mg/ml. Cuando el crioprotector empleado fue el sorbitol, los resultados fueron similares pero alcanzando grados de coalescencia inferiores a los obtenidos para glucosa. Se hace evidente que la mayor disponibilidad de proteínas nativas de soja para cubrir la interfase junto con la presencia de un crioprotector ejerce un efecto sinérgico positivo para impedir la coalescencia.

Al analizar las Figuras 61 c y d, se puede ver que las emulsiones ASD también coalescen en un grado mucho menor cuando contienen crioprotector y su concentración es creciente. Sin embargo, el efecto del aumento de proteínas desnaturalizadas de soja fue totalmente opuesto al descrito para las emulsiones con proteínas nativas. A concentraciones de ASD 5 y 10 mg/ml, el IC % de la emulsión congelada fue cercano a cero, pero a 20 mg/ml se observó un abrupto incremento en la coalescencia con valores de IC % mayores a 400. Un factor que estaría influyendo de manera negativa a altas concentraciones es la elevada hidrofobicidad superficial de las proteínas desnaturalizadas de soja que promueve en presencia de glucosa o sorbitol el debilitamiento del film y/o la formación de agregados proteicos. En este caso, el aumento simultáneo de la concentración de proteína y crioprotector estarían ejerciendo un efecto antagónico para la estabilidad frente a la coalescencia.

Los índices de coalescencia + floculación (ICF %) de las emulsiones ASN congeladas a -80°C en presencia de crioprotectores fueron siempre superiores a IC % independientemente de la concentración de muestra en la dispersión, con valores muy elevados en el rango $3 \cdot 10^3 - 10^4$. Esto se observó, incluso en aquellas condiciones en donde $\text{IC \%} \approx 0$ (emulsiones preparadas con 10 y 20 mg/ml de ASN con alta concentración de glucosa o sorbitol). Además, este parámetro de desestabilización no exhibió ninguna tendencia en función de la concentración de muestra y de la concentración de crioprotector. De acuerdo a estos resultados, en las condiciones más favorables, la presencia de glucosa o sorbitol pudo evitar la coalescencia pero no la floculación. Como se dijo con anterioridad, la formación de

hielo obliga a las gotas a entrar en contacto en la fase acuosa no congelada lo cual favorece la formación de flóculos en los estadios iniciales del proceso de congelación, debido a la alta capacidad de agregación de la globulina 11 S.

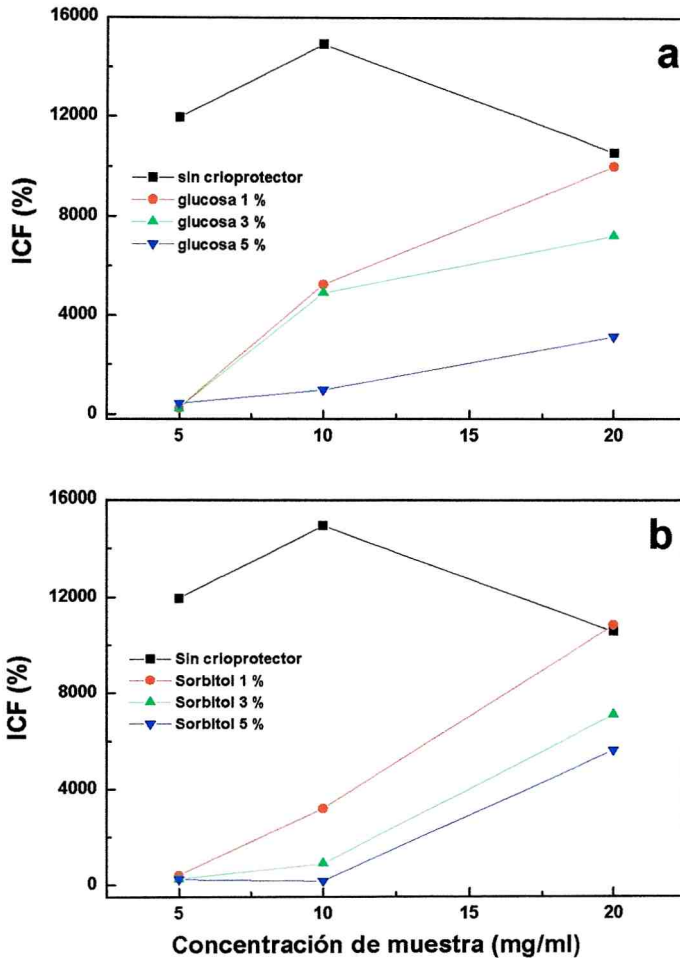


Figura 62: Índice de coalescencia + floculación (ICF %) de las emulsiones ASD congeladas a -80°C en ausencia y presencia de glucosa (a) o sorbitol (b) (1, 3 y 5 % p/v, en la fase acuosa). Las emulsiones se prepararon con dispersiones acuosas de 5, 10 y 20 mg/ml.

El ICF % de las emulsiones ASD congeladas a -80°C en presencia de crioprotectores mostró una tendencia similar a la observada para IC % en cuanto a la concentración de muestra y de crioprotector (Figura 62). Los valores más bajos de este parámetro se observaron para las emulsiones preparadas con las dispersiones acuosas de 5 mg/ml independientemente de la concentración de glucosa o sorbitol, y en el mismo orden del valor de GF % inicial de esta emulsión (≈ 220) (Figura 50). Este resultado indicaría que en estas condiciones durante el proceso de congelación no se

formaron nuevos flóculos y los que estaban presentes inicialmente antes del tratamiento de congelación no se desestabilizaron por coalescencia, acorde al índice de coalescencia casi nulo de estas emulsiones (IC % \approx 0, Figura 61).

En las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas a mayores concentraciones de muestra, ICF % aumenta pero en menor grado para la mayor concentración de sorbitol o glucosa (5 % p/v). Para la emulsión más concentrada en ASD (20 mg/ml) y menos concentrada en glucosa o sorbitol (1% p/v) resultaron los valores mas elevados de ICF %. Como se observa en la Figura 62, este parámetro fue incluso similar al observado para las mismas emulsiones en ausencia de crioprotector, lo cual estaría indicando que los crioprotectores a 1 % p/v estarían inhibiendo parcialmente la coalescencia pero no la formación de flóculos cuando la concentración proteica es muy alta.

En las emulsiones congeladas a -20° C se observaron las mismas tendencias respecto del efecto combinado de la concentración proteica y de crioprotector, aunque los valores absolutos no fueron coincidentes, lo cual podría estar indicando que los mecanismos de protección no son necesariamente los mismos. Serán requeridas futuras investigaciones en este campo para una comprensión más profunda de los resultados obtenidos.

Si los resultados presentados hasta el momento se analizan en base a la Figura 56 en la que se postulan los eventos que conducen a la desestabilización de la emulsión después de su congelación-almacenamiento congelado y descongelación, podría proponerse los siguientes puntos:

- La estabilidad de una emulsión o/w frente a la congelación es altamente dependiente del grado de formación de hielo.
- Los crioprotectores actuarían inhibiendo parcialmente la formación de hielo. En consecuencia, se controla la deshidratación del film interfacial.
- El mantenimiento de un film interfacial hidratado otorgaría estabilidad frente a la coalescencia.
- La inhibición de la formación de hielo disminuye la crioconcentración de componentes tanto en la fase acuosa continua como en la interfase
- La baja crioconcentración de proteínas daría un menor grado de agregación tanto en la interfase como en la fase continua.
- La formación de agregados interfaciales depende no sólo de la concentración proteica de la dispersión acuosa, sino también de las características de las proteínas.

- El aumento de la concentración proteica tiene un efecto promotor de la floculación sólo cuando las proteínas tienen alta tendencia a agregarse por interacciones hidrofóbicas, el cual es el caso de las proteínas desnaturalizadas.
- El control de la agregación proteica sería un factor fundamental para impedir la formación de flóculos (por inhibición de la interacción entre films interfaciales) y la ruptura del film interfacial (por colapso del mismo debido a la agregación proteica en la interfase).

Los crioprotectores actuarían por lo tanto, a dos niveles marcadamente diferentes:

- Manteniendo la integridad del film interfacial
- Disminuyendo la formación de agregados proteicos y de flóculos entre gotas.

Analizando los resultados obtenidos en base a estos principios se podría concluir que:

La actividad de crioprotección de las emulsiones de aislados de soja durante la congelación se expresa en mayor medida a nivel de la interfase, ya que se logró obtener emulsiones con grados de coalescencia nulos pero con formación de flóculos.

Conclusiones parciales

- ✓ De las muestras proteicas empleadas, el caseinato de sodio resultó ser el que le otorga mayor estabilidad a las emulsiones frente a la congelación, con valores muy bajos de coalescencia y floculación a las tres concentraciones estudiadas (5, 10 y 20 mg/ml).
- ✓ En presencia de glucosa o sorbitol a cualquiera de los niveles ensayados (1, 3 y 5%) resultó en emulsiones con grados de floculación y coalescencia prácticamente nulos.
- ✓ La formulación de emulsiones con dispersiones acuosas de aislados de soja desnaturalizados permite obtener emulsiones de menor tamaño de gota y menor grado de floculación en comparación con las preparadas con aislado nativo.
- ✓ Con las dispersiones acuosas más concentradas de aislados desnaturalizados se obtienen emulsiones con un grado de floculación casi nulo y de tamaño de gota similar a las preparadas con caseinato de sodio.
- ✓ En ausencia de crioprotectores, independientemente de la concentración de muestra en la dispersión acuosa y de la temperatura de congelación, las emulsiones preparadas con aislados nativos fueron muy inestables, exhibiendo separación gravitacional y una fase crema con formación de agregados proteicos insolubles con y sin aceite ocluido y aceite separado. Este hecho estaría relacionado con la agregación inducida durante la congelación de la globulina 11S adsorbida en la interfase.
- ✓ El empleo de aislados de soja desnaturalizados no le otorgó ningún efecto positivo a la estabilidad de las emulsiones congeladas en presencia de crioprotectores. La fase crema de las emulsiones de aislados denaturalizados mostró las mismas características que las preparadas con aislados nativos al ser descongeladas.
- ✓ El aumento de la concentración de muestra en las emulsiones de aislados de soja, tanto nativo como desnaturalizado tampoco ejerció ningún efecto protector.
- ✓ Las emulsiones preparadas con proteínas de aislado de soja tienen un comportamiento muy diferente a las de caseinato de sodio. Aunque es posible formular emulsiones de proteínas de soja con tamaño de gota similar a las de caseinato de sodio, la mayor estabilidad frente a la congelación se logró sólo en algunas condiciones particulares y siempre en presencia de crioprotectores.

- ✓ La concentración de glucosa o sorbitol que logra la mayor estabilidad de las emulsiones preparadas con aislados de soja nativos o desnaturalizados fue la mas alta de las ensayadas (5%).
- ✓ Las condiciones que permitieron alcanzar los menores valores de índice de coalescencia y floculación en las emulsiones con aislado nativo de soja fue la concentración más alta (20 mg/ml).
- ✓ La mayor disponibilidad de proteínas nativas de soja para cubrir la interfase junto con la presencia de un crioprotector ejercen un efecto sinérgico positivo para impedir la coalescencia.
- ✓ En las emulsiones con aislados desnaturalizados de soja la alta concentración proteica constituye un efecto negativo para la estabilidad frente a la congelación aun a altas concentraciones de crioprotector.
- ✓ La adición de glucosa o sorbitol como agentes crioprotectores tuvo un mayor efecto sobre la coalescencia que sobre la floculación.
- ✓ Se postuló un esquema de los procesos involucrados en la desestabilización durante el tratamiento de congelación/descongelación y los niveles en los que actúan los crioprotectores así como la influencia del tipo y concentración de proteínas presentes.

4.- CONCLUSIONES FINALES

4.- CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo se estudió la estabilidad de las emulsiones en tres condiciones diferentes: almacenamiento estacionario, esfuerzos de corte (agitación) y congelación.

La estabilidad global de las emulsiones frente al almacenamiento estacionario está gobernada por el tamaño de gota inicial y la formación y naturaleza de los flóculos. Los flóculos de estructura abierta, observados en las proteínas desnaturalizadas de soja y caseinato de sodio, producen un retraso en la velocidad de separación gravitacional en los primeros estadios del almacenamiento y en una etapa posterior forma fases cremas de alto grado de hidratación y estables frente a la coalescencia. La adición de NaCl antes de preparar las emulsiones tiene en la mayoría de los casos un efecto desestabilizante frente a la separación gravitacional por aumento del tamaño de gota inicial, aunque frente a la coalescencia solo produjo modificaciones negativas en la estabilidad de las emulsiones preparadas con las proteínas nativas. Precisamente, en este caso el grado de hidratación con una estructura reológica tipo gel es el factor principal que explica la estabilidad de las emulsiones preparadas con las proteínas desnaturalizadas.

Debido a las características de las proteínas de suero de soja, la desnaturalización térmica y la consecuente inactivación enzimática son un requisito para la aplicación de esta fracción proteica en alimentos. Las proteínas de suero desnaturalizadas demostraron no sólo tener mejores propiedades superficiales que las nativas, sino también la capacidad de formar emulsiones con una estabilidad frente a la coalescencia relativamente alta, aunque las mismas sean preparadas con dispersiones acuosas diluidas. Cabe destacar, que la estabilidad de estas emulsiones frente al cremado y a la coalescencia no se modificó por aumento de la fuerza iónica, dato importante si se tiene en cuenta que la adición de NaCl es un proceso muy común en la industria alimentaria. Utilizadas en mayor concentración, las proteínas de suero de soja podrían emplearse para la formulación de alimentos emulsionados.

La estabilidad de las emulsiones en condiciones de trabajo mecánico está fuertemente influenciada por el tipo de muestra, su concentración y la fuerza iónica de la fase acuosa. El efecto del tipo de muestra fue evidente al comparar el comportamiento de las emulsiones de aislado nativo y caseinato de sodio en relación con las de aislado desnaturalizado. El factor de peso, principalmente a concentraciones diluidas estaría relacionado con la resistencia del film interfacial en

condiciones de trabajo mecánico, el cual explicaría la estabilidad de las emulsiones de aislado nativo.

La adición de NaCl tiene un efecto desestabilizador para emulsiones preparadas con proteínas nativas, pero es eficientemente contrarrestado por el efecto de la concentración de proteína en la interfase; por tal motivo el efecto de ambos es antagónico. En la muestra desnaturalizada el efecto de la formación de multicapas actuaría de manera sinérgica con el de la fuerza iónica.

En este caso, también cabe destacar la utilidad del método turbidimétrico, como un método sencillo y de costo relativamente bajo para la evaluación de la floculación. Además, las condiciones de medición del analizador de tamaño de partícula son suficientemente drásticas para producir la disociación de los flóculos poco estables, con lo cual se subestima el grado de floculación.

La estabilidad de las emulsiones frente a la congelación es altamente dependiente de las características iniciales de la muestra y de la microestructura de las emulsiones. En ausencia de crioprotectores, la desestabilización de las emulsiones preparadas con proteínas de soja es consecuencia de la capacidad de agregación de las globulinas nativas oligoméricas a temperaturas de enfriamiento y congelación, mientras que la alta hidrofobicidad superficial explica la agregación y floculación en las emulsiones preparadas con el aislado desnaturalizado.

Cuando las emulsiones son congeladas y almacenadas a temperaturas subcero, donde se produce la cristalización de hielo y por ende una crioconcentración proteica, el estado desnaturalizado de las proteínas de soja no otorgó ningún efecto protector a las emulsiones resultantes. Incluso a altas concentraciones de muestra, como sería el caso de una emulsión alimentaria, el efecto fue opuesto al esperado, teniendo en cuenta que las emulsiones iniciales preparadas con aislados de soja desnaturalizados tienen menor grado de floculación y tamaño de gota que las preparadas con aislado nativo.

Era esperable que la desnaturalización térmica, la cual produce un aumento de la actividad interfacial y de la hidrofobicidad superficial, mejore la estabilidad de las emulsiones resultantes a altas concentraciones de muestra. Sin embargo, sólo en algunas condiciones se logró aumentar la estabilidad respecto a las emulsiones preparadas con las proteínas nativas. En estado congelado, donde se favorece la deshidratación del film interfacial y la agregación proteica, el efecto fue opuesto al observado en condiciones donde el film interfacial es sometido a esfuerzos de corte.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, cabe esperar que en futuras investigaciones, para mejorar la estabilidad de las emulsiones preparadas

con proteínas de soja frente a la congelación se requiera una modificación previa de las mismas, diferente de la desnaturalización térmica total. El objetivo en ese caso estaría centrado en producir la disociación de la estructura oligomérica para minimizar el efecto de la floculación de las emulsiones antes de la congelación y a la vez aumentar la carga superficial, dado que las proteínas con alta densidad de carga como las de caseinato les confiere a las emulsiones resultantes una elevada estabilidad frente a la congelación y el almacenamiento congelado.

Las emulsiones preparadas con aislados de soja mejoraron notablemente su estabilidad frente a la congelación al ser formuladas con glucosa o sorbitol como crioprotectores. Sin embargo, si bien se logró controlar la coalescencia no fue lo mismo con la floculación. En el futuro, para ampliar el estudio llevado a cabo en este trabajo, se requerirá un mayor conocimiento y ensayos adicionales relacionados con el tipo y concentración de crioprotector. De acuerdo a datos existentes actualmente en la bibliografía, otras proteínas distintas a la de soja, como las del lactosuero, tampoco logran estabilizar a las emulsiones sin la adición de crioprotectores. Se debe tener en cuenta además que en las emulsiones alimentarias, la adición de otros componentes no proteicos, como las sales, tienen un efecto negativo sobre la estabilidad al producir apantallamiento de cargas y competir con la proteína por las moléculas de agua, con lo cual las emulsiones se hacen aún más inestables frente a la congelación.

Aún, las emulsiones preparadas con caseinato de sodio se convierten en poco estables a la congelación cuando están formuladas con sales de calcio. Se hace por lo tanto necesario un estudio más profundo de las interacciones entre componentes proteicos, sales y crioprotectores y su relación con la estabilidad de emulsiones congeladas.

5.- BIBLIOGRAFÍA

5.- BIBLIOGRAFÍA

Alba, F., Crawley, G.M., Fatkin, J., Higgs, D.J.M., Kippax, P.G. Acoustic spectroscopy as a technique for the particle sizing of high concentration colloids, emulsions and suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **153**, 495-502 (1999).

Anton, M., Beaumal, V, Brossard, C., Llamas, G. y LeDenmat, M. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk en *Food emulsions and dispersions*. Anton, M (ed). Kerala, India: Research Singpost, páginas 15-28 (2002).

AOAC, *Official methods of Analysis*. 14th edition: Williams, S (ed). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.

Arakawa, T. y Timasheff, S.N. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*. 21, 6536-6539 (1982).

Badley, R.A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J.P., y Stubbs, J.M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **412**, 214-228 (1975).

Berger, K.G. *Ice creams*, en *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. (ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., páginas 413-491 (1997).

Boode, K., and Walstra, P. Partial coalescence in oil-in-water emulsions 1: Nature of aggregation. *Colloid and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. **81**, 121-137 (1993).

Boode, K., Walstra, P. and de Groot-Mostert, A.E.A. Partial coalescence in oil-in-water emulsions 2: Influence of the properties of the fat. *Colloid and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. **81**, 139-151 (1993).

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254 (1976).

Britten, M. y Giroux, H.J. Coalescence index of protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*. **56**, 792-795 (1991).

Carpenter, J.F. and Crowe, J.H. The mechanism of crioprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*. **25**, 244 (1988).

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

Cheftel, J.C., Cuq, J. L. y Lorient., D *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia Páginas. 257-275 (1989).

Cramp, G.L., Docking, A.M., Ghosh, S. y Coupland, J.N. On the stability of oil in water emulsions to freezing. *Food Hydrocolloids*. **18**, 899-905 (2004).

Creamer, L.K. y Berry, G.D. A study of the properties of dissociated bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research*. **42**, 169-183 (1975).

Couper, A. *Surface tension and its measurement*, en *Physical Methods of Chemistry*., Vol. IXA, Cap. 1, Rossiter, B.W y Baetzold, R.C (ed). New York: John Wiley and Sons (1993).

Dagorn-Scaviner, C., Guéguen, J. y Lefebvre, J. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *Journal of Food Science*. **52**, 335-341 (1986).

Damodaran, S. Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*. **70(3)**, 54-66 (2005).

Das, A.K. y Ghosh, P.K. Concentrated emulsions: investigation of polydispersity and droplet distortion and their effect on volume fraction and interfacial area. *Langmuir*. **6**, 1668-1675 (1990).

Dickinson, E. *An introduction to Food Colloids*. Oxford: Oxford University Press. (1992).

Dickinson, E., Flint, F.O y Hunt, J.A. Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. **2**, 389-397 (1989).

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

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

Dickinson, E., y Mc Clements, D.J. *Advances in Food Colloids*. Glasgow: Blackie Academic & Professional (1996).

Dickinson, E., Radford, S.J. y Golding, M. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*. **17**, 211-220 (2003).

Dickinson, E. y Stainsby, G. *Advances in Food Colloids and Foams*. Reino Unido: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.(1988).

Ford, L., Borwankar, R., Martin Jr., R.W y Holcomb, D.N. *Dressing and sauces en Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. New York: Marcel Dekker, Inc., páginas 361-412 (1997)

Friberg, S.E. *Emulsion stability en Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. New York: Marcel Dekker, Inc., páginas 1-55 (1997)

- Fox, F.P. y Kelly, A.L. *The caseins en Proteins in food processing*. Yada, R.Y (ed). Cambridge, Reino Unido: CRC Press y Woodhead Publishing limited. (2004).
- Fukushima, D. *Soy proteins en Proteins in food processing*. Yada, R.Y (ed). Cambridge, Reino Unido: CRC Press y Woodhead Publishing limited. (2004).
- Graham, D.E. y Phillips, M.C. Protein at liquid interfaces. Part 5. *Journal of Colloid and Interface Science*. **76**, 240-252 (1980).
- Haque, Z. y Kinsella, J.E. Emulsifying properties of food proteins: bovine serum albumin. *Journal of Food Science* **53 (2)**, 416-426 (1988).
- Hartel, R.W. *Crystallization in foods*. Gaithersburg Md: Aspen Publishers (2001).
- Hashizume, K., Kariuchi, K., Koyama, E. y Watanabe, T. Denaturation of soybean protein by freezing. Part I. *Agricultural Biological Chemistry*. **33(4)**, 449-459 (1971).
- Hill, S.E. *Emulsions en Methods of testing of protein functionality*. Hall, G.M (ed). London: Blackie Academic & Professional. Páginas 175-178 (1996).
- Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces. New York: Academic Press, páginas 176-178 (1992).
- Jiménez-Colmenero, F. y García-Matamoros, E. *Effects of washing on the properties of mechanically deboned meat en Proceedings of the 27th European Meeting of Meat Research Workers*. Viena: Pränd O. (ed), páginas 351-354 (1981).
- Kato, A., and Nakai, S. Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **624(1)**, 13-20 (1980).
- Kauten, R.J., Maneval, J.E y Mc Carthy. Fast determination of spatially localized volume fractions in emulsions *Journal of Food Science* **56**, 799-801 (1991).
- Kinsella, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **21**, 197-262 (1984).

- Kinsella, J.E. In *Methods for Isolation in Food Biotechnology* Knorr, D (ed.) New York: Marcel Dekker, Inc. Páginas 363-364 (1986).
- Liener, I.E. Factors affecting the nutritional quality of soy products. *Journal of the American Oil of Chemists' Society*. **58**, 406-415 (1981).
- Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. y Sharon, N. Subunit structure of soybean agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*. **249**, 1219-1224 (1974).
- Lucassen-Reynders, E.H. Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*. **12**, 1-12 (1993).
- Mackie, A.R., Gunning, A.P., Pugnali, L.A., Dickinson, E., Wilde, P.J. y Morris, V.J. Growth of surfactants domains in protein films. *Langmuir*. **19**, 6032-6038 (2003).
- Márquez, A.L., Palazolo, G.G. y Wagner, J.R. Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja I: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites (International Journal of Fats and Oils)*. **56 (1)**, 59-66 (2005).
- Martin, A.H., Bos, M.A. y van Vliet, T. Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*. **16**, 63-71 (2002).
- Mascheroni, R.H. y Calvelo, A. Modelo de descenso crioscópico en tejidos cárnicos. *La Alimentación Latinoamericana*. **12**, 34.
- Matveev, Y. I. Modification of the method for calculation of the C'g and T'g intersection point in state diagrams of frozen solutions. *Food Hydrocolloids*. **18**, 363-366 (2004).
- McClements, D.J. *Food Emulsions: principles, practice and techniques*. New York: CRC Press (1999).

McClements, D.J. Protein-stabilized emulsions. *Current opinion in Colloid and Interface Science*. **9**, 305-313 (2004).

Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K. y Snabre, P. Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*. 50, 445-456 (1999).

Mitidieri, F.E., Puppo, M.C. y Wagner, J.R. *Comportamiento reológico y coalescencia de fase crema de emulsiones estabilizadas por aislados de soja en Ingeniería de Alimentos. Nuevas Fronteras en el siglo XXI. Tomo I: Propiedades físicas y aspectos fisicoquímicos en relación con los procesos alimentarios*. Fito, P., Mulet, A., Chiralt, A y Andrés, A. (Ed.) Editorial UPV, páginas 275-280 (2001).

Mitidieri, F. E. y Wagner, J. R.. 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 (6)**, 547-557 (2002).

Ntainianas, H.A. y Whitney, R. McL. Calcium as indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. *Journal of Dairy Science*. 44, 65-81 (1964)

Palanuwech, J., Potineni, R., Roberts, R.F. y Coupland. J.N. A method to determine free fat in emulsions. *Food Hydrocolloids*. **17**, 55-62 (2003).

Pan, L.G. , Tomás, M. C. y Añón, M.C. Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*. **5(2)**, 135-143 (2002).

Pearce, K.N y Kinsella, J.E. Emulsifying properties of food proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **26**, 716-723 (1978).

Phillips, M.C. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*. **35**, 50-57 (1981).

- Rawle, A. Basic principles of particle analysis. *Malvern Mastersizer Limited, technical paper*. (2005).
- Reddy, S.R. y Fogler, H.S. Emulsion stability: determination from turbidity. *Journal of Colloid Interface Studies*. **79**, 101-104 (1981).
- Relkin, P. y Sourdet, S. Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*. **19**, 503-511 (2005).
- Robins, M. M. Emulsions-creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. **5**, 265-272 (2000).
- Roos, Y.H. *Phase transitions in foods*. San Diego: Academic Press, Inc. (1995)
- Saito, H., Kawagishi, A., Tanimoto, T., Okada, S., Komatsu, H. y Handa, T. Coalescence of lipid emulsions in floating and freeze-thawing processes: examination of coalescence transition state theory. *Journal of Colloid and Interface Science*. **219**, 129-134 (1999).
- Sorgentini, D.A., y Wagner, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*. **23 (5)**, 489-507 (1999).
- Sorgentini, D.A. y Wagner, J.R.. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research International*. **35**, 721-729 (2002).
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. y Añón, M.C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationships of soluble and insoluble fractions *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**, 2471-2479 (1995).
- Stainsby, G. Foaming and emulsification en *Functional properties of food macromolecules*. Mitchell, J.R. y Ledward, D.A. (ed). Elsevier applied science Publishers: Reino Unido (1986).
- Swift, C.E., Lockett, C. y Fryar, A.J. Comminuted meat emulsions: capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technology*. **15**, 468-473 (1961).

Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R. y Mc Clements, D.J. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. **18**, 1033-1043 (2004).

Thiebaud, M., Dumay, E.M. y Cheftel, J.C. Pressure-shift freezing of o/w emulsions: influence of fructose and sodium alginate on undercooling, nucleation, freezing kinetics and ice crystal distribution. *Food Hydrocolloids*. **16**, 527-545 (2002).

Tornberg, E., y Ediriweera, N. 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 (1988).

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

Tornberg, E.; Olsson, A., y Persson, K. *The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions* en *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. (ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., páginas 267-391 (1997).

Utsumi, S., Matsamura, Y. y Mori, T. *Structure-function relationships of soy proteins* en *Food proteins and their applications*. Damodaran, S. and Paraf, A (ed). New York : Marcel Dekker, Inc., páginas 257- 291 (1997).

van Aken, G.A., Blijdenstein, T. B. y Hotrum, N.E. Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilised emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. **8**, 371-379 (2003).

Wagner, J.R. *Propiedades superficiales en Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Bartholomai, G. B y Pilosof, A.M.R. (ed.). Buenos Aires: Eudeba (2000).

Wagner, J.R. y Guéguen, J. Effects of dissociation, deamidation and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1993-2000 (1995).

Wagner, J.R. y Guéguen, J. Surface functional properties of native, acid treated and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47 (6)**, 2173-2180 (1999a).

Wagner, J.R., y Guéguen, J. Surface functional properties of native, acid treated and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47(6)**, 2181-2187, (1999b).

Walstra, P. *Formation of emulsions in Encyclopedia of emulsion technology*. Vol. 1: Basic theory. Becher, P. (ed). New York: Marcel Dekker, Inc. páginas 57-127 (1983).

Walstra, P. Casein-submicelles: do they exist?. *International Dairy Journal*. **9**, 189-192 (1999).

Wolf, W.J y Briggs, D.R Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 186-199 (1956).

Wolf, W.J y Sly, D.A. Cryoprecipitation of soybean 11S protein. *Cereal Chemistry*. **44**, 653-668 (1967).

Xiong, Y.L. *Protein denaturation and functionality losses en Quality in frozen foods*, Ericsson, M. C y Hung, Y.C. (ed) USA: Chapman & Hall, páginas 111-140 (1997).

Yamauchi, F., Yamagishi, T. y Iwabuchi, S. Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean protein. *Food Reviews International*. **7(3)**, 283-322 (1991).

Ye, A. y Singh, H. Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*. **15**, 195-207 (2001).