



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (UNLP)
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

PROPIEDADES INTERFACIALES Y ESPUMANTES DE PROTEINAS Y PEPTIDOS DE AMARANTO

Lic. Agustín J. Bolontrade

*Trabajo de tesis presentado para optar por el título académico de Doctor de la Facultad
de Ciencias Exactas, realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecología de los Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET, La Plata, Argentina)*



Directora: Dra. Ma. Cristina Añón
Co-Directora: Dra. Adriana A. Scilingo

2016

“Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés”

Louis Pasteur

Agradecimientos

A mis directoras de Tesis, Cristina y Adriana, por buscar siempre lo mejor de mí como profesional y persona, porque dejaron en mí una marca. A Cristina, por su invitación a realizar este trabajo y haberme permitido formar parte de su grupo, por haberme dado su confianza, por sus enseñanzas, por sus consejos cuando los necesité, por su motivación, por su aliento en situaciones de la vida misma, por brindarme su tiempo. A Adriana, por su calidez y su ternura, por escucharme e intercambiar pensamientos, por preocuparse siempre por mí, por su “hola lindo”. A ambas les estaré eternamente agradecido.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme otorgado la formación para acceder al grado de Doctor.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación, al programa ECOS, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el otorgamiento de las becas y subsidios que me permitieron realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que compartieron mucho o poco tiempo pero que hicieron de ese un lindo lugar de trabajo, por su compañerismo, por los momentos divertidos que pasamos, porque me llevo los mejores recuerdos.

A todo el personal técnico y administrativo del CIDCA, por su buena predisposición y atención cuando los necesité.

A mis padres, Griselda y Juan, por el apoyo incondicional, por alentar mi formación, por compartir mis alegrías y tristezas, por el ejemplo.

A Pani, Alejandra y Cecilia por las discusiones de interface compartidas; y a los chicos del laboratorio por su amabilidad y buen trato, a todos por haberme hecho conocer el carnaval.

A Marc Anton y su grupo del INRA-Nantes, por haberme abierto las puertas del laboratorio y haberse preocupado por mí durante mis estadías, por las clases de francés durante el café, por haberme hecho sentir uno más de ellos.

A Cachito y su familia, por haberme recibido y abrirme las puertas de su hogar, por los especiales y hermosos momentos compartidos.

A Joaquín, Nacho, Jorge y Cristian, porque compartimos buenos y malos momentos, porque nos acompañamos, porque no los voy a olvidar nunca, porque fueron mis nobles compañeros en esta larga etapa y ahora son mis amigos, porque crecimos juntos.

A Sergio, Jorge, Emiliano, Ayelén, Fernanda y Natalia, por los momentos de escritorio compartidos, por su compañerismo, por las lindas charlas.

A mis compañeros de almuerzo, por compartir el descanso, por las charlas, por el intercambio de ideas.

A mis amigos, porque sin entender de qué se trataba este trabajo siempre me apoyaron, entendieron mis ausencias, me alentaron a terminarlo, por ser mis amigos.

A Rosita e Inés, porque compartieron conmigo esta última etapa de trabajo en donde haciendo huecos terminaba de escribir, porque me dieron una mano muy grande, porque me ayudaron a poder ausentarme para terminar esta tesis, porque son excelentes compañeras.

A quien en algún momento se siente a leer este trabajo.

Indice

1. Introducción	1
1.1. El amaranto	1
1.1.1. Contexto histórico y situación actual	1
1.1.2. El grano y su cultivo.....	1
1.1.3. Las proteínas. Características estructurales.....	2
1.1.4. Modificación estructural de las proteínas y sus propiedades funcionales	3
1.2. Propiedades superficiales	4
1.2.1. Difusión	5
1.2.2. Adsorción	6
1.2.3. Reordenamiento	7
1.2.4. Reología interfacial.....	7
1.2.4.1. Reología interfacial dilatacional	8
1.3. Propiedades espumantes.....	9
1.3.1. Formación de la espuma	10
1.3.1. Estabilidad de la espuma.....	11
1.3.1.1. Drenado.....	11
1.3.1.2. Desproporción y colapso.....	12
2. Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	15
3.1. Materiales	15
3.1.1. Harina de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	15
3.1.2. Aislado proteico de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	15
3.1.3. Aislados proteicos hidrolizados y aislado proteico modificado térmicamente	16
3.1.4. Composición química del aislado proteico, aislado proteico modificado térmicamente y aislados proteicos hidrolizados.	17
3.1.5. Soluciones reguladoras del estado ácido-base y de la fuerza iónica (buffers).	17
3.1.6. Soluciones proteicas.....	18
3.2. Caracterización estructural y composición	18
3.2.1. Determinación de la solubilidad proteica	18
3.2.2. Análisis de la composición polipeptídica.....	19
3.2.2.1. Reactivos y equipo	19
3.2.2.2. Preparación de las muestras y siembra	20
3.2.2.3. Electroforesis nativa.....	21

3.2.2.4. Electroforesis desnaturalizante.....	21
3.2.2.5. Electroforesis desnaturalizante en medio reductor	21
3.2.2.6. Electroforesis bidimensional.....	21
3.2.2.7. Tinción de bandas	22
3.2.2.8. Obtención de imágenes digitales.....	22
3.2.3. Determinación de la hidrofobicidad superficial.....	22
3.2.3.1. Determinación de la capacidad de unión a una sonda hidrofóbica.....	23
3.2.3.2. Determinación de la fluorescencia intrínseca.....	23
3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido.....	24
3.2.5. Dicroísmo circular.....	25
3.2.6. Distribución de tamaño de partículas	26
3.2.7. Microscopía electrónica de transmisión	26
3.3 Propiedades interfaciales.....	26
3.3.1. Propiedades interfaciales dinámicas en interfaces adsorbidas.....	27
3.3.1.1. Tensiómetro de gota dinámico.....	27
3.3.1.2. Tensiómetro de volumen de gota.....	28
3.3.1.3. Cinéticas de adsorción a la interface aire/agua.....	30
3.3.1.4. Reología interfacial dilatacional.....	33
3.3.2 Propiedades interfaciales estáticas en interfaces adsorbidas.....	34
3.3.2.1 Tensiómetro de anillo de duNouy- balanza de torsión.....	34
3.3.2.2. Isotermas de adsorción a la interface aire/agua en estado de equilibrio termodinámico.....	37
3.3.2.3. Reología interfacial dilatacional.....	38
3.3.3. Propiedades interfaciales estáticas en interfaces esparcidas.....	39
3.3.3.1 Balanza de Langmuir	39
3.3.3.2. Espectroscopía infrarroja de reflectancia-absorbancia	41
3.3.3.3. Microscopía de fuerza atómica	43
3.3.3.4. Microscopía de fluorescencia.....	44
3.4 Propiedades espumantes.....	45
3.4.1. Espumómetro.....	45
3.4.1.1. Parámetros que permiten evaluar la capacidad de formación de espuma	47
3.5 Análisis estadístico	49
4. Resultados y discusión	50
4.1. Caracterización estructural del aislado proteico de <i>A. hypochondriacus</i> (HA).....	50
4.1.1. Calorimetría diferencial de barrido.....	50
4.1.2. Análisis de la composición polipeptídica.....	51

4.1.2.1. Análisis de la composición polipeptídica en dos dimensiones en condiciones control	51
4.1.2.2. Análisis de la composición polipeptídica de las fracciones solubles e insolubles en las condiciones de trabajo.	52
4.1.3. Dicroísmo circular.....	54
4.1.4. Análisis del tamaño de partículas.....	56
4.1.4.1. Distribución del tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz.	56
4.1.4.2. Microscopía de fuerza atómica de la solución proteica.....	58
4.1.5. Solubilidad.....	63
4.2. Propiedades superficiales	64
4.2.1. Adsorción en la interface aire-agua	64
4.2.1.1. Difusión	65
4.2.1.2. Adsorción y reordenamiento	70
4.2.1.3. Tensión superficial en el equilibrio	74
4.2.2. Viscoelasticidad interfacial.....	76
4.2.2.1 Comportamiento viscoelástico de la película interfacial durante el proceso de adsorción.....	76
4.2.2.2. Viscoelasticidad de la interface en función de la concentración	78
4.2.2.3 Barrido de frecuencias de deformación.....	81
4.2.3. Isotermas de adsorción de la proteína en la interface	82
4.2.4. Isotermas de compresión de la proteína esparcida en la interface.....	86
4.2.4.1 Efecto del cambio de pH y μ al momento de esparcir la proteína sobre la interface.	88
4.2.5. Estructura secundaria de la proteína esparcida en la interface	93
4.2.5.1. Influencia de la condición de la interface sobre la estructura secundaria de la proteína esparcida	98
4.2.6. Análisis por microscopía de las películas de Langmuir-Blodgett	101
4.3 Propiedades espumantes.....	109
4.3.1. Capacidad de formación de espuma.....	110
4.3.1.1. Espumas preparadas con la fracción soluble y total de proteínas.....	110
4.3.1.2. Dependencia de la concentración y de la fracción insoluble sobre las propiedades espumantes en la condición pH 2 μ 0,5.	114
4.3.2. Características del espumado y su relación con las propiedades interfaciales.	119
4.3.3. Estabilidad de la espuma.....	120
4.3.3.1. Parámetros estimativos de la estabilidad de la espuma ($t_{1/2}$ y VLE_{10min}).....	121
4.3.3.2. Modelado de la desestabilización de la espuma.....	123
4.3.3.3. Análisis de imágenes	127

4.3.3.4. Estabilidad de la espuma en la condición pH 2 μ 0,5 a distintas concentraciones. Efecto de la fracción insoluble.	129
4.3.4. Reología interfacial y su relación con la estabilidad de la espuma.	134
4.4. Propiedades superficiales y espumantes de las proteínas modificadas por tratamiento térmico e hidrólisis	136
4.4.1. Caracterización estructural	136
4.4.1.1. Calorimetría diferencial de barrido	136
4.4.1.2. Análisis de la composición polipeptídica.....	137
4.4.2. Propiedades superficiales	141
4.4.2.1. Adsorción y reordenamiento en la interface aire-agua	142
4.4.2.2. Isotermas de adsorción de la proteína a la interface.....	144
4.4.2.3. Isotermas de compresión de la proteína esparcida en la interface	145
4.4.3. Propiedades espumantes	147
4.4.3.1. Capacidad de formación de espuma	148
4.4.3.2. Estabilidad de la espuma.....	152
5. Conclusiones.....	156
6. Bibliografía	160

1. Introducción

1.1. El amaranto

1.1.1. Contexto histórico y situación actual

El amaranto es un vegetal autóctono de América Central. Fue un cultivo muy importante de las comunidades maya, azteca e inca, quienes lo utilizaron tanto para alimentación como rituales religiosos (Saunders y Becker, 1984). Con la colonización de América por los españoles, y la imposición del catolicismo, el amaranto fue prohibido de manera de limitar las creencias paganas con lo cual cayó en desuso.

En 1975 la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (United Academy of Sciences, 1975) llevó a cabo un estudio por el cual consideró al amaranto como un cultivo poco explotado y con potencial futuro por su capacidad de crecer en zonas desfavorables y sus propiedades nutricionales.

En la actualidad varias investigaciones se han focalizado en la búsqueda de nuevos recursos proteicos para satisfacer las demandas de alimentos (Aiking, 2011); las proteínas vegetales se presentan como una alternativa promisorio para sustituir parcialmente la proteína animal en la nutrición humana (Tavano y col., 2008).

1.1.2. El grano y su cultivo

El amaranto taxonómicamente pertenece a la división Angiospermae, clase Dicotyledonae, serie Centrospermae, familia Amaranthaceae, género *Amaranthus* (Tapia, 1997) siendo considerado un pseudocereal por compartir algunas características con los cereales. Tiene un metabolismo C4, con una mayor eficiencia en la fijación de dióxido de carbono y mayor velocidad de crecimiento. Es resistente a sequías y a suelos salinos, lo que aumenta su potencial como cultivo en zonas con condiciones inferiores a las óptimas (Bressani, 1994).

El grano de amaranto está compuesto, en promedio, por 59 % de carbohidratos, 13,6 % de proteínas, 11,3 % de agua, 7 % de lípidos, 6,7 % de fibra dietaria, 2,9 % de cenizas (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21).

Sus proteínas de reserva son apropiadas para el consumo humano ya que el balance aminoacídico se acerca al óptimo sugerido por la Organización de Alimentos y Agricultura, FAO (FAO/WHO, 1973). Su composición en lisina es relativamente alta (3,2 a 6,4 %) en comparación a los cereales más comunes, y su concentración de aminoácidos azufrados (2,6 a 5,5 %) es mayor al de las legumbres más importantes como arvejas, porotos, soja (Segura Nieto y col., 1994).

1.1.3. Las proteínas. Características estructurales.

Las proteínas pueden clasificarse de acuerdo a características como funcionalidad o propiedades fisicoquímicas. La clasificación de Osborne agrupa las proteínas de acuerdo a su solubilidad denominando albúminas a las proteínas solubles en agua, globulinas a las solubles en soluciones salinas diluidas y neutras, glutelinas a las solubles en soluciones ácidas o básicas, y prolaminas a las solubles en etanol 50-80 % (Osborne, 1924).

La fracción globulinas es cuantitativamente el grupo más importante encontrándose en el aislado en un porcentaje cercano al 56 %. La fracción albúminas se encuentra en segundo lugar, representando aproximadamente el 26% de las proteínas totales. La fracción glutelinas representa el 18 %, y finalmente las prolaminas representan la fracción minoritaria entre el 1,5 y 11 %. Estos valores corresponden a los hallados en nuestro laboratorio (Castellani, 2000), no encontrándose en bibliografía un total consenso. Cabe señalar que el protocolo de extracción seguido contempla la extracción diferencial de la fracción globulina-P, que otros autores normalmente no llevan a cabo. Como consecuencia de la diferencia en la extracción las fracciones proteicas de la harina se distribuyen en proporción diferente (Seguro-Nieto y col., 1994; Marcone y Yada, 1992).

Las globulinas están compuestas por cantidades semejantes de globulina 11S (Segura-Nieto y col., 1994; Chen y Paredes-López, 1997; Martínez y col., 1997) y globulina-P, una globulina tipo 11S presente en el amaranto con características particulares, entre las que se destacan su gran tendencia a polimerizarse y la menor solubilidad que presenta en soluciones salinas neutras (Martínez y col., 1997; Quiroga, 2008). En menor proporción se encuentra la globulina 7S descrita por Barba de la Rosa y col. (1992) y Martínez y col. (1997). La globulina 11S está formada por un hexámero de masa molecular entre 300 y 360 kDa (Marcone, 1999). El mismo está formado por subunidades de masa molecular entre 50 y 70 kDa unidas por interacciones covalentes, cada una de ellas formada por un polipéptido ácido de masa molecular 32-34 kDa (péptido tipo A) y un polipéptido básico de masa molecular 20-22 kDa (péptido tipo B) unidos por un enlace disulfuro. En la globulina-P se observa la presencia de un polipéptido de 56 kDa (P56) el cual podría ser

precursor de las subunidades A-B previo a la proteólisis postraduccional que conduce a la síntesis de las subunidades maduras (Martínez y col., 1997, Castellani y col., 1998; Castellani y col., 2000). La fracción albúminas es la que se extrae de la harina en una primera instancia con agua. Está constituida por polipéptidos de diversos tamaños, la mayoría entre 10 y 43 kDa (Marccone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992), aunque también han sido detectados otros polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kDa (Martínez y Añón, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992, Konishi y col., 1991). En general se destacan algunos polipéptidos con masas moleculares de 12 kDa y 35 kDa. La mayoría de los polipéptidos son monoméricos, no dissociables por 2-ME. Se conoce también que la estabilidad térmica de esta fracción proteica es muy baja siendo su temperatura de desnaturalización de 64 °C (Martínez y Añón, 1996).

La fracción glutelinas, si bien se diferencia de las globulinas por ser soluble sólo a pHs extremos, presenta una composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina-P (Abugoch, 2006).

Las prolaminas constituyen una fracción formada por polipéptidos de baja masa molecular. Existen algunas discrepancias acerca de los componentes mayoritarios que la constituyen. Gorinstein y col., (1991 y 1996) informan que los péptidos mayoritarios tienen pesos moleculares entre 10 y 14 kDa, mientras que Segura-Nieto y col. (1992) encuentran algunos péptidos de masa molecular algo más alta, entre 16 y 22 kDa.

1.1.4. Modificación estructural de las proteínas y sus propiedades funcionales

Con el objetivo de mejorar las propiedades interfaciales y espumantes de las proteínas de amaranto se recurrió a la modificación de las mismas por tratamiento térmico e hidrólisis enzimática. Ambos tratamientos han conducido a mejoras en estas propiedades para otras proteínas (Kilara y Panyam, 2003).

Por tratamiento térmico se han logrado mejoras en las propiedades espumantes de las proteínas de suero lácteo (Zhu y Damodaran, 1994) y clara de huevo (Nicorescu y col., 2011), entre otras. La hidrólisis enzimática es una técnica utilizada frecuentemente con el fin de mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas (Panyam y Kilara, 1996). De las diferentes maneras de obtener productos de hidrólisis, la hidrólisis enzimática es la preferida dado su simplicidad en el control de la reacción y la reducción de formación de productos secundarios

(Mannheim y Cheryan, 1992). Por medio de esta se han obtenido mejores propiedades espumantes en diversas proteínas, entre ellas proteínas de soja (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Molina Ortiz y Wagner, 2002), girasol (Martínez y col., 2005), favorecidas principalmente por el incremento de la solubilidad, propiedad relacionada directamente con la capacidad de formación de espumas. Condés y col. (2009) demostraron un incremento en la densidad y estabilidad de espumas formadas a pH 8,5 a partir de aislados de amaranto hidrolizados con tripsina.

En cuanto a los mecanismos de hidrólisis y enzimas utilizadas, son varias las enzimas que han sido estudiadas con resultados promisorios (Govindaraju y Srinivas, 2006), entre ellas se encuentran la alcalasa y la tripsina, las cuales fueron seleccionadas en nuestro trabajo para realizar el proceso de hidrólisis.

Los hidrolizados enzimáticos se clasifican en tres grupos dependiendo del grado de hidrólisis alcanzado, lo que determina su aplicación. Hidrolizados de bajo grado de hidrólisis (menor de 10 %) los cuales muestran propiedades funcionales mejoradas, hidrolizados de grado de hidrólisis variable utilizados para la mejora del “flavor”, e hidrolizados de grado de hidrólisis alto (mayor de 10 %) los cuales son utilizados en suplementos dietarios y a los que en algunos casos se les han atribuido propiedades fisiológicas (Vioque y col., 2001; Orsini y col., 2011).

1.2. Propiedades superficiales

Las proteínas gracias a su naturaleza anfifílica y su flexibilidad pueden acomodarse en distintas interfaces líquido-líquido y gas-líquido y provocar el descenso de la tensión superficial (Vos van Vliet, 2001) característica que les otorga funcionalidad como espumantes en la interface aire-agua, llamada superficie (Everett, 1988), y emulsificante en la interface aceite-agua. La termodinámica clásica define a la tensión superficial (γ) como el trabajo (W) necesario para incrementar en una unidad el área de una superficie (A) (Dickinson y Stainsby, 1982; Hiemenz, 1986),

$$\Delta G = \gamma \Delta A \quad \text{ec. 1.1}$$

El descenso de la tensión superficial en presencia del tensioactivo se denomina presión superficial (π).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{ec. 1.2}$$

Donde γ_0 refiere a la tensión superficial del solvente puro, y γ en presencia del tensioactivo.

Las proteínas en solución mantienen su estructura terciaria y cuaternaria mediante un equilibrio entre fuerzas hidrofóbicas, van der Waals, puente hidrógeno, interacciones electrostáticas (Lehninger y col., 1993). Esta estructura dinámica va a definir las propiedades superficiales, con lo cual modificaciones del entorno como temperatura, pH, fuerza iónica impactarán directamente sobre las mismas.

La llegada de la proteína a la interface y su acomodamiento en la misma se puede estudiar en varias etapas, separadas principalmente en difusión, adsorción y reordenamiento, todas ellas termodinámicamente favorables contribuyendo al descenso de la energía libre del sistema (MacRitchie, 1990).

1.2.1. Difusión

A bajas concentraciones de proteína en solución la adsorción se ve limitada por el proceso de difusión de la proteína a la interface de acuerdo a la ecuación de Ward y Torday (Ward y Torday, 1946)

$$\Gamma = 2C_0 \left(\frac{D_s t}{3,14} \right)^{1/2} \quad \text{ec. 1.3}$$

donde Γ corresponde a la concentración de proteínas en la interface, C_0 a la concentración de la proteína en el seno de la solución, D_s al coeficiente de difusión calculado y t al tiempo.

Si se grafica Γ vs $t^{1/2}$ se obtiene una relación lineal, cuya pendiente (k_{dif}) es directamente proporcional a D_s .

El cambio de Γ en el tiempo se puede expresar como (1.4)

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \left(\frac{d\Gamma}{d\pi} \right) \left(\frac{d\pi}{dt} \right) \quad \text{ec. 1.4}$$

Si $\left(\frac{d\Gamma}{d\pi} \right)$ es constante, como ha sido demostrado para seroalbúmina bovina (Graham y Phillips, 1979a) y para apolipoproteína A-I (Shen y Scanu, 1980), cabe asumir como válida la aplicación de la ecuación de estado de los gases ideales (1.5)

$$\pi = kT\Gamma \quad \text{ec. 1.5}$$

al reordenar las ecuaciones 1.3 y 1.5 se obtiene la ecuación 1.6, a partir de la cual utilizando el cambio de π en el tiempo se puede evaluar la difusión de la proteína a la interface.

$$\pi = 2C_0kT\left(\frac{D_s t}{3,14}\right)^{1/2} \quad \text{ec. 1.6}$$

Esta ecuación se denomina ecuación de Ward y Torday modificada y ha sido utilizada en los últimos años por varios autores para evaluar la velocidad de difusión de distintas proteínas a la interface (Perez y col., 2009; Pérez y col., 2008). La ecuación de Ward y Torday modificada permite una importante simplificación metodológica en el estudio de la difusión de proteínas a la interface, aunque se han observado desviaciones de la naturaleza lineal de la ecuación de estado (Graham y Phillips, 1979a; Wüstneck y col., 1996; Cho y col., 1996) lo que llevaría a la aparición de un período de inducción.

Tripp y col. (1995) analizaron resultados obtenidos por diferentes investigadores, y consideraron que en varios de ellos la ecuación de adsorción de Gibbs era inaplicable por dos razones básicas. Por un lado el potencial químico de la proteína desplegada era diferente al de su estado nativo y por otro, en general, la adsorción de la proteína a la interface era un proceso irreversible. Resulta difícil entonces predecir la cinética de adsorción de una proteína a la interface por medio de la evaluación del descenso de la tensión superficial. A pesar de ello este parámetro es el que más interesa conocer a efectos de comprender el comportamiento de las proteínas como agentes tensioactivos.

1.2.2. Adsorción

El proceso de adsorción de la proteína sobre la interface aire-agua, llamado también penetración y anclaje, tiene un rol fundamental sobre la formación de una espuma (Dickinson, 1992). La adsorción de la proteína conlleva un descenso de la energía libre (Hiemenz, 1986) del sistema dado por la sustitución de la interacción directa entre las moléculas de agua y el aire por interacciones entre los segmentos polares (hidrofilicos) de las proteínas y el agua, y los segmentos no polares (hidrofóbicos) y el aire.

La velocidad de este proceso resulta de vital importancia para la formación de la burbuja en el proceso de espumado, dependiendo de características de la proteína como tamaño, conformación e interacciones, de las condiciones del medio y del proceso.

Durante este proceso la proteína arriba a la interface y se desnatura parcialmente ocupando la mayor área posible; la velocidad de este primer contacto dependerá de la concentración proteica y de la flexibilidad molecular principalmente (Wilde y Clark, 1996).

1.2.3. Reordenamiento

Una vez que la proteína se encuentra adsorbida se producen reordenamientos estructurales para llegar a una menor energía libre (Bos y Van Vliet, 2001), exponiéndose la mayor cantidad posible de aminoácidos hidrofóbicos al aire y residuos hidrofílicos al agua (Dill, 1990) y estableciéndose interacciones con otras proteínas del entorno. Estos cambios conformacionales tienen diferentes velocidades de acuerdo a la estructura de la proteína y su flexibilidad. Damodaran mostró que para caseína, proteína flexible, se alcanza el equilibrio entre la concentración en la interface y la presión superficial de manera conjunta (Damodaran, 1994), mientras que para seroalbúmina bovina, proteína globular, se sigue observando un descenso de la tensión superficial luego de alcanzar la concentración de equilibrio, lo que sería debido a un desplegamiento y reordenamiento más lento para esta última (Anand y Damodaran, 1995). Durante estos procesos se producen fenómenos de desorción los cuales son más lentos y con una mayor barrera energética cuanto menor es la concentración de la proteína en la interface (Narsimhan y Uraizee, 1992).

1.2.4. Reología interfacial

Cuando las proteínas se adsorben y se reordenan en la interface forman una película proteica con propiedades viscoelásticas, las cuales determinan principalmente su capacidad para resistir y acomodarse frente a deformaciones. Se presentan principalmente dos clases de deformaciones, de tensión de corte (de forma) y de compresión/dilatación (de área) (Lucassen-Reynders, 1993).

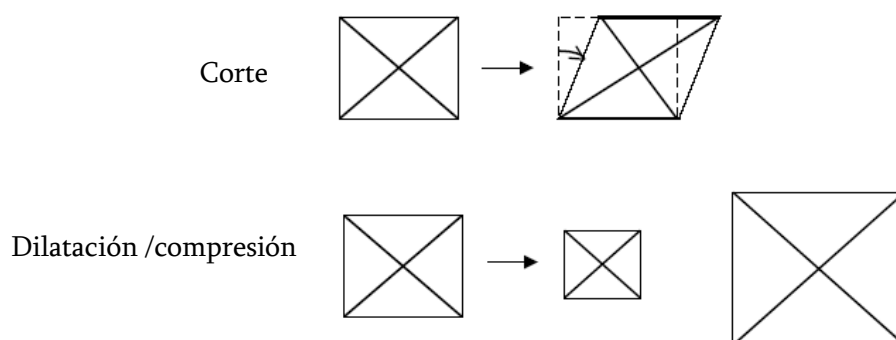


Figura 1.1. Ejemplo de la deformación por tensión de corte y compresión/dilatación.

En este trabajo se aplicaron deformaciones de compresión/dilatación, las cuales se acercan más a la realidad de una interface en una espuma.

1.2.4.1. Reología interfacial dilatacional

La evaluación de la reología interfacial dilatacional se realiza mediante la aplicación de pequeños cambios sinusoidales de área ($dA/A = \ln A$) y la evaluación continua de la tensión superficial (γ). A partir de la relación $d\gamma$ sobre $d \ln A$ se obtiene el módulo interfacial dilatacional E^* definido como

$$E^* = d\gamma / d \ln A \quad \text{ec. 1.7}$$

que nos da una idea de la resistencia a la deformación de la interface ante deformaciones de compresión/dilatación.

El E^* es una magnitud compleja compuesta por una componente elástica (E') y una componente viscosa (E'')

Para una monocapa insoluble $\tau \approx 1/A$ y $E = E_0$ (Elasticidad de Gibbs) donde

$$E_0 = d\gamma / d \ln \Gamma \quad \text{ec. 1.8}$$

Cuando en la interface durante la compresión ocurren procesos de relajación se introduce la viscosidad de compresión (κ), la cual forma la parte compleja (E'') con un comportamiento lineal en función de la frecuencia ω de deformación sinusoidal.

$$E'' = i\omega\kappa \quad \text{ec. 1.9}$$

En el estudio de interfaces proteicas la interpretación de los parámetros reológicos va a depender de la antigüedad de la interface y de la frecuencia de deformación (Bos y Van Bliet, 2001).

Para interfaces completamente elásticas la tensión interfacial (γ) responde inmediatamente al cambio de área (A) sin ningún retardo o latencia. No obstante para la mayoría de las interfaces la respuesta a la tensión superficial tiene un desfase a la deformación expuesta debido a procesos de relajación de la interface y de intercambio con el seno de la solución, los cuales se ven favorecidos por la mayor concentración interfacial y la menor frecuencia de deformación.

Durante la dilatación se genera una expansión del área lo que permite la incorporación de moléculas de la solución sobre la nueva superficie creada, mientras que durante la compresión

algunas moléculas (o partes de ellas) son expulsadas de la interface hacia la subfase o seno de la solución. Este fenómeno de adsorción/desorción está determinado por la frecuencia de deformación y los tiempos medio de relajación. Los últimos son menores cuando estos son moléculas pequeñas y flexibles generando interfaces viscosas.

Mientras que por un lado las proteínas flexibles son las que más rápidamente se acomodan en la interface, lo cual como sabemos favorece la formación de la interface, no son precisamente las que generan interfaces de mayor módulo viscoelástico (E^*) y de mayor resistencia a la deformación. Las interfaces de menor módulo viscoelástico favorecen los procesos de colapso en la desestabilización de la espuma (Langevin, 2000). Por consiguiente al pensar en interfaces de espumas se debe encontrar una situación de compromiso pensando en la formación de la espuma y en la estabilidad de la misma (Wilde, 2000).

1.3. Propiedades espumantes

La mayoría de los alimentos procesados son dispersiones coloidales complejas, muchos de ellos espumas (sistemas gas-líquido). En los últimos años se ha incursionado en el desarrollo de alimentos funcionales, motivo por el cual es de interés el estudio de las proteínas de amaranto como ingrediente en la formulación de nuevos alimentos (Nakamura y Doi, 2000).

Una espuma es una dispersión de una fase dispersa de naturaleza gaseosa en una fase continua de naturaleza líquida. Esta es termodinámicamente inestable debido a que la energía libre asociada a la misma es mayor que la asociada al sistema de gas - líquido separado. Desde su formación, la espuma evoluciona para minimizar la energía libre interfacial (Weaire y Hutzler, 1999).

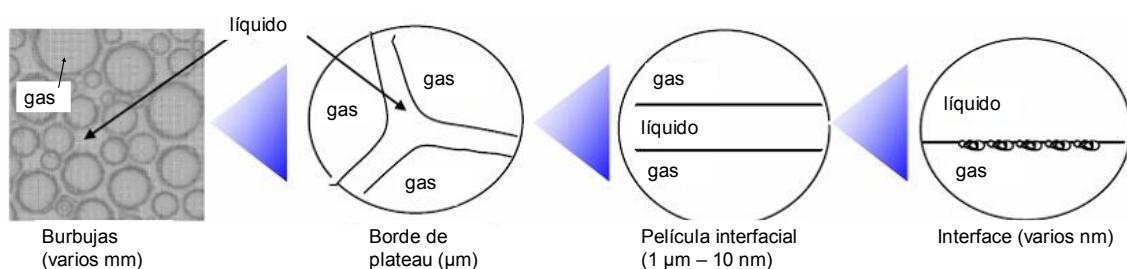


Figura 1.2. Representación de la estructura de una espuma a diferentes escalas.

Como se muestra en la figura 1.2 la espuma presenta distintos niveles de organización.

- como un todo, a escala macroscópica, con las burbujas dispersas en el líquido,
- a nivel de los bordes de Plateau que separan tres burbujas

- a nivel de la película interfacial que separa dos burbujas
- y a nivel de la interface aire/líquido que compone la película interfacial.

Para estudiar las propiedades de la espuma se suele separar el sistema en dos procesos, formación y estabilidad. Estos dos procesos no son independientes dado que paralelamente a la formación de la espuma tienen lugar mecanismos de desestabilización (Langevin, 2000). No obstante para su estudio se realiza la simplificación de analizarlos separadamente.

1.3.1. Formación de la espuma

Existen diferentes métodos que permiten generar una espuma (Lagerge, 2002). Dos de los métodos más utilizados son burbujeo y batido. En el primero se realiza el burbujeo de gas a través de una placa fritada conteniendo una solución acuosa. En el segundo método, un equipo mecánico (batidor) permite la introducción de burbujas de gas en el líquido. En este último, al comienzo de la agitación, se forman burbujas grandes que son fragmentadas en burbujas más pequeñas durante la agitación prolongada (Walstra, 1989). Existen otros métodos de producción de espumas, como el caso de la espuma de la cerveza, donde por fermentación se genera dióxido de carbono, el cual es mantenido bajo presión hasta que la despresurización por apertura de la botella permite la generación de las burbujas (Jeandet y col., 2007).

Los diferentes métodos conducen a la generación de espumas con características distintivas de cada proceso como tamaño de las burbujas, distribución de tamaño, y cantidad de gas incorporado. En este trabajo las espumas se realizaron por burbujeo por ser el método que mejor permite controlar las variables de formación que impactan sobre las características de las espumas.

La formación de la espuma consiste en la incorporación de aire a una solución tensioactiva con la consecuente creación de nueva área interfacial. Algunos factores que afectan directa e indirectamente este proceso son la concentración proteica de la solución, la velocidad de incorporación a la interface, las propiedades viscoelásticas de la película interfacial creada, como así también aquellos factores dependientes del ensayo como tamaño de la placa porosa y velocidad de burbujeo. Según la ecuación de Prins (1988) (1.10)

$$R = \left(\frac{3r\gamma}{2\delta g} \right)^{1/3}$$

ec. 1.10

Donde R corresponde al radio de la burbuja, r al radio del orificio de burbujeo, γ a la tensión superficial, δ a la densidad de la solución y g a la aceleración de la gravedad. A mayor radio de poro de la placa fritada y mayor valor de la tensión superficial mayor será el radio de la burbuja. El tensioactivo debe poseer una rápida capacidad de difusión hacia la interface para poder descender rápidamente la tensión superficial y así generar burbujas de pequeño radio, más estables, con propiedades mecánicas adecuadas pensando en la estabilidad de la espuma.

En los primeros estadios posteriores a la formación de la espuma es cuando la misma se encuentra con la mayor fracción de líquido incorporado y consecuente mayor densidad, con burbujas esféricas separadas por una gruesa lamela.

1.3.1. Estabilidad de la espuma

Como ya hemos mencionado, la espuma es un sistema inestable que tiende a disminuir su área interfacial y formar finalmente un sistema bifásico líquido-aire con la menor cantidad de área interfacial posible, condición de mínima energía libre. Existen varios mecanismos de desestabilización descriptos, los cuales toman prevalencia en distintos momentos del proceso de desestabilización y con distinto grado de magnitud. En este trabajo, para su análisis, se la evaluó en base a dos procesos principales (Monsalve y Schechter, 1984; Yu y Damodaran, 1991) que son:

- Drenado
- Desproporción y colapso

Dentro de cada uno de estos procesos existen otros fenómenos que se discutirán oportunamente.

1.3.1.1. Drenado

El líquido contenido en la espuma migra hacia el seno de la fase continua (líquida para la espuma) debido principalmente a la fuerza de gravedad. Este proceso es a su vez afectado por otros factores como la diferencia de densidad entre ambas fases y la viscosidad de la fase líquida. Al comienzo del drenado se produce una separación de las burbujas dentro de la espuma acorde a la ley de Stokes

$$v_f = \frac{2r^2g(\delta_g - \delta_l)}{9\eta} \quad \text{ec. 1.11}$$

Donde v_f corresponde a la velocidad de flotación, r al radio de la burbuja, δ_g a la densidad de la fase gaseosa, δ_l a la densidad de la fase líquida, g a la aceleración de la gravedad, y η a la viscosidad de la fase líquida. En concordancia con esta ley las burbujas grandes migran hacia la superficie más rápidamente que las pequeñas dado el menor radio, menor relación superficie/volumen y menor resistencia que presentan éstas últimas. Esta redistribución de las burbujas según su tamaño, denominado proceso de flotación, se aprecia macroscópicamente. A su vez el líquido drena por efecto de la gravedad y por la diferencia de presión entre la lamela y el borde de Plateau que impulsa el pasaje de líquido hacia este último. Este gradiente de presión se debe a la diferencia de curvatura entre la lamela y el borde de Plateau de acuerdo con la ley de Laplace

$$\Delta P = 2\gamma \left(\left(\frac{1}{R_p} \right) + \left(\frac{1}{R_l} \right) \right) \quad (\text{ec. 1.12})$$

Donde ΔP es la diferencia de presión, γ la tensión superficial, R_p el radio de curvatura del borde Plateau y R_l el radio de curvatura de la lamela.

El proceso de flotación en conjunto con el drenado del líquido lleva a la disminución del grosor de la lamela y la aproximación de las burbujas tomando formas poliédricas. En esta instancia del proceso de desestabilización es cuando comienza a tomar un peso relevante el mecanismo de desproporción y colapso (Wagner, 2000).

1.3.1.2. Desproporción y colapso

La desproporción, o también llamada maduración de Ostwald, es consecuencia de la difusión de gas desde las burbujas de menor a las de mayor tamaño (Murray, 2002) dado el gradiente de presión generado según la ecuación de Laplace. Este proceso aumenta el tamaño promedio de las burbujas y se acelera así mismo dado que las burbujas pequeñas disminuyen su tamaño con lo cual aumentan su presión y así también el gradiente de presión que es la fuerza impulsora de la difusión de gas (Figura 1.3).

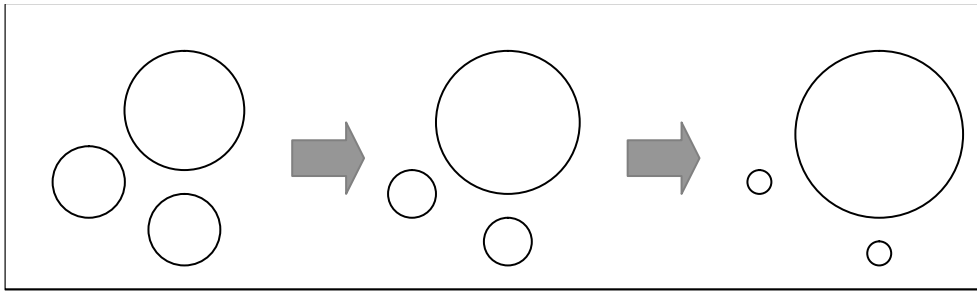


Figura 1.3. Representación esquemática de la desproporción.

El colapso corresponde a la fusión de dos burbujas debido a la ruptura de la lamela. Este proceso se debe a diversos fenómenos como la presencia de partículas de igual tamaño que la lamela que ponen en contacto ambas interfaces, la evaporación de la lamela, todos fenómenos que ocurren cuando las burbujas se acercan debido al adelgazamiento de la lamela por debajo de cierto espesor crítico donde ya no resiste y ocurre el colapso (Figura 1.4).

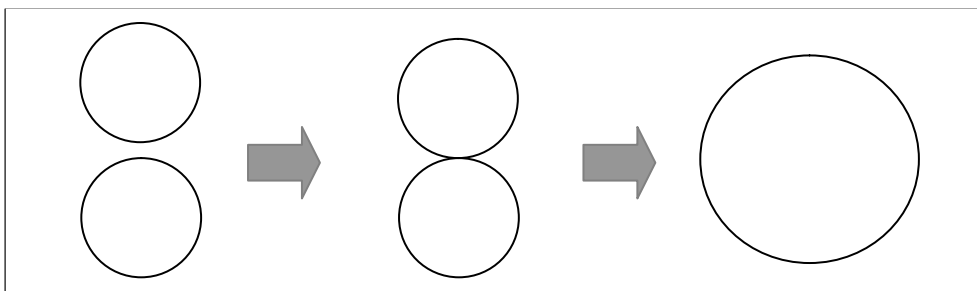


Figura 1.4. Representación esquemática del colapso.

De lo expuesto surge con claridad que resta mucho camino por recorrer para alcanzar un real conocimiento de las propiedades funcionales de las proteínas de amaranto; conocimientos que permitirían en un futuro el desarrollo de nuevos ingredientes alimentarios.

En este contexto nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

Postulamos que las proteínas del grano de amaranto presentan propiedades similares a las de otras fuentes alimentarias y poseen polipéptidos y proteínas que pueden mostrar actividad superficial. Esta actividad puede además ser mejorada mediante la optimización de la flexibilidad y tamaño molecular

2. Objetivos

Es nuestra intención aportar mayores conocimientos sobre la incidencia que poseen cambios conformacionales de la estructura de proteínas y polipéptidos de reserva presentes en el grano de amaranto sobre su desempeño como posibles ingredientes tensioactivos, estudiando las propiedades de superficie de las proteínas de amaranto a nivel de interface y en el seno de la solución.

El **objetivo general** de este Trabajo de Tesis Doctoral es generar nuevos conocimientos que sirvan de base para el desarrollo de nuevos agentes tensioactivos derivados de amaranto.

En particular se propone:

- determinar las propiedades interfaciales y espumantes, de las proteínas nativas, en distintas condiciones de pH y fuerza iónica.
- obtener proteínas modificadas por tratamiento térmico e hidrólisis enzimática con proteasas de origen bacteriano o animal
- caracterizar desde el punto de vista estructural y fisicoquímico las proteínas modificadas y polipéptidos, y determinar sus propiedades interfaciales y espumantes.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Harina de *Amaranthus hypochondriacus*

La harina se preparó en dos oportunidades a partir de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. cv Artaza 9122, cosechas años 2006 y 2008 respectivamente, las cuales fueron cultivadas en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria en Anguil, La Pampa, Argentina. Las semillas se molieron en un molino ciclónico UDY de 1 mm de malla (UDY Corporation, Fort Collins, CO, EE. UU.) y la harina obtenida se pasó a través de un tamiz de 92 μm de malla en la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Posteriormente la harina se desgrasó por extracción con n-hexano a temperatura ambiente durante 24 h con agitación continua en una relación de 1 g de harina por cada 10 mL de solvente. Luego de la extracción, se filtró y se dejó reposar bajo campana durante 12 h para eliminar el solvente remanente por evaporación. La harina desgrasada se almacenó a 4 °C hasta su utilización. La composición porcentual de la harina desgrasada de ambas cosechas fue similar y se mantuvo en los rangos 60 - 67 g de carbohidratos, 20 - 24 g de proteínas, 8 - 10 g de agua y 4 - 4,5 g de cenizas, cada 100 g de harina desgrasada.

3.1.2. Aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus*

Para la obtención del aislado proteico, el cual denominaremos HA ("H" de *hypochondriacus* y "A" de aislado) la harina desgrasada se dispersó en agua en una relación 1/10 p/v ajustando a pH 9 con NaOH 2 N. La dispersión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, luego se centrifugó durante 20 min a 9000 g y 4 °C; el precipitado obtenido se descartó y el sobrenadante se ajustó a pH 5 con HCl 2 N y se centrifugó a 9000 g a 4 °C durante 20 min para precipitar la fracción proteica. El precipitado se resuspendió en agua, se neutralizó con NaOH 0,1 N, se liofilizó y se molió en mortero para finalmente conservarlo a 4 °C hasta su utilización (Martínez y Añón, 1996).

3.1.3. Aislados proteicos hidrolizados y aislado proteico modificado térmicamente

Los aislados proteicos fueron hidrolizados enzimáticamente con alcalasa o con tripsina. Se prepararon suspensiones de 25 g de aislado proteico por cada L de buffer pH 7,8 y fuerza iónica 0,1 (31,9 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM NaH₂PO₄), las cuales se agitaron durante 1 h a 37 °C, para posteriormente agregar la enzima. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 20 min o 4 h con alcalasa de *Bacillus licheniformis* (CAS 9014-01-1, Cod. Prod. P4860, 2,125 U Anson/mL, Sigma-Aldrich Chemicals, EE. UU.) (0,8 µL de enzima por cada g de aislado), y durante 20 min con tripsina de páncreas bovino (CAS 9002-07-7, Cod. Prod. T1426, 13500 U BAEE/mg, Sigma-Aldrich Chemicals, EE. UU.) (10 mg de enzima por cada g de sustrato). Las enzimas se inactivaron térmicamente calentando las mezclas de reacción a 85 °C durante 10 min. Las suspensiones obtenidas se liofilizaron, se molieron y se conservaron a 4 °C para su posterior utilización.

El grado de hidrólisis alcanzado en los distintos tratamientos enzimáticos se evaluó mediante un método colorimétrico que permite cuantificar los grupos amino libres por reacción con trinitrobencensulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1979). El grado de hidrólisis alcanzado tratando al aislado con alcalasa durante 20 min fue $1,7 \pm 0,1$ %, y $9,5 \pm 0,1$ % cuando la proteólisis se realizó durante 4 h. En el tratamiento con tripsina durante 20 min se alcanzó un grado de hidrólisis de $2,2 \pm 0,3$ %. Los tres hidrolizados proteicos se identificarán en el texto con el grado de hidrólisis, la inicial de la enzima utilizada, la especie de la semilla y la letra “H”, de hidrolizado, por lo tanto los mismos serán llamados 1,7 AHH, 9,5 AHH y 2,2 THH.

Para la obtención del hidrolizado proteico el aislado se sometió a diferentes tratamientos siendo el paso de detención de la reacción enzimática de notable relevancia por el efecto del tratamiento térmico en la estructura tridimensional de las proteínas y consecuentemente en las propiedades funcionales de la misma. Por esta razón se preparó un aislado control que se denominó aislado proteico calentado (HA Q), en el cual se realizó el mismo tratamiento térmico que el descrito para detener la reacción enzimática.

3.1.4. Composición química del aislado proteico, aislado proteico modificado térmicamente y aislados proteicos hidrolizados.

Se determinó la composición química de los aislados proteicos (HA) de los años 2006 (HA 2006) y 2008 (HA 2008), los aislados proteicos hidrolizados con alcalasa y tripsina (1,7 AHH, 9,5 AHH y 2,2 THH) y el aislado proteico modificado térmicamente (HA Q).

El contenido total de proteína se determinó mediante el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883; método 954.01 AOAC, 1990) utilizando el valor 5,85 como factor para relacionar el contenido de nitrógeno determinado con el de proteína (Segura-Nieto y col., 1994). El contenido de proteína en base húmeda de HA 2006 y HA 2008 fue $75,8 \pm 0,1$ % y $78,0 \pm 2,7$ % respectivamente. Los aislados proteicos hidrolizados y el tratado térmicamente, durante las diferentes etapas del tratamiento de hidrólisis y control de la misma se enriquecieron en minerales aportados por los buffers utilizados, disminuyendo así el contenido relativo del resto de los componentes y alcanzándose un contenido de proteínas de 54 ± 2 % en base húmeda.

El contenido de agua se determinó indirectamente luego de conocer la contribución de la sustancia seca a la masa total por secado en estufa a 105 ± 1 °C y presión atmosférica hasta peso constante (método 928.10 AOAC, 1998). El contenido de agua del HA 2006 fue $10,7 \pm 0,3$ % y del HA 2008 $8,6 \pm 0,1$ %.

La determinación de cenizas se realizó gravimétricamente luego de calcinar la muestra a 550 ± 5 °C y presión atmosférica hasta cenizas blancas (método 923.03, AOAC 1998 16 edición 4° revisión). La cantidad de cenizas fue $2,7 \pm 0,1$ % para el HA 2006 y $3,8 \pm 0,1$ % para el HA 2008, sobre base húmeda. Como ya se detalló 1,7 AHH, 9,5 AHH, 2,2 THH y HA Q se enriquecieron en minerales aumentando el contenido de cenizas a $28,2 \pm 0,1$ % en base húmeda.

3.1.5. Soluciones reguladoras del estado ácido-base y de la fuerza iónica (buffers).

Las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas se estudiaron en tres condiciones de pH (2,0; 6,3 y 8,0) y dos condiciones de fuerza iónica (μ) (0,06 y 0,5), para lo que fue necesario preparar seis soluciones reguladoras.

- pH 2, μ 0,047, 35 mM fosfato (18,7 mM H_3PO_4 ; 16,2 mM NaH_2PO_4 ; 30,83 mM NaCl)

- pH 2, μ 0,5, 35 mM fosfato (17,2 mM H_3PO_4 ; 17,7 mM NaH_2PO_4 ; 432 mM NaCl)

- pH 6,3, μ 0,06, 35 mM fosfato (28,4 mMNaH₂PO₄; 6,1 mM Na₂HPO₄)
- pH 6,3, μ 0,5, 35 mM fosfato (25,2 mMNaH₂PO₄; 9,7 mM Na₂HPO₄; 446 mM NaCl)
- pH 8, μ 0,047, 35 mM Tris (tris(hidroximetil)aminometano) (20,4 mMTris ácido;14,5 mM Tris básico; 26,6 mMNaCl)
- pH 8, μ 0,5, 35 mM Tris (tris(hidroximetil)aminometano) (21,8 mM Tris ácido; 13,1 Tris básico; 479 mMNaCl).

3.1.6. Soluciones proteicas

Se prepararon dispersiones de aislado o hidrolizado en el solvente adecuado con agitación constante durante 1 h a 25 °C, de modo que la concentración final de proteína soluble fuese 1 g/L. Dichas dispersiones se centrifugaron a 10000 g, 15 min, 25 °C, seguidamente se recuperaron las fracciones solubles las cuales posteriormente se diluyeron para alcanzar la concentración deseada en las diferentes soluciones de trabajo.

3.2. Caracterización estructural y composición

3.2.1. Determinación de la solubilidad proteica

La solubilidad se determinó por duplicado a partir de dispersiones de 1,5 g de proteína en 1,5 mL de solución reguladora del estado ácido-base en tubos de microcentrífuga de 2 mL. Las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente mientras fueron agitadas a máxima velocidad en vortex (Thermolyne Type 37600 Mixer) en posición “touch” durante 4 s cada 15 min. Las dispersiones se centrifugaron a 10000 g, 15 min a 25 °C, separando el sobrenadante y determinando el contenido de proteína en el mismo por duplicado mediante la aplicación de la técnica descrita por Lowry y col. (1951). Esta es una técnica colorimétrica basada en la proporcionalidad existente entre la concentración de proteínas en la solución y la intensidad de la absorbancia espectrofotométrica a 750 nm de longitud de onda (λ). La emisión a $\lambda = 750$ nm se debe a la formación de un complejo entre el Cu⁺² y los enlaces peptídicos en medio alcalino (mismo fundamento del método de Biuret (Gornall y col., 1949) y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdido-fosfotúngstico) por oxidación de los residuos fenólicos. Para la calibración del método se preparó una solución 10 g/L de albúmina bovina (CAS 9048-46-8, Cod. Prod. A3350, Lot 123H0811, Sigma-Aldrich Chemicals, EE. UU.).

La solubilidad se expresó como:

$$\% \text{ proteína soluble} = (\text{proteína soluble} / \text{proteína total}) \times 100 \quad \text{ec. 3.1}$$

3.2.2. Análisis de la composición polipeptídica

La composición polipeptídica de las muestras se estimó mediante la técnica de electroforesis, la cual se basa en la capacidad de migración de una partícula cargada bajo la acción de un campo eléctrico. A pHs diferentes al pI, pH en el cual las cargas eléctricas de los residuos aminoácidos se encuentran compensadas generando una carga neta neutra en la cadena polipeptídica, las proteínas se encuentran cargadas y se mueven frente a la fuerza impulsora generada por el campo eléctrico. Según la ley de Stokes las partículas se movilizarán a una velocidad definida según su tamaño, carga y viscosidad del medio. En las electroforesis de proteínas se utilizan soportes estructurados los cuales además actúan como tamiz, limitando así la movilidad de las proteínas de acuerdo a su tamaño.

El gel de poliacrilamida es el soporte más comúnmente utilizado por su alta reproducibilidad, estabilidad (pH, temperatura, fuerza iónica), inercia química y porosidad controlable. La polimerización de la acrilamida sigue un mecanismo de radicales libres cuyo iniciador es el persulfato de amonio con el N, N, N', N' tetrametiletenodiamina (TEMED) actuando como catalizador. La porosidad del gel se controla mediante la relación entre la acrilamida y la N, N'-metileno-bis-acrilamida, la cual actúa como entrecruzador, y la concentración de ambos compuestos.

3.2.2.1. Reactivos y equipo

Buffer de electrodo: Tris (hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3), con o sin dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v, para electroforesis desnaturante o nativa respectivamente.

Buffer de gel apilador: Tris-HCl 500mM (pH 6,8) con o sin SDS 0,4 % p/v; N', N', N', N', tetrametiletenodiamina (TEMED) 0,4 % v/v.

Buffer de gel separador: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) con o sin SDS 0,4 % p/v; N', N', N', N', tetrametiletenodiamina (TEMED) 0,4 % v/v.

Buffer de muestra para electroforesis desnaturante (SDS-PAGE): Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8), sacarosa 15 % v/v, SDS 2 % p/v, EDTA 25 mM y azul de bromofenol 0,05 % p/v con o sin 2-

mercaptoetanol (2-ME) 5 % v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

Buffer de muestra para electroforesis nativa (PAGE): Tris-HCl 62,5mM (pH 6,8), sacarosa 15 % v/v, EDTA 25 mM y azul de bromofenol 0,05 % p/v.

Buffer de tratamiento para gel muestra en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 1 % p/v, sacarosa 20 % p/v, con o sin 2-ME 1,5 % v/v (Utsumi y col., 1984).

Solución de acrilamida-bisacrilamida: 30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida se llevan a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Luego se filtra y se almacena al abrigo de la luz.

Buffer de disolución de la muestra: buffer fosfato 35 mM, pH 7,8 μ 0,1.

Solución de proteínas patrón: se solubilizaron 575 μ g de una mezcla de 6 proteínas en 100 μ L de buffer de muestra para el caso de electroforesis desnaturizante. Las proteínas puras y de masa conocida fueron: fosforilasa b (94 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), y α -lactoalbúmina (14,4 kDa) (GE-Healthcare, EE. UU.).

Equipo de electroforesis: Mini Protean II (BIO-RAD LifeSciences, EE. UU.). Se prepararon geles utilizando separadores entre placas de 1 mm de espesor para la mayoría de los geles, y 0,75 mm y 1,5 mm para el gel de la primera y segunda dimensión de la electroforesis bidimensional respectivamente.

3.2.2.2. Preparación de las muestras y siembra

El sólido liofilizado se dispersó en 1 mL de buffer de disolución en una concentración de 20 - 30 g/L. La dispersión se solubilizó durante 1 h a temperatura ambiente agitando con vortex (ThermolyneType 37600 Mixer) en posición "touch" al máximo de velocidad durante 4 s, cada 15 min. Se mezclaron 2 partes de dispersión con 1 parte de buffer de muestra para la electroforesis nativa y 1 parte de dispersión con 2 partes de buffer de muestra para el caso de la electroforesis desnaturizante. La mezcla se dispersó rápidamente y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 20 °C en microcentrífuga (Spectrofuge 24D, Labnet International, Inc.) para remover proteínas insolubles y/o posibles compuestos de otra naturaleza tales como hidratos de carbono del buffer de muestra. En el caso de las electroforesis desnaturizantes en condiciones reductoras las muestras se trataron con 2-ME a 100 °C durante 60 s. En los distintos geles de poliacrilamida se

sembraron entre 5 μ L y 25 μ L de muestra por calle o 3 μ L de solución patrón para tener una concentración detectable y buena resolución con la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.2.2.3. Electroforesis nativa

La electroforesis nativa se conoce comúnmente como PAGE (del inglés PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). En esta se preserva la estructura nativa de las proteínas separando las mismas en base a la relación carga/masa. En este sistema se utilizan los reactivos sin SDS, y se prepara el gel separador al 7 % p/v de acrilamida y el gel de concentración al 4 % p/v. La corrida electroforética se realizó con una diferencia de voltaje constante de 25 mV controlando que la temperatura de la cuba no exceda los 35 °C.

3.2.2.4. Electroforesis desnaturizante

Se utilizó el esquema experimental de Laemmli (1970). La proteína tratada con SDS, detergente aniónico, pierde su estructura cuaternaria y terciaria. Los polipéptidos que forman las subunidades de proteínas multiméricas y las proteínas monoméricas, se cargan negativamente de manera uniforme por lo cual frente a la acción de un campo eléctrico se separan de acuerdo a su tamaño. La concentración de acrilamida del gel de separación fue de 12 % p/v y del gel de concentración de 4 % p/v (Martínez y col., 1997). La corrida se realizó a voltaje constante de 30 mV por placa y se controló que la temperatura de la cuba no supere los 35 °C. Se construyeron curvas de calibración relacionando el factor R_f de las proteínas patrón ($R_f = D_x/D_f$ (D_x = distancia recorrida por el polipéptido, D_f = distancia recorrida por el frente de corrida)) y el logaritmo de su peso molecular para estimar por interpolación la masa de los polipéptidos desconocidos.

3.2.2.5. Electroforesis desnaturizante en medio reductor

Este tipo de electroforesis se realizó como una SDS-PAGE, solo que la muestra se trató previamente con 2-ME, un agente reductor de puentes disulfuro que permite desarmar estructuras multiméricas estabilizadas por uniones covalente entre grupos tiol de cisteínas.

3.2.2.6. Electroforesis bidimensional

Se realizó una primera dimensión en las condiciones descritas para la electroforesis nativa, en geles de 0,75 mm de espesor. La muestra se sembró en dos calles consecutivas las cuales luego de la corrida se cortaron y utilizaron como muestra del gel (segunda dimensión), colocadas de forma

transversal en la parte superior del gel, después de ser sometidas al tratamiento correspondiente. La segunda dimensión se corrió en las condiciones indicadas para SDS-PAGE utilizando separadores y geles de 1,5 mm de espesor. El tratamiento al que fueron sometidas las calles cortadas consiste en la inmersión de las mismas en buffer Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 1 % p/v, sacarosa 20 % p/v, con o sin 2-ME 1,5 % v/v (Utsumi y col., 1984) durante 1 h a 55 °C, renovando el buffer a los 30 min. Este tratamiento se realizó en condiciones reductoras (en presencia de 2-ME) y no reductoras.

3.2.2.7. Tinción de bandas

Los geles se fijaron y colorearon en una misma etapa en solución de Coomassie Brilliant Blue R (Anedra, Argentina) al 0,192 % p/v en agua-metanol-ácido acético (10:10:4) durante un tiempo mayor a 1,5 h y se destiñeron en solución agua-etanol-ácido acético (65:25:10) con sucesivos cambios de la solución a temperatura ambiente hasta obtener la decoloración deseada (Walker, 2002).

3.2.2.8. Obtención de imágenes digitales

Las imágenes se obtuvieron con un escaner (HP Scanjet G2710 o Epson Perfection 1200) en una resolución de 300 dpi. Para algunos geles se utilizó un software de análisis gráfico (Image Quant versión 4.2a, Molecular Dynamics) para calcular la intensidad relativa de diferentes especies proteicas.

3.2.3. Determinación de la hidrofobicidad superficial

El término hidrofobicidad refiere a la no afinidad de un soluto cuando el medio en que se encuentra es agua. Para proteínas globulares, las porciones hidrofóbicas de la proteína nativa interactúan entre ellas, manteniéndose en el interior de la molécula, para disminuir la interacción con el solvente acuoso y bajar consecuentemente la energía libre. Los sitios hidrofóbicos que quedan expuestos al exterior de la proteína se evalúan por medio de la medida de hidrofobicidad superficial (H_0), y tienen especial interés en algunas propiedades funcionales de superficie (Nakai y col., 1996) como la capacidad espumante (Kato y col., 1985).

3.2.3.1. Determinación de la capacidad de unión a una sonda hidrofóbica

La determinación se fundamenta en la capacidad de unión de una sonda hidrofóbica a los sitios hidrofóbicos de la proteína. La sonda utilizada fue el compuesto 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS) (Aldrich Chemical Co., EE. UU.) la cual cuando se encuentra unida a un sitio aromático fluoresce con mayor intensidad y a una longitud de onda diferente a la correspondiente de la sonda libre.

Las muestras se dispersaron en buffer fosfato 35 mM (NaH_2PO_4 5,6 mM Na_2HPO_4 34,3 mM NaCl 400 mM) pH 7,5 μ 0,5 y se solubilizaron durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 15000 g, 20 min a 20 °C, y los sobrenadantes se diluyeron para llegar a una concentración final de 0,1 g/L. Se preparó una solución de ANS 10 mM en el mismo buffer. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS 50B (Perkin-Elmer Corp., Inglaterra).

Se determinó la intensidad de fluorescencia (IF) en un espectro entre 450 nm y 540 nm, excitando la muestra con luz UV a 350 nm, a distintas concentraciones de ANS entre 0 μ M y 100 μ M. Lo mismo se realizó sin proteína, blanco de reacción, para descartar emisión fluorescente proveniente de otra fuente que no sea el complejo sonda-proteína. Para la interpretación de las medidas experimentales se procedió a restar los espectros con su blanco, y se graficó la IF resultante a 470 nm, longitud de onda a la cual se presentó el máximo de emisión, en función de la concentración de ANS. Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación:

$$IF = A * [ANS] / (B + [ANS]) \quad \text{ec. 3.2}$$

Los parámetros A y B se obtuvieron por iteraciones sucesivas con el software Origin Pro 8 (OriginLab CO., EE. UU.). El parámetro A representa la IF máxima para la concentración de proteína evaluada expresada por unidad de mg, este valor se corresponde con la H_0

$$H_0 = A/[proteína] \text{ (mg/ml)} \quad \text{ec. 3.3}$$

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

3.2.3.2. Determinación de la fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca se atribuye principalmente a los residuos aromáticos de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina. Sin embargo, en la práctica, se estudia la

fluorescencia del triptófano, ya que la señal de fenilalanina es baja y la de tirosina se debilita por reacciones secundarias (Freifelder, 1976). La excitación del triptófano a 297 nm da un espectro característico entre 325 nm y 350 nm, dependiendo del entorno (Burstein y col., 1973). Cuanto más expuestos al entorno hidrofílico se encuentran los residuos triptófano más se corre el máximo de emisión del espectro a longitudes de onda cercanas a 350 nm. La mayor exposición de residuos triptófano hacia el exterior se correlaciona con una mayor hidrofobicidad superficial.

Metodológicamente se realizó una dilución al medio de las soluciones utilizadas en la determinación de H_0 para llegar a una concentración final 0,05 g/L. Se excitó la muestra a 297 nm y se registró el espectro de emisión entre 310 nm y 550 nm, detectando la longitud de onda a la cual se hace máxima la intensidad de emisión.

3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido

Este método, conocido como DSC (del inglés: Differential Scanning Calorimetry), se basa en el análisis del flujo de calor entregado diferencialmente a una muestra y una referencia inerte para elevar o descender la temperatura a una velocidad controlada e igual en ambas. Cuando la muestra experimenta una transición física o química que requiere o disipa calor, se necesita que fluya una cantidad mayor o menor de energía con respecto a la referencia con lo cual se puede conocer indirectamente y de manera absoluta la energía necesaria para que ocurra la transición. La referencia utilizada debe ser de capacidad calorífica conocida y bien definida en el rango de temperatura de trabajo. Uno de los procesos que resulta interesante conocer en el análisis térmico de proteínas es la desnaturalización térmica, un proceso endotérmico que consume una cantidad de calor conocida como entalpía de desnaturalización o, más correctamente, entalpía del proceso. Los flujos de calor diferenciales se observan como picos respecto a la línea de base y se calculan a partir del área comprendida entre los mismos al graficar el flujo de calor en función del tiempo o la temperatura cuando se utiliza aire como referencia (para el caso de entalpía debería utilizarse en las abscisas tiempo).

Las medidas se realizaron en un calorímetro TA Q100 (TA Instruments, EE. UU.) a una velocidad de 10 °C/min en el rango de 40 a 120 °C. El calorímetro se calibró con indio, ácido láurico y ácido esteárico, sustancias de punto de fusión conocido, y se utilizó aire como referencia. Las muestras liofilizadas se dispersaron al 20 % p/v en buffer fosfato 35 mM pH 7,5 y μ 0,5; luego se depositaron 15-20 mg de la dispersión en cápsulas de aluminio las que se sellaron en forma hermética. Previa

y posteriormente a la corrida calorimétrica las cápsulas se pesaron para corroborar que no se hubieran abierto y se hubiera perdido muestra durante la medida. Posteriormente cada cápsula fue perforada y secada en estufa a 105 °C para determinar gravimétricamente el peso de masa seca. Los resultados experimentales se procesaron con el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments-Waters LLC) y se obtuvieron las entalpías de desnaturalización (ΔH_d) y la temperatura de desnaturalización (T_d) (temperatura de flujo máximo).

3.2.5. Dicroísmo circular

Esta técnica se basa en la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente en dos planos (a la derecha y a la izquierda) en fase y con la misma amplitud, al pasar por un medio ópticamente activo con centros quirales. La absorción diferencial induce un desfase y un cambio de magnitud en ambos planos provocando una rotación en un ángulo α generando una elipse.

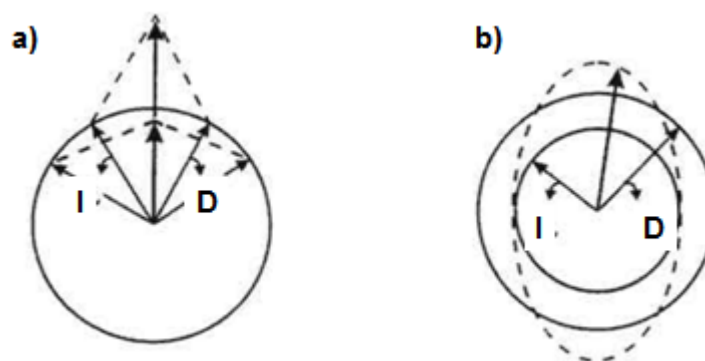


Figura 3.1. Planos de luz circularmente polarizada a la izquierda (I) y a la derecha (D) A) los dos componentes con la misma amplitud generando una polarización plana al combinarse y B) los dos componentes con distinta amplitud generando una polarización elíptica como resultante (línea punteada) (Kelly y Price, 2000).

Esta técnica permite el análisis de la estructura secundaria de las proteínas (Greenfield, 1996). Los espectros de las distintas estructuras definidas (α -hélice, hoja plegada β , giros β , estructura desordenada) son característicos y han sido bien descritos, lo cual permite calcular para proteínas puras la contribución de las distintas estructuras secundarias a su conformación. En nuestras muestras solo pudimos observar diferencias relativas debido a que se trabajó con mezclas de proteínas.

Las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jobin-Yvon CD6 (Jobin-Yvon SA, Longjumeaux, Francia). Las soluciones de proteína 1 g/L se vertieron en celdas de cuarzo con un paso de luz de 0,1 mm y los espectros se midieron en el UV lejano (190-250 nm). La diferencia

entre la absorbancia de las dos componentes circularmente polarizadas se graficó en función de la longitud de onda y los espectros obtenidos se analizaron comparando con los espectros típicos de las estructuras secundarias conocidas (Kelly y Price, 1997).

3.2.6. Distribución de tamaño de partículas

El tamaño de las partículas se analizó a partir de la función de correlación temporal de la intensidad de luz dispersada a 90° utilizando un goniómetro ALV/CGS-5022F acoplado a un correlacionador digital de tiempo múltiple ALV-5000/EPP, en un rango de tiempo de 10^{-6} – 10^{-3} s. La fuente de luz utilizada fue un láser de helio-neón operando a 22 mW. Cada función de correlación fue analizada con el ajuste por cumulantes que brindó un coeficiente de difusión medio aparente y su dispersión. A partir de la fórmula de Stokes-Einstein fue posible obtener el radio hidrodinámico. Las mediciones se llevaron a cabo sobre soluciones 1 g/L filtradas con una membrana de 0,22 μm de poro a temperatura ambiente. La distribución en masa se realizó asumiendo la dispersión de Rayleigh (Provencher, 1982).

3.2.7. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión con su poder de resolución del orden de los nanómetros permite obtener imágenes de las proteínas en la dispersión. Una gota de cada muestra de la dispersión acuosa se colocó sobre una rejilla de carbono recubierta de cobre (Quantifoil, Alemania) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. La muestra luego se tiñó negativamente con una gota de una solución de acetato de uranilo 2 % p/p (Merck, Alemania) y se dejó secar al aire antes de su introducción en el microscopio electrónico. La evaluación de las muestras se realizó con un microscopio JEOL JEM-1230 operado a 80 kV.

3.3 Propiedades interfaciales

Las propiedades interfaciales refieren a aquellas características de la interface que van a definir y otorgar aspectos particulares de los alimentos relacionados con la formación, estabilidad, elasticidad/compresibilidad. En esta sección separaremos los Materiales y Métodos de acuerdo a si los estudios son dinámicos o estáticos y según sean interfaces adsorbidas o esparcidas. Los estudios dinámicos se aplican a sistemas en estado de no-equilibrio termodinámico, y los estáticos a sistemas en estados de equilibrio o pseudoequilibrio termodinámico.

3.3.1. Propiedades interfaciales dinámicas en interfaces adsorbidas.

3.3.1.1. Tensiómetro de gota dinámico.

El tensiómetro de gota dinámico (Tracker, IT-Concept. Saint-Clement, Francia) permite conocer la tensión interfacial de una gota/burbuja a un tiempo dado de la formación de la misma. En nuestro trabajo se formó una burbuja en una solución conteniendo el surfactante (proteína), con lo cual se determinó la tensión de interface aire/agua, denominada tensión superficial.

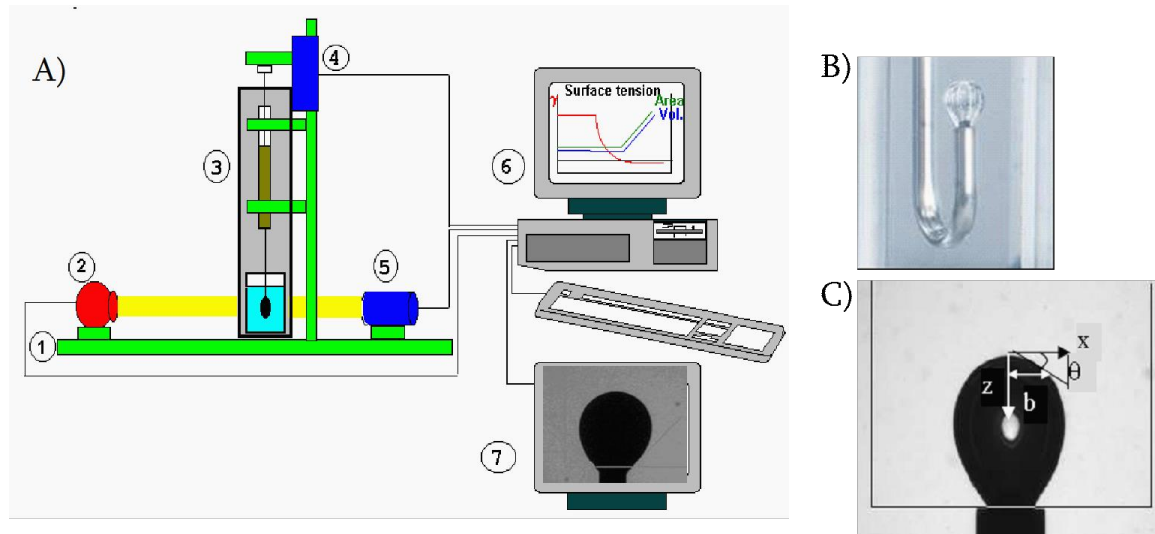


Figura 3.2. A) Representación esquemática y fotografía del tensiómetro dinámico de gota (Tracker). 1: base de fibra óptica 2: fuente luminosa 3: jeringa 4: motor 5: cámara 6: computadora 7: monitor de video (Tomado de Alain CAGNA, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France, 2008). B) Imagen lateral de la cubeta. C) Perfil de la burbuja.

Principio de funcionamiento

Se forma una burbuja de aire en la solución con tensioactivo a través de una jeringa con una aguja en forma de U. El émbolo de la jeringa es comandado por un motor manejado por el software para controlar el volumen de la burbuja (Benjamins y col., 1996).

La forma de la gota no sólo se encuentra determinada por la tensión interfacial, la cual fuerza la burbuja a una forma completamente esférica, sino que también se ve influenciada por la fuerza de la gravedad, que provoca burbujas elongadas y aplanadas. Teniendo en cuenta estos dos efectos se deduce la ecuación de Gauss-Laplace para gotas axi-simétricas (Bashforth y Adams, 1983)

$$\frac{d\theta}{d\tilde{z}} = 2 \pm \beta \tilde{z} - \frac{\sin \theta}{\tilde{x}} \quad \text{ec. 3.4}$$

$$\frac{d\tilde{x}}{d\tilde{s}} = \cos \theta \quad \text{ec. 3.5}$$

$$\frac{d\tilde{z}}{d\tilde{s}} = \sin \theta \quad \text{ec. 3.6}$$

donde $\tilde{s} = s/b$, $\tilde{x} = x/b$, $\tilde{z} = z/b$ corresponden a la longitud de arco, la coordenada horizontal y la coordenada vertical, respectivamente, las cuales son adimensionales y están normalizadas por el radio de curvatura en el vértice (b). θ es el ángulo de la tangente, y $\beta = g\Delta\delta b^2/\gamma$, donde g corresponde a la aceleración de la gravedad, $\Delta\delta$ a la densidad diferencial y γ a la tensión superficial.

Procedimiento experimental

El método consiste en la formación de una burbuja de aire en el extremo en una aguja de acero inoxidable en forma de U adosada a una jeringa micrométrica de vidrio tipo Hamilton de 2,5 mL. La aguja se sumergió en una cubeta de vidrio de 5 cm³ que contenía la solución con el tensioactivo termostatzada a 25 °C. El aire de la jeringa se liberó por medio de la orden al software, llegando a formar una burbuja de área superficial de 17 ± 1 mm² en el extremo de la jeringa, la cual permaneció allí durante el tiempo que duró la experiencia. Las imágenes tomadas por la cámara se digitalizaron y los parámetros geométricos se analizaron haciendo uso del software. Este análisis permite obtener los valores de tensión superficial para las distintas burbujas.

Los materiales de trabajo se lavaron con detergente y se enjuagaron con agua destilada en una primera etapa, y agua milli-Q en una segunda etapa, para eliminar cualquier contaminante que pudiera funcionar como tensioactivo.

Luego de montar la jeringa sobre el equipo se alineó la aguja verticalmente. Las medidas control se realizaron con soluciones tampón sin proteína para descartar la presencia de algún contaminante con actividad tensioactiva en el buffer.

3.3.1.2. Tensiómetro de volumen de gota

El tensiómetro de volumen de gota (LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. Lauda-Konigshofen, Alemania) permite conocer la tensión interfacial de una gota/burbuja a un tiempo dado de la formación de la misma. En nuestro trabajo se formó una gota pendiente con la solución de proteína y se determinó la tensión superficial a distintos tiempos.

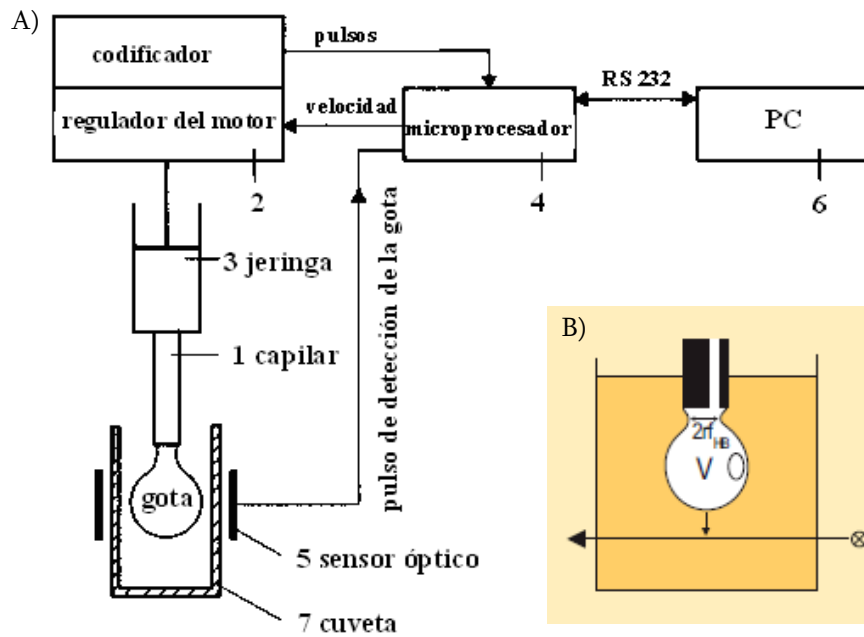


Figura 3.3. A) Representación esquemática del tensiómetro de volumen de gota LAUDA TVT2 (Tomado de Miller y col., 1998). B) Gota pendiente al momento del desprendimiento (tomado del Manual del usuario del equipo).

Principio de funcionamiento

El fundamento de la técnica se basa en la compensación del peso de una gota de líquido con la fuerza superficial que la mantiene pendiente. La gota se forma a distintas velocidades predefinidas y se mantiene pendiente hasta el momento en el que el peso de la gota supera la fuerza superficial. En ese momento la gota cae y la caída es detectada por el sensor óptico del equipo. A menor velocidad de formación la gota se desprende a menores volúmenes debido al mayor tiempo del agente tensioactivo para alcanzar la interface.

De la compensación de fuerzas se obtiene la ecuación 3.7, de donde se despeja γ (3.8)

$$2\pi f\gamma = \Delta\delta gV \tag{ec. 3.7}$$

$$\gamma = \frac{\Delta\delta gV}{2\pi f} \tag{ec. 3.8}$$

$\Delta\delta$ corresponde a la diferencia de densidad entra las dos fases, g a la fuerza gravitatoria, V al volumen de la gota al momento de desprenderse, r al radio del aguja, y f al factor de corrección que contempla que el desprendimiento de la gota no se produce exactamente en el extremo de la aguja sino del cuello formado por debajo (Figura 3.3-B)

$$f = r/a \quad \text{ec. 3.9}$$

$$a = \sqrt{\frac{2\gamma}{\Delta\delta g}} \quad \text{ec. 3.10}$$

Procedimiento experimental

La solución de trabajo se termostató a 25 °C y se cargó en la jeringa. Las medidas se realizaron en el modo dinámico, formando gotas a distintas velocidades, dando distintos tiempos al tensioactivo para descender la tensión superficial y alcanzar la compensación de las fuerzas. Se trabajó con dos programas de velocidad, el primero en el rango de tiempos de formación de gota, 0,08-0,10 s/μL, con un diferencial entre velocidades de 0,005 s/μL, y el segundo, 0,10-0,80 s/μL, con un diferencial entre velocidades de 0,1 s/μL. En el primer rango de velocidades se utilizó la opción de corrección del efecto hidrodinámico debido a la alta velocidad de formación de la gota. Este fenómeno se debe al elevado tiempo que toma el proceso de desprendimiento de la gota en relación al tiempo de formación de la misma, lo que conduce a la formación de gotas de mayor volumen que el que correspondería al obtenido por la compensación de las fuerzas.

Para descartar la presencia de tensioactivos contaminantes el material de trabajo se lavó con detergente y se enjuagó en una primera etapa con agua destilada y en una segunda con agua mili-Q o destilada-desionizada en su defecto. Las soluciones también se midieron para controlar la ausencia de impurezas con efecto tensioactivo en los reactivos de trabajo. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

3.3.1.3. Cinéticas de adsorción a la interface aire/agua.

Las cinéticas de adsorción de la proteína a la interface se dedujeron de la evolución de la tensión superficial en el tiempo, asumiendo la ecuación de estado (3.11) (Rodríguez Patino y col., 1999)

$$\pi = \Gamma kT \quad \text{ec. 3.11}$$

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{ec. 3.12}$$

Donde π corresponde a la presión superficial, γ_0 a la tensión superficial del agua pura, γ a la tensión superficial de la solución, k a la constante de Boltzmann, T a la temperatura y Γ a la concentración de proteínas en la interfase.

La adsorción de la proteína a la interface se interpretó por medio del descenso de la tensión superficial (Martin y col., 2002; Rodríguez Patino y col., 1999).

Difusión a la interface

A baja concentración de proteína, la adsorción a la interface y el consecuente descenso de π se ven limitados por la difusión desde el seno de la solución a la subfase (Ward y Torday, 1946). Durante este período es posible estimar la velocidad de difusión de la proteína a la interface ajustando los datos experimentales a la ecuación modificada de Ward y Torday (3.13) (Rodríguez Patino y col., 1999; De Feijter y Benjamins, 1987)

$$\pi = 2C_0kT\left(\frac{D_s t}{3,14}\right)^{1/2} \quad \text{ec. 3.13}$$

donde π corresponde a la presión superficial, k a la constante de Boltzmann, T a la temperatura, D_s al coeficiente de difusión calculado y t al tiempo.

Reordenando la ecuación se puede llegar a la siguiente expresión:

$$\pi = 2C_0kT\left(\frac{D_s}{3,14}\right)^{1/2}(t)^{1/2} \quad \text{ec. 3.14}$$

que permite obtener la constante de difusión (k_{dif}) a partir de la pendiente de la zona lineal de la gráfica π vs $t^{1/2}$. Por lo tanto,

$$k_{dif} = 2C_0kT\left(\frac{D_s}{3,14}\right)^{1/2} \quad \text{ec. 3.15}$$

donde C_0 y T constantes, k_{dif} depende directamente de D_s .

Las medidas experimentales se realizaron con soluciones proteicas de concentración 0,1, 0,01 y 0,001 g/L, las cuales son lo suficientemente bajas como para poder observar el proceso de adsorción dependiente de la difusión durante el tiempo experimental. Los ensayos se llevaron a cabo durante 10800 s en un tensiómetro de gota dinámico (Tracker, IT-Concept. Saint-Clement, Francia) sobre las diferentes muestras en las distintas condiciones de pH y μ . Los datos obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8 SR0 (OriginLabCorporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.)

En los casos en que se observó un período de latencia (tiempo de inducción, t_{ind}), se graficó π vs t_{dif} ($t_{dif} = t - t_{ind}$) y de la pendiente se calculó k_{dif} (Figura 3.4).

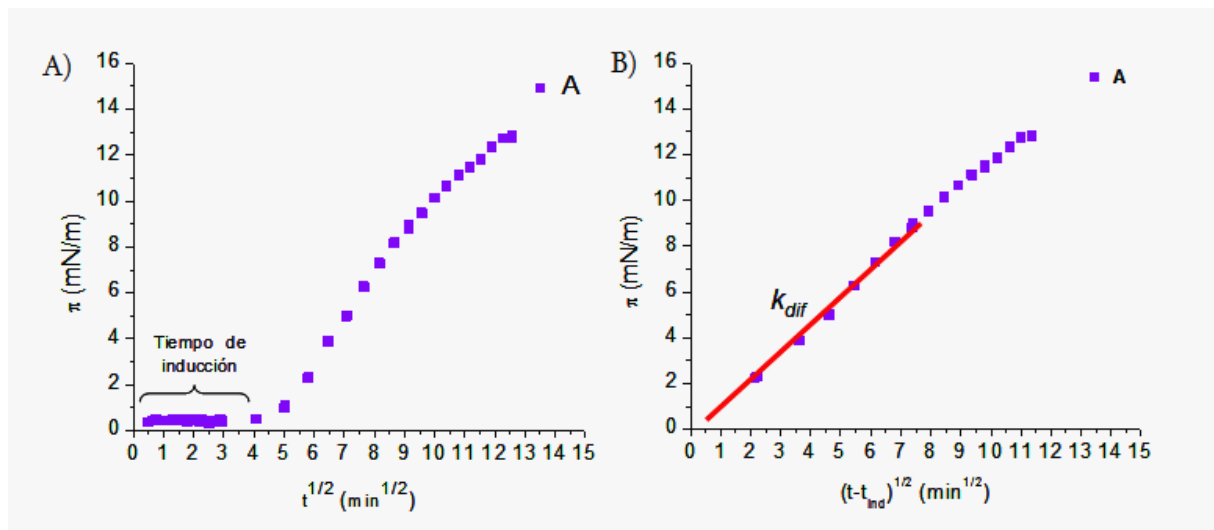


Figura 3.4. Representación esquemática de la gráfica de A) π vs $t^{1/2}$ desde la formación de la gota y B) π vs $t_{dif}^{1/2}$ ($t_{dif} = t - t_{ind}$). La pendiente de la gráfica B representa la k_{dif} .

Adsorción a la interface y reordenamiento

El análisis de esta etapa incluye a los procesos de penetración, anclaje y desplegamiento parcial de la proteína, todos ellos englobados en el nombre de adsorción, y también al proceso posterior de reordenamiento.

El descenso de la presión superficial, π , se evaluó sobre soluciones 1 g/L, concentración a la cual el proceso de adsorción no se ve limitado por el proceso de difusión. Las experiencias se realizaron en un tensiómetro de volumen gota LAUDA TVT2 (LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. Lauda-Konigshofen, Alemania) en modo dinámico. Las medidas se realizaron por triplicado con cada muestra, preparando las soluciones de estudio por duplicado. Se graficó π en función de t . Los datos experimentales se ajustaron a un modelo que emplea una ecuación bifásica de primer orden (3.16) (Panizzolo, 2005). La ec. 3.16 explica el proceso en dos fases, una atribuida al fenómeno de adsorción (a), y otra al fenómeno de reordenamiento (r).

$$\gamma = \gamma_a e^{-k_a t} + \gamma_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad \text{ec. 3.16}$$

Cada fase se representa mediante un parámetro de amplitud (γ_a , γ_r) y una constante de velocidad (k_a , k_r), las cuales caracterizan el proceso. γ_e se obtuvo de la gráfica γ vs $1/\sqrt{t}$, donde la ordenada al origen representa el valor de γ a tiempo infinito. El valor de γ a los 3 s de formada la interface (γ_{3s}) se obtuvo interpolando el tiempo (3 s) en la ecuación del modelo. Este valor permitió conocer

la magnitud del descenso de la tensión superficial a los 3 s en referencia a la tensión superficial al tiempo 0 s (γ_0) (3.17).

$$\pi_{3s} = \gamma_0 - \gamma_{3s} \quad \text{ec. 3.17}$$

Los datos experimentales se procesaron en el programa para análisis de datos OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.).

3.3.1.4. Reología interfacial dilatacional

La reología dilatacional estudia la respuesta de la interface cuando es sometida a deformaciones sinusoidales de compresión/expansión. Se asume que dichas deformaciones provocan cambios de área sin modificar la forma. La respuesta de la interface a la deformación se describe mediante el módulo complejo viscoelástico E , el cual refiere a la relación entre la respuesta en γ para una deformación de área relativa dada.

$$E = \frac{d\gamma}{\frac{dA}{A}} = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad \text{ec. 3.18}$$

El módulo viscoelástico (E) es un número complejo, que puede descomponerse en una parte real y otra imaginaria mediante la aplicación del modelo de Maxwell de resorte-amortiguador (Krotov, 2009). La parte real (E'), llamada módulo de almacenamiento, representa el comportamiento elástico de la interface, mientras que la parte imaginaria (E''), llamada módulo de pérdida representa la componente viscosa.

$$E = E' + iE'' \quad \text{ec. 3.19}$$

Para una interface completamente elástica, la deformación se encuentra completamente en fase con la respuesta en γ . No obstante, generalmente se observa un defasaje definido por un ángulo θ , el cual aumenta con la mayor contribución de la componente viscosa.

$$E' = |E| \cos \theta \quad \text{ec. 3.20}$$

$$E'' = |E| \sin \theta \quad \text{ec. 3.21}$$

$$\tan \theta = \frac{E''}{E'} \quad \text{ec. 3.22}$$

La composición relativa de ambas componentes se evaluó mediante el parámetro $\tan\theta$ (ec. 3.22). Experimentalmente los parámetros reológicos E , E' , E'' y $\tan\theta$ se evaluaron durante la formación de la película interfacial por un período de 10800 s en las condiciones de pH y μ antes descritas, a concentraciones 0,001, 0,01, 0,1 y 1 g/L. Se realizaron deformaciones sinusoidales de frecuencia 100 mHz durante 50 s, cada 500 s, con una amplitud de $0,1 \frac{\Delta A}{A}$ dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

3.3.2 Propiedades interfaciales estáticas en interfaces adsorbidas.

Las propiedades interfaciales estáticas refieren a aquellas propiedades estables en el tiempo otorgadas a la interface por las proteínas una vez alcanzado el equilibrio termodinámico. Este equilibrio debe ser alcanzado entre la interface-subfase-seno de la solución, y en la interface propiamente dicha luego de haber tenido lugar los procesos de reorganización intra e intermoleculares.

3.3.2.1 Tensiómetro de anillo de duNouy- balanza de torsión

La tensión superficial en estado de pseudo-equilibrio se evaluó con el tensiómetro de anillo de DuNouy (DuNouy Precision Tensiometer CSC n° 70535, CSC Scientific Company, Inc.). Este equipo se compone de una balanza de torsión con la cual se mide la fuerza necesaria para separar un anillo de platino-iridio de la superficie del líquido en estudio.

La balanza de torsión (Figura 3.5) está constituida por un alambre de acero (a) fijo por uno de sus extremos a una pieza metálica accionada por tres tornillos (A, B y C), los cuales permiten modificar la tensión del alambre para calibrar la balanza. El otro extremo del alambre (a) se encuentra unido a un tambor o dial graduado el cual es accionado por el tornillo D. Este último permite evaluar la tensión del alambre en la escala graduada (T). En la parte media del alambre (a) se halla una palanca liviana (P) en cuyo extremo libre se cuelga el anillo de platino-iridio (An). Este anillo se pone en contacto con la solución a ensayar la cual se encuentra sobre el plato de la balanza el cual se regula en altura.

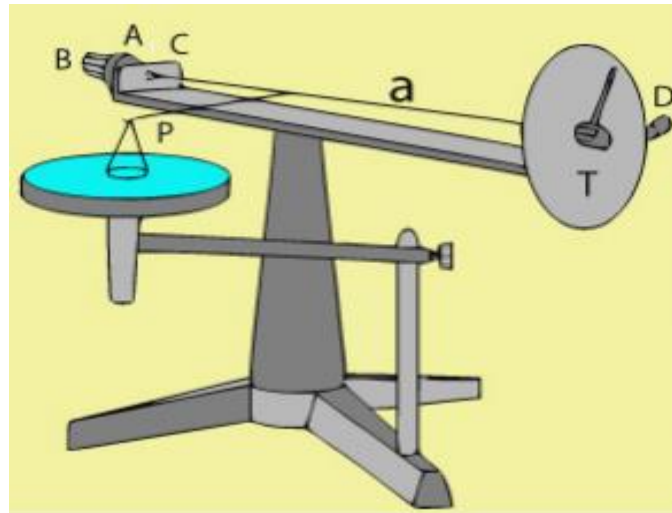


Figura 3.5. Tensiómetro de anillo de DuNouy.

Principio de funcionamiento

El método se basa en la determinación de la fuerza necesaria para separar el anillo unido a la balanza de torsión de la superficie de la solución en estudio. La fuerza necesaria se relaciona con la tensión superficial y de la siguiente manera (ec. 3.23):

$$\gamma = \frac{F_{\text{exp}} f}{4\pi r} \quad \text{ec. 3.23}$$

Donde F_{exp} es la fuerza aplicada al anillo al momento de desprenderlo, r el radio medio del anillo y f el factor de corrección.

El factor de corrección f (ec. 3.24) (Zuidema y Waters, 1941) se incluye a modo de corrección de las fuerzas de tensión que no están dirigidas verticalmente y de la forma del líquido al momento de desprenderse el anillo, con lo cual este factor depende de las dimensiones del anillo y de la naturaleza de la interface. El factor viene dado por:

$$f = 0,7250 + \sqrt{\frac{0,01452 F_{\text{exp}}}{c^2 (\delta_{\text{sol}} - \delta_{\text{aire}})} + 0,04534 - \frac{1,679r}{R}} \quad \text{ec. 3.24}$$

Donde c refiere a la circunferencia del anillo, δ_{sol} a la densidad de la solución, δ_{aire} a la densidad del aire, r al radio del alambre del anillo y R al radio medio del anillo. Para nuestro caso $c = 5,992$ cm, $\delta_{\text{sol}} = 1004$ g/L, $\delta_{\text{aire}} = 0$ g/L y $R/r = 53,6$.

Procedimiento experimental

Previo a la medida experimental se realizó la limpieza exhaustiva del anillo y de la cubeta que contendrá la solución a estudiar. Para eso el anillo durante algunos segundos hasta color rojo antes de cada medida. La cubeta se lavó con detergente, se enjuagó con agua destilada-desionizada y se calcinó en mufla a 400 °C durante 16 h. La limpieza de la cubeta es de fundamental importancia en aquellos ensayos en los que se deja estabilizar la interface durante varias horas, lo cual aumenta la probabilidad de detectar efectos no deseados producidos por la presencia de algún contaminante con actividad tensioactiva.

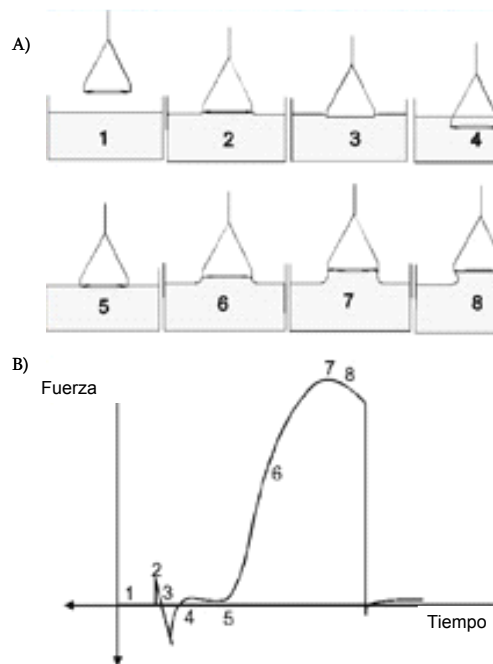


Figura 3.6. Esquema representativo del A) movimiento del anillo y B) del perfil de fuerza obtenido durante la medida de la tensión superficial con el tensiómetro de duNouy (tomado de <http://www.cscscientific.com/surface-tension/>)

El anillo se colgó del brazo de la balanza y se colocó la cubeta con la solución a ensayar sobre el plato de la balanza. Posteriormente se elevó la cubeta hasta que el anillo quedó completamente sumergido en la solución, aproximadamente 0,5 cm por debajo de la superficie (Figura 3.6, punto 4). Posteriormente se comenzó a descender lentamente la cubeta hasta llegar con el anillo a la superficie (Figura 3.6, punto 5), momento en el cual se taró la balanza. Inmediatamente se continuó descendiendo la cubeta al mismo tiempo que se tensionó el alambre con el tornillo D, manteniendo siempre la palanca en posición perpendicular, hasta que el film se cortó. La máxima fuerza que se leyó en el dial es la que permite conocer la tensión superficial experimental (Figura 3.6, punto 7), que corresponde a la tensión superficial corregida luego de la aplicación del factor de corrección.

3.3.2.2. Isotermas de adsorción a la interface aire/agua en estado de equilibrio termodinámico

La adsorción se evaluó a distintas concentraciones de proteína soluble luego de 24 h de formado el sistema. De acuerdo a Rodríguez Niño y col. (2001) y Benjamins (2000), cuando se utilizan proteínas como tensioactivo no se alcanza el equilibrio a las 24 h ni aún a las 72 h. No obstante ello, se evaluó la dependencia de π con el tiempo a las 24 h y se obtuvo $\frac{\delta\pi}{\delta t} \approx 0$, con lo cual se tomó este tiempo como suficiente para estudiar la interface en un estado cercano al equilibrio, denominado estado de pseudo-equilibrio.

Se partió de una solución proteica de concentración 10 g/L para cada una de las condiciones de pH y μ antes indicadas. A partir de cada una de estas se obtuvieron diluciones las cuales se dejaron reposar en cápsulas de 6 cm de diámetro por 1,5 cm de alto, durante 24 h a 23 ± 1 °C hasta alcanzar el estado de pseudo-equilibrio.

Para preparar las soluciones proteicas (Figura 3.7) en la primer cápsula se colocaron 26,64 mL de la solución 10 g/L, de la cual se tomaron 6,66 mL y se agregaron a la segunda cápsula junto a 26,64 mL de agua (dilución 1/5) obteniendo una concentración final de 2 g/L. De esta segunda cápsula se tomaron 13,32 mL de solución y se agregaron a la tercer cápsula junto a 13,32 mL de agua (dilución 1/2), obteniendo una concentración final en la tercer cápsula de 1 g/L. Esta serie de pasos de diluciones 1/5 y 1/2 se realizó sucesivamente hasta llegar a la concentración final en la última cápsula de 0,00001 (10^{-5}) g/L. Todas las cápsulas quedaron con 19,98 mL finales de solución, ocupando 0,7 cm del alto de las mismas. De este modo los fenómenos interfaciales son completamente independientes de los fenómenos de borde. La relación final área/volumen (m^2/m^3) resultó 1,41/m.

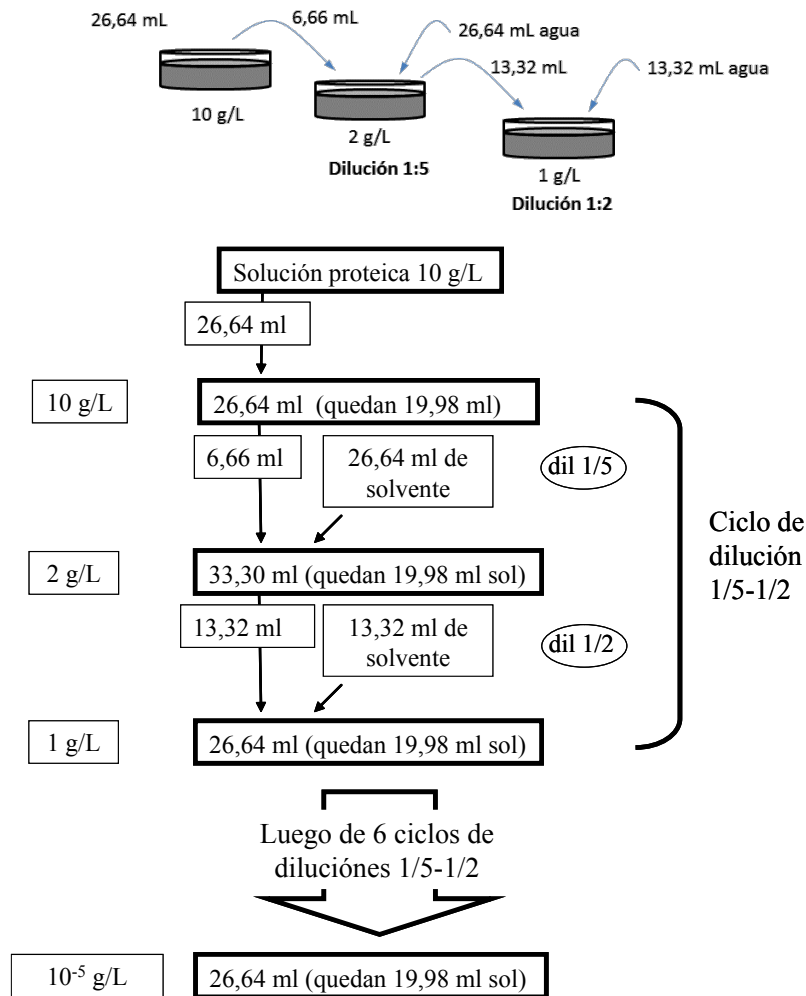


Figura 3.7. Esquema representativo del protocolo de preparación de las diluciones proteicas.

Las isothermas se graficaron como π en función de $\log C$ (logaritmo de la concentración).

3.3.2.3. Reología interfacial dilatacional

La reología interfacial de películas en estado de pseudo-equilibrio se estudió en un tensiómetro de gota dinámico (Tracker, IT-Concept. Saint-Clement, Francia) descrito en el punto 3.3.1.1. El comportamiento reológico a distintas frecuencias de deformación de la interface permite analizar los tiempos de relajación en la estructura interfacial a las diferentes concentraciones ensayadas. Los ensayos se llevaron a cabo a 3 y 11 h desde la formación de la película, a concentraciones 0,001; 0,01; 0,1 y 1 g/L en las condiciones de pH y μ antes descriptas. Se realizaron deformaciones sinusoidales de amplitud $0,1 \frac{\Delta A}{A}$ barriendo un rango de frecuencias entre 5 mHz y 300 mHz. Los resultados se presentan en gráficas de E , E' , E'' y $\tan\theta$ (parámetros definidos en el punto 3.3.1.4.) en función de la frecuencia de deformación.

3.3.3. Propiedades interfaciales estáticas en interfaces esparcidas.

En esta sección nos referimos a las interfaces formadas por deposición de la proteína en la interface misma, sin necesidad de migrar desde el seno de la solución a la interface. De esta manera se favorece la saturación interfacial.

3.3.3.1 Balanza de Langmuir

La balanza de Langmuir está constituida básicamente de dos partes. Por un lado, una cuba que contiene la solución a estudiar, y por el otro una placa de Wilhelmy conectada a una electrobalanza. Para nuestras experiencias utilizamos la balanza de Langmuir modelo Nima 601BAM (Nima Technology Ltd., Coventry, Inglaterra). La misma consta de una cuba de teflón, termostata en su parte inferior por una corriente de agua y de dos barreras móviles controladas electrónicamente, por medio de las cuales se modifica el área interfacial.

La utilización de la placa de Wilhelmy es uno de los tantos métodos utilizados para conocer π en interfaces. A diferencia del método del anillo de duNouy, éste método no requiere de la rotura de la interface para seguir el cambio de π para distintos estados de compresión de la interface creada. En nuestras experiencias se utilizó papel de filtro absorbente (Whatman 43) como sensor de presión adosado a la balanza.

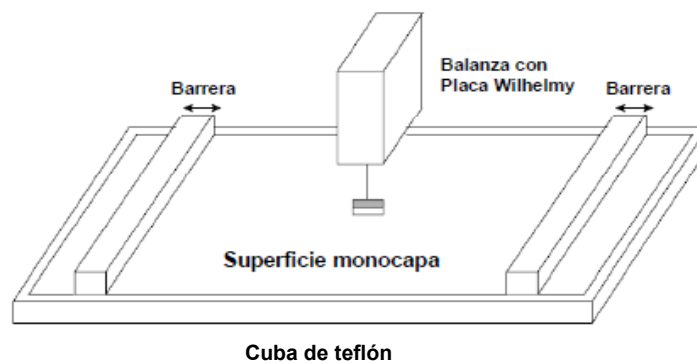


Figura 3.8. Representación gráfica de una balanza de Langmuir clásica.

Fundamento teórico

Esta técnica se basa en la medida del peso del líquido que sube a lo largo del perímetro de la placa cuando entra en contacto con la solución. La cantidad de líquido depende de la tensión superficial y de la densidad. La tensión superficial se relaciona con el peso a través del ángulo de contacto que tenga el menisco (3.25)

$$P_l = p\gamma \cos\theta \quad \text{ec. 3.25}$$

Donde P_l refiere al peso del líquido absorbido, p al perímetro de la placa, γ a la tensión superficial y θ al ángulo que forma el menisco. Para los casos en que se utiliza papel absorbente, el cual se moja completamente, se obtiene $\theta = 0$ y $\cos \theta = 1$ de manera que la ecuación 3.25 se simplifica a la ecuación 3.26

$$P_l = p\gamma \quad \text{ec. 3.26}$$

Las barreras que se encuentran en la superficie de la cuba permiten controlar el área interfacial. Luego de esparcida la proteína en la interface, el cambio del área permite analizar la respuesta de π a los cambios de concentración y modificaciones del estado conformacional de la proteína en la interface.

Procedimiento experimental.

Las soluciones de trabajo se prepararon como se detalla en el punto 3.1.7, obteniendo soluciones de proteína soluble, 1 g/L, las cuales se llevaron a un volumen final de 2,222 mL para obtener una concentración final 0,45 g/L.

El área inicial de la cuba se fijó en 350 cm² y se llenó con buffer hasta superar los bordes (aproximadamente 250 cm³). La temperatura se mantuvo a 20 ± 0,2 °C durante todo el ensayo. El papel se sumergió durante 2 min para dejarlo humedecer, luego se elevó completamente hasta despegarlo y se volvió a descender hasta la posición en que hace contacto con la interface. Se ajustó $\pi = 0$ mN/m y se levantó completamente el papel hasta despegarlo de la superficie de manera de controlar la pureza del buffer (se espera $\pi > 70$ mN/m).

La siembra de tensioactivo, la solución de proteínas en nuestro caso, se realizó con una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV 89520, EE. UU.). Se depositaron 100 µL de solución en 20 porciones de 5 µL cada una, lo cual corresponde a 45 µg de proteína (0,1286 µg/cm²). Se realizaron deposiciones equidistantes en la superficie de la balanza, para así facilitar la distribución y esparcimiento homogéneos de la proteína en toda la superficie interfacial. Luego de las deposiciones se dejó reposar el sistema durante 1 h y se comprimió a una velocidad de 40 cm²/min hasta un área final de 40 cm².

Los valores de π se registraron durante toda la compresión, se procesaron con el software OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.) y se analizaron las gráficas π (mN/m) vs área/proteína (cm²/µg) y $\delta\pi/\delta(\ln(\text{área/proteína}))$ vs π (cm²/µg).

3.3.3.2. Espectroscopía infrarroja de reflectancia-absorbancia

Esta técnica resulta de la aplicación de la espectroscopía infrarroja (IR) en el estudio de la estructura de las proteínas en interface. De la intensidad de los picos de absorción y de los espectros de las bandas amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) y amida II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) se puede conocer la concentración, y las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas en interface (Meinders y col., 2000).

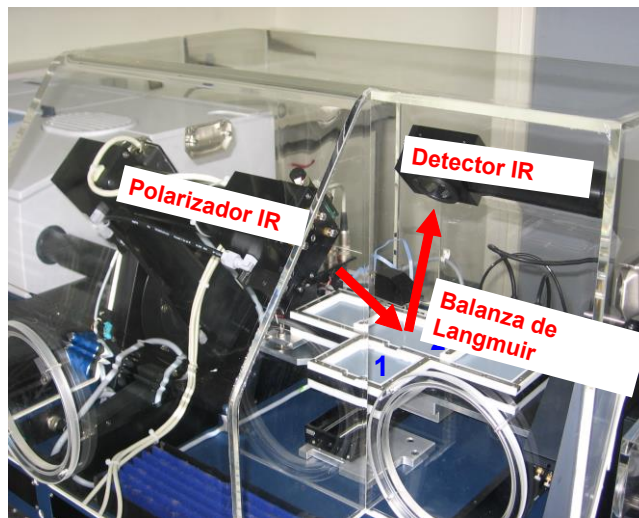


Figura 3.9. Fotografía y componentes del espectrómetro utilizado para los ensayos de espectroscopía infrarroja de reflectancia-absorbancia.

El equipo se encuentra conformado por un espectrómetro IR Bruker Vertex 70 (Bruker Optik GMBH, 76275 Ettlingen, Alemania), una unidad de reflexión Bruker A 511, un detector MCT y dos cubas. La primera cuba es de área fija y contiene la solución de referencia, mientras que la segunda cuba forma parte de una balanza de Langmuir, donde se esparce la macromolécula a estudiar. Ambas cubas se encuentran conectadas en su parte inferior para compensar las presiones y así mantener la misma altura de solución.

Fundamento teórico

La técnica se basa en la absorción de luz en el espectro IR realizadas por las macromoléculas adsorbidas en la interface, gracias a la vibración de los enlaces atómicos. La frecuencia de vibración de los enlaces y el espectro de absorción en el IR son característicos de la estructura que asume la macromolécula en la interface.

La luz emitida que llega a la superficie se divide en una parte que es reflejada y otra absorbida. Mediante la relación entre la luz reflejada por la interface con la proteína, y por la interface

referencia (sin proteína), se puede conocer indirectamente la luz absorbida por la proteína adsorbida. El resultado del espectro se presenta en unidades de reflectancia-absorbancia (RA) (3.27)

$$RA = -\log \frac{R}{R_0} \quad \text{ec. 3.27}$$

Donde R corresponde a la reflectividad de la interface cubierta con la proteína, y R_0 a la reflectividad de la interface sin proteína, interface de referencia (Mendelsohn y col., 2010).

Mediante el análisis de la relación entre $\frac{RA_{1658\text{cm}^{-1}}}{RA_{1628\text{cm}^{-1}}}$ se evaluó el cambio relativo de la estructura

secundaria a distintas π .

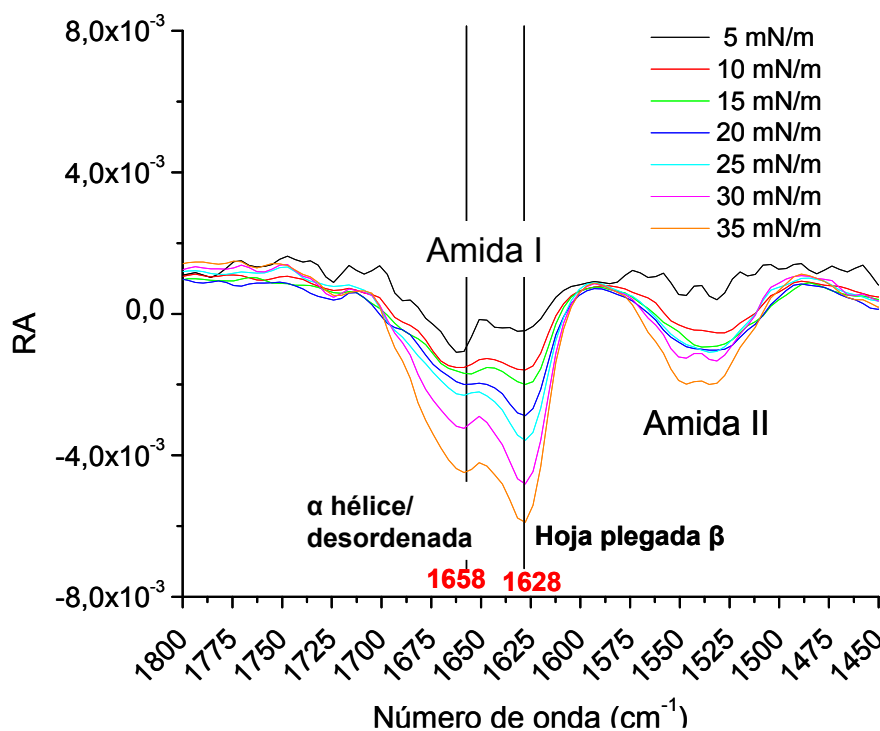


Figura 3.10. Gráfico de RA vs número de onda para distintos valores de π .

Procedimiento experimental

La interface se preparó de modo similar al descrito para la balanza de Langmuir Nima 601BAM en el punto 3.3.3.1. En este caso, se depositaron con una jeringa Hamilton 14 porciones de 5 μL .

cada una, de una solución de concentración 0,45 g/L. La reducción del número de porciones se debe al menor tamaño de la cuba (180 cm² en su posición inicial) como se detalló en el punto 3.3.3.1. Se sembraron 70 µL manteniendo una relación de proteína/área igual a 0,175 µg/cm², mayor a la utilizada en las experiencias en la balanza de Langmuir, pero con $\pi < 5$ mN/m. La superficie se comprimió a una velocidad de 40 cm²/min, misma velocidad relativa a la utilizada en la balanza de Langmuir Nima, comprimiendo el 90 % del área en 7,75 min.

La interface se comprimió en tramos de 5 mN/m, donde se mantuvo π constante para tomar espectros de polarización p (en el plano de incidencia) y s (perpendicular al plano de incidencia) con un ángulo de incidencia de 40°.

3.3.3.3. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica permite la obtención de imágenes de alta resolución del orden de nm por medio del barrido de una superficie con una sonda piezoeléctrica.

Preparación de la película de Langmuir-Blodgett

La muestra utilizada se denomina película de Langmuir-Blodgett, y se preparó transfiriendo la monocapa interfacial a una superficie sólida.

La interface se preparó en una balanza KSV la cual contiene un recolector, capaz de portar una superficie sólida, controlado por medio de un software. La balanza abierta tiene un área de 727,5 cm² y se sembraron 208 µL de la solución 0,45 g/L para mantener la misma relación proteína/área que en los ensayos de compresión (0,1286 µg/cm²) (punto 3.3.3.1.). Con el objetivo de mantener la misma velocidad relativa de compresión, la superficie se cerró a una velocidad de 83,15 cm²/min.

Las soluciones de trabajo se trataron con la sonda fluorescente Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.), que permite detectar la proteína marcada por microscopía de fluorescencia (Punto 3.3.3.4.).

La superficie sólida utilizada fue una porción de mica constituida por silicatos de aluminio y potasio en finas capas apiladas. Previo a la inmersión de la mica en la subfase se realizó la activación. Este proceso consiste en quitar con una cinta adhesiva las capas superficiales de la mica y generar así una nueva superficie virgen, libre de contaminantes.

El film de Langmuir-Blodgett se formó mediante el descenso de la mica en posición perpendicular a la interface a una velocidad de 1 mm/min durante 17 min sumergiendo 17 mm del largo de la

mica. La misma se retiró completamente de la subfase a la misma velocidad. Durante el descenso y ascenso se mantuvo constante la presión superficial (Figura 3.11).

Para cada muestra de trabajo se prepararon películas de Langmuir-Blodgett a $\pi = 10$ mN/m y $\pi = 30$ mN.

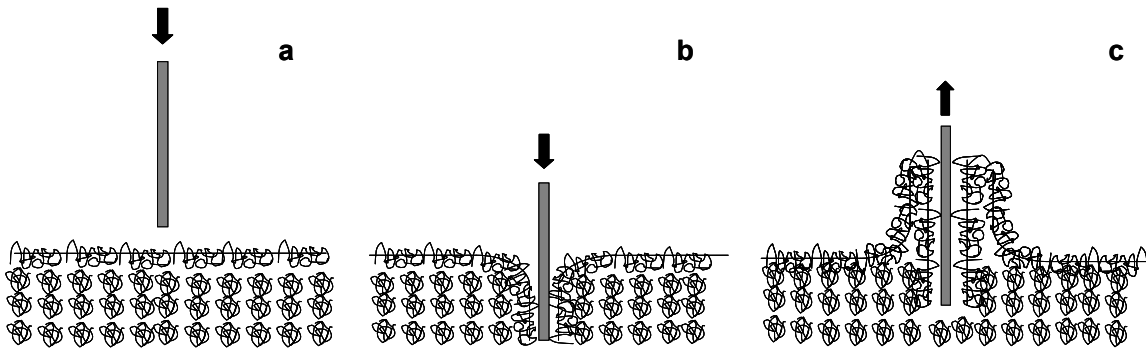


Figura 3.11. Descenso y ascenso de la mica indicada con una flecha sobre la interfase aire/agua para formar el film de Langmuir-Blodgett.

Procedimiento experimental

Las imágenes de las películas de Langmuir-Blodgett fueron obtenidas por microscopía de fuerza atómica mediante un AutoProbe CP Parque Scientific Instrument (Sunnyvale, EE.UU.). Las imágenes de AFM se registraron en el modo de repiqueteo por procesamiento de la señal de error, utilizando sondas piramidales RTESPA-CP de nitruro de silicio (cantilever) con una constante elástica de 20 N/m (Digital Instruments, Santa Bárbara, EE.UU.). El barrido lateral se realizó con una frecuencia de 1 línea/s, de manera de utilizar la menor fuerza posible (menos de 10 pN) y así reducir al mínimo la deformación de la muestra. La resolución se estableció en 256 x 256 pixel². Las imágenes se analizaron con el software WSxM 4,0 (Nanotec Electrónica, España). Para cada muestra se escanearon varias áreas, recopilando información de al menos cinco lugares de manera de garantizar una buena representatividad.

3.3.3.4. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia permitió la obtención de imágenes de menor resolución pero más representativas de la interfase.

Las muestras de estudio fueron las películas de Langmuir-Blodgett preparadas para el estudio por microscopía de fuerza atómica (punto 3.3.3.3).

Las películas se examinaron en un microscopio LEICA DMRD, utilizando un filtro para ajustar la longitud de onda de excitación a 460-495 nm y longitud de onda de emisión a 510-550 nm (emisión verde).

3.4 Propiedades espumantes

Las propiedades de formación y estabilidad de las espumas se evaluaron mediante el método desarrollado por Loisel y col. (1993) con algunas modificaciones.

3.4.1. Espumómetro

En este equipo la espuma se forma por burbujeo de gas a través de una placa fritada conteniendo la solución acuosa. El seguimiento de la evolución temporal de la espuma durante el burbujeo y posterior al mismo se lleva a cabo mediante medidas conductimétricas de la solución remanente y captura de imágenes digitales de la espuma propiamente dicha.

El equipo se encuentra formado por una columna de 2,35 cm de diámetro interno y 27,5 cm de largo abierta en los extremos, a la cual se le adosa en la parte inferior un receptáculo de su mismo diámetro sujetado a presión (Figura 3.12). El último permite la conexión entre el tubo y el equipo de burbujeo; contiene en su parte media un vidrio fritado que posibilita la contención de la solución y el pasaje del gas y adosado a sus paredes un par de placas metálicas de área A que permiten medir la conductividad. De acuerdo a la ecuación 3.28 la conductancia (C) depende de la conductividad del medio (c), del área de cada placa (A) y de la distancia de separación entre ellas (L)

$$C = c * \left(\frac{A}{L} \right) \quad \text{ec. 3.28}$$

Para un medio dado y distancia fija de separación entre placas, se puede conocer el área expuesta por medio de la medida de la conductancia. Aplicando la ecuación 3.29 podemos conocer el volumen del líquido remanente (V_{LS}) y de líquido incorporado en la espuma (V_{LE}) (ecuación 3.30)

$$V_{LS_t} = V_{LS_0} * \left(\frac{C_0}{C_t} \right) \quad \text{ec. 3.29}$$

$$V_{LE_t} = V_{LS_0} - V_{LS_t} \quad \text{ec. 3.30}$$

Con la intención de analizar la espuma visualmente, se adosó una cámara web a la columna de burbujeo, a fin de obtener imágenes durante su formación y desestabilización.

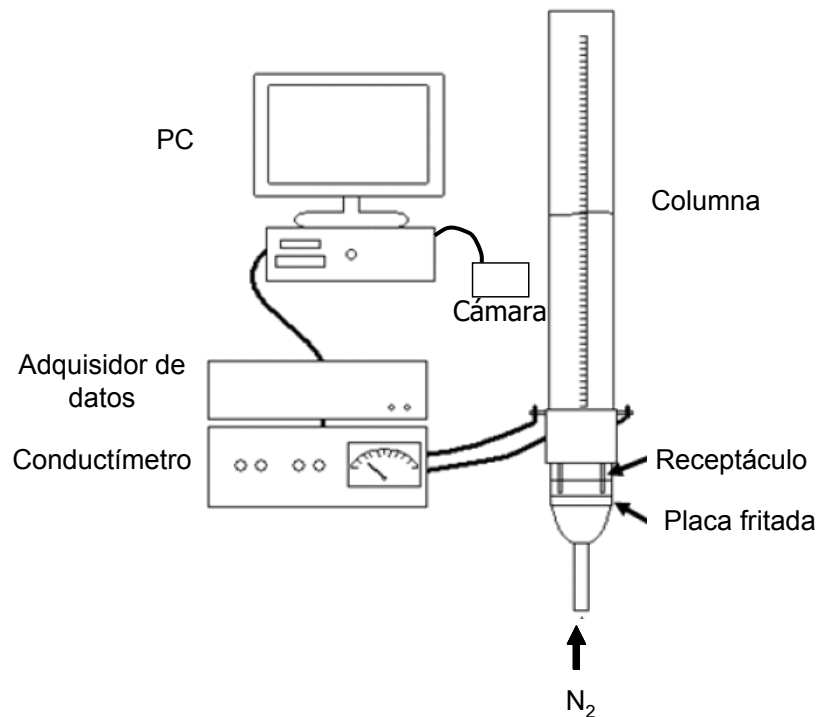


Figura 3.12. Esquema del espumómetro utilizado para la evaluación de las propiedades de formación y estabilidad de las espumas.

Procedimiento experimental

La espuma se formó por burbujeo de nitrógeno en la solución de proteínas. El gas atraviesa la placa de vidrio fritado G4 (5-15 μm de poro) y burbujea en 6 mL de solución proteica de concentración 1 g/L en las distintas condiciones de pH y μ . Para la condición de pH 2 y μ 0,5 se ensayaron soluciones de diferente concentración de proteína, 0,25; 1; y 5 g/L. El burbujeo de nitrógeno se realizó a un caudal de 80 mL/min durante 30 s.

Antes de realizar la medida experimental se limpió el receptáculo donde se encuentra la placa fritada con HNO_3 85 % p/v durante 12 h y se enjuagó varias veces con agua destilada.

Los datos experimentales se adquirieron con el programa Cortidat 01- Lec 2008 a través de un adquisidor de datos de 2 canales voltimétrico micro-controlado con comunicación serie a la computadora, ambos desarrollados por personal del CIDCA. Los datos se procesaron con el programa para análisis OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.). Los datos obtenidos durante el período de burbujeo se extrajeron para el análisis de los parámetros de formación. A partir del cese del burbujeo se consideró $t = 0$ para el análisis de los parámetros de desestabilización de la espuma.

Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara de video tipo web, controlada desde la computadora por medio del programa SupervisionCam (Versión 3.05.14). Se obtuvieron imágenes cada 2 s, desde 10 s antes del comienzo del burbujeo hasta el final de las experiencias. Las imágenes se obtuvieron en formato JPEG de dimensiones 320 x 256. Para normalizar el tamaño de las imágenes se tomó una imagen de un trozo de papel milimetrado pegado al tubo de burbujeo (Figura 3.13-A).

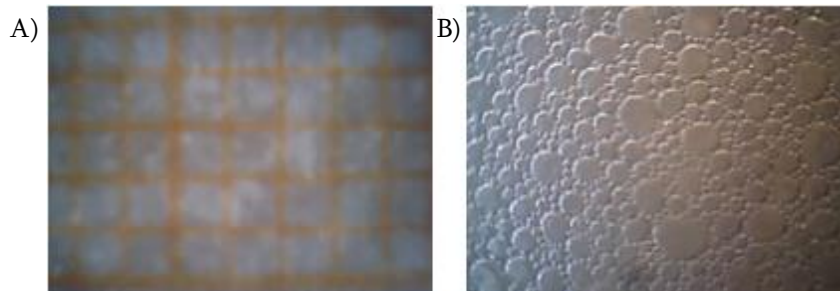


Figura 3.13. A) imagen del papel milimetrado sobre el tubo, B) imagen de una espuma formada.

3.4.1.1. Parámetros que permiten evaluar la capacidad de formación de espuma

A partir de los datos experimentales se calcularon:

- **Velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0)**

Se calculó como la pendiente máxima de la gráfica V_{LE} vs t , $\left(\frac{d(V_{LE})}{d(t)}\right)_t$ máx, durante el burbujeo,

la cual corresponde a la pendiente en el punto t donde $\frac{d(V_{LE})^2}{d(t)^2} = 0$.

- **Volumen de líquido incorporado en la espuma (V_{LE})**

Corresponde al volumen de líquido incorporado en la espuma al finalizar el burbujeo.

- **Volumen de espuma (V_{esp})**

Corresponde al volumen de espuma formado al final del burbujeo. Se obtiene de la ecuación 3.31 a partir de la lectura visual de la altura de la espuma, h , en la escala graduada de la columna de diámetro d .

$$V_{esp} = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 * h \quad \text{ec. 3.31}$$

- Densidad de la espuma (δ_{esp})

Se calculó a partir de la relación entre V_{LE} y V_{esp} al final del burbujeo.

$$\delta_{esp} = \frac{V_{LE}}{V_{esp}} \quad \text{ec. 3.32}$$

Parámetros que permiten evaluar la estabilidad de la espuma

- Tiempo medio ($t_{1/2}$)

Se define al tiempo medio como el tiempo transcurrido desde el cese del burbujeo hasta el drenado de la mitad del volumen de líquido incorporado a la espuma.

- Volumen de líquido en la espuma a los 10 min (V_{10})

Corresponde al volumen de líquido remanente en la espuma a los 10 min desde el cese del burbujeo. Es un parámetro que permite estimar la estabilidad de la espuma por procesos de *difusión y colapso*.

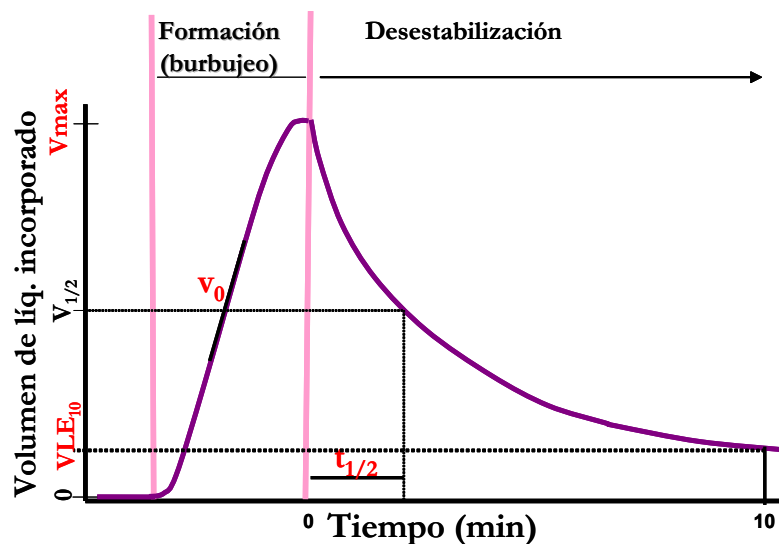


Figura 3.14. Volumen de líquido incorporado en la espuma en función del tiempo para un ensayo de evaluación de la capacidad de formación y de estabilidad de la espuma.

- Modelado de la desestabilización de la espuma

El fenómeno de desestabilización de la espuma se interpretó como dos procesos que ocurren en simultáneo. Los dos procesos fueron por un lado el drenado del líquido por gravitación, y por otro el drenado a causa de la difusión y colapso (Wright y Hemmant, 1987; Yu y Damodaran, 1991).

El modelo utilizado es un modelo bifásico exponencial de primer orden (ec. 3.33)

$$V_{LE}(t) = V_g e^{\left(\frac{-t}{\tau_g}\right)} + V_d e^{\left(\frac{-t}{\tau_d}\right)} \quad \text{ec. 3.33}$$

donde el primer término refiere al proceso de drenado gravitacional (g), y el segundo al drenado por difusión y colapso (d). Con la aplicación del modelo se ajustan cuatro parámetros, dos que se corresponden a la amplitud de cada proceso (V_g , V_d), y dos parámetros cinéticos que corresponden al tiempo de relajación de cada uno, τ_g y τ_d . El parámetro VLE para distintos t se calculó por medio de la inclusión de los valores de V_{LS} , obtenidos experimentalmente, en la ecuación 3.30.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo con el programa OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.), realizando experiencias por triplicado para cada condición.

3.5 Análisis estadístico

Los ensayos estadísticos se llevaron a cabo por medio del programa OriginPro 8 SR0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 EE. UU.). Los datos experimentales se promediaron a partir de al menos dos ensayos independientes y los resultados se presentan como media +/- desviación estándar. Los análisis de varianza significativa de medias (ANAVA) se realizaron por la prueba LSD con un $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización estructural del aislado proteico de *A.*

hypochondriacus (HA)

4.1.1. Calorimetría diferencial de barrido

El amaranto ha sido objeto de estudio desde hace varios años en nuestro laboratorio, por lo cual el aislado proteico de *A. hypochondriacus* (HA) ha sido caracterizado previamente (Martínez y Añón, 1996; Condés y col., 2009). A efectos de analizar el estado estructural de las proteínas presentes en el aislado preparado en esta oportunidad se realizó una calorimetría diferencial de barrido. Se preparó para eso una dispersión 20 % p/v de la muestra en buffer fosfato 35 mM pH 7,5 y μ 0,5. En la Figura 4.1 se muestra el termograma obtenido en el que se pueden identificar dos picos endotérmicos, uno a 71 ± 1 °C y otro a 98 ± 2 °C, característicos del aislado de amaranto obtenido por extracción a pH 9 y precipitación isoeléctrica a pH 5 (Martínez y col., 1997).

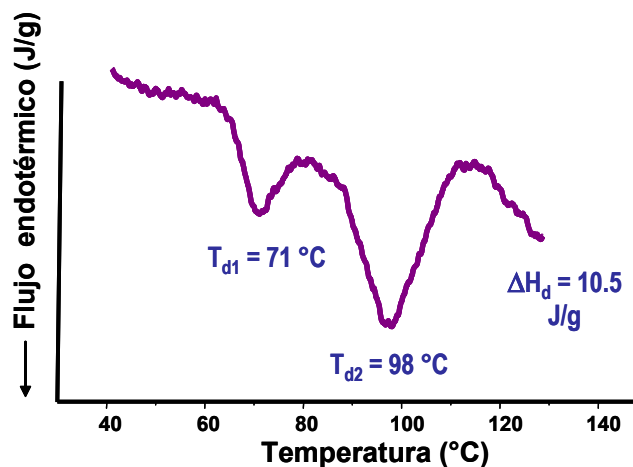


Figura 4.1. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido de una dispersión 20 % p/v de HA en buffer fosfato 35 mM pH 7,5, μ 0,5.

Los resultados obtenidos por Ventureira (2009) mediante calorimetría diferencial de barrido mostraron para un aislado a pH 8 μ 0,06 dos picos endotérmicos a 71 °C y 98 °C, equivalentes a los observados en este trabajo de Tesis para la dispersión a pH 7,5 μ de 0,5. En ambos casos la entalpía de proceso, ΔH_d 10,5 J/g, fue del mismo orden. El análisis calorimétrico del aislado

proteico a pH 2,0 reveló la ausencia de endotermas en el termograma, indicando que en medio ácido se produjo la desnaturalización completa de las proteínas presentes en el aislado.

4.1.2. Análisis de la composición polipeptídica

Se analizó la composición polipeptídica del HA en las condiciones control (pH 7,5; μ 0,5) utilizadas en la caracterización de las muestras, y en las condiciones de trabajo, pH 2 y pH 8, y μ 0,06 y μ 0,5. En todos los casos se realizaron electroforesis en condiciones nativa, desnaturalizante en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) y desnaturalizante en condiciones reductoras por tratamiento previo con 2-ME.

4.1.2.1. Análisis de la composición polipeptídica en dos dimensiones en condiciones control

Inicialmente se realizó una corrida electroforética en condición nativa, separando los polipéptidos por la relación carga/masa, manteniendo la estructura terciaria y secundaria de los mismos. A partir de esta primera dimensión se corrió una segunda dimensión en condición desnaturalizante (Figura 4.2-A), y desnaturalizante reductora (Figura 4.2-B).

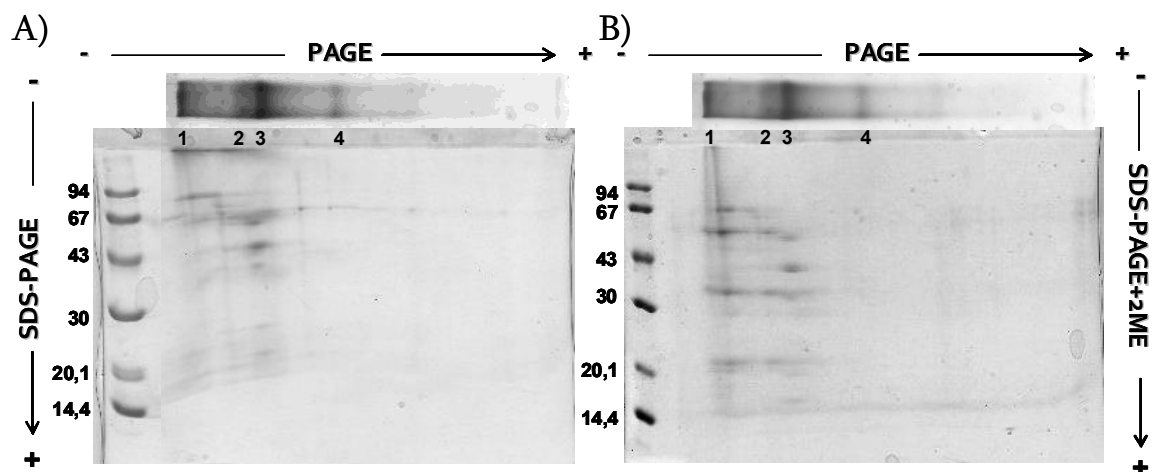


Figura 4.2. Electroforesis bidimensional del aislado solubilizado a pH 7,5 μ 0,5. Primer dimensión nativa, segunda dimensión A) desnaturalizante, B) desnaturalizante reductora.

Se observaron bandas de distinta intensidad y movilidad correspondientes a diferentes péptidos (Figura 4.2, bandas 1 a 4, primera dimensión). La banda de menor movilidad (Figura 4.2, banda 1) corresponde a agregados formados por las globulinas de reserva. Las dos bandas siguientes, de movilidad similar (Figura 4.2 bandas 2 y 3), corresponden a las globulinas P, 11S y 7S, lo cual se evidenció en la segunda dimensión donde se observaron polipéptidos de peso molecular 52-56

kDa (dímeros A-B), 32-34 kDa (péptido tipo A), 20-22 kDa (péptido tipo B), 56 kDa (globulina P) (Martínez y col., 1997). En presencia de 2-ME se detectó una disminución en la intensidad de la banda de 52-56 kDa y un incremento en las correspondientes a 20-22 kDa y 32-34 kDa, lo cual sugiere la ruptura de los enlaces disulfuro intercatenarios de la subunidad A-B.

4.1.2.2. Análisis de la composición polipeptídica de las fracciones solubles e insolubles en las condiciones de trabajo.

Se analizó la composición polipeptídica de la dispersión proteica previa solubilización en las diferentes condiciones de ensayo (pH 2 y pH 8, y μ 0,06 y μ 0,5) durante 1 h a 25 ± 2 °C, con agitación continua, y de las fracciones soluble e insoluble luego de la centrifugación de la dispersión a 10000 g durante 15 min a 25 ± 2 °C, en presencia y ausencia de 2-ME (Figuras 4.3 y 4.4).

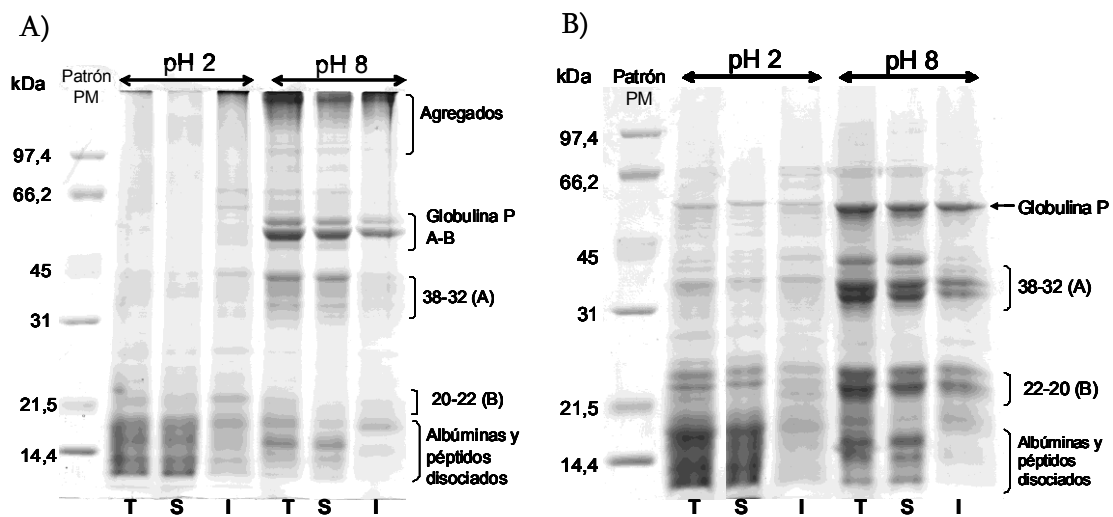


Figura 4.3. Electroforesis desnaturalizante, A) en condición no reductora, B) en condición reductora del total de la dispersión (T), la fracción soluble (S) y la fracción insoluble (I) a pH 2 y pH 8, μ 0,06.

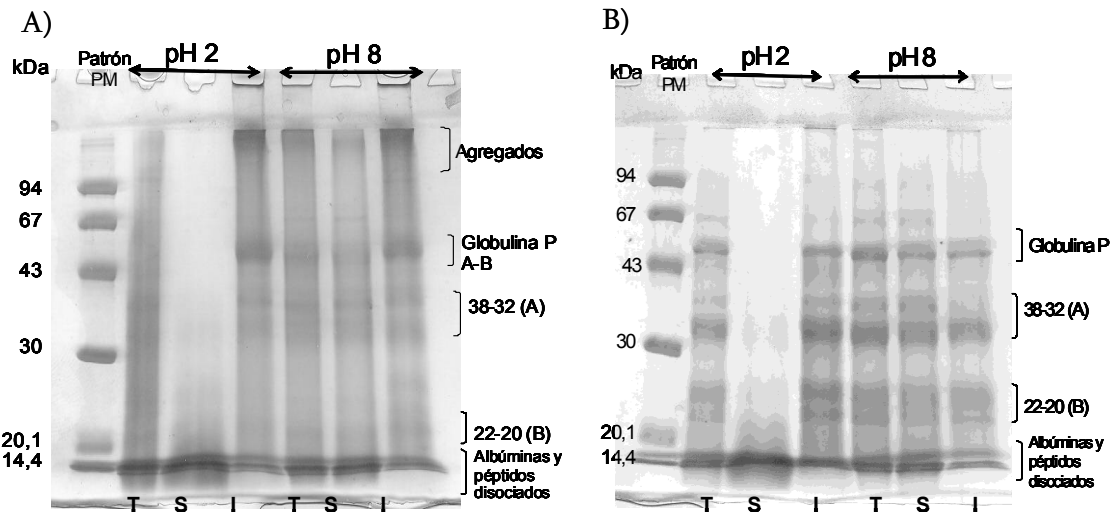


Figura 4.4. Electroforesis desnaturizante, en condición no reductora (a) y en condición reductora (b), del total de la dispersión (T), la fracción soluble (S) y la fracción insoluble (I) a pH 2 y pH 8, μ 0,5.

La fracción soluble (S) de HA a pH 8 μ 0,06 (Figura 4.4-A) presentó un perfil polipeptídico similar al de la dispersión total (T), con presencia de los polipéptidos observados en la condición control indicados en la Figura 4.2. En T se detectó mayor cantidad de proteínas agregadas que no logran entrar al gel separador, provenientes de la fracción insoluble (I). La fracción S se enriqueció en polipéptidos de la globulina 7S, de 66, 43 y 16 kDa (Quiroga y col., 2010) respecto de la I. A pH 2 se observa un perfil muy diferente. La composición polipeptídica de la dispersión T y la fracción S fueron similares, lo cual se debería a la elevada solubilidad de las proteínas en esta condición de pH y μ (87 ± 3 %) y la fuerte contribución de la fracción S en la dispersión T. La fracción S se encuentra formada en más de un 80 % por polipéptidos de tamaño molecular menor a 20 kDa pertenecientes a albúminas y péptidos provenientes de la disociación de globulinas. La presencia de péptidos de tamaño reducido, en una proporción importante, hizo pensar en la existencia de reacciones de hidrólisis. Ventureira y col. (2012) describieron la presencia de una proteasa aspártica activa a pH ácido en los aislados de amaranto, cuya acción hidrolítica se hace evidente a tiempos de reacción mayores a 20 min. La solubilización de las proteínas empleadas en las corridas electroforéticas se llevó a cabo durante un período de 60 min (punto 3.2.2.2), por lo que es esperable la presencia de péptidos productos de hidrólisis. En la fracción I se detectaron péptidos no hidrolizados y agregados que no entraron en el gel.

En presencia de 2-ME, tanto a pH 8 como a pH 2, se detectó un incremento de la intensidad de las bandas correspondientes a los péptidos de 54 kDa, y de los péptidos ácido, A, y básico, B, a expensas de los agregados y de la subunidad A-B.

A μ 0,5 (Figura 4.4) los perfiles electroforéticos presentaron una menor definición, siendo similares a los obtenidos a μ 0,06 para cada uno de los pH ensayados.

4.1.3. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular obtenidos deben ser interpretados en forma cuidadosa y bajo ciertos límites dado que se trata de mezclas proteicas y no de moléculas puras. No obstante a partir de los espectros característicos correspondientes a las diferentes estructuras secundarias descriptas: hélice α , hoja plegada β , estructura desordenada (Greenfield y Fasman, 1969), es posible llevar a cabo una interpretación en términos relativos. El pico máximo a 195 nm (Figura 4.5) se atribuye a la estructura hoja plegada β (espectro 2), mientras que el mínimo a 208 y 222 nm es característico del espectro de hélice α (espectro 1). El espectro indicado con el número 3, representa estructuras desordenadas. Por lo tanto, la estructura desordenada en una muestra que previamente presentaba estructuras hélice α y hoja plegada β , se observará como un corrimiento del mínimo de 208 nm a longitudes de onda menores, y la presencia de un hombro a 222 nm (Greenfield, 1996).

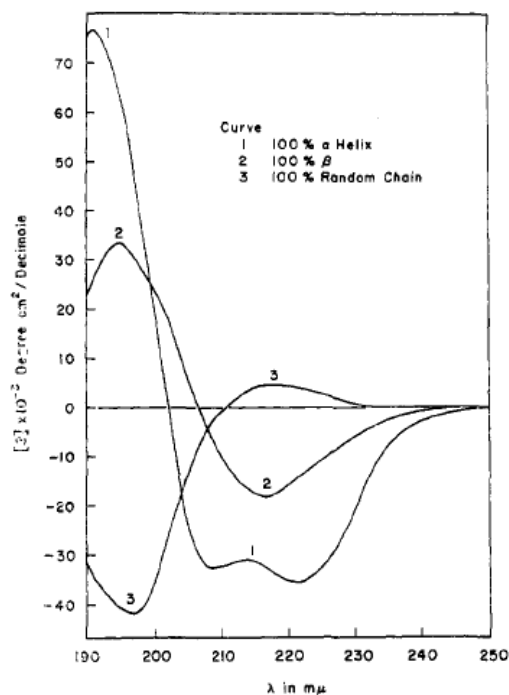


Figura 4.5. Espectro de dicroísmo circular de poly-L-lisina en la estructura hélice α (1), hoja plegada β (2) y estructura desordenada (3). Tomada de Greenfield, 1969.

La comparación de los espectros correspondientes a las muestras de pH 2 respecto a las de pH 8, ambas a μ 0,06 (Figura 4.6) mostró la desaparición del pico a 195 nm y un corrimiento del mínimo

del pico de 208 nm a 205 nm. Estas modificaciones de los espectros sugieren un aumento en el contenido de estructura desordenada a expensas de hoja plegada β al descender el pH. Resultados similares fueron observados para las globulinas 11S y 7S de soja (glicinina y β -conglucina) (Kim y col., 2004; Sze y col., 2007), y para la globulina de avena (Ma y col., 2001). Estudios realizados por Gorinstein y col., (1996) con globulinas de *A. hypochondriacus* a pH 7,2 y μ 0,4 mostraron la presencia de 31,4 % de estructura hélice α , valor un poco menor al presente en las globulinas de soja (39,8 %). No se detectaron diferencias entre los espectros correspondientes a las muestras de pH 8 a baja y alta fuerza iónica. El incremento de la fuerza iónica (μ 0,5) a pH 2 indujo la formación de una estructura más ordenada semejante a las estructuras detectadas a pH alcalino. Este efecto podría atribuirse al efecto salino sobre la carga neta de las moléculas proteicas y/o al enriquecimiento de la fracción soluble ácida en proteínas con mayor grado de estructura a causa del descenso de la solubilidad proteica de 87 ± 3 % (pH 2 μ 0,06) a $25,3\pm 0,4$ % (pH 2 μ 0,5). Las moléculas proteicas más desordenadas y con mayor grado de flexibilidad, interaccionarían con mayor facilidad y formarían agregados que participarían de la fracción insoluble.

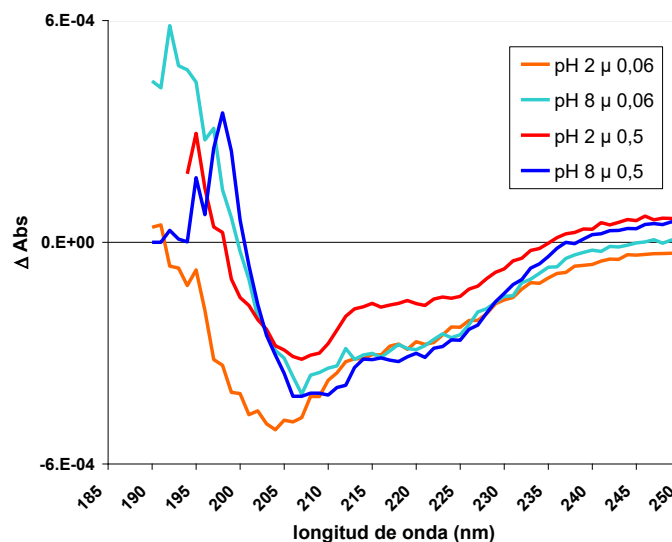


Figura 4.6. Espectros de dicroísmo circular de HA a pH 2 y pH 8, y μ 0,06 y μ 0,5.

Estos resultados son concordantes con la composición polipeptídica de las distintas muestras bajo ensayo y su grado de conformación nativa, resultados que indicaron la presencia a pH 8 de polipéptidos nativos con un tamaño molecular típico de las globulinas de almacenamiento, en tanto que a pH 2 se detectó la presencia de polipéptidos, de los cuales una porción habría sufrido reacciones de hidrólisis con la consecuente disminución de su masa molecular.

4.1.4. Análisis del tamaño de partículas

4.1.4.1. Distribución del tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz.

Seguidamente se analizó la distribución del tamaño de las partículas presentes en las fracciones solubles obtenidas a pH 2 y pH 8, a μ 0,06 y μ 0,5. Al analizar las gráficas de la distribución de tamaños en peso en función del radio hidrodinámico (asumiendo la partícula como una esfera) se observó en todas las condiciones ensayadas una distribución binomial, con un efecto marcado del pH y la μ .

La Figura 4.7-A presenta las distribuciones obtenidas a pH 8 μ 0,06 y μ 0,5. En ambos casos se observó una población de partículas de radios hidrodinámicos menores a 25 nm y otra de radios mayores. A μ 0,06 la primer población representó el 56 % de la masa, con la moda a 7,4 nm, mientras que la segunda representó el 44 % restante con una moda a 60 nm. Al incrementar μ se observó un aumento relativo de la primer población, 78 % del total de la masa, a expensas de la segunda (22 %) con un desplazamiento de la moda hacia menores radios (5,8 nm). Este aumento de la primera población fue mayor al esperado considerando la concentración de la solución en partículas de menor tamaño como consecuencia del descenso de la solubilidad a alta μ (de 70 % a 59 %). Por consiguiente es posible que coexistan otros fenómenos además de la insolubilización de partículas, tales como la disociación de moléculas proteicas que a baja μ se encontraban formando parte de la segunda población que corresponde a la fracción de partículas de mayor tamaño.

A pH 2 el tamaño de las poblaciones detectadas se encontró desplazado hacia la izquierda con respecto a pH 8. A μ 0,06 la primer población está constituida por un 31 % de partículas entre 2 nm y 7 nm, con una moda a 4,2 nm. La segunda población constituye el 69 % restante de la masa y está integrada por partículas entre 20 nm y 100 nm con la moda en 37,5 nm.

Al incrementar μ se observó un desplazamiento de las modas a radios menores con ensanchamiento de las dos poblaciones detectadas. La primera población se localizó en el rango de radios de 1,5 nm a 15 nm, con la moda a 2,8 nm comprendiendo el 49 % de la masa, mientras que la segunda representó el 51 % restante de la masa entre 15 nm y 100 nm con la moda a 32 nm. A pH ácido, al incrementar μ , se observó un aumento relativo de la primera población, lo que podría atribuirse a un mayor descenso de la solubilidad de las partículas de la segunda

población lo que enriquecería la solución en partículas de menor tamaño. Tal como se indicara previamente, este fenómeno estaría acompañado por una disociación de agregados y/o moléculas proteicas que conduce a partículas de menor tamaño.

La segunda población de las distribuciones analizadas se encontraría formada por agregados moleculares, ya que una proteína como la globulina 11S de 300-360 kDa (Marccone y Yada, 1998), que contiene entre 2500 y 3000 residuos aminoacídicos, tiene un radio hidrodinámico de 4,6-5 nm (http://www.calctool.org/CALC/prof/bio/protein_length). Este valor además sostiene nuestra hipótesis de la existencia de reacciones de disociación inducidas por la acidificación del medio e incremento de la fuerza iónica.

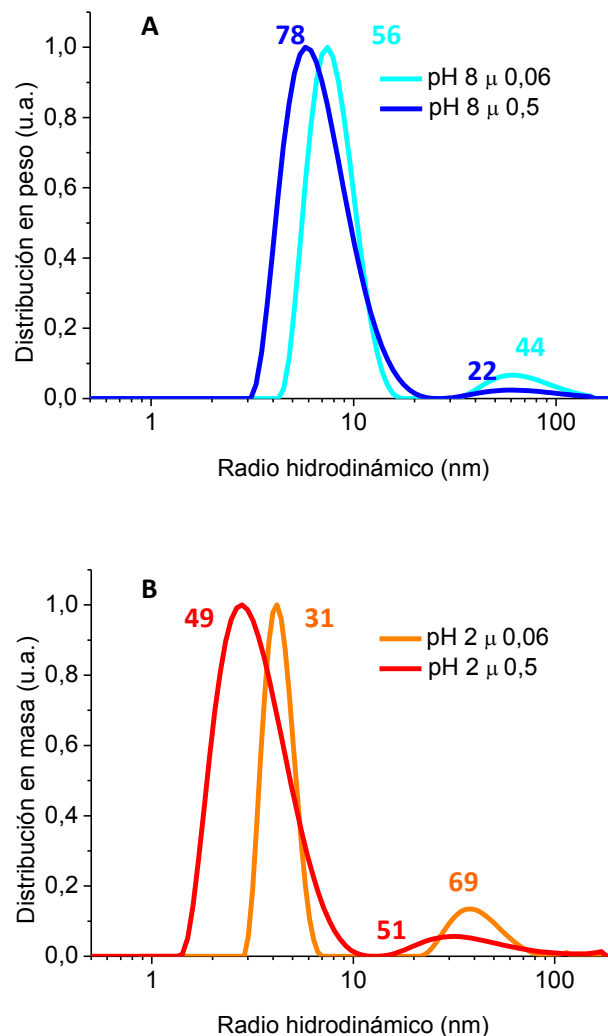


Figura 4.7. Distribución de tamaño de partículas a μ 0,06 y μ 0,5, A) pH 8 y B) pH 2.

4.1.4.2. Microscopía de fuerza atómica de la solución proteica.

Las soluciones proteicas a pH 2 y pH 8 (μ 0,06) se evaluaron por microscopía de fuerza atómica. Esta metodología permite dilucidar la posible existencia de partículas mayores a 200 nm, las cuales no fueron consideradas en el análisis de distribución del tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz.

pH8

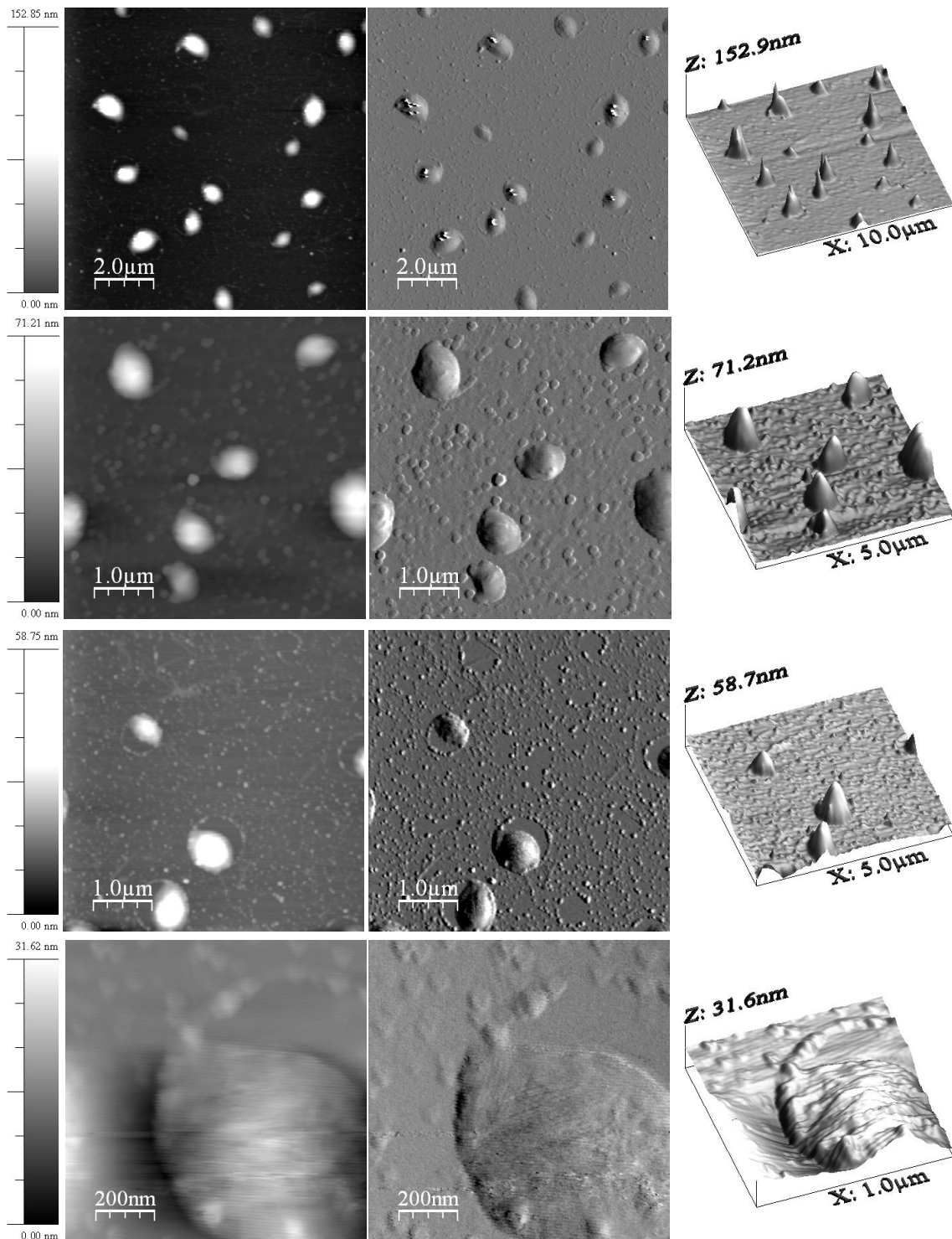


Figura 4.8. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la solución proteica a pH 8.

En las Figuras 4.8 y 4.9 se pueden observar dos poblaciones principales de partículas, una de diámetro entre 100 - 200 nm, y otra de aproximadamente 1 μm . La primer población aquí descrita podría corresponder a la población de mayor tamaño (25 - 150 nm de radio hidrodinámico) descrita en los análisis por dispersión dinámica de luz.

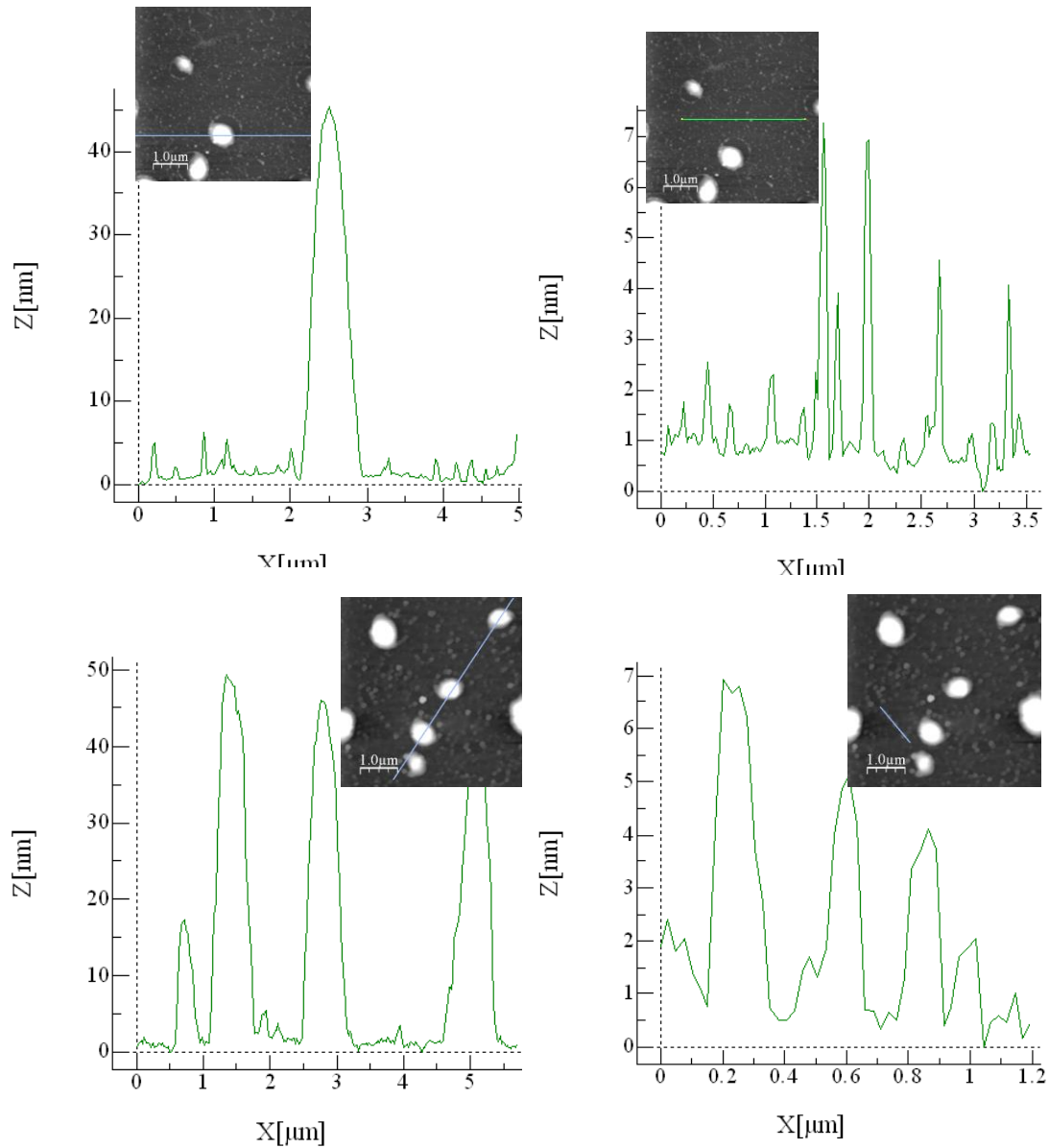


Figura 4.9. Perfil de alturas de las partículas sobre la línea azul o verde. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de fuerza atómica de las soluciones proteicas a pH 8.

pH 2

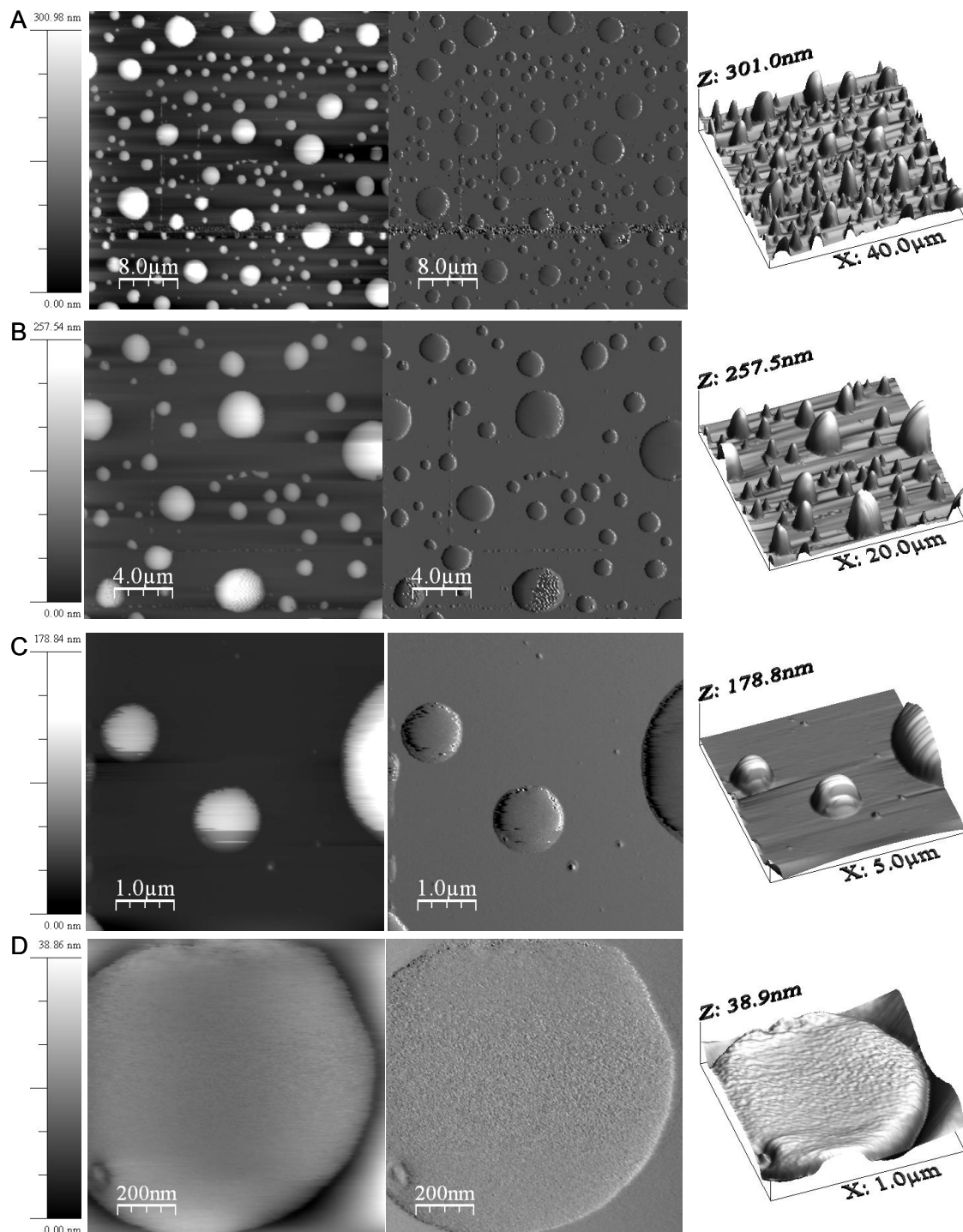


Figura 4.10. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la solución proteica a pH 2.

La microscopía de fuerza atómica de la solución proteica a pH 2 reveló la presencia de partículas de mayor tamaño que a pH 8 (Figuras 4.10 y 4.8, respectivamente). Las mismas presentan un diámetro aproximado de 4 μm (Figuras 4.10 y 4.11). También se pudo observar la presencia de

partículas más pequeñas (Figura 4.10-C) aunque en proporción menor en relación a lo observado a pH 8.

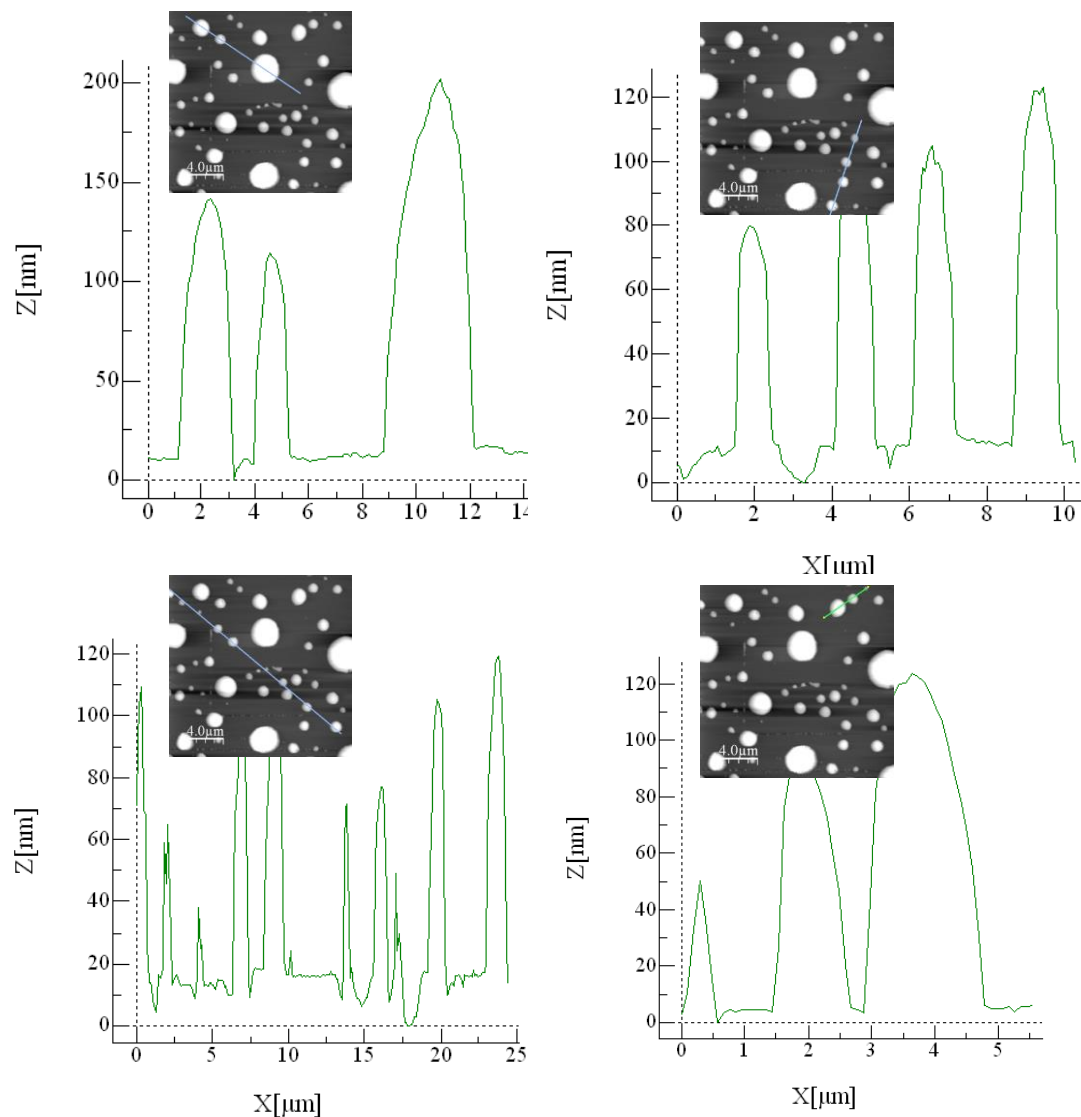


Figura 4.11. Perfil de alturas de las partículas sobre la línea azul. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de fuerza atómica de las soluciones proteicas a pH 2.

Del análisis conjunto del tamaño de partículas obtenido por los métodos descritos se podría concluir que a ambos pHs coexisten tres grandes poblaciones de partículas, siendo las dos más pequeñas las dilucidadas por el análisis de dispersión dinámica de luz y la tercera observada por microscopía de fuerza atómica.

A pH 8 se encuentran en mayor proporción las dos poblaciones más pequeñas en relación a la tercera, los agregados observados por microscopía de fuerza atómica. Estos últimos a pH 2 poseen mayor tamaño y se encuentran en mayor proporción. La población más pequeña de la solución a

pH 2 tiene su moda a un radio hidrodinámico inferior al de la misma población a pH 8. Siendo la solución a pH 2 la que posee los agregados más grandes, y así también los péptidos más pequeños en solución. Esto permitiría pensar en la posibilidad de otorgarle a la solución por medio de sus péptidos buena capacidad espumante por su capacidad de descender rápidamente la tensión interfacial, como así también buenas propiedades reológicas con la adsorción de los agregados en la interface.

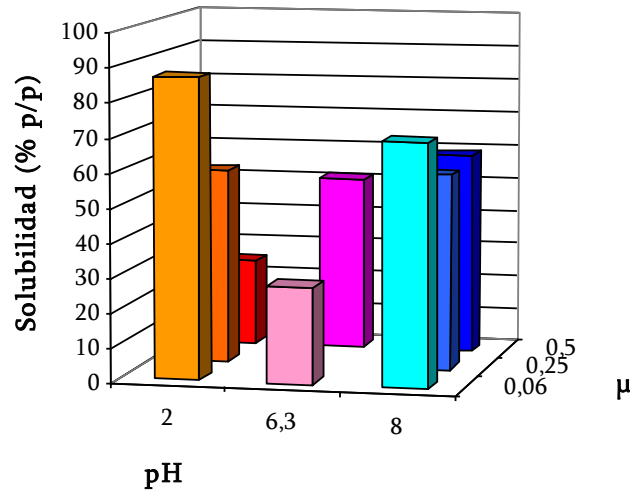
4.1.5. Solubilidad

La solubilidad es una expresión del estado de equilibrio entre las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas (Damodaran, 1989). Este parámetro no sólo presenta valor por sí mismo, sino que resulta relevante para el desempeño de la proteína en otras propiedades funcionales como capacidad gelificante, emulsificante, espumante, entre otras (Halling, 1981). La solubilidad de los aislados proteicos de amaranto se analizó en tres condiciones de pH (2, 6,3 y 8) y dos condiciones de μ (0,06 y 0,5) a temperatura ambiente.

Del análisis de los resultados a μ 0,06 (Figura 4.12), se observó un perfil típico en forma de U de la solubilidad en función del pH (Pilosof, 2000), con un mínimo localizado a pH 6,3, valor que se encuentra dentro del rango de pH correspondiente al punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de amaranto (4,5-6,5) (Konishi y col., 1991). A pHs cercanos al pI las proteínas muestran usualmente el valor mínimo de solubilidad (Vodjani, 1996). A este pH las proteínas presentan carga neta cero, lo que reduce las fuerzas electrostáticas intervinientes y conduce a una disminución de las interacciones hidrofílicas y aumento de las hidrofóbicas. Estas últimas hacen más probable la interacción proteína-proteína, favoreciendo la formación de agregados, la precipitación y por ende la disminución de la solubilidad.

Al aumentar la μ se detectaron distintas tendencias dependiendo del pH. A pH 6,3 se observó un aumento de la solubilidad de acuerdo a lo esperado según la teoría de Debye-Huckel. A pH 2 se detectó un descenso de la solubilidad, resultado concordante a lo observado por otros autores para heliantinina, la proteína tipo 11S de girasol (González-Pérez y col., 2004). El incremento de μ provoca disminución de la repulsión eléctrica debido al apantallamiento de las cargas superficiales de la proteína, y por consiguiente el aumento del número de sitios hidrofóbicos expuestos a causa de la desnaturalización y disociación ácida, factores que favorecen la interacción hidrofóbica, formación de agregados y precipitación proteica con descenso de la

solubilidad (Hermansson, 1973; Canella y col., 1985). A pH 8 se observó un leve descenso de la solubilidad, de 70 % a 59 % cuando se aumentó la fuerza iónica de 0,06 a 0,5.



pH \ μ	0,06	0,25	0,5
2	87 +/- 3	56,5 +/- 2,6	25,3 +/- 0,4
6,3	28 +/- 1		51 +/- 1
8	70 +/- 4	57 +/- 3	59 +/- 1

Figura 4.12. Solubilidad porcentual p/p de HA a pH 2, 6,3 y 8; y μ 0,06 y 0,5

4.2. Propiedades superficiales

4.2.1. Adsorción en la interface aire-agua

El proceso de adsorción en la interface se puede separar en varias etapas, *difusión*, *adsorción* (también llamada *penetración y anclaje*) y *reordenamiento* de la proteína en la interface, todas ellas termodinámicamente favorables, contribuyendo al descenso de la energía libre del sistema (MacRitchie, 1990).

En esta sección analizaremos el comportamiento de las proteínas de amaranto en las etapas antes mencionadas.

4.2.1.1. Difusión

Diferentes investigadores han indicado que a bajas concentraciones de proteína en solución la adsorción a la interface depende del proceso de difusión, de acuerdo a la ecuación integrada de Ward y Torday (4.1) (Ward y Torday, 1946), mencionada en Materiales y Métodos (punto 3.3.1.3).

$$\Gamma = 2C_0 \left(\frac{D_s t}{3,14} \right)^{1/2} \quad \text{ec. 4.1}$$

donde Γ corresponde a la concentración de proteínas en la interface, C_0 a la concentración de la proteína en el seno de la solución, D_s al coeficiente de difusión calculado y t al tiempo.

Si se grafica Γ vs $t^{1/2}$ se obtiene una relación lineal, cuya pendiente (k_{dif}) es directamente proporcional a D_s .

El cambio de Γ en el tiempo se puede expresar como (4.2):

$$d\Gamma/dt = \left(d\Gamma/d\pi \right) \left(d\pi/dt \right) \quad \text{ec. 4.2}$$

Si $\left(d\Gamma/d\pi \right)$ es constante, como ha sido demostrado por Graham y Phillips para seroalbúmina bovina (Graham y Phillips, 1979a) y Shen y Scanu para apolipoproteína A-I (Shen y Scanu, 1980), cabe asumir como válida la aplicación de la ecuación de estado de los gases ideales (4.3)

$$\pi = kT\Gamma \quad \text{ec. 4.3}$$

Al reordenar las ecuaciones 4.1 y 4.3 se obtiene la ecuación 4.4, a partir de la cual utilizando el cambio de π en el tiempo se puede evaluar la difusión de la proteína a la interface.

$$\pi = 2C_0 kT \left(\frac{D_s t}{3,14} \right)^{1/2} \quad \text{ec. 4.4}$$

Esta ecuación se denomina ecuación de Ward y Torday modificada y ha sido utilizada en los últimos años por varios autores para evaluar la velocidad de difusión de distintas proteínas a la interface (Perez y col., 2009; Pérez y col., 2008). La ecuación de Ward y Torday modificada permite una importante simplificación metodológica en el estudio de la difusión de proteínas a la interface, aunque se han observado desviaciones de la naturaleza lineal de la ecuación de estado

(Graham y Phillips, 1979a; Wüstneck y col., 1996; Cho y col., 1996) lo que llevaría a la aparición de un período de inducción, el cual será discutido más adelante.

Tripp y col. (1995) analizaron resultados obtenidos por diferentes investigadores y consideraron que en varios de ellos la ecuación de adsorción de Gibbs era inaplicable por dos razones básicas. Por un lado el potencial químico de la proteína desplegada era diferente al de su estado nativo y por otra parte, en general, la adsorción de la proteína a la interface era un proceso irreversible. Resulta difícil entonces predecir la cinética de adsorción de una proteína a la interface por medio de la evaluación del descenso de la tensión superficial. A pesar de ello este parámetro es el que más interesa conocer a efectos de comprender el comportamiento de las proteínas como agentes tensioactivos.

En aquellos ensayos en los que se observó un período de inducción la pendiente hallada en la región lineal permitió calcular un coeficiente de difusión al que varios autores llaman *coeficiente de difusión aparente* (Xu y Damodaran, 1992; Sengupta y col., 1999). En algunos casos los investigadores no hicieron una distinción entre la presencia o no del período de latencia y compararon directamente los valores de pendiente obtenidos.

En nuestro caso graficamos π vs t_{dif} para las distintas condiciones de ensayo y calculamos las k_{dif} .

Período de inducción

Fundamentos teóricos

Miller y col., (2000) indicaron que el tiempo de inducción corresponde a un período en el cual la proteína se adsorbe sin cambios en la tensión de la interface. Fainerman y Miller (1998) por su parte demostraron que la tensión superficial comienza a decrecer cuando el área de la interface se encuentra cubierta en un 10-20 %, previamente la contribución de la entropía de la película interfacial a π es muy reducida. La contribución de la entropía de mezcla a π está determinada por el factor $\frac{RT}{\omega}$, donde ω corresponde al área media que ocupa la proteína en la interface.

Dada la mayor área que ocupa una molécula de proteína respecto a una de surfactante, este factor es varios órdenes de magnitud menor para las proteínas, razón por la cual no se observa un período de inducción en el proceso de adsorción de los surfactantes (Miller y col., 2000). Resultados similares fueron observados por Razumovsky y Damodaran (1999) quienes estudiaron la adsorción a la interface de 39 proteínas a través de la evaluación de Γ y π en función del tiempo. Estos autores demostraron la existencia de una concentración superficial mínima (Γ_{min}), requerida para generar un aumento de π , la cual va desde 0,12 mg/m² para la ferredoxina a 1,21 mg/m² para

la fosfogliceroquinasa. En estos estudios no se encontró una relación directa entre el tamaño molecular y Γ_{\min} , razón por la cual se postuló que Γ_{\min} estaría relacionado con la cantidad e intensidad de las interacciones cohesivas entre las proteínas adsorbidas. De ese modo, cuanto mayor sea el número y la intensidad de las interacciones, menor será Γ_{\min} . Por otro lado, estos investigadores también sugirieron la posibilidad de que el período de inducción estuviera relacionado con el tiempo que requiere la proteína para desplegarse en la interface e interactuar con la misma. Esta última hipótesis fue validada por experiencias realizadas por Wei y col. (1986) quienes evaluaron la cinética de reducción de la tensión superficial de cinco proteínas modelo. En este trabajo los autores encontraron que la velocidad de descenso de tensión superficial está relacionada con la estabilidad conformacional de la proteína, lo que les permitió atribuir el período de inducción al tiempo necesario para el desplegamiento de la molécula en la interface. Anand y Damodaran (1995) explicaron el período de inducción durante la adsorción de lisozima a la interface asociándolo a la existencia de una barrera energética debida a la naturaleza de las fuerzas de dispersión (Sengupta y Damodaran, 1998).

Resultados experimentales

Nuestros ensayos demostraron la existencia de un período de inducción a bajas concentraciones de proteína en la solución (0,001 y 0,01 g/L) independientemente de las condiciones de pH y μ en las que se hallaran las proteínas de amaranto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13 y en la Tabla 4.1.

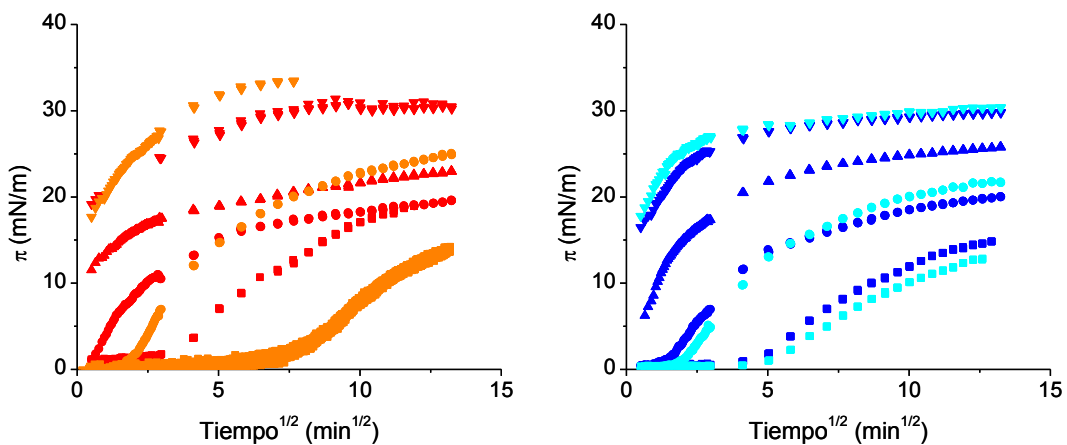


Figura 4.13. Evaluación de π en función de $t_{1/2}$ a concentración 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo), 0,1 g/L (triángulo), y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian) y μ 0,5 (azul), y pH 2 μ 0,06 (naranja) y μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Tabla 4.1. Períodos de inducción y constantes de difusión correspondientes a las distintas muestras y condiciones ensayadas

	Concentración (g/L)	Período de inducción (min)	k_{dif} (mN/m \sqrt{t})
pH 8 μ 0,06	0,001	21,7	1,43 (0,997)
	0,01	4,1	3,13 (0,992)
	0,1	ND	ND
pH 8 μ 0,5	0,001	21,3	1,45 (0,996)
	0,01	2,7	2,97 (0,993)
	0,1	-	8,70 (0,994)
pH 2 μ 0,06	0,001	64,3	1,52 (0,991)
	0,01	3,7	3,74 (0,994)
	0,1	ND	ND
pH 2 μ 0,5	0,001	12,2	1,85 (0,995)
	0,01	0,1	5,61 (0,998)
	0,1	-	-

ND: No determinado.

El valor entre paréntesis corresponde al r^2 del ajuste por cuadrados mínimos

A pH 8 μ 0,06 y concentración de proteína 0,001 g/L, el tiempo de inducción fue 21,7 min, el cual disminuyó a 4,1 min al aumentar la concentración proteica en un orden decimal. Cuando se utilizó μ 0,5 se obtuvieron valores similares, y el mismo efecto al aumentar la concentración de proteínas en la solución, detectándose tiempos de inducción de 21,3 min y 2,7 min a 0,001 g/l y 0,01 g/L de proteína, respectivamente.

A pH 2 μ 0,06 y a la menor concentración de proteínas ensayada (0,001 g/L) el tiempo de inducción fue de 64,3 min, el cual descendió a 3,7 min al aumentar la concentración en un orden decimal. El incremento de la concentración salina a μ 0,5, produjo modificaciones en las proteínas

que se reflejan en un descenso marcado de los tiempos de inducción, alcanzándose valores de 12,2 min y 0,1 min a 0,001 g/L y 0,01 g/L de proteína, respectivamente.

Estos resultados obtenidos se cotejaron con los hallados por Rodríguez Patino y col. (2004) para glicinina (11S) y β -conglucina (7S) de soja. Estos autores realizaron sus ensayos a una concentración de proteínas de 0,001 g/L, μ 0,05, pH 8 y pH 2. Los tiempos de inducción determinados para la glicinina (11S) y la β -conglucina (7S) fueron a pH 8 de 15 min y 0,87 min, y a pH 2 de 2,17 min y 5,83 min, respectivamente. Los tiempos de inducción que encontramos son del mismo orden que los hallados para las globulinas mayoritarias de la soja (Rodríguez Patino y col., 2004). Ambos estudios se realizaron con proteínas de reserva de semillas, que presentan ciertas similitudes estructurales. En cambio, el tiempo de inducción determinado por Miller y col. (1998) para β -caseína fue menor (11,7 min, para 0,00048 g/L de proteína). Este resultado es esperable dada la mayor flexibilidad estructural que caracteriza a la molécula de β -caseína, lo que permitiría un rápido desplegamiento de la misma en la interface y una rápida interacción intermolecular, factores responsables del incremento de π luego de la adsorción (Razumovsky y Damodaran, 1999; Wei y col., 1986).

Como hemos indicado previamente el descenso del pH a μ 0,06 retardó notablemente el comienzo de la difusión de la proteína a la interface. Este resultado parecería en principio ser opuesto al esperado dado que la acidificación conduce a la desnaturalización y disociación de las moléculas proteicas; no obstante a pH 2 se detectó una mayor proporción de partículas de mayor tamaño (punto 4.1.4.2.), lo cual reduce la probabilidad de adsorción dado el menor descenso de entropía de la interface que producen este tipo de partículas (Miller y col., 2000). Por el otro lado es sabido que las partículas cargadas positivamente deben superar una mayor barrera energética en el proceso de adsorción a la interface aire/agua, que las partículas cargadas negativamente (Sengupta y col., 1999). Al incrementarse la μ de la solución a pH 2 las proteínas son más estructuradas (punto 4.1.3) lo que permitiría pensar en tiempos de inducción más alto. Sin embargo dicho tiempo resultó menor debido al enriquecimiento de la solución en partículas de menor tamaño que resultó ser el efecto predominante (punto 4.1.4).

En todas las condiciones el aumento de la concentración de proteína en el seno de la solución generó una disminución del período de inducción.

Descenso de la tensión superficial dependiente de la difusión

A concentraciones de proteína de 0,001 y 0,01 g/L el proceso de adsorción se vio limitado por el proceso de difusión de la proteína a la interface. A partir de los datos mostrados en la Tabla 4.1 se pudo evaluar el efecto del pH y μ sobre la velocidad de difusión a la interface de las proteínas de amaranto. A pH 8 μ 0,06 se obtuvo un valor para la k_{dif} de 1,43 y 3,13 para 0,001 g/L y 0,01 g/L de proteínas respectivamente, valores que no varían significativamente al aumentar μ . A pH 2 los valores calculados de k_{dif} fueron mayores que a pH 8 a iguales concentraciones proteicas y μ . Al aumentar la μ se observó un aumento de la k_{dif} , lo cual podría deberse al menor tamaño de partículas y al descenso de la repulsión electrostática entre partículas, como fuera observado y analizado por otros autores (Dukhin y col., 1995; Tcholakova y col., 2006; Davis y col., 2004). Como era de esperar, el aumento de la concentración de proteínas en la solución generó, en todos los casos, un incremento en la velocidad de difusión de la proteína a la interface debido al mayor gradiente de concentración generado, hecho previsto por la ley de Fick.

En las distintas condiciones estudiadas, con excepción de pH 2 μ 0,06, el aumento de la velocidad de difusión se relacionó con un menor tiempo de inducción, coincidentemente con un menor tamaño de partícula y una mayor flexibilidad molecular. A pH ácido y baja μ se obtuvo un valor de k_{dif} mayor al esperado considerando el tamaño medio de partículas detectado. Diferentes trabajos han mostrado un aumento de la velocidad de difusión de tensioactivo o de proteína a la interface a pesar de un aumento del tamaño medio, siempre y cuando estuviera acompañado de un aumento de la estructura desordenada (Damodaran y Song, 1988), hecho comprobado en nuestro caso.

4.2.1.2. Adsorción y reordenamiento

Las cinéticas de adsorción y reordenamiento de la proteína a la interface solo pueden ser evaluadas midiendo el descenso de la tensión superficial cuando las concentraciones de proteína son lo suficientemente altas como para que la difusión no limite el proceso. En nuestras condiciones experimentales estos dos procesos se estudiaron a concentraciones de proteína en solución de 1 g/L.

Varios modelos matemáticos permiten interpretar el proceso de adsorción y el de reordenamiento de las proteínas en la interface. En nuestro caso emplearemos un modelo bifásico exponencial de primer orden desarrollado por Panizzolo (2005) el cual fue descrito en Materiales y Métodos (punto 3.3.1.3). A modo de recordatorio, en este modelo el primer término describe la adsorción

(a) y el segundo el reordenamiento (r) de la proteína a la interface. Cada uno de ellos incluye la amplitud del fenómeno que describe, γ , y la constante de velocidad del mismo, k.

$$\gamma = \gamma_a e^{-k_a t} + \gamma_r e^{-k_r t} + \gamma_e \quad \text{ec. 4.5}$$

Adsorción

Esta etapa corresponde a la penetración y anclaje de la proteína en la interface, lo que requiere del desplegamiento parcial de la proteína debido al cambio del entorno agua por aire.

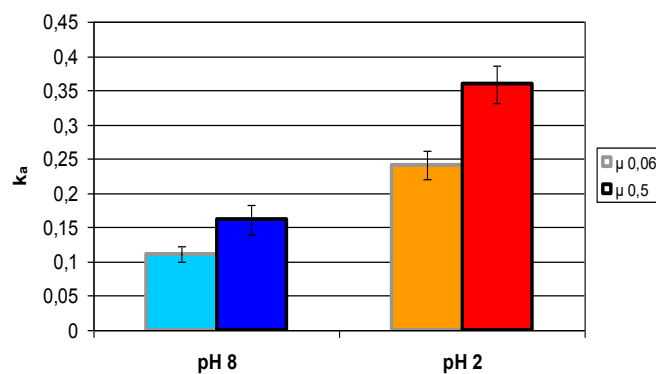


Figura 4.14. Constante de velocidad del proceso de adsorción (k_a) a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

Los datos calculados para k_a , se presentan en la Figura 4.14. La menor velocidad de adsorción, se observó a pH 8 μ 0,06. El aumento de μ y el descenso del pH provocaron un aumento de la velocidad de adsorción. Estos resultados son concordantes con la mayor contribución de las partículas de menor tamaño a la solución, inducidos por el aumento de μ y la mayor proporción de estructura desordenada inducida por el descenso del pH. Cabe recordar que Miller y col. (2000) indicaron que un menor tamaño de partícula en solución favorece el aumento de la entropía interfacial, y así la penetración y anclaje de la misma a la interface.

Para lograr un rápido descenso de la tensión superficial no solo es relevante la velocidad de adsorción sino también la reducción de la energía libre superficial causada por la proteína adsorbida, lo cual se evaluó por medio de la amplitud del proceso, γ_a . Los resultados obtenidos (Figura 4.15) no mostraron diferencias significativas en el descenso de la tensión superficial entre pH ácido y alcalino. No obstante se detectó un mayor descenso de la tensión superficial al aumentar la μ , lo cual se podría correlacionar con la menor repulsión de cargas entre partículas, favoreciendo un mejor acomodamiento de las mismas en la interface (Mackie y col., 1999).

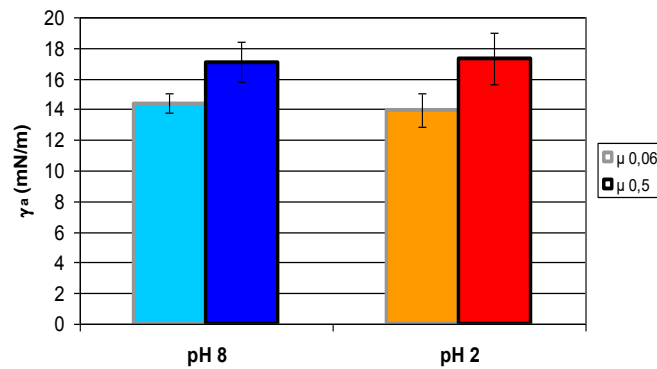


Figura 4.15. Amplitud del proceso de adsorción (γ_a) a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

Reordenamiento

El reordenamiento es un fenómeno característico de las interfaces en las que encontramos proteínas ancladas (Damodaran, 1996). En esta etapa las proteínas se reacomodan para lograr la conformación estérica y termodinámica más favorable, exponiéndose la mayor cantidad posible de aminoácidos hidrofóbicos al aire, la mayor cantidad posible de residuos hidrofílicos al agua (Dill, 1990), y estableciéndose interacciones con otras proteínas del entorno. Al analizar las constantes de velocidad de reordenamiento, k_r , (Figura 4.16) se encontraron valores de un orden de magnitud menor que los de las constantes correspondientes al proceso de adsorción (k_a). No se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones de pH y μ ensayadas.

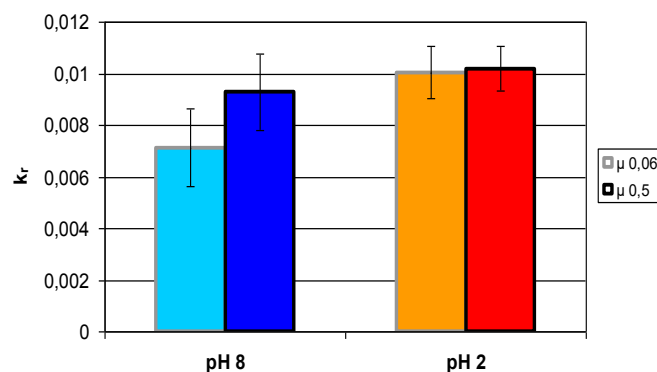


Figura 4.16. Constante de velocidad del proceso de reordenamiento (k_r) a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

La amplitud del descenso de la tensión superficial debido al reordenamiento molecular en la interface (γ_r) fue menor que la debida a la adsorción de la proteína a la interface en todas las condiciones ensayadas. A pH 8 μ 0,06 se observó un descenso medio de γ_r de 6,9 mN/m, ascendiendo esta magnitud a 8,1 mN/m a μ 0,5, sin llegar a ser una diferencia significativa. Al descender el pH la amplitud de reordenamiento resultó significativamente menor que en las soluciones de pH alcalino. Sin embargo, los valores obtenidos a ambas μ , 4,3 mN/m a μ 0,06 y 3,7 mN/m a μ 0,5, no resultaron ser significativamente diferentes entre sí.

El mayor descenso de la tensión superficial detectado a pH 8 respecto a pH 2 debido al reordenamiento molecular, podría estar relacionado con el mayor tamaño de los polipéptidos presentes en la solución de pH alcalino (Figuras 4.3 y 4.4), a la conformación nativa de dichos polipéptidos (punto 4.1.1) o a la posibilidad de cambiar su conformación tridimensional y reestructurarse en la interface.

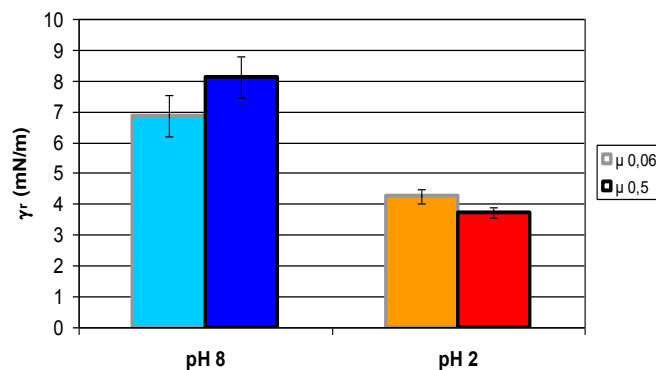


Figura 4.17. Amplitud del proceso de reordenamiento (γ_r) a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

En el proceso de adsorción se observó un efecto significativo del pH y la μ en la velocidad, mientras que en el valor de la amplitud solo fue significativo el efecto de μ . En tanto que en el proceso de reordenamiento solo se detectó un efecto significativo del pH.

Los resultados obtenidos conducen a pensar que en la etapa de adsorción resulta más importante el efecto que ejerce el tamaño de partícula y la presencia de sales que neutralizan cargas, mientras que para la etapa de reordenamiento tiene mayor incidencia la capacidad de los polipéptidos de modificar su conformación.

4.2.1.3. Tensión superficial en el equilibrio

A partir de las curvas experimentales obtenidas en el tensiómetro de volumen de gota se calculó la tensión superficial en el equilibrio (γ_e) para cada condición. Los valores determinados se muestran en la Figura 4.18. Este parámetro resultó menor en las muestras preparadas a pH 8 que en aquellas preparadas a pH 2 (Figura 4.18). Este efecto podría ser atribuido a la mayor contribución de la etapa de reordenamiento en el descenso de la energía interfacial. El incremento de μ provocó aún un mayor descenso debido a la menor repulsión de cargas y mayor amplitud de la etapa de adsorción.

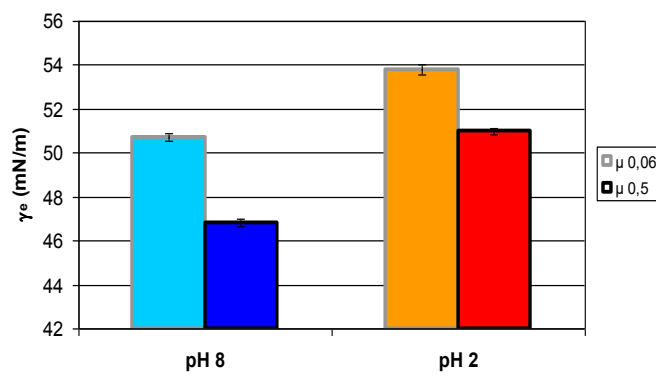


Figura 4.18. Tensión superficial en el equilibrio (γ_e) de soluciones proteicas 1 g/L a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

Algunos autores han relacionado la capacidad de descenso de la tensión interfacial con algunas propiedades funcionales superficiales, como las propiedades espumante y emulsionante (Kitabatake y Doi, 1988; Wilde, 2000; Yampolskaya y Platikanov, 2006). Sin embargo cabe señalar que para que el descenso de la tensión interfacial pueda relacionarse con la funcionalidad, tendría que producirse a tiempos en los que se forme la burbuja en la espuma o la gota en la emulsión, independientemente de la tensión interfacial que el sistema pueda alcanzar a tiempos más largos (Kitabatake y Doi, 1988). Para analizar ese momento, calculamos a partir del modelo antes planteado la tensión superficial a los 3 segundos de formada la interface y la presión superficial a dicho tiempo (π_{3s}) (Figura 4.19).

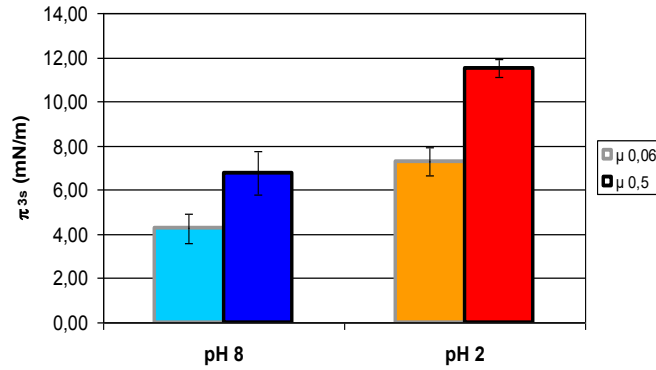


Figura 4.19. Presión superficial a los 3 s de formada la interface(π_{3s}) de soluciones proteicas 1 g/L a pH 8 y pH 2, a μ 0,06 (contorno gris) y μ 0,5 (contorno negro).

La presión interfacial π_{3s} determinada con las muestras preparadas a pH 8 fueron menores que las obtenidas con las muestras a pH 2, y menores aún a μ 0,06 que a μ 0,5. Ya que el descenso de la tensión interfacial en tiempos tan cortos se debe casi totalmente al proceso de adsorción (96,6 %, Tabla 4.2), se analizó la dependencia de la constante de velocidad de adsorción k_a con la presión superficial a los 3 segundos.

Tabla 4.2. Descenso de π_{3s} debido al proceso de adsorción y reordenamiento en ambas condiciones de pH y μ a 25 °C.

	pH 8		pH 2	
	μ 0,06	μ 0,5	μ 0,06	μ 0,5
Π_{3s} (mN/m)	4,23	6,77	7,31	11,52
Π_{3s} -adsorción (mN/m)	4,08	6,55	7,18	11,41
Π_{3s} -reordenamiento (mN/m)	0,15	0,22	0,13	0,11
Π_{3s} -adsorción/ Π_{3s} (%)	96,6	96,7	98,3	99,0

Estos resultados se presentan en la Figura 4.20, en la que se observa la proporcionalidad entre k_a y el descenso de la tensión superficial a los 3 segundos en todas las condiciones ensayadas.

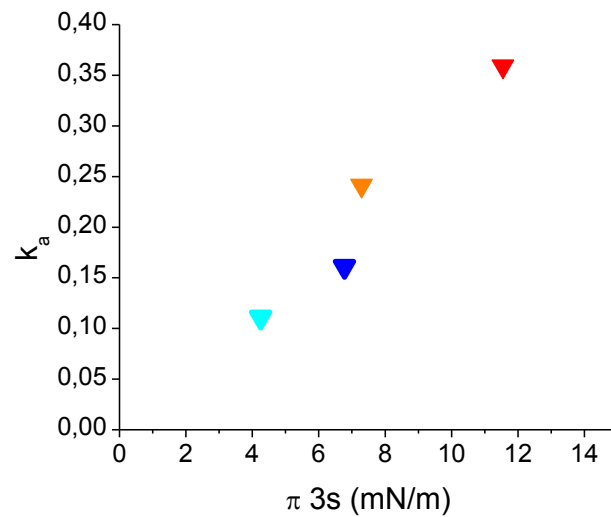


Figura 4.20. Relación entre k_a y π_{3s} en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

4.2.2. Viscoelasticidad interfacial

4.2.2.1 Comportamiento viscoelástico de la película interfacial durante el proceso de adsorción

El estudio de las propiedades viscoelásticas de la interface se llevó a cabo mediante ensayos de reología interfacial dilatacional, evaluando la respuesta de la tensión superficial en el tiempo frente a deformaciones oscilatorias de expansión-compresión. Se determinó el módulo viscoelástico, E^* , para muestras en todas las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración estudiadas (Figura 4.21).

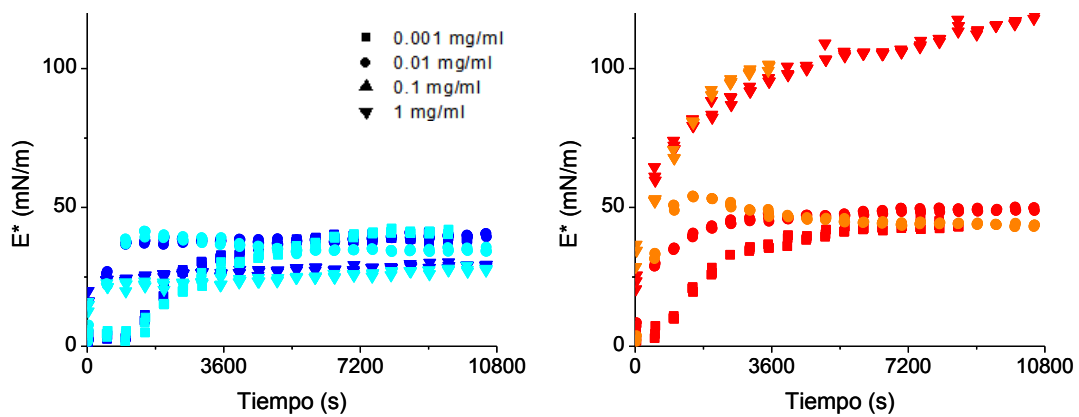


Figura 4.21. Evaluación del módulo complejo (E^*) en función del tiempo a concentración 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo) y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones A- pH 8 μ 0,06 (cian) y μ 0,5 (azul) B- pH 2 μ 0,06 (naranja) y μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

En todas las condiciones ensayadas se observó un incremento del módulo viscoelástico (E^*) con el envejecimiento de la interface. E^* es un parámetro de evaluación de la resistencia a la deformación de la interface, generalmente asociado con la rigidez de la misma.

A pH 8 no se observó diferencia entre las condiciones de μ ensayadas. Al aumentar la concentración de proteínas de 0,001 g/L a 0,01 g/L E^* se incrementó con mayor velocidad. No obstante, a pesar del mayor descenso de γ a 0,01 g/L con respecto a 0,001 g/L, a las 3 horas de formada la interface se alcanzaron valores de $E^* \sim 40$ mN/m sin diferencias significativas. A 1 g/L, E^* aumentó a igual velocidad que a 0,01 g/L, alcanzándose menores valores de E^* (~ 28 mN/m), lo que sugiere un debilitamiento de la interface a pesar del incremento de la concentración proteica.

A pH 2 no se observó diferencia entre las dos condiciones de μ ensayadas. Al aumentar la concentración de proteínas E^* se incrementó a mayor velocidad. Cuando se estudiaron las soluciones proteicas de concentración 0,001 g/L y 0,01 g/L, a las 3 horas de formada la interface, el valor de E^* llegó a ~ 46 mN/m. Las soluciones más concentradas, 1 g/L, a diferencia de lo observado anteriormente a pH 8, mostraron un incremento en el valor de E^* con el tiempo. La interface incrementó su resistencia a la deformación alcanzando valores de 116 mN/m en el rango de tiempo ensayado.

Si intentamos trasladar estos resultados a la formación de la interface en el proceso de espumado, vemos que cuanto mayor sea el módulo elástico, se debe invertir mayor energía para ampliar la interface. Sin embargo ya que a bajos valores de E^* se favorece el proceso de colapso, se debe encontrar una situación de compromiso (Langevin, 2000).

4.2.2.2. Viscoelasticidad de la interface en función de la concentración

Al evaluar el incremento de la resistencia a la deformación (E^*) en función de π para la solución proteica 0,001 g/L, se observó la formación de películas interfaciales en estado de equilibrio termodinámico en todas las condiciones de pH y μ analizadas. Este resultado no fue hallado cuando se analizaron las muestras a mayores concentraciones de proteína (Figura 4.22).

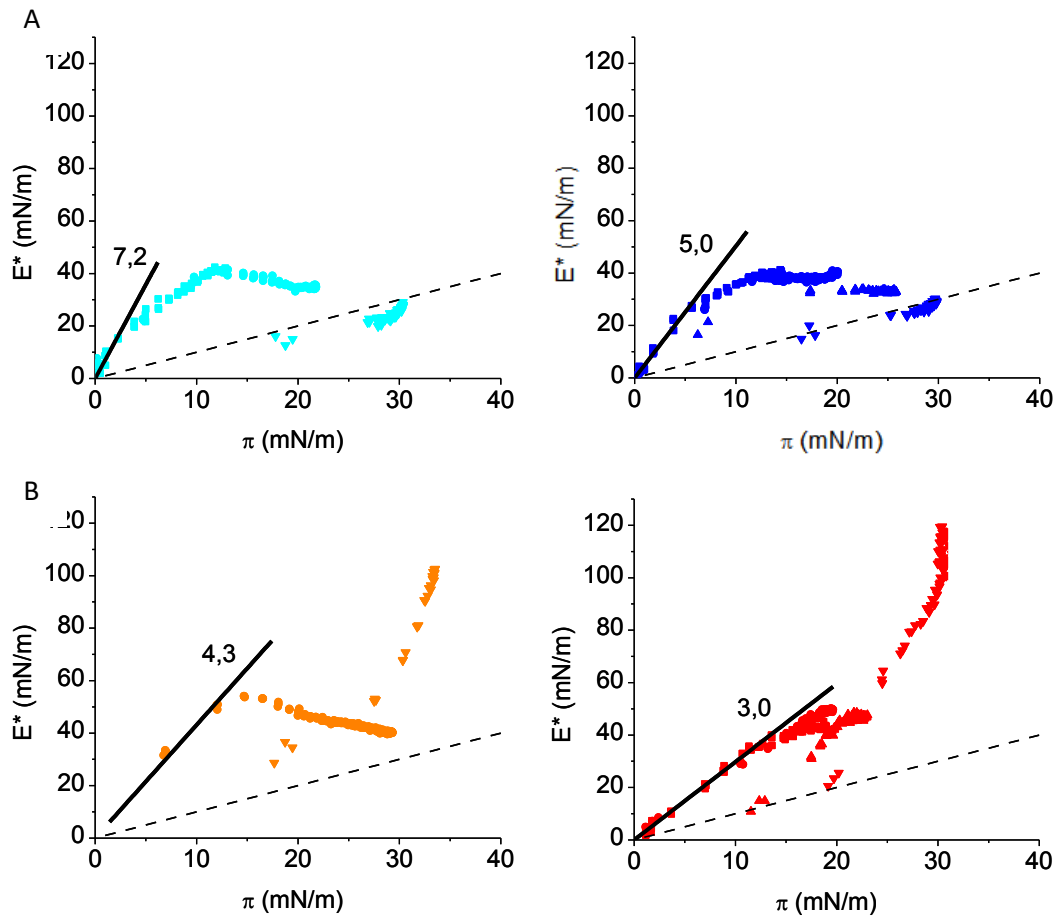


Figura 4.22. Evaluación del módulo complejo (E^*) en función de π a concentración 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo) y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones A- pH 8 μ 0,06 (cian) y μ 0,5 (azul) B- pH 2 μ 0,06 (naranja) y μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

La pendiente de la gráfica E^* vs π se muestra en la Figura 4.22. Es un parámetro que permite evaluar la flexibilidad de las moléculas en la interface, la que será mayor cuanto menor sea la pendiente (Hambardzumyan y col., 2004; Maldonado Valderrama, 2006). En trabajos previos, realizados por otros grupos, se encontraron los valores máximos del módulo E^* para las proteínas más rígidas, siendo la ovoalbúmina \approx β -lactoglobulina > seroalbúmina bovina > β -caseína (Lucassen-Reynders y col., 2010). Las proteínas más flexibles generalmente producen interfaces

más compresibles y menos elásticas que las proteínas más compactas (Benjamins y Lucassen-Reynders, 1998).

En nuestros ensayos, observamos pendientes más altas para las soluciones preparadas a pH 8 (7,2 y 5, Figura 4.22) que para las obtenidas con las muestras a pH 2 (4,3 y 3, Figura 4.22). La fuerza iónica también incidió en el valor hallado, siendo más flexibles las moléculas en la interface a mayor μ . Joss (1975) encontró para β -lactoglobulina una pendiente de 7,5, mientras que Benjamins y Lucassen-Reynders (1998) hallaron un valor de 4 para κ -caseína. Del análisis de nuestros resultados interpretamos que a pH 2 y μ 0,5 obtuvimos la mayor flexibilidad de la interface, mientras que a pH 8 y μ 0,06 obtuvimos la interface menos flexible. El comportamiento relativo de las proteínas en las interfaces permitió relacionar el aumento de la flexibilidad con la disminución del tamaño de las partículas de proteínas y su desagregación, disociación y desnaturalización, relación que fue también hallada y descrita para otras proteínas (Benjamins y col., 1996).

Como hemos mencionado anteriormente (punto 1.2.4.1), el módulo viscoelástico está formado por una componente elástica (E') y otra viscosa (E''). La relación E''/E' se corresponde numéricamente con la tangente del ángulo de desfase, θ , entre la deformación sinusoidal impuesta a la película y la respuesta de la misma. El aumento en el valor de θ y de $\text{tg } \theta$ implica un aumento en la contribución de la componente viscosa al módulo viscoelástico. Algunos de los procesos de relajación que contribuyen a la viscosidad de la interface son la reorientación de las moléculas de proteína luego de la adsorción, las re conformaciones internas, la compresión molecular y la formación de estructuras multicapa. Es difícil distinguir entre los diferentes mecanismos en el caso de interfaces densas ya que pueden ocurrir en forma simultánea y a distintas velocidades dependiendo de la presión interfacial (Benjamins y col., 2006).

En la Figura 4.23 se muestra la variación de la tangente de θ durante la formación de la película interfacial. En todas las condiciones de pH y μ ensayadas, cuando se aumentó la concentración de proteína en solución se observó un incremento de la proteína adsorbida en la interface (Figura 4.13). Esto último conduce a un mayor intercambio de moléculas proteicas entre la interface y el seno de la solución, y en consecuencia a un incremento de la componente viscosa con valores de tangente de θ mayor o igual a 0,6 (Benjamins y col., 2006). A baja concentración de proteína, 0,01 y 0,001 g/L, para pH 8 μ 0,06 y μ 0,5 y pH 2 μ 0,06, los valores de tangente de θ fueron menores o iguales a 0,2 lo que sugiere la formación de interfaces más elásticas con baja contribución de la componente viscosa.

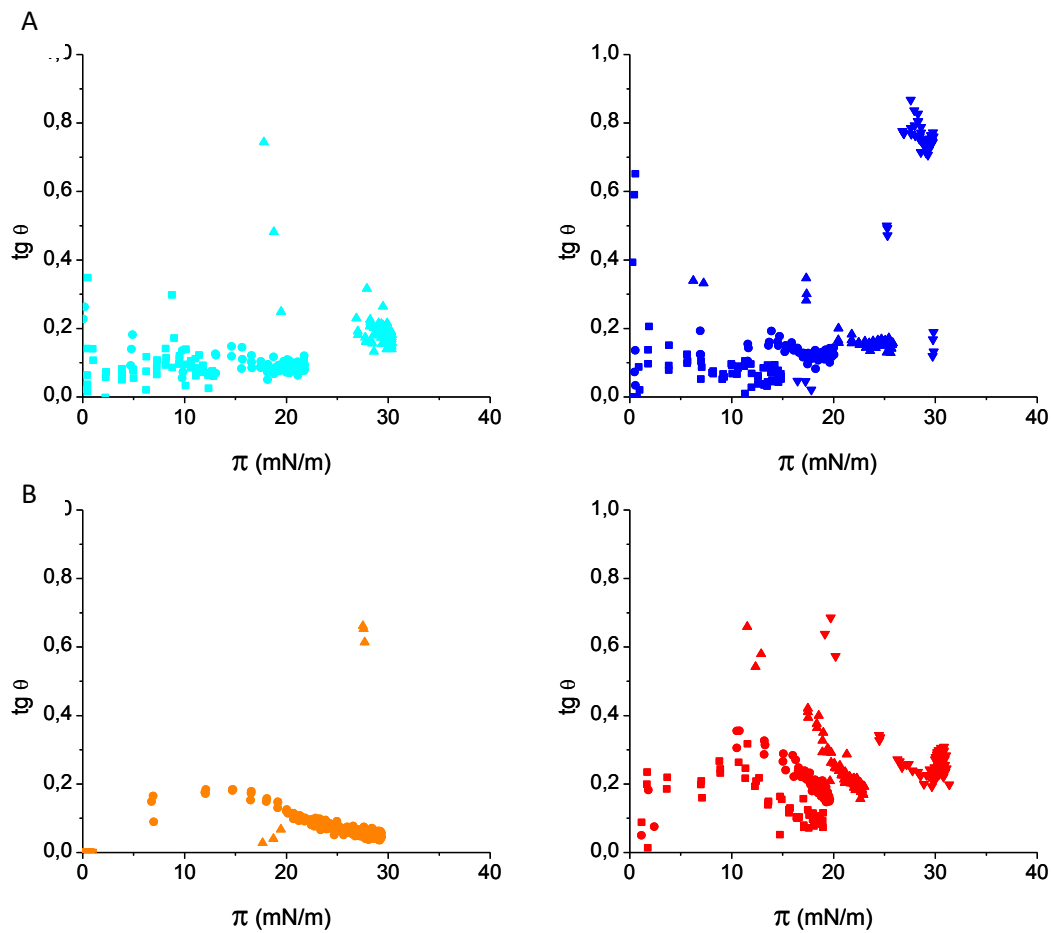


Figura 4.23. Evaluación de $\text{tg } \theta$ en función de π a concentración 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo) y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones A- pH 8 μ 0,06 (cian) y μ 0,5 (azul) B- pH 2 μ 0,06 (naranja) y μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

A pH 2 μ 0,5 (símbolos rojos), se pueden detectar cuatro poblaciones de datos separadas por la concentración interfacial, lo cual podría deberse a una mayor velocidad de los procesos de relajación en las interfaces más densas respecto a las más diluidas; tal como fuera informado por Freer y col., (2004); Serrien y col., (1992). Durante la formación de la película, etapa analizada mediante el incremento de π , se observó un aumento relativo de la componente elástica de la película interfacial para las diferentes concentraciones de proteína ensayadas, este aumento se encuentra bien definido para HA pH 2 μ 0,5. De acuerdo a Benjamins y col. (2006) la contribución de la componente viscosa para valores de $\text{tg } \theta < 0,1$ es despreciable. En esta misma condición el aumento de la componente elástica es absoluto ya que se puede observar un incremento del módulo viscoelástico de 20 mN/m a 120 mN/m cuando π pasa de 20 mN/m a 30 mN/m. Este incremento podría atribuirse a una reestructuración y reorganización de la proteína en la interface con modificación de los mecanismos de relajación que tienen lugar (Lucassen-Reynders y col., 2010) lo que contribuiría a una mayor elasticidad de la película.

4.2.2.3 Barrido de frecuencias de deformación

Del modelo propuesto en el trabajo de Lucassen y van den Tempel (1972) surge que la relación entre las componentes elástica y la viscosa del módulo dilatacional depende de la frecuencia de la perturbación aplicada a la interface. Estos autores observaron una disminución del desfase de la respuesta a la deformación con el aumento de la frecuencia de perturbación, hecho atribuido a la disminución del tiempo del ciclo de deformación por debajo del tiempo necesario para que ocurran ciertos procesos de relajación.

La película interfacial, luego de 3 horas de formada la interface, se sometió a deformaciones sinusoidales $\delta A/A=0,1$ en un rango de frecuencias elegido, entre 0,005 y 0,30 Hz.

A pH 8 y a las dos μ ensayadas se observó un descenso del módulo viscoelástico al aumentar la concentración proteica de la solución de 0,01 a 1 g/L en todo el rango de frecuencias ensayado (Figura 4.24).

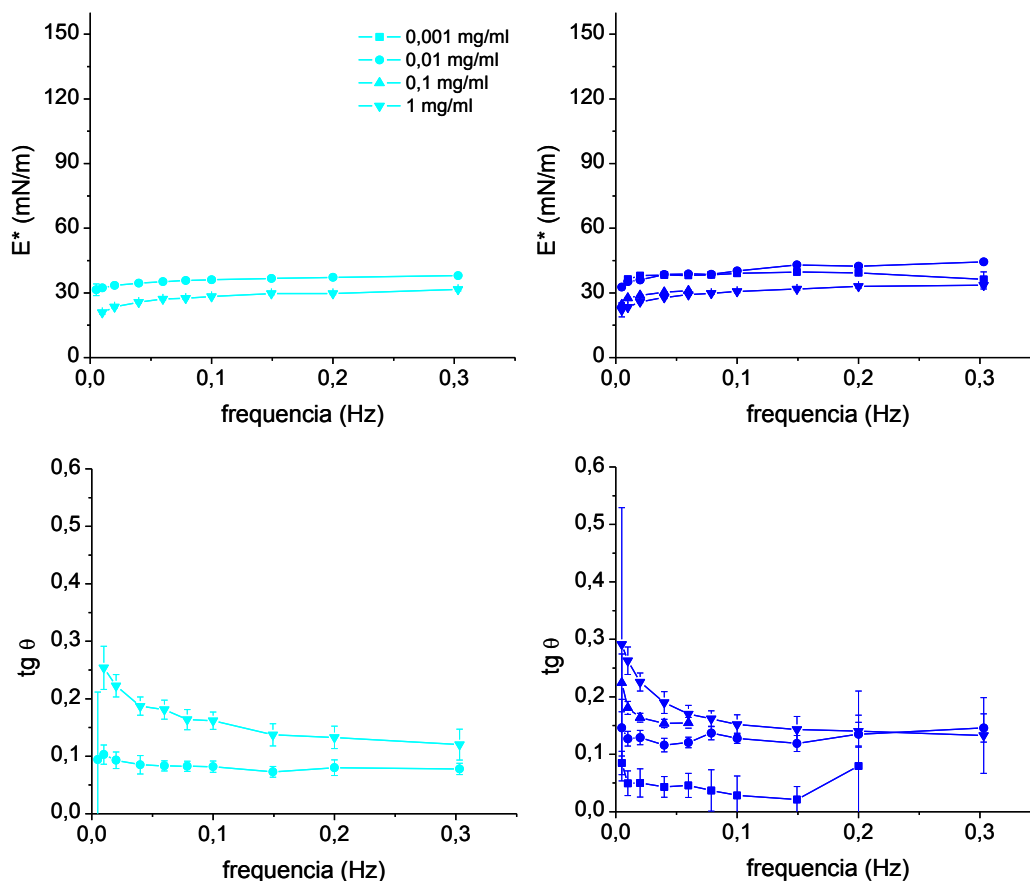


Figura 4.24. Evaluación del módulo complejo (E^*) y de $\text{tg } \theta$ en función la frecuencia de deformación de soluciones de proteínas de amaranto preparadas a diferentes concentraciones 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo) y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian) y μ 0,5 (azul) a 25 °C.

Al aumentar la frecuencia de la deformación se detectó, como era esperable, una disminución de la viscosidad interfacial que se refleja en la Figura 4.24 con el comportamiento de la $\text{tg } \theta$ con la frecuencia.

El comportamiento encontrado para las interfaces creadas con las muestras a pH 2 fue similar al descrito a pH 8 (Figura 4.25). A frecuencias mayores a 0,15 Hz se observó un incremento importante en la resistencia a la deformación, con un marcado incremento en la elasticidad interfacial. Así también a este pH se observaron procesos de relajación más veloces que los hallados a pH 8, evidenciados por el descenso de $\text{tg } \theta$ a mayores frecuencias de deformación.

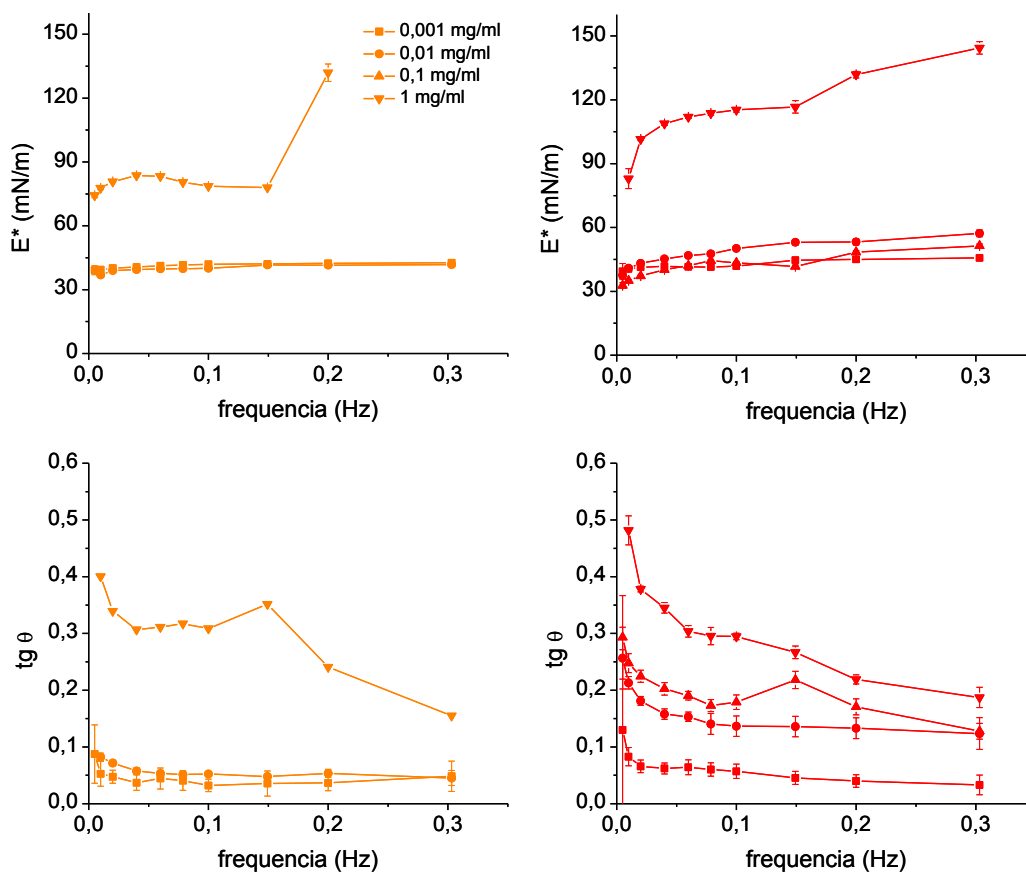


Figura 4.25. Evaluación del módulo complejo (E^*) y de $\text{tg } \theta$ en función la frecuencia de deformación de soluciones de proteínas de amaranto preparadas a diferentes concentraciones 0,001 g/L (cuadrado), 0,01 g/L (círculo) y 1 g/L (triángulo invertido) en las condiciones pH 2 y 0,06 (naranja) y 0,5 (rojo) a 25 °C.

4.2.3. Isotermas de adsorción de la proteína en la interface

Las isotermas de adsorción de Gibbs permiten el estudio de la adsorción de la proteína a la interface mediante la medida de la tensión superficial una vez alcanzado el equilibrio, en función de la concentración. En nuestros ensayos decidimos que el equilibrio es alcanzado a las 24 h de

iniciada la adsorción, tal como proponen otros autores (Rodríguez Niño y col., 2001; Lucassen-Reynders y col., 2000).

En todas las condiciones ensayadas la variación de la presión interfacial con la concentración proteica presentó un comportamiento sigmoideo evidenciado por un aumento de π al incrementarse la concentración proteica hasta alcanzar un valor constante. Este tipo de comportamiento ha sido observado para soluciones de β -caseína, de proteínas de suero lácteo (Phillips y col.; 1975; Graham y Phillips, 1979b; Rodríguez Niño y col., 2001), de proteínas de soja (Molina y col., 2003) y de lisozima (Graham y Phillips, 1979b).

A bajas concentraciones de proteína, menores a 10^{-6} % p/v, el comportamiento de las interfaces equivalente al de los gases ideales con valores de $\pi \sim 0$. Cuando la concentración de proteínas supera 10^{-5} % p/v, se observó un incremento de π debido a la mayor incorporación de proteína en la interface. Durante esta etapa se forma una monocapa de proteína adsorbida en la interface de manera irreversible, la cual incorpora mayor cantidad de moléculas proteicas con el incremento de la concentración en la solución hasta alcanzar la concentración de saturación. Estudios de elipsometría realizados con proteínas marcadas con radioactivos han mostrado la formación de monocapas de 50 – 100 Å de grosor, alcanzando la saturación de la interface a concentraciones de 2 – 3 mg de proteína por m^2 (Graham y Phillips, 1979a). La concentración de saturación de la interface se utiliza como un parámetro de medida de la *eficiencia de adsorción* (Rodríguez Niño y col., 2005).

Cuando la concentración de proteínas aumenta más se comienza a formar una multicapa, debida a la adsorción de proteínas en capas por debajo de la primera. En condiciones de formación de multicapas, la incorporación de proteínas en la interface no provoca un cambio importante de π , por lo que se alcanza un valor constante, denominado *actividad superficial* (Rodríguez Niño y col., 2005).

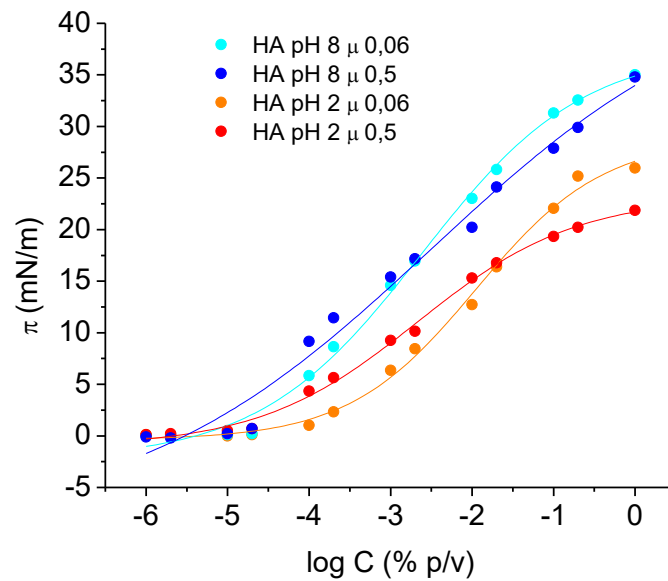


Figura 4.26. Isotherma de adsorción de AH soluble en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

En nuestras condiciones de ensayo observamos un mayor incremento de π al aumentar la concentración de proteínas en las soluciones de pH 8 que el que hallamos en las soluciones a pH 2, lo que sugiere mayor actividad superficial de las proteínas de amaranto a pH alcalino (Figura 4.26).

Tanto a pH ácido como alcalino el incremento de μ permitió encontrar valores de $\pi \neq 0$ a concentraciones de proteína más bajas que las que fueron necesarias a menor fuerza iónica. En las interfaces obtenidas con las soluciones de μ 0,06 fue necesario utilizar concentraciones de proteína más altas para generar un cambio en la π que las que se requirieron al utilizar las soluciones de μ 0,5. Sin embargo, una vez que este valor comenzó a aumentar, el cambio de la presión con la concentración, $\frac{d\pi}{d \ln C}$, fue mayor, lo cual permitiría pensar en una barrera energética más alta debido a la mayor repulsión eléctrica existente a baja μ . Luego de superada esta barrera energética se produciría un mejor acomodamiento de la proteína en la interface.

Para validar los distintos métodos de medida de la tensión interfacial, analizar los resultados en su conjunto, e interpretar los fenómenos que ocurren, se intentó comparar los valores experimentales obtenidos por medio del tensiómetro de anillo de DuNouy con los calculados a partir de los datos determinados con el tensiómetro de gota. Para ello fue necesario tener en cuenta que en ambos métodos existe una relación diferente volumen/superficie, que para el tensiómetro de gota corresponde a una gota mientras que para el tensiómetro de anillo de

DuNouy corresponde a una cápsula. Para que la comparación sea válida se debe trabajar a igual concentración de proteína por unidad de superficie y no de volumen. En la Tabla 4.3 se presentan las relaciones volumen/superficie y proteína/superficie que permiten calcular la concentración de proteína por unidad de volumen en el método del tensiómetro de anillo de DuNouy comparable a 0,1 % p/v (1 g/L) en el tensiómetro de gota y así obtener por ambos métodos igual relación proteína/superficie.

Tabla 4.3. Cálculo de los parámetros volumen/superficie y proteína/volumen para obtener igual relación proteína/superficie en la gota (tensiómetro de gota) y en la cápsula (tensiómetro de anillo de DuNouy)

	volumen/superficie (mm ³ /mm ²)	proteína/volumen (g/L)	proteína/superficie (g/mm ²)
Tensiómetro de gota (gota)	0,3750	1	3,75 x 10 ⁵
Isotermas de adsorción (cápsula)	7,067	0,053 (log 0,0053% = - 2,2757)	3,75 x 10 ⁵

A partir de los resultados obtenidos con el tensiómetro de gota, presentados en la Figura 4.18, se calculó el valor de π_{eq} , los valores fueron incluidos en la Tabla 4.4. De la Figura 4.26 se obtuvo el valor de π correspondiente a un valor de log C (% p/v) igual a -2,2757 (Tabla 4.3). Las presiones así obtenidas se muestran en la tercer columna de la Tabla 4.4. Se puede observar que los valores de π correspondientes a la muestra HA pH 8 μ 0,06 fueron similares independientemente del método usado en su cálculo. En el resto de las condiciones de ensayo, HA pH 8 μ 0,5 y HA pH 2 baja y alta μ , se obtuvieron valores de π menores cuando se midió con el tensiómetro de anillo de DuNouy, principalmente para las muestras a pH 2. Este hecho podría atribuirse a una formación diferente de la interface, ya que en el caso del tensiómetro de gota existen fenómenos de convección, mientras que la solución colocada en la cápsula del tensiómetro de anillo de DuNouy se mantiene estanca durante 24 h. Por otro lado, en el tensiómetro de anillo de DuNouy, la interface es agredida y perturbada al introducir el anillo en la solución para llevar a cabo la medida. Los resultados obtenidos cuando se deforma la interface (punto 4.2.2) soportan la idea de que la perturbación introducida en la medida con el anillo de DuNouy es la responsable de la diferencia en los valores encontrados entre ambos métodos (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Presión de equilibrio, π_{eq} , evaluada en el tensiómetro de gota para una solución de 1 g/L y en el tensiómetro de anillo de DuNouy para una solución de 0,053 g/L, concentraciones con la misma relación proteína/superficie.

	Π_{eq} (mN/m) tensiómetro de gota	Π (mN/m) isoterma de adsorción
HA pH 8 μ 0,06	21,3	21,5
HA pH 8 μ 0,5	25,2	20,0
HA pH 2 μ 0,06	18,2	11,0
HA pH 2 μ 0,5	21,0	13,5

4.2.4. Isotermas de compresión de la proteína esparcida en la interface

Las isotermas obtenidas por esparcimiento de la muestra se estudiaron en la balanza de Langmuir por medio de la compresión de la película formada por deposiciones de la solución proteica en la interface. Esta técnica permite conocer la cantidad de proteína necesaria en la interface para alcanzar distintos valores de π , como así también la compresibilidad de la película proteica.

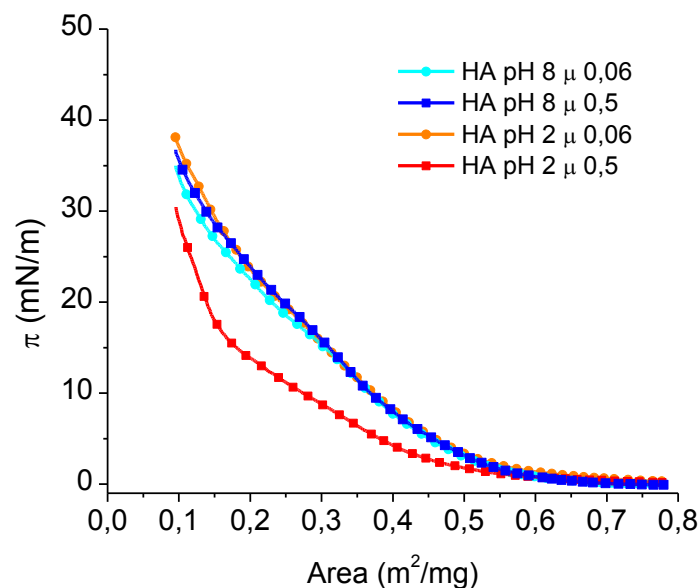


Figura 4.27. Evaluación de π (mN/m) en función del área de compresión para la condición HA pH 8 μ 0,06 (cian), HA pH 8 μ 0,5 (azul), HA pH 2 μ 0,06 (naranja), HA pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

En las condiciones de pH y μ ensayadas se observó el comportamiento característico de las proteínas en interface (Graham y Phillips, 1978c), en el cual aumenta π al comprimir el área

interfacial (Figura 4.27). A pH 8, tanto a alta como a baja μ , las isothermas mostraron igual comportamiento, aunque a μ 0,06 se observaron valores de π ligeramente menores. A pH 2 μ 0,06 el comportamiento fue similar al hallado con las soluciones a pH 8. Todas ellas presentan cambios en la pendiente que se denominan transiciones. Las transiciones halladas ocurren a distintos valores de área, lo que sugiere una composición diferente de proteínas en la interface. Cuando la solución es preparada y medida a pH 2 μ 0,5 se observa un comportamiento diferente. La compresión generó un menor aumento de π , comparado con las tres condiciones antes descritas, mostrando dos transiciones bien marcadas a $\pi \sim 6$ mN/m y $\pi \sim 15$ mN/m.

A efectos de magnificar las transiciones detectadas en las isothermas de compresión, en la Figura 4.28 se muestra la relación entre el módulo de compresión (mN/m) y la presión π . Cuando se compara el comportamiento de la interface esparcida a pH 8 a baja fuerza iónica con la correspondiente a alta fuerza iónica se observaron las mismas transiciones en la isoterma a valores más altos de π (Figura 4.28), lo cual permitiría pensar en la existencia de estructuras proteicas iguales en la interface al variar el contenido salino, aunque con distinto efecto sobre π .

Al analizar la variación del módulo de compresión en función de π se observó un comportamiento diferencial para la condición pH 2 μ 0,5 detectándose claramente dos picos.

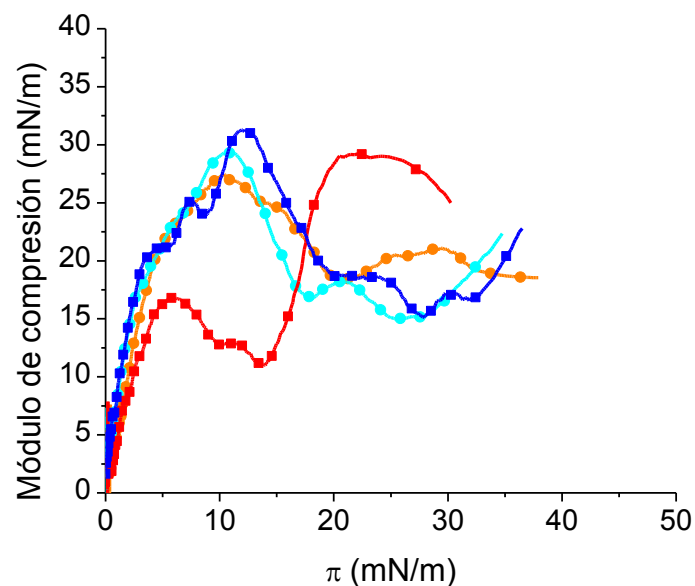


Figura 4.28. Módulo de compresión (mN/m) en función de π (mN/m) para la condición HA pH 8 μ 0,06 (cian), HA pH 8 μ 0,5 (azul), HA pH 2 μ 0,06 (naranja), HA pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

4.2.4.1 Efecto del cambio de pH y μ al momento de esparcir la proteína sobre la interface.

Los resultados obtenidos en los ensayos descritos previamente mostraron claramente que el pH y la μ fueron determinantes de la composición y conformación proteica en la solución de esparcimiento, como así también del comportamiento de la fracción soluble en la interface. Para comprender mejor el efecto del pH y la μ en el comportamiento de la proteína en la interface trabajamos con dos soluciones diferentes: una que se colocó en la cuba de la balanza de Langmuir y otra con la que se realizó el esparcimiento.

En una primera serie de ensayos se utilizaron soluciones de diferente pH pero igual μ para cargar la cuba de la balanza y solubilizar la muestra respectivamente, mientras que en otros ensayos se mantuvo el mismo pH en ambas soluciones y se varió la μ .

- Cambio de pH a baja fuerza iónica

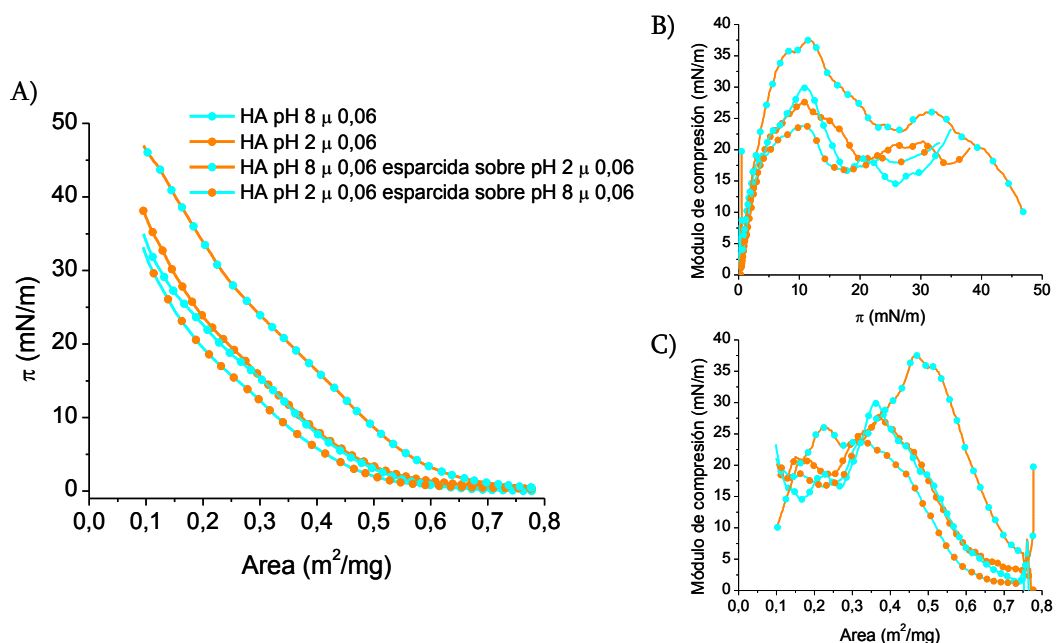


Figura 4.29. A) π (mN/m) en función del área de compresión. B) Módulo de compresión en función de π (mN/m). C) Módulo de compresión en función del área de compresión. En todos ellos se identifica a la condición pH 8 μ 0,06 con el color cian, pH 2 μ 0,06 con el color naranja; mientras que a la solución de sembrado conteniendo la proteína se la identifica con un símbolo, y el buffer de la cuba sobre el cual se esparce la proteína con la línea continua. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C.

En la Figura 4.29-A se presentan las isothermas de adsorción de la proteína de amaranto. Se puede observar que una de las curvas, la correspondiente a la deposición de la solución de proteína a pH 8 sobre la interface a pH 2, se desplaza hacia mayores valores de π y mayores valores de área

respecto a la obtenida cuando se deposita la misma solución de proteína sobre la interface a pH 8 (Figura 4.29-A). El módulo de compresión, para el mismo ensayo, se desplazó hacia mayores valores de π (Figura 4.29-B), lo cual podría ser atribuido a una mejor exposición de las porciones hidrofóbicas de las proteínas hacia el aire a pH 2 respecto a pH 8, lo cual disminuiría más fácilmente la tensión superficial. Además el aumento del módulo de compresión se desplazó a un mayor valor de área, o una menor compresión (Figura 4.29-C), lo que podría atribuirse a una menor desorción de la proteína en la interface a pH 2 con respecto a la interface a pH 8, manteniéndose una mayor concentración proteica en la interface ácida.

En el ensayo de deposición de la proteína soluble a pH 2 sobre la interface a pH 8 se observó un leve desplazamiento de la isoterma de adsorción y las transiciones que muestra, hacia menores valores de π respecto a las obtenidas cuando se deposita la solución a pH 2 sobre la interface a igual pH. (Figura 4.29-A y 4.29-B), requiriéndose un mayor grado de compresión para elevar el valor del módulo de compresión (Figura 4.29-C). Todos estos resultados confirman la hipótesis de un mejor acomodamiento de la proteína en la interface a pH 2 con respecto a pH 8, como así también su menor desorción sobre la interface ácida.

- Cambio de pH a alta fuerza iónica

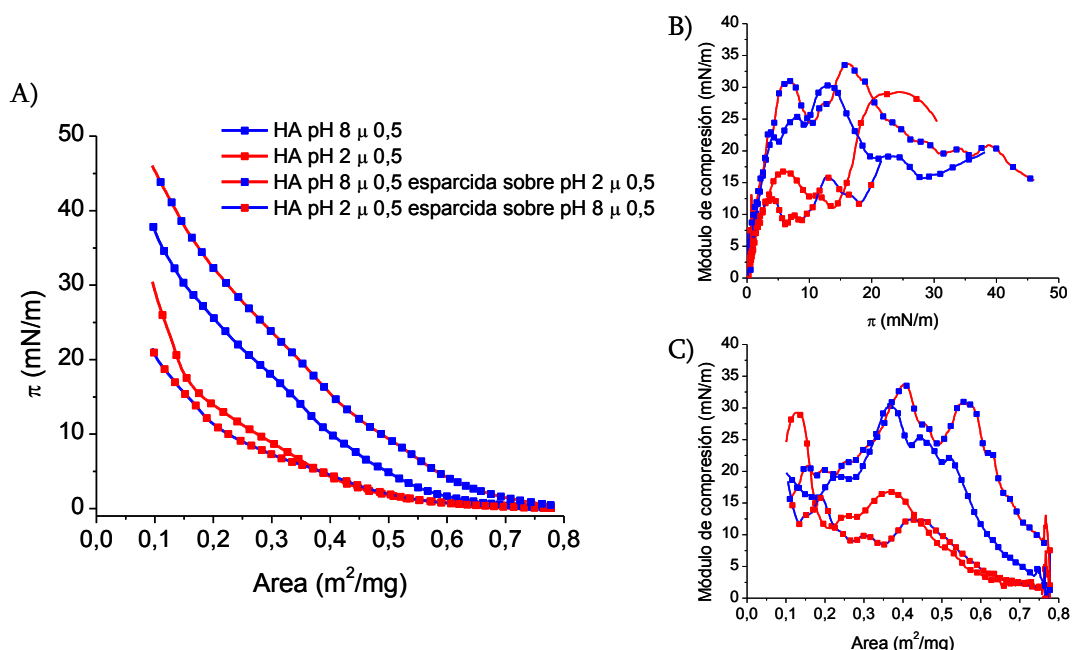


Figura 4.30. A) π (mN/m) en función del área de compresión. B) Módulo de compresión en función de π (mN/m). C) Módulo de compresión en función del área de compresión. En todos ellos se identifica a la condición pH 8 μ 0,5 con el color azul, pH 2 μ 0,5 con el color rojo; mientras que a la solución de sembrado conteniendo la proteína se la identifica con un símbolo y el buffer de la cuba sobre el cual se esparce la proteína con la línea continua. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C.

Cuando se incrementó la fuerza iónica y se realizaron los ensayos previamente descritos con la solución proteica a pH 8 depositada sobre la interface a pH 2 se obtuvieron resultados equivalentes a los discutidos anteriormente. Estos resultados son esperables dado que el perfil polipeptídico y la composición proteica es similar en las soluciones de pH 8 a las distintas fuerzas iónicas ensayadas (μ 0,06 y μ 0,5) (Figura 4.30-A). Igual tendencia se observa en la variación del módulo de compresión con π y con el área, Figuras 4.30 B y C.

Al analizar la deposición de la proteína soluble a pH 2 sobre la interface a pH 8 se observó un comportamiento similar al detectado cuando se la depositó sobre la interface a pH 2, con un leve desplazamiento de la isoterma de compresión hacia menores valores de π , indicando un mejor acomodamiento de la proteína en la interface a pH 2 que a pH 8 (Figura 4.30-A). Igual tendencia se puede observar en las Figuras 4.30 B y C. No obstante, a diferencia de lo observado a μ 0,06, las transiciones en la isoterma de adsorción se encontraron a mayores valores de área, lo cual podría atribuirse a una menor desorción a pH 8 en esta condición.

-Cambio de fuerza iónica a pH 8

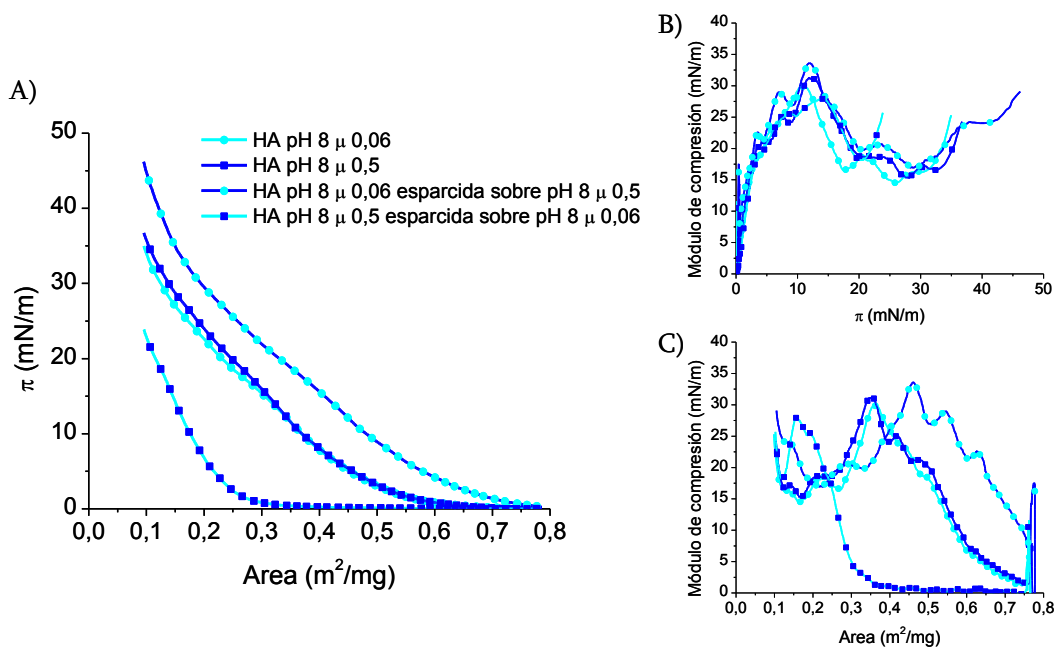


Figura 4.31. A) π (mN/m) en función del área de compresión. B) Módulo de compresión en función de π (mN/m). C) Módulo de compresión en función del área de compresión. En todos ellos se identifica a la condición pH 8 μ 0,06 con el color cian, pH 8 μ 0,5 con el color azul; mientras que a la solución de sembrado conteniendo la proteína se la identifica con un símbolo y el buffer de la cuba sobre el cual se esparce la proteína con la línea continua. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C.

Al analizar la deposición de la solución proteica de pH 8 μ 0,06 sobre las interfaces a alta y baja μ se observó un incremento más rápido de π con la compresión a μ 0,5, mientras que al sembrar la solución pH 8 μ 0,5 sobre la interface μ 0,06 se detectó un retardo en el aumento de π (Figura 4.31 A). Este resultado, sumado al perfil del módulo de compresión en función de π el cual fue similar para todas las condiciones de ensayo (Figura 4.31-B), permite pensar en una menor desorción de la proteína a μ 0,5 con respecto a μ 0,06 (Figura 4.31-C).

- Cambio de fuerza iónica a pH 2

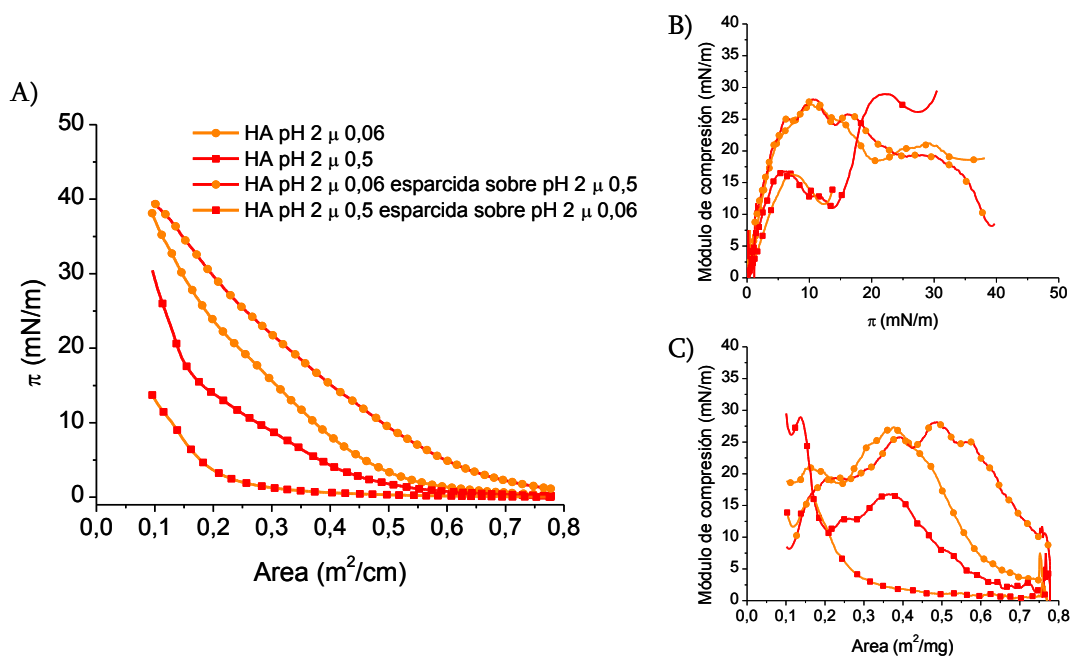


Figura 4.32 A) π (mN/m) en función del área de compresión. B) Módulo de compresión en función de π (mN/m). C) Módulo de compresión en función del área de compresión. En todos ellos se identifica a la condición pH 2 μ 0,06 con el color naranja, pH 2 μ 0,5 con el color rojo; mientras que a la solución de sembrado conteniendo la proteína se la identifica con un símbolo y el buffer de la cuba sobre el cual se esparce la proteína con la línea continua. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C.

Las isotermas de compresión (Figura 4.32-A) muestran un perfil similar al encontrado a pH 8, con un incremento más rápido de π con la compresión al incrementar la μ de la interface y viceversa. No obstante al evaluar el módulo de compresión en función de π (Figura 4.31 B) se observó que el perfil es determinado por la solución de esparcimiento, independientemente de la interface, lo que sugiere un efecto de la interface solo sobre la concentración de la proteína interfacial, fenómeno de desorción, sin modificación de la estructura de la proteína esparcida.

En el punto 4.1. se discutió la disminución de la solubilidad del aislado al aumentar μ , así como el incremento en la proporción de partículas de menor tamaño a alta fuerza iónica, atribuido a la disociación de agregados presentes a μ 0,06 (pH 8). Ambos factores, aumento de la solubilidad y disociación de los agregados en la interface, como así también el apantallamiento de las cargas superficiales de las proteínas con el consiguiente descenso de las fuerzas de repulsión entre partículas, podrían ser factores que contribuyen a la elevada actividad interfacial de la fracción soluble a μ 0,06 dispersada en la interface μ 0,5.

- Cambio simultáneo de pH y fuerza iónica

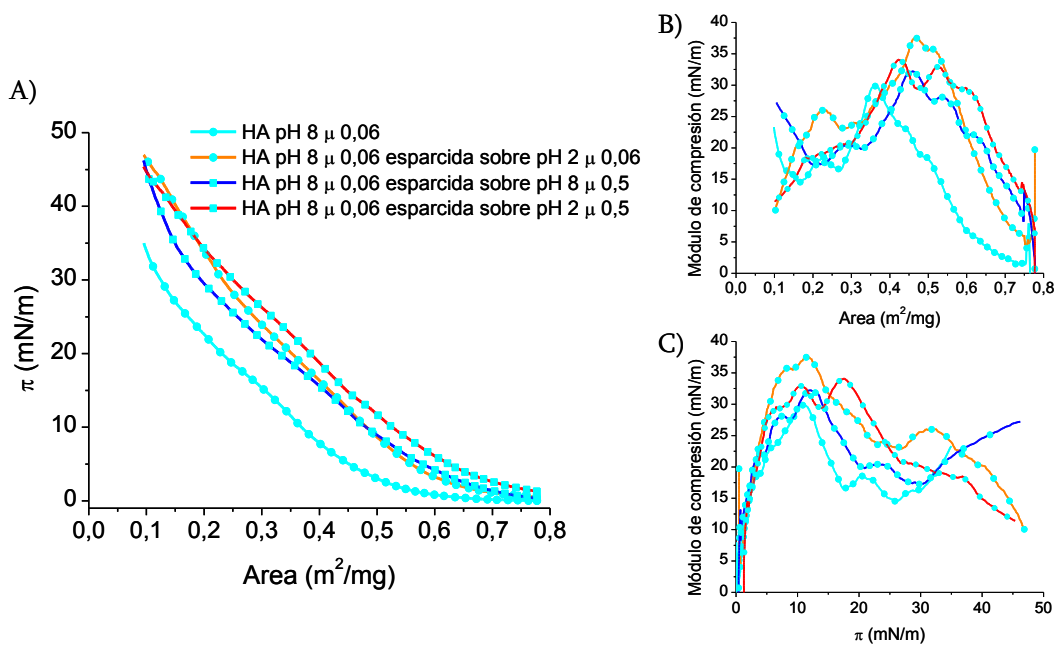


Figura 4.33. A) π (mN/m) en función del área de compresión. B) Módulo de compresión en función de π (mN/m). C) Módulo de compresión en función del área de compresión. En todos ellos se identifica a la condición pH 8 μ 0,06 con el color cian, pH 8 μ 0,5 con el color azul, pH 2 μ 0,06 con el color naranja, pH 2 μ 0,5 con el color rojo; mientras que a la solución de sembrado conteniendo la proteína se la identifica con un símbolo y el buffer de la cuba sobre el cual se esparce la proteína con la línea continua. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C.

Para estudiar la interacción del pH y μ en forma simultánea se sembró proteína soluble a pH 8 μ 0,06 sobre la interface a pH 2 μ 0,5. Al analizar los resultados obtenidos (Figura 4.33 A, B y C) se detectó una mayor actividad interfacial de la proteína al cambiar el pH y μ de la interface respecto a la solución de esparcimiento. Esto sugiere la existencia de: - un efecto del pH ácido sobre el desplegamiento de la proteína en la interface con el consecuente descenso de la desorción de la

misma debido a la baja solubilidad de la proteína desnaturalizada, y - un efecto de μ sobre el descenso de la desorción de la proteína de la interface debido a la baja solubilidad de la proteína y al descenso de la repulsión de cargas en la interface al aumentar el contenido salino.

4.2.5. Estructura secundaria de la proteína esparcida en la interface

La estructura secundaria de las proteínas en las distintas condiciones de pH y μ , y a distintas concentraciones en las interfaces esparcidas se estudió utilizando la espectroscopia de luz infrarroja de reflexión-absorción, o IRRAS por su sigla en inglés.

La espectroscopía IR permite obtener información relacionada con la estructura secundaria de proteínas, teniendo en cuenta la capacidad de absorción de energía de los enlaces moleculares en la región infrarroja (Barth, 2007). En los espectros IR (Figura 4.34) se pueden identificar nueve bandas características de la estructura polipeptídica (Krimm y Bandekar, 1986), correspondientes a la banda amida I y la banda amida II. La banda amida I se localiza entre 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} y se encuentra mayoritariamente asociada a la vibración de elongación C=O (en un 70 - 85 %) y en menor porcentaje a la vibración de elongación C-N (10 - 20 %). La banda amida II se encuentra situada entre 1510 y 1580 cm^{-1} y suele ser de utilidad en la interpretación de la estructura proteica (Tu, 1982), aunque el significado de esta banda aún no ha sido totalmente descripto (Barth, 2007). La intensidad negativa de la banda amida I y amida II se incrementa al aumentar la concentración proteica. Sin embargo, con el fin de conocer el espesor de la película interfacial, se analiza la banda originada por la absorción del enlace O-H entre 3700 y 3300 cm^{-1} , que es la zona del espectro en la que el aumento de la intensidad de absorción correlaciona mejor con el espesor de la película (Kerth y col., 2004). Esta relación entre la intensidad de banda y el grosor de la película se debe a una menor contribución del enlace O-H del agua desplazada por la proteína. La banda amida I se encuentra compuesta por la banda correspondiente a la estructura hélice α ($1650 - 1658\text{ cm}^{-1}$) y a la estructura desordenada ($1645 - 1650\text{ cm}^{-1}$) las cuales forman parte de un mismo pico a 1658 cm^{-1} . En el rango $1615 - 1640\text{ cm}^{-1}$ se observa un hombro o un pico definido que corresponde a la estructura β (en nuestros ensayos se tomó la lectura a 1628 cm^{-1}).

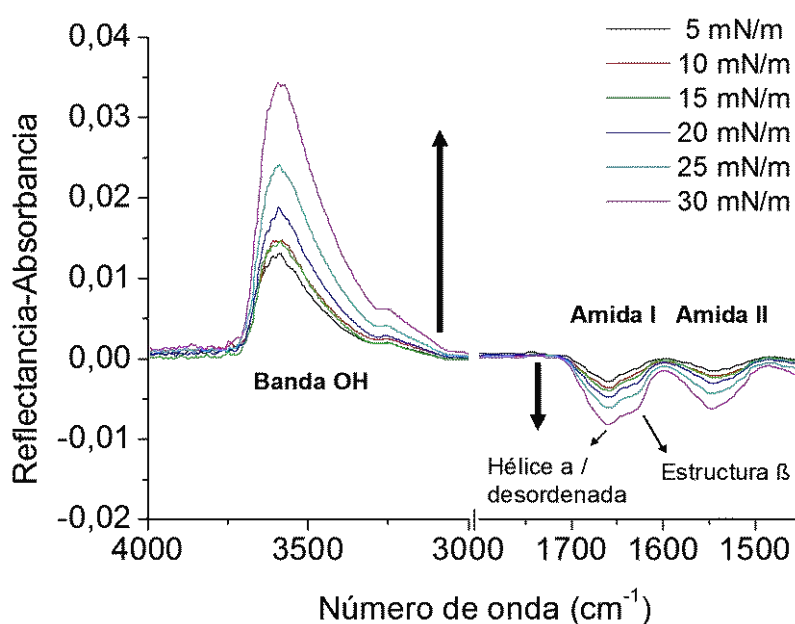


Figura 4.34. Espectros de IRRAS típicos a distintas presiones interfaciales

Cuando se realizó la compresión de la interface a pH 8 a baja y alta μ se observó un incremento del espesor del film interfacial, tal como lo sugiere el incremento de la intensidad de la banda de vibración del enlace O-H (Figura 4.35), y el aumento de la intensidad de las bandas amida I y amida II (Figura 4.36). A $\pi > 20$ mN/m, se detectó un menor espesor de la película formada a μ 0,5 para alcanzar la misma π , hecho que estaría relacionado con la menor concentración de proteína en la interface tal como se indicara previamente (Figura 4.31-A).

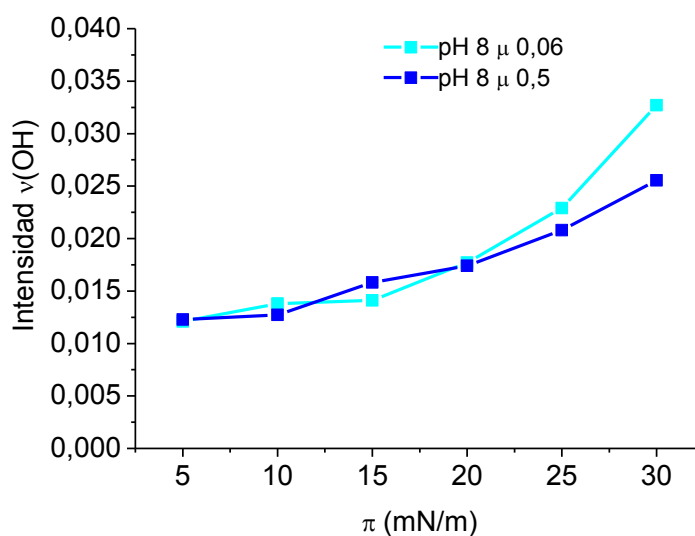


Figura 4.35. Intensidad de la banda (OH) en función de π para la condición pH 8 μ 0,06 (cian) y pH 8 μ 0,5 (azul) a 25 °C.

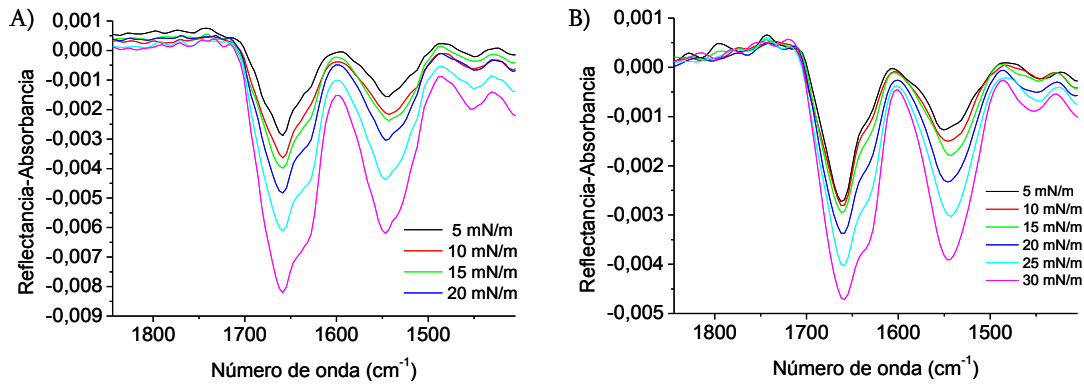


Figura 4.36. Espectro de banda amida I y amida II en función de π a 25 °C para la condición A) pH 8 μ 0,06 y B) pH 8 μ 0,5.

A partir de los espectros y analizando las intensidades de la banda localizada a 1658 cm^{-1} (estructura hélice α y desordenada) respecto a la situada a 1628 cm^{-1} (estructura hoja plegada β), se observó que la compresión a pH 8 provoca un aumento de la proporción de estructura hoja plegada β de las proteínas (Figura 4.37). Este aumento se observó a las dos μ ensayadas, a pesar de que a μ 0,06 se partió de una estructura proteica en la interface con mayor proporción de hoja plegada β . Este tipo de estructura secundaria podría estar relacionado con la mayor proporción de agregados presente en la solución proteica a pH 8 μ 0,06 respecto a μ 0,5. Algunos autores han demostrado para glicinina de soja (Robert y col., 2001; Bos y col., 2001) y ovoalbúmina (Renault y col., 2002) una relación positiva entre la formación de agregados y la presencia de estructura hoja plegada β intermolecular.

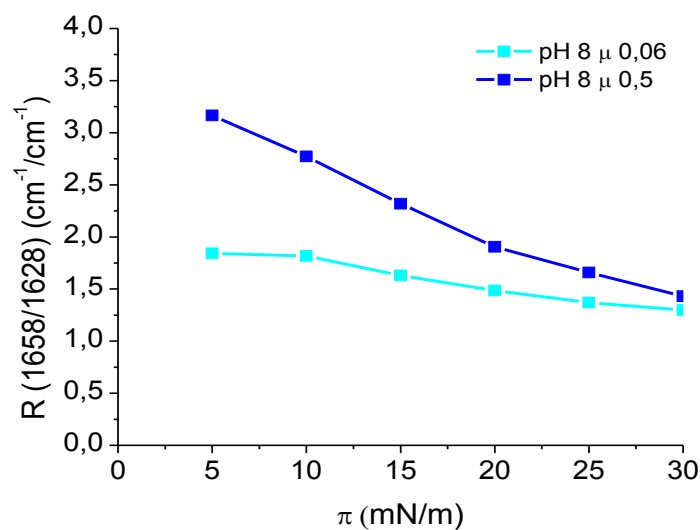


Figura 4.37. Relación de intensidad de la banda a 1658 cm^{-1} (estructura hélice α y desordenada) y la banda a 1628 cm^{-1} (estructura hoja plegada β), para las condiciones experimentales pH 8 μ 0,06 (cian) y pH 8 μ 0,5 (azul).

A pH 2, al igual que a pH 8, se observó un aumento del grosor de la película interfacial con la compresión, formándose una película más fina a μ 0,5 (Figura 4.38). Para esta condición se observó previamente que se necesita un mayor grado de compresión de la interface para incrementar π (Figura 4.27), lo cual podría ser atribuido a un mayor grosor de la película para una dada π . En el punto 4.2.4.1, cuando se discutió el efecto de los cambios de pH a alta μ , se planteó la hipótesis de la existencia de un fenómeno de desorción de la proteína interfacial esparcida sobre la misma interface. Esta hipótesis se vería reforzada por los resultados aquí obtenidos que indican la presencia de una película interfacial de menor espesor al esperado para la compresión interfacial ensayada.

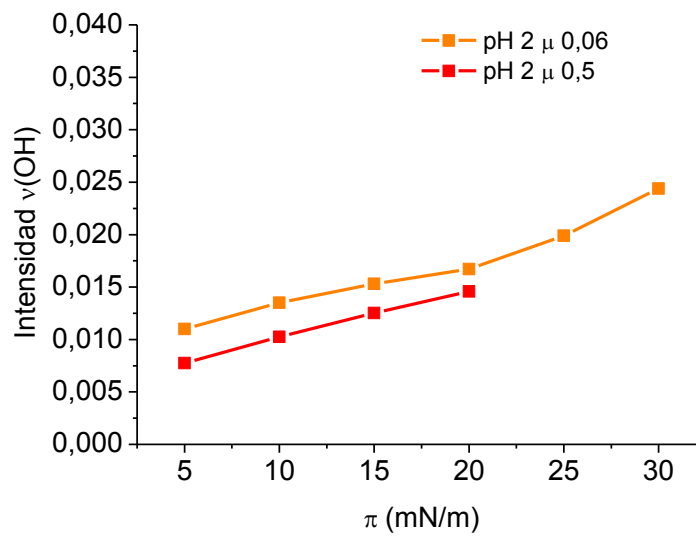


Figura 4.38. Intensidad de la banda (OH) en función de π para la condición pH 2 μ 0,06 (naranja) y pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

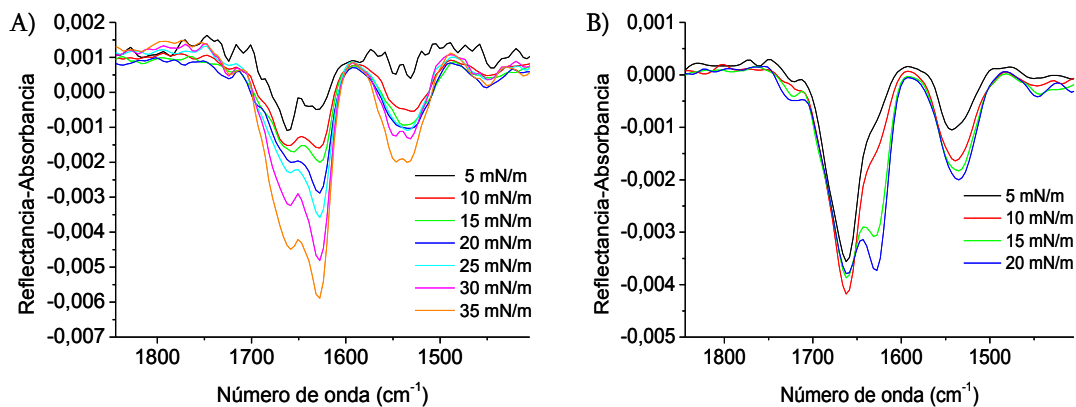


Figura 4.39. Espectro de banda amida I y amida II en función de π a 25 °C para la condición A) pH 2 μ 0,06 y B) pH 2 μ 0,5.

El análisis de la banda amida I (Figura 4.39) permitió observar un aumento de la estructura hoja plegada β con la compresión, siendo este mayor a pH 2 que a pH 8, independientemente de μ . A μ 0,06, se detectó el mayor contenido de la estructura hoja plegada β lo cual concuerda con la mayor presencia de agregados en la solución proteica como se demostró para otras proteínas (Robert y col., 2001; Bos y col., 2001; Renault y col., 2002).

A alta fuerza iónica, μ 0,5, se observó un incremento bien marcado en la proporción de hoja plegada β al comprimir la interface de $\pi = 5$ mN/m a $\pi = 15$ mN/m (Figura 4.40). En este rango de π la isoterma de compresión presentó una transición en la interface a $\pi \sim 14$ mN/m, acompañada de un aumento del módulo de compresión que estaría relacionado con el cambio detectado en la estructura secundaria de la proteína (Figura 4.32).

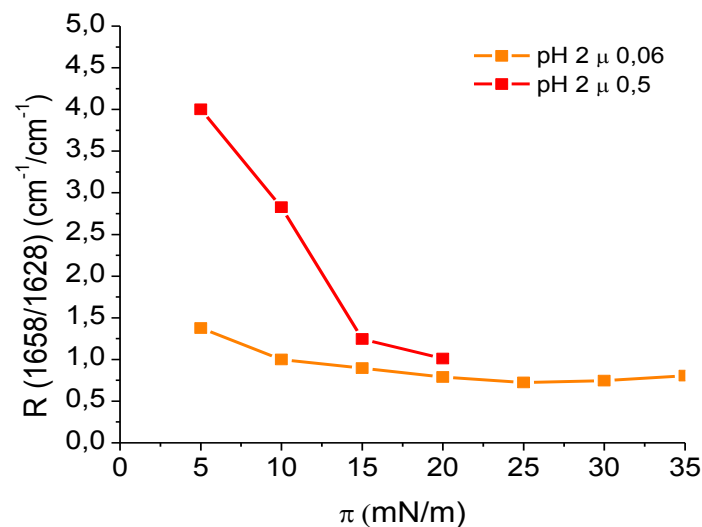


Figura 4.40. Relación entre la banda a 1658 cm^{-1} (estructura hélice α y desordenada) y la banda a 1628 cm^{-1} (estructura hoja plegada β), para la condición A) pH 2 μ 0,06 (naranja) y B) pH 2 μ 0,5 (rojo).

En todas las condiciones de pH y μ analizadas se detectó un aumento de la proporción de estructura hoja plegada β al comprimir la interface. Resultados similares fueron encontrados para glicinina de soja (Martin y col., 2003). Cabe recordar que la glicinina 11S de soja presenta una estructura similar a la globulina tipo 11S de amaranto, la cual constituye una fracción cuantitativamente importante del aislado utilizado en este trabajo. El aumento en la proporción de estructura hoja plegada β podría relacionarse con la formación de agregados solubles estabilizados mediante interacciones intermoleculares, tal como se describió para las proteínas de soja antes citadas.

La presencia de la estructura hoja plegada β de las proteínas en la interface podría ser debido a la estructura propia de las proteínas en la solución de esparcimiento, y/o a la estructura adquirida por la proteína en el proceso de esparcimiento en la interface, tal como Caessens y col. (1999) y Damodaran (2003) observaron para β -caseína durante el proceso de adsorción.

Por esta razón se decidió analizar la influencia de la condición de la interface sobre la estructura secundaria de la proteína esparcida.

4.2.5.1. Influencia de la condición de la interface sobre la estructura secundaria de la proteína esparcida

A efectos de determinar la relevancia de la condición de la interface se evaluó el efecto la solución esparcida a un pH diferente al de la cuba de la balanza de Lagmuir en contacto con la interface. Los ensayos se realizaron a μ 0,06.

La película formada por la solución proteica a pH 8 esparcida sobre la interface a pH 2 incrementó más lentamente su grosor en función de π respecto a la proteína esparcida a pH 8 (Figura 4.41). Este comportamiento podría deberse a que a pH 2 (Figura 4.29-A) existe menor desorción de la proteína, lo que permitiría mantener una mayor concentración de proteína en la interface. Sin embargo no puede descartarse que a pH 2 la exposición de las porciones hidrofóbicas hacia el aire sea más efectiva que a pH 8 (Figura 4.29-B)

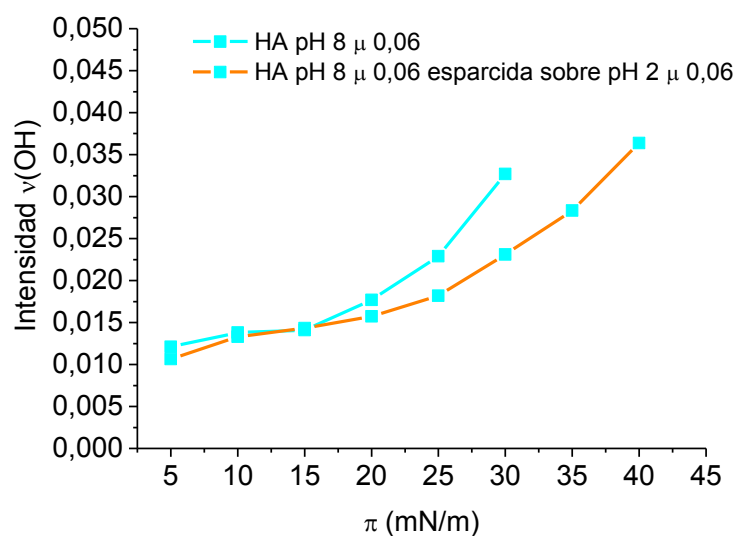


Figura 4.41. Intensidad de la banda $\nu(\text{OH})$ en función de π para la solución de proteína a pH 8 μ 0,06 sobre la interface de igual condición (cuadrados y línea color cian), y sobre la interface pH 2 μ 0,06 (cuadrados cian y línea naranja) a 25 °C.

Este acomodamiento diferencial de la proteína en la interface fue confirmado cuando se analizó la banda amida I correspondiente a la solución proteica a pH 8 esparcida a pH 2 respecto a la esparcida a pH 8, donde se determinó un aumento en la estructura hoja plegada β (Figura 4.42).

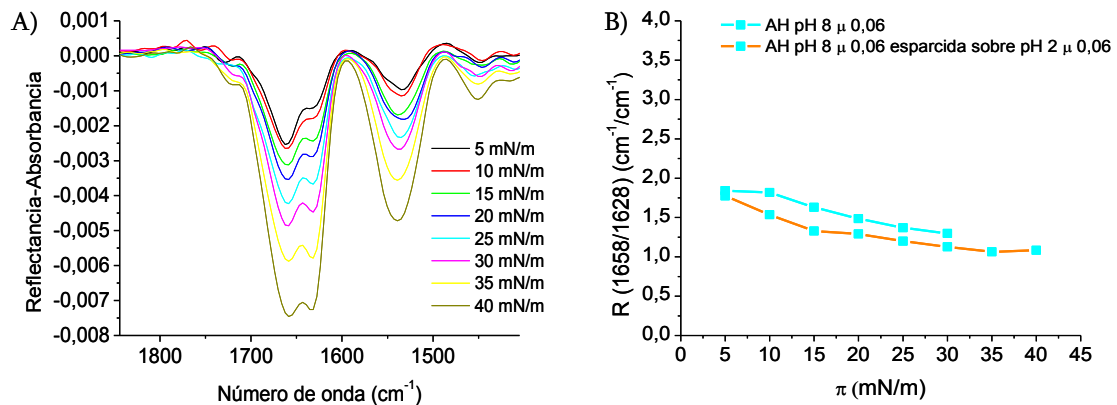


Figura 4.42. A) Espectro de banda amida I y amida II en función de π a 25 °C para la solución proteica a pH 8 μ 0,06 esparcida sobre la interface a pH 2 μ 0,06. B) Relación de intensidad de las bandas detectadas a 1658 cm^{-1} (estructura hélice α y desordenada) y a 1628 cm^{-1} (estructura hoja plegada β), para la solución de proteína a pH 8 μ 0,06 esparcida sobre la interface de igual condición (cuadrados y línea cian), y sobre la interface a pH 2 μ 0,06 (cuadrados cian y línea naranja) a 25 °C.

En la Figura 4.43 se presenta la variación de la intensidad de la banda O-H con la presión interfacial correspondiente a la solución proteica a pH 2 esparcida sobre la interface a pH 8. No se observan diferencias significativas entre las curvas obtenidas con las dos interfaces, indicando que no hay diferencias significativas en el grosor de las películas formadas en ambos casos. Este resultado es esperable ya que en estas condiciones se obtuvieron isoterms de compresión muy similares (Figura 4.29-A).

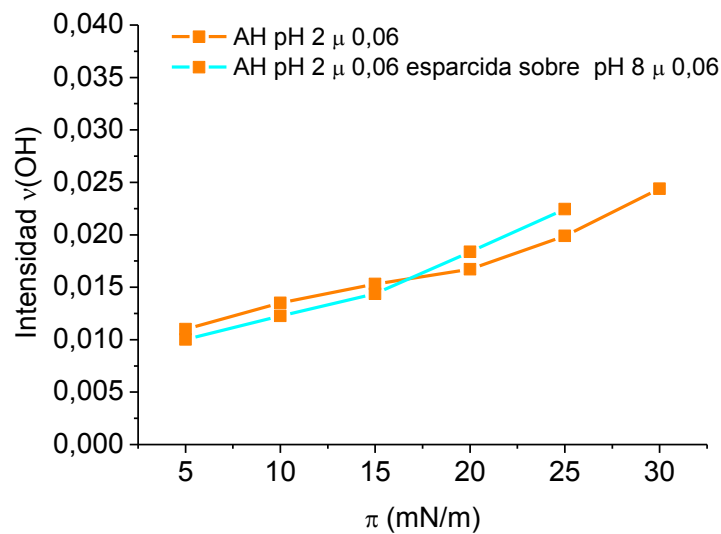


Figura 4.43. Intensidad de la banda (OH) en función de π para la solución de proteína a pH 2 μ 0,06 sobre la interface de igual condición (cuadrados color naranja y línea color naranja), y sobre la interface pH 8 μ 0,06 (cuadrados naranja y línea color cian) a 25 °C.

Al esparcir la solución proteica a pH 2 sobre la interface a pH 8 se observó una disminución de la estructura hoja plegada β (Figura 4.44).

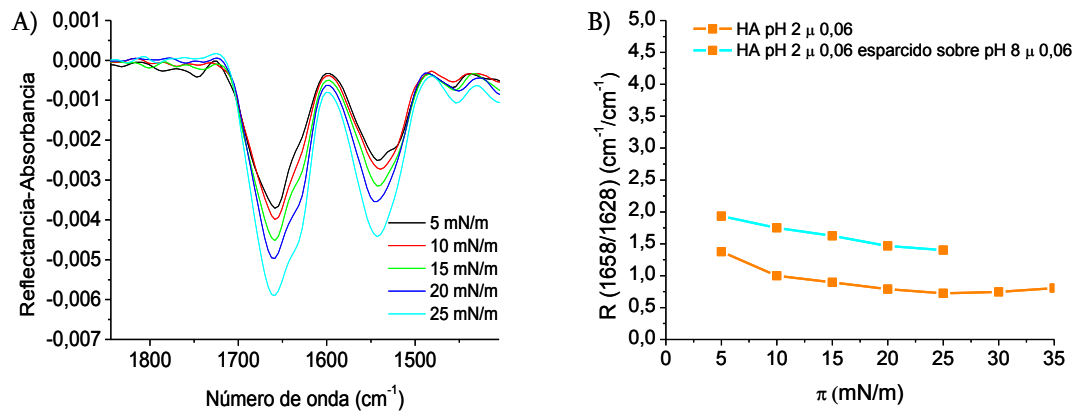


Figura 4.44. A) Espectro de banda amida I y amida II en función de π a 25 °C para la solución proteica a pH 2 μ 0,06 esparcida sobre la interface a pH 8 μ 0,06. B) Relación de intensidad de la banda a 1658 cm^{-1} (estructura hélice α y desordenada) y la banda a 1628 cm^{-1} (estructura hoja plegada β), para la solución de proteína a pH 2 μ 0,06 esparcida sobre la interface de igual condición (cuadrados y línea color naranja), y sobre la interface a pH 8 μ 0,06 (cuadrados naranja y línea cian) a 25 °C.

La totalidad de los resultados obtenidos evidencian una relación positiva entre la mejor exposición de los residuos hidrofóbicos de la proteína a pH 2 con respecto a pH 8 y el contenido de estructura hoja plegada β .

4.2.6. Análisis por microscopía de las películas de Langmuir-Blodgett

Las películas obtenidas fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica. Se obtuvieron imágenes de la interface a pHs 2 y 8 y μ 0,06 a dos niveles de presión interfacial: $\pi=10$ mN/m y $\pi=30$ mN/m, respectivamente.

El análisis mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4.45) mostró que la interface formada a pH 8, es homogénea a las dos π seleccionadas. Al aumentar la compresión se observó la formación de pliegues. A pH 2 la interface presenta características muy diferentes ya que no sólo es posible observar inhomogeneidades sino que se distinguen zonas vacías o agujeros y zonas llenas. Las zonas vacías disminuyen de tamaño cuando se incrementa la compresión, lográndose una película más homogénea sin llegar a ser lisa.

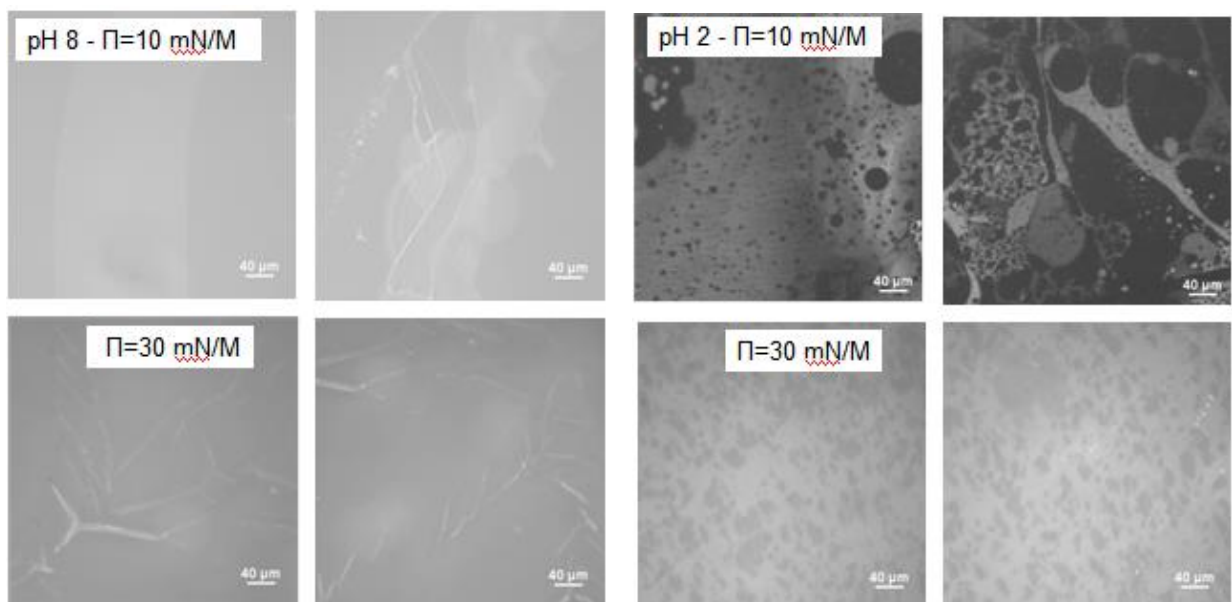


Figura 4.45. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la película formada en la interface a pH 2 y pH 8 a $\pi = 10$ mN/m y $\pi = 30$ mN/m. Ambas soluciones se prepararon a μ 0,06 utilizando la sonda Alexa 625 como marcador de fluorescencia.

Para caracterizar la interface con un mayor grado de resolución se utilizó microscopía de fuerza atómica.

A pH 8 μ 0,06 se observa un fondo liso con presencia de planos de contorno irregular (Figura 4.46-A) y agregados de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ de diámetro y 150 nm de espesor. A mayor aumento (Figura 4.46-C) se puso en evidencia un fondo rugoso en el que se pueden identificar agregados menores a 100 nm.

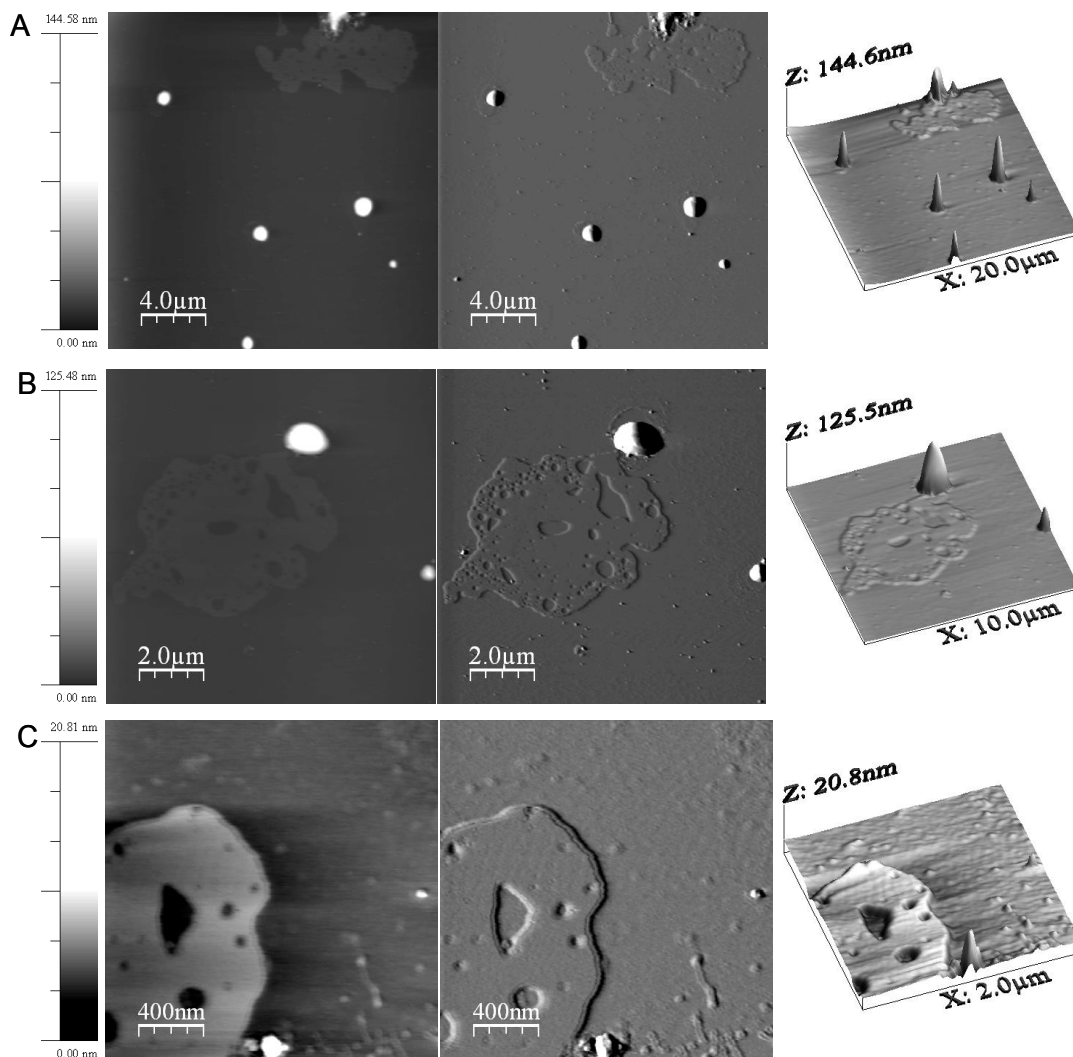


Figura 4.46. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 10$ mN/m a partir de la solución AH pH 8 μ 0,06 esparcida sobre la misma interface.

Cuando se incrementó la presión interfacial, de 10 a 30 mN/m (Figura 4.47-A) se observó la aparición de agregados, aparentemente globulares, de aproximadamente 200 nm, ubicados en un fondo homogéneo conformado por partículas de diámetro menor a 100 nm. Estas últimas se encuentran muy concentradas tapizando el fondo, mientras que en la imagen obtenida a $\pi=10$ mN/m se observan más distanciadas entre sí. El aumento de la compresión interfacial originó la pérdida de las zonas planas irregulares y de los agregados más grandes (1 μ m) y el aumento de la concentración proteica en la interface en forma de agregados de menor tamaño. Estas características de la interface sugieren que se obtuvo una película resistente a la compresión. La disociación de los agregados grandes ocasionada por el aumento de la compresión podría deberse al proceso mecánico en sí, como así también a los procesos de transición estructural.

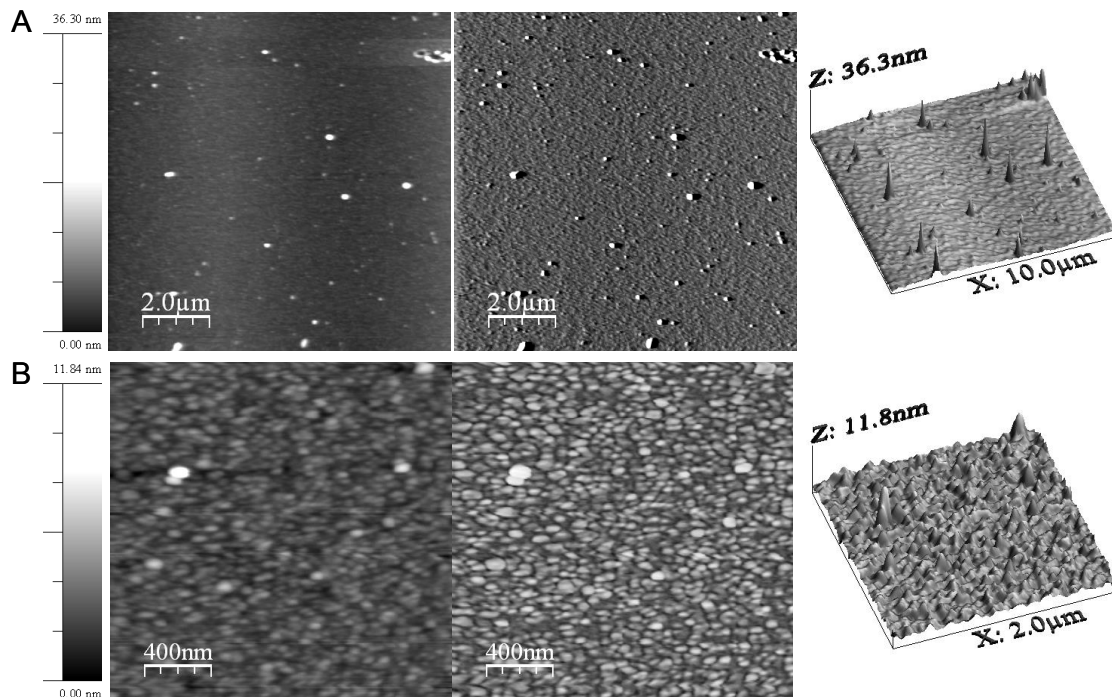


Figura 4.47. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 30$ mN/m a partir de la solución AH pH 8 μ 0,06 esparcida sobre la misma interface.

A pH 8 y μ 0,5 se observaron agregados proteicos muy grandes mayores a $2 \mu\text{m}$ de diámetro y de espesor cercano a $1 \mu\text{m}$ (Figura 4.48-A) y otros más pequeños, de diámetro aproximado a $1 \mu\text{m}$ y 100 nm de espesor, distribuidos homogéneamente (Figura 4.48-B). Se observaron también otras partículas más pequeñas de 100 nm y 10 nm de espesor que se distinguen claramente en la Figura 4.48-C.

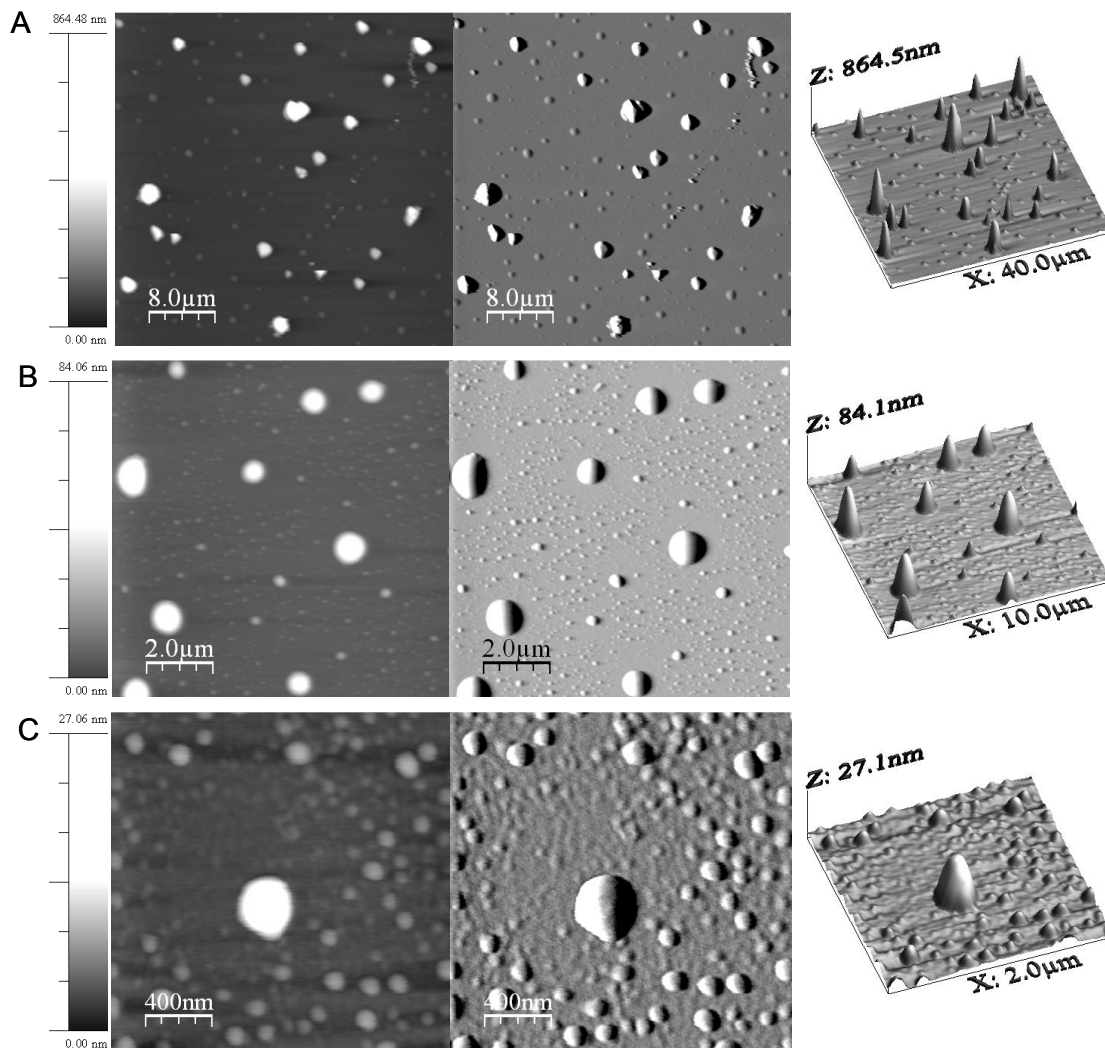


Figura 4.48. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 10$ mN/m a partir de la solución AH pH 8 μ 0,5 esparcida sobre la misma interface.

Cuando la presión interfacial aumentó a 30 mN/m, se observó la disociación de los agregados presentes, tal como hemos descrito para las soluciones de menor fuerza iónica (μ 0,06). En estas condiciones el diámetro promedio de las partículas resultó menor a 2 μ m, mientras que el espesor también fue menor, aproximadamente 150 nm (Figura 4.49-A). En la Figura 4.49-C se observa una superficie homogénea, bien compacta, similar a un gel, lo que sugiere la obtención de una interface firme con resistencia a la compresión.

A mayor fuerza iónica, μ 0,5, se detectó mayor cantidad de agregados en la interface de mayor tamaño que a μ 0,06.

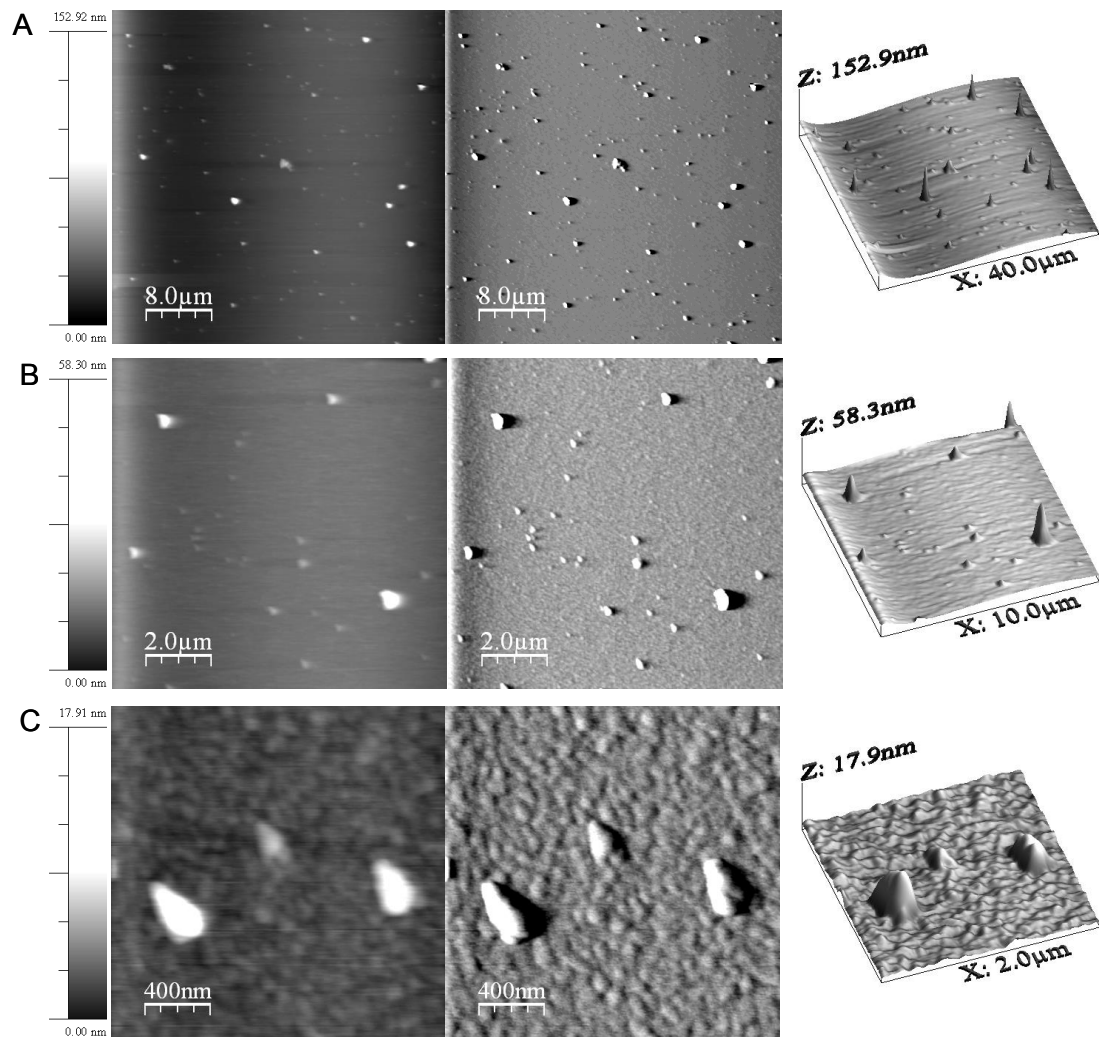


Figura 4.49. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 30$ mN/m a partir de la solución AH pH 8 μ 0,5 esparcida sobre la misma interface.

En las condiciones de ensayo pH 2, μ 0,06 y compresión de la interface hasta $\pi=10$ mN/m, se detectaron algunos agregados grandes, de tamaño entre 3 μ m y 4 μ m, y un fondo cubierto de agregados más pequeños (Figura 4.50-A). Los agregados grandes mostraron bordes irregulares y espesores variables que llegan a los 500 nm. En las Figuras 4.50-B y 4.50-C se observa que los agregados más pequeños están homogéneamente distribuidos, presentan también contornos irregulares y tamaños entre 200 nm y 400 nm, ubicados en una superficie de características rugosas.

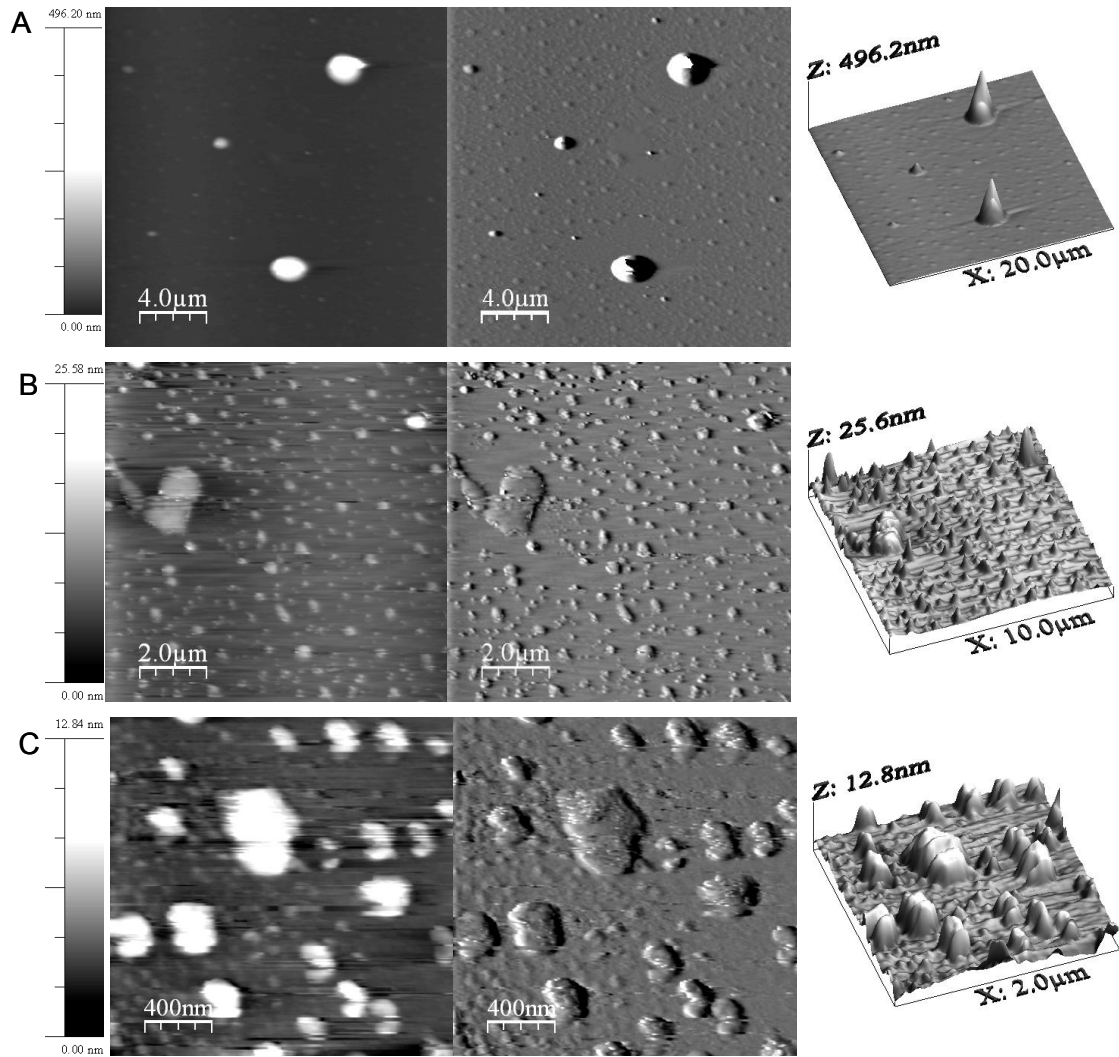


Figura 4.50. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 10$ mN/m a partir de la solución AH pH 2 μ 0,06 esparcida sobre la misma interface.

Al aumentar la compresión de la interface hasta $\pi=30$ mN/m se observó disminución del tamaño de los agregados con una interface de fondo irregular, con zonas deprimidas y/o vacías, y la presencia de formaciones alargadas de tamaño variable (Figura 4.51).

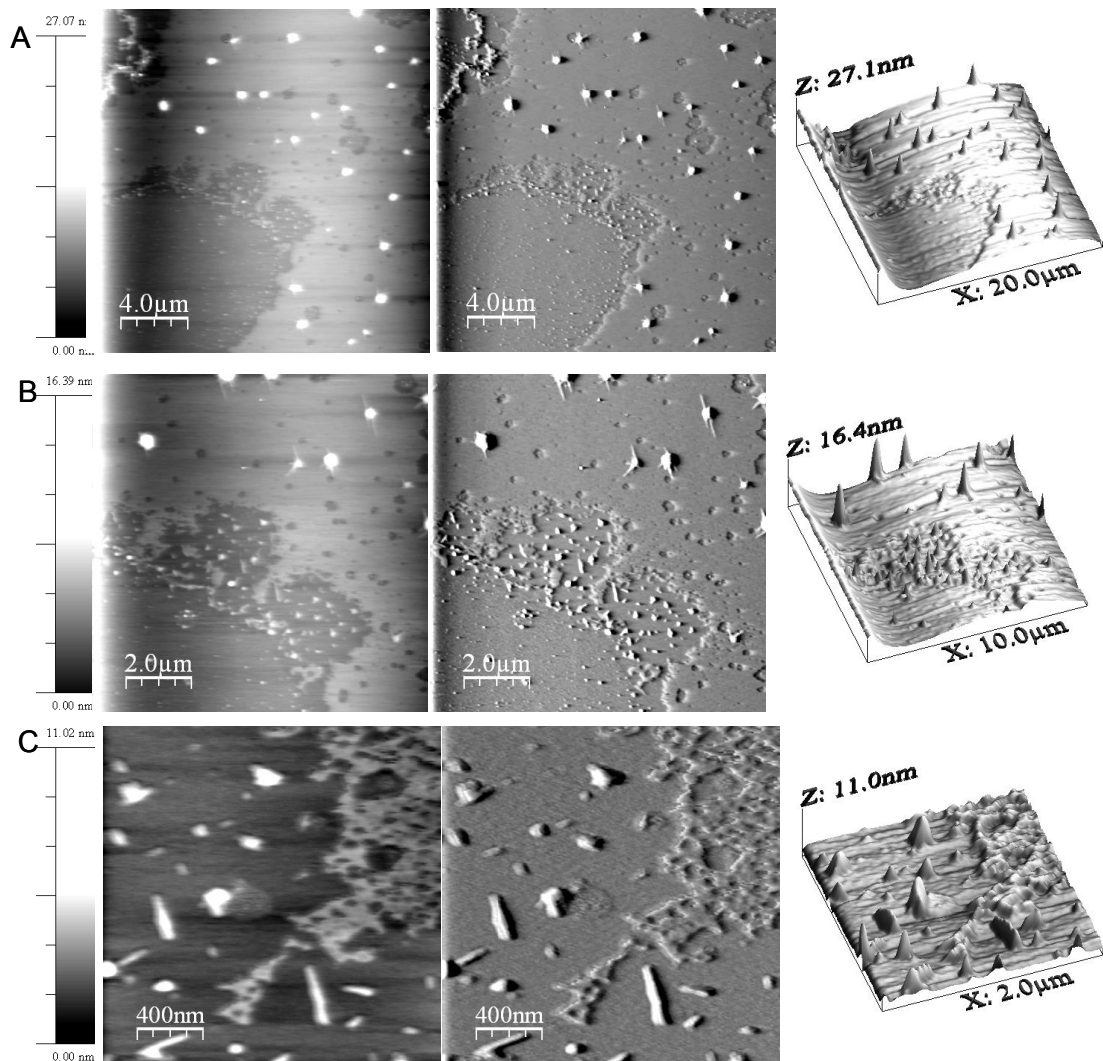


Figura 4.51. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 30$ mN/m a partir de la solución AH pH 2 μ 0,06 esparcida sobre la misma interface.

A igual pH y mayor fuerza iónica (pH 2 μ 0,5) se observa una interface más homogénea, con agregados de menor tamaño y menor espesor (Figura 4.52).

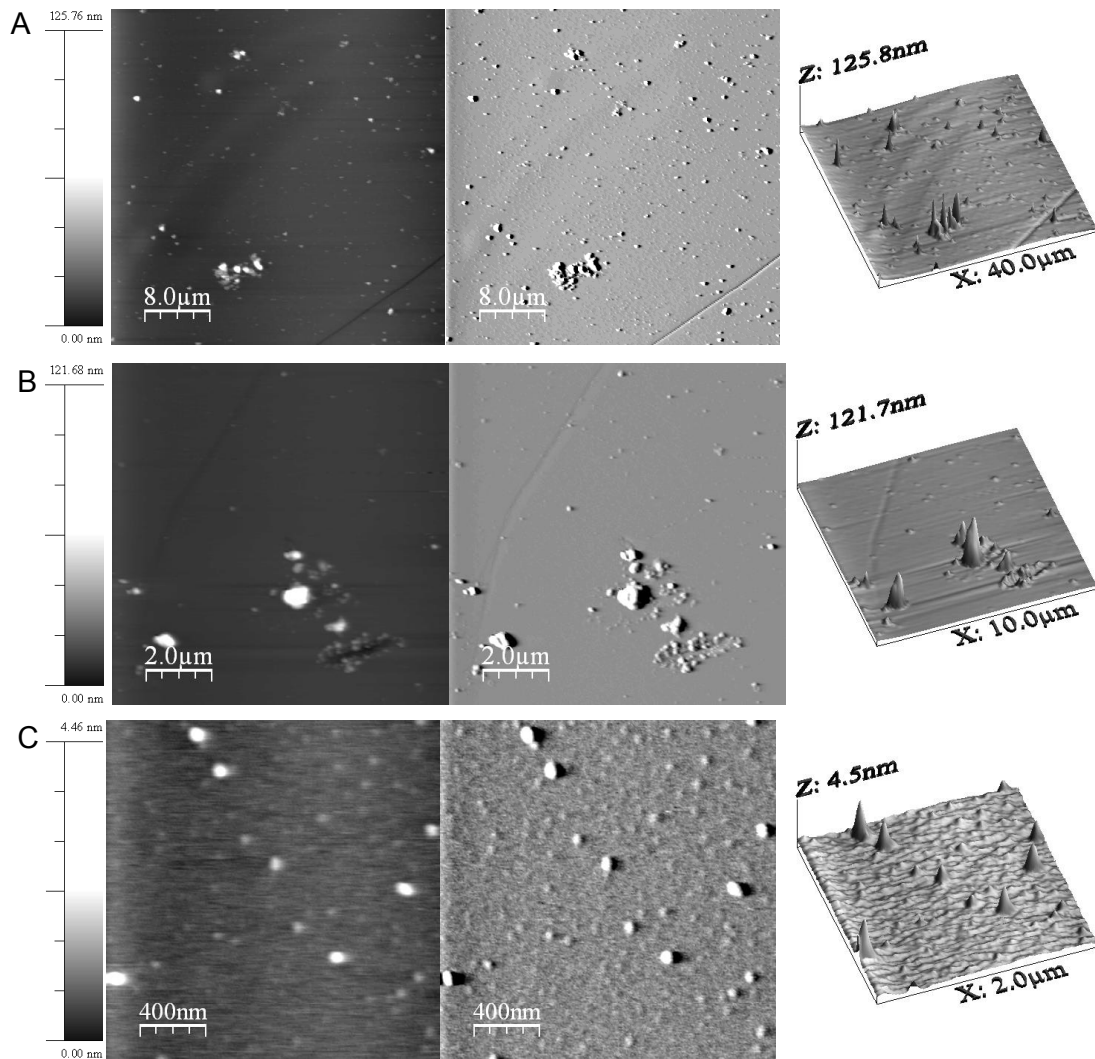


Figura 4.52. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 10$ mN/m a partir de la solución AH pH 2 μ 0,5 esparcida sobre la misma interface.

Al comprimir la interface hasta 30mN/m se acentuó la rugosidad del fondo, formado en este caso por agregados de menor tamaño y espesor medio. A mayores aumentos se distinguen zonas deprimidas y partículas alargadas de tamaño variable (Figura 4.53).

La compresión condujo a la disociación de agregados y aumento de la rugosidad de la película interfacial.

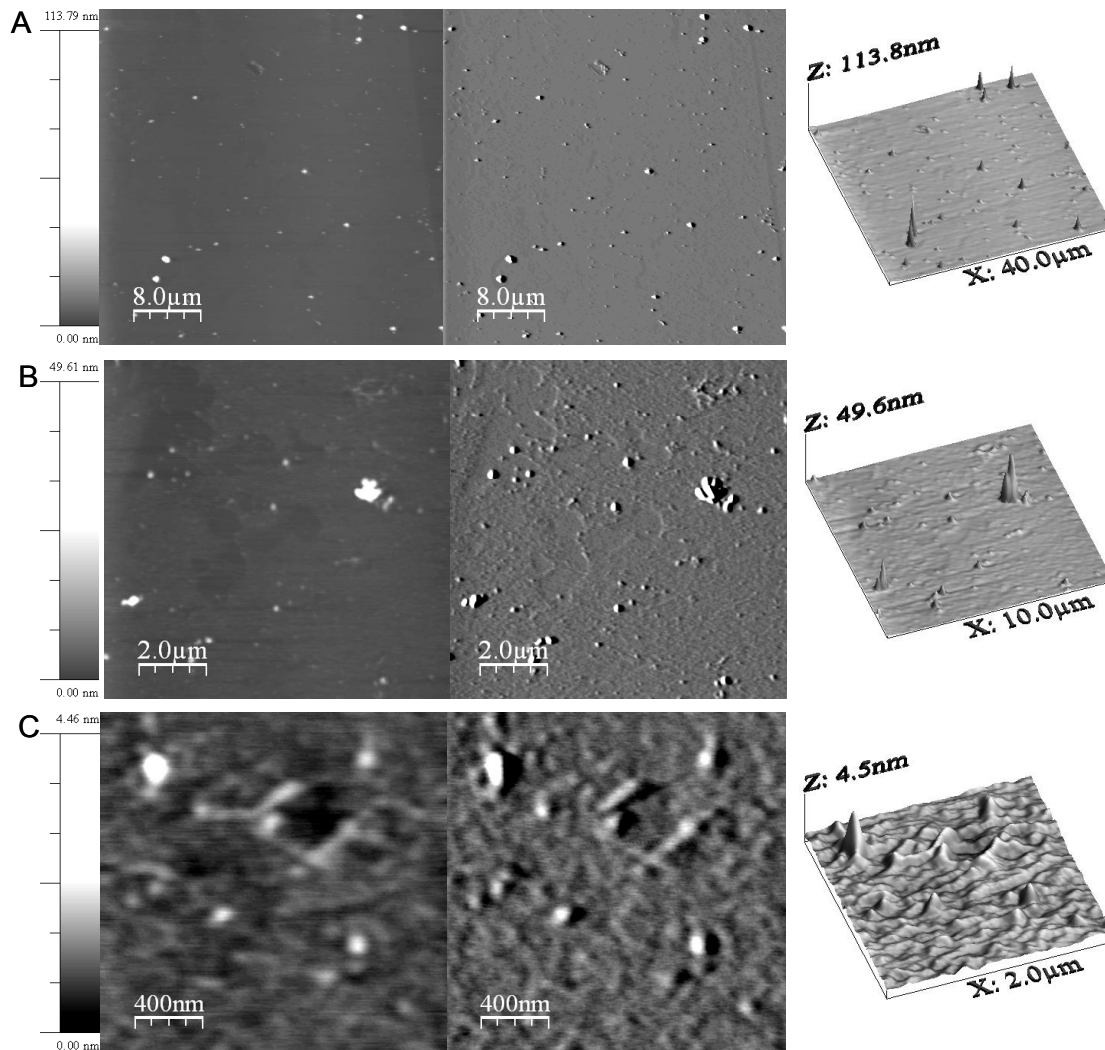


Figura 4.53. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la película formada en la interface a $\pi = 30$ mN/m a partir de la solución AH pH 2 μ 0,5 esparcida sobre la misma interface.

Mediante esta técnica logramos apreciar que las interfaces tienen diferentes características según las condiciones de pH y fuerza iónica que se utilicen. A pH 2 se observaron interfaces más rugosas e irregulares que a pH 8. Además el aumento de la concentración salina tuvo efectos opuestos a los dos pHs ensayados.

4.3 Propiedades espumantes

El estudio de las propiedades espumantes de las proteínas resulta de interés cuando se desea utilizarlas como ingredientes funcionales en el desarrollo de alimentos espumados (Nakamura y Doi, 2000). El estudio de estas propiedades se puede separar temporal y fenomenológicamente en dos etapas básicas, por un lado el análisis de las propiedades de formación de la espuma, y por el otro el correspondiente a la estabilidad de la misma. Esta división resulta compleja debido a la

pronta desestabilización de la espuma, la cual se inicia durante el período de formación (Halling, 1981; Salager y col., 2003).

4.3.1. Capacidad de formación de espuma

4.3.1.1. Espumas preparadas con la fracción soluble y total de proteínas

La capacidad de formación de espuma se evaluó por medio de varios parámetros determinados en la fracción soluble y la dispersión total (fracción soluble e insoluble), ya mencionados en el capítulo Materiales y métodos (punto 3.4). Durante el burbujeo se evaluó la *velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma* (v_0) la cual se relacionó con la adsorción de la proteína en la interface. Al finalizar el burbujeo se evaluó el *volumen de líquido incorporado en la espuma* (VLE), el *volumen de espuma* (V_{esp}) y relacionando los parámetros anteriores la *densidad de la espuma* (δ_{esp}). También se obtuvieron imágenes digitales de las espumas formadas.

En la Figura 4.54 se muestran los valores correspondientes a la velocidad de incorporación de líquido a la espuma. Puede observarse que el valor de v_0 en las espumas formuladas con las fracciones solubles, fue mayor a pH 2 que a pH 8 en particular a μ 0,5. Las espumas formadas con la dispersión total mostraron la misma tendencia que las correspondientes a la fracción soluble.

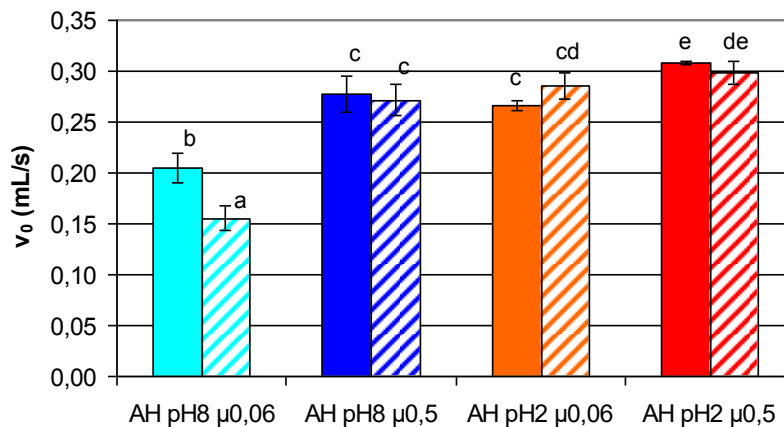


Figura 4.54. Velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0) a partir de la solución de proteína 1 g/L (barra llena) y de la dispersión total 1 g/L (barra rayada) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Los valores de v_0 obtenidos no presentaron diferencias significativas, excepto para la dispersión de proteínas preparada a pH 8 μ 0,06, en la que la velocidad de incorporación de líquido a la espuma, v_0 , resultó ser más pequeña.

Al finalizar el burbujeo se calculó inicialmente el volumen de líquido incorporado a la espuma. En la Figura 4.55 se presentan los valores de VLE obtenidos para las distintas muestras ensayadas.

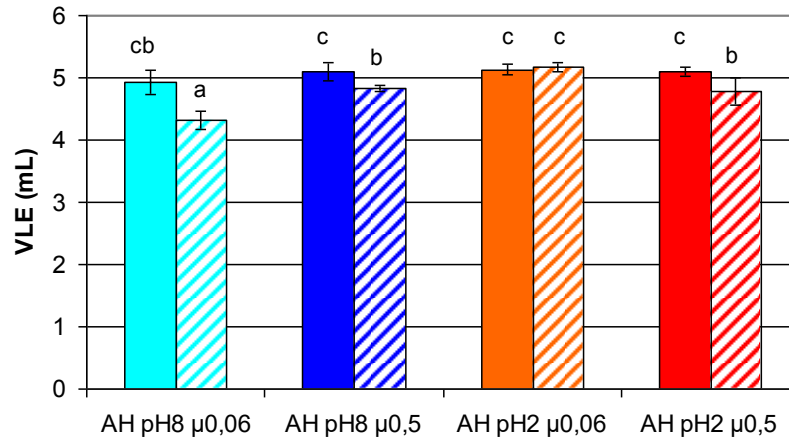


Figura 4.55. Volumen de líquido incorporado en la espuma (VLE) a partir de la solución de proteína 1 g/L (barra llena) y de la dispersión total 1 g/L (barra rayada) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Se observa que las espumas preparadas con la fracción soluble muestran iguales valores de VLE en las diferentes condiciones de pH y μ analizadas. En general, las espumas preparadas con la dispersión total incorporaron una menor cantidad de líquido que las correspondientes a la fracción soluble con excepción de la espuma preparada a pH 2 μ 0,06, la cual incorporó la misma cantidad de líquido que las espumas de la fracción soluble.

Los valores de V_{esp} mostraron una tendencia similar a los correspondientes a la incorporación de líquido en la espuma (Figura 4.56). No se observaron diferencias significativas en el V_{esp} obtenido con la fracción soluble en las diferentes condiciones de ensayo, mientras que con la dispersión total se obtuvieron mayores volúmenes de espuma a pH 2 siendo significativa esta diferencia a μ 0,06.

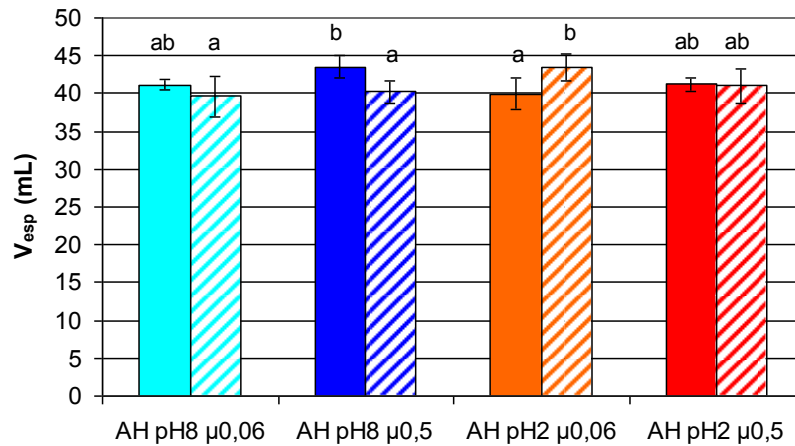


Figura 4.56. Volumen de espuma (V_{esp}) a partir de la solución de proteína 1 g/L (barra llena) y de la dispersión total 1 g/L (barra rayada) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Por último se calcularon los valores de δ_{esp} a partir de la relación VLE/V_{esp} , los mismos se presentan en la Figura 4.57.

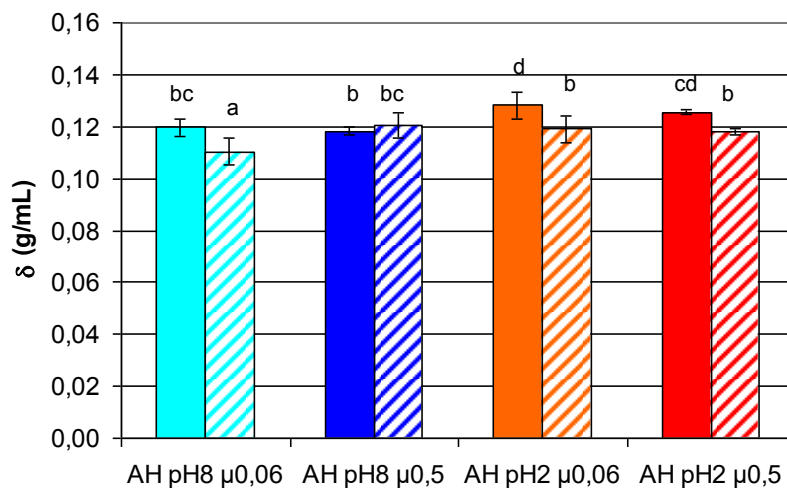


Figura 4.57. Densidad de la espuma (δ_{esp} g/mL) a partir de la solución de proteína 1 g/L (barra llena) y de la dispersión total 1 g/L (barra rayada) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Las espumas formadas con la fracción de proteína soluble fueron más densas a pH 2 que a pH 8, no encontrándose diferencias significativas con la fuerza iónica. En tanto que las espumas formadas con la dispersión total presentaron una menor densidad que las anteriores para todas

las condiciones de pH y μ , con excepción de la espuma formada a pH 8 μ 0,5 que no mostró diferencias entre la fracción soluble y la dispersión total.

Las espumas fueron monitoreadas con una cámara digital, no sólo durante su formación, sino también una vez que se detuvo el burbujeo y se produjeron los fenómenos de desestabilización. Las imágenes se obtuvieron para las espumas preparadas con la fracción soluble y la dispersión total en todas las condiciones utilizadas (diferentes pHs y μ). Las mismas fueron analizadas cualitativamente. A continuación se discutirán sólo las correspondientes al tiempo de finalización del burbujeo.

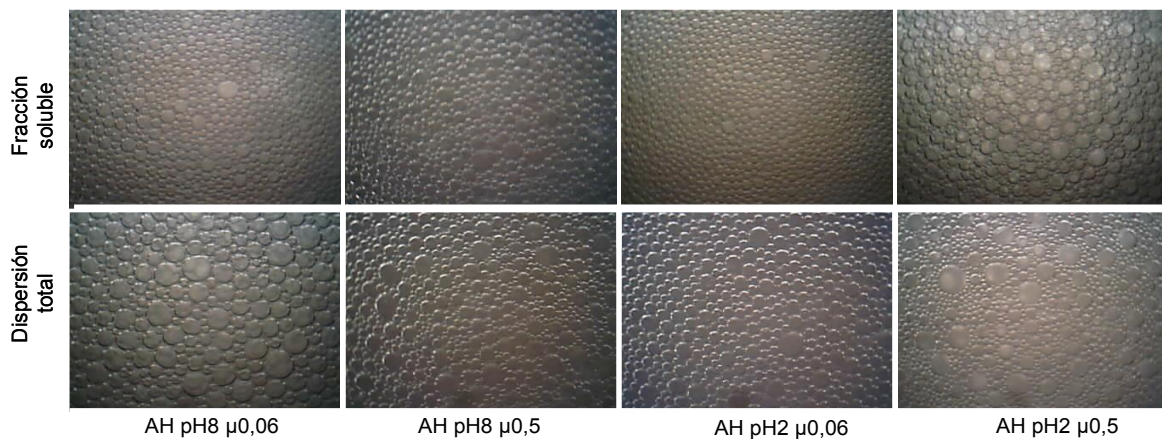


Figura 4.58. Imágenes de espumas preparadas con la fracción soluble (1 g/L) y con la dispersión total (1g/L) al finalizar el burbujeo. Las condiciones utilizadas se indican al pie de las fotos. Las espumas fueron preparadas a 25 °C.

Las espumas formadas a partir de la fracción soluble mostraron una distribución de tamaños de burbuja más homogénea a μ 0,06 que a μ 0,5, sin que se hayan detectado diferencias apreciables entre las espumas preparadas a los diferentes pHs.

Las imágenes de las espumas formadas con la dispersión total mostraron una distribución de burbujas de mayor tamaño y con mayor grado de inhomogeneidad que las preparadas con la fracción soluble. Según la ecuación de Prins (4.6) donde R corresponde al radio de la burbuja, r al radio del orificio de burbujeo, γ a la tensión superficial, ρ a la densidad de la solución y g a la aceleración de la gravedad, la mayor inhomogeneidad podría atribuirse a la menor velocidad de descenso de la tensión superficial provocada por la dispersión total de proteínas que contiene una menor cantidad de partículas de menor tamaño que las presentes en la fracción soluble.

$$R = \left(\frac{3r\gamma}{2\rho g} \right)^{1/3}$$

ec. 4.6

La presencia de burbujas de mayor radio hidrodinámico conduce a una disminución de la relación área/volumen. Teniendo en cuenta que no se observó diferencia significativa entre el V_{esp} obtenido con la dispersión total y el obtenido con la fracción soluble (Figura 4.56), es de esperar una menor incorporación de líquido y por ende menor densidad de la espuma (Figura 4.57).

El análisis de todos los parámetros determinados en su conjunto permite concluir que las mejores espumas para las proteínas de amaranto se obtienen a pH 2 μ 0,5, pudiendo atribuirse este hecho a la mayor velocidad de incorporación de líquido en la espuma debido a la rápida migración y reordenamiento de la proteína en la interface. No obstante visualmente estas espumas fueron poco homogéneas.

4.3.1.2. Dependencia de la concentración y de la fracción insoluble sobre las propiedades espumantes en la condición pH 2 μ 0,5.

Distintos investigadores han demostrado que la capacidad espumante de las proteínas aumenta con el incremento de su concentración en la solución de espumado (Carrera Sánchez col., 2005). No obstante ello, resulta interesante conocer, en el caso específico de las proteínas de amaranto, la magnitud de dicho aumento y, ya que en algunas condiciones la solubilidad es bastante reducida, analizar de qué modo influye la fracción insoluble sobre la capacidad espumante de estas proteínas.

Para realizar este estudio se eligió la condición de pH 2 μ 0,5, en la cual el amaranto presentó buenas propiedades espumantes, interfaciales y reológicas. Se prepararon soluciones proteicas de concentración 0,25, 1 y 4 g/L y dispersiones proteicas que contuvieran la misma cantidad de proteína soluble que las soluciones. Dado que la solubilidad en las condiciones de ensayo es cercana al 25%, se utilizaron 1 y 4 g/L de proteína total para la preparación de las dispersiones, valores que equivalen a 0,25 y 1 g/L de proteína soluble, respectivamente.

Una vez preparadas las soluciones y las dispersiones se obtuvieron las espumas y los parámetros asociados a su formación y a su estabilidad.

La Figura 4.59 muestra los volúmenes de líquido incorporados a las espumas. Las barras llenas corresponden a los VLE que se obtuvieron con las soluciones proteicas, mientras que las barras rayadas corresponden a los medidos en las espumas preparadas con las dispersiones.

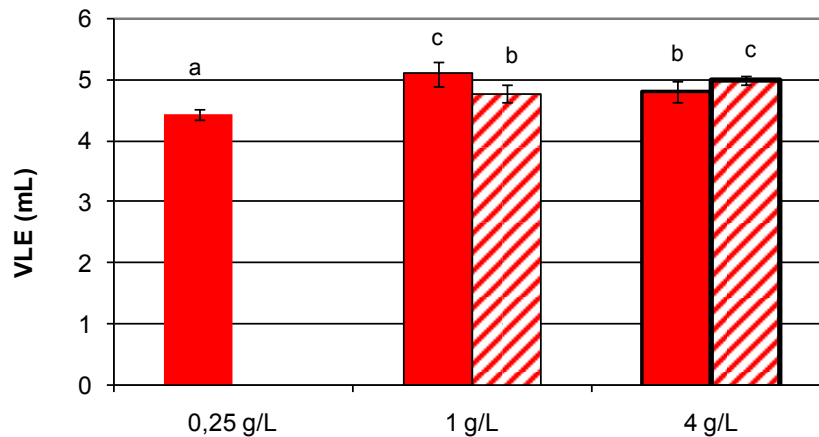


Figura 4.59. Volumen de líquido incorporado en la espuma (VLE (mL)) en la condición pH 2 μ 0,5 a 25°C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

Se observa que el VLE aumenta al aumentar la concentración de proteína en la solución hasta 1 g/L y que desciende a concentraciones más altas (barras rojas llenas). Cuando se utilizan las dispersiones totales los resultados obtenidos indicarían que para bajas concentraciones proteicas (1g/L conteniendo 0,25 g/l de proteína soluble) la proteína insoluble ejercería un efecto algo negativo, efecto que decrece al incrementarse la concentración proteica (4 g/L conteniendo 1 g/L de proteína soluble) En suma los resultados obtenidos indicarían que la proteína insoluble prácticamente no ejerce efecto en la formación de la espuma.

En la Figura 4.60 se presentan los volúmenes máximos de espuma (V_{esp}) obtenidos con las soluciones y las dispersiones del aislado proteico de amaranto a pH 2 μ 0,5.

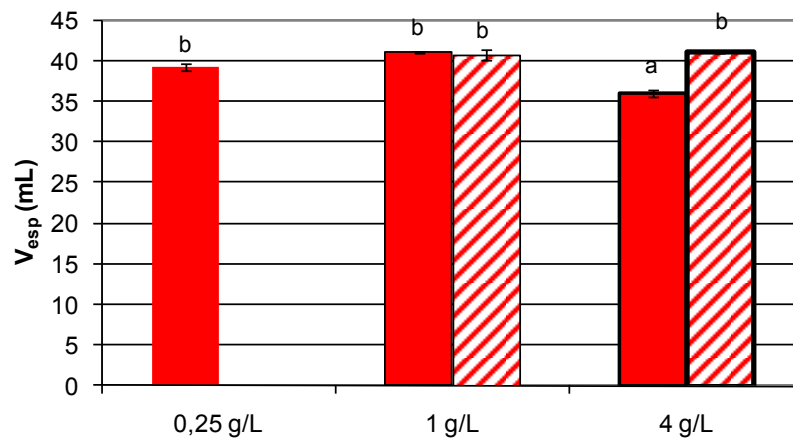


Figura 4.60. Volumen de espuma (V_{esp} (mL)) en la condición pH 2 μ 0,5 a 25 °C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

No se observaron diferencias entre las muestras ensayadas, a excepción de la fracción soluble de mayor contenido de proteína que formó un volumen de espuma menor. La presencia de proteínas insolubles no ejerce ningún efecto en la formación espuma; por ejemplo los V_{esp} obtenidos para la solución de 1 g/L y para la dispersión total de 4 g/L, que contiene solo un cuarto de proteína soluble, fueron equivalentes.

La Figura 4.61 muestra los valores de densidad de espumas calculados para las diferentes espumas obtenidas. Es posible observar que la densidad de las espumas formuladas con la fracción soluble se incrementa con el aumento de la concentración proteica. El incremento detectado a 1 g/L podría ser atribuido al aumento de VLE previamente discutido (Figura 4.59). Por otro lado, un menor tamaño de burbujas que se traduce en una mayor relación área/volumen permitiría un mayor alojamiento de líquido lamelar, contribuyendo al incremento de la densidad de la espuma. Previamente hemos demostrado que, a mayor concentración proteica, 4 g/L, desciende VLE y en mayor magnitud V_{esp} (Figuras 4.59 y 4.60), lo que permitiría explicar el incremento de δ_{esp} detectado.

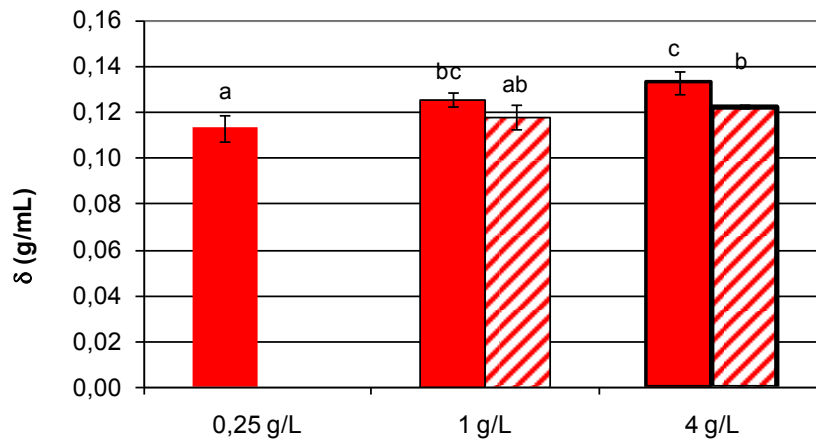


Figura 4.61. Densidad de la espuma (δ_{esp} (g/mL)) en la condición pH 2 μ 0,5 a 25 °C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

No se observaron diferencias en δ_{esp} entre las espumas preparadas con la dispersión total, ni entre estas y la correspondiente a la espuma formulada con 1 g/L de fracción soluble, lo que nuevamente sugiere que la proteína insoluble no ejerce ningún efecto en la espuma.

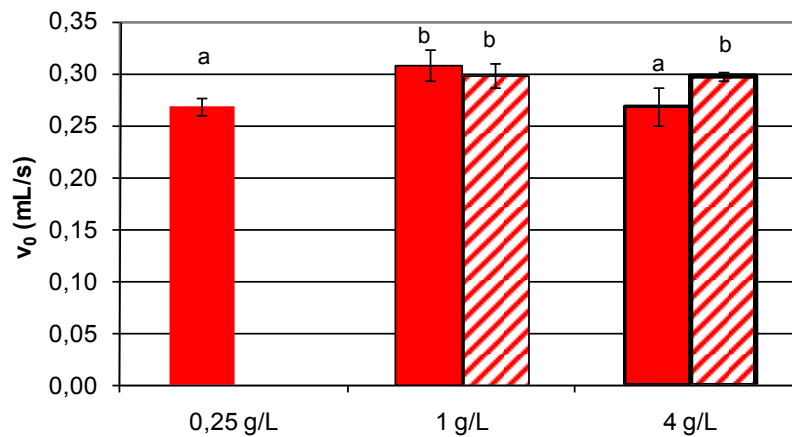


Figura 4.62. Velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0) en la condición pH 2 μ 0,5 a 25 °C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

Los valores de la velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma mostraron la misma tendencia que los correspondientes a V_{LE} y V_{esp} , detectándose los mayores valores a 1 g/L así como ausencia de un efecto de la fracción proteica insoluble.

Para completar el análisis del efecto de la fracción de proteína insoluble en la formación de espumas se tomaron imágenes digitales de las mismas, las cuales se presentan en la Figura 4.63.

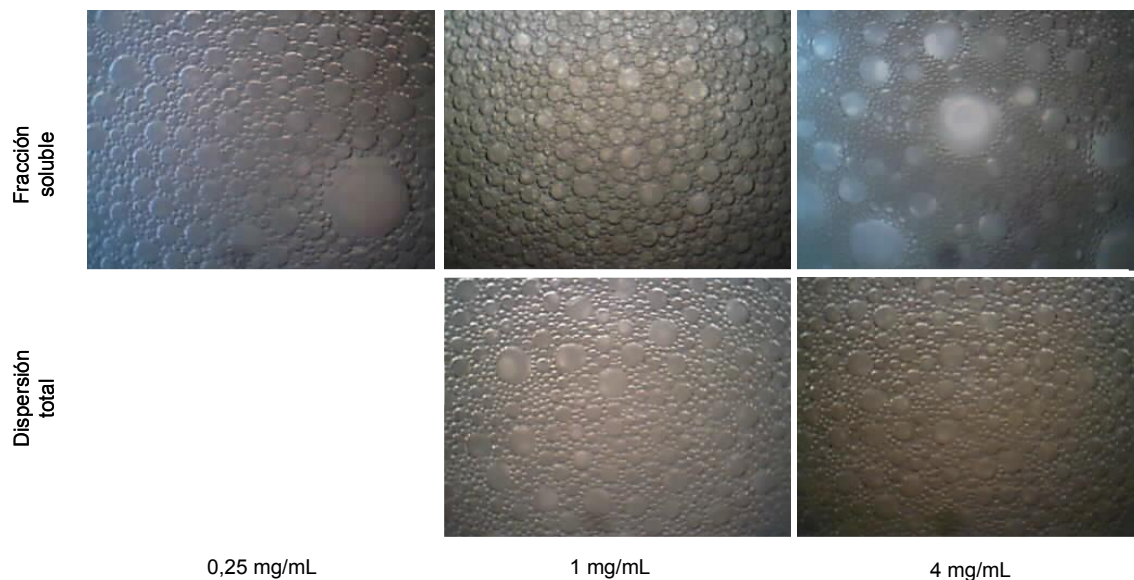


Figura 4.63. Imágenes de las espumas obtenidas con las soluciones y con las dispersiones proteicas al finalizar el burbujeo. Las concentraciones utilizadas se indican en la figura; todas las imágenes corresponden a espumas preparadas a pH 2 μ 0,5 a 25 °C.

Las espumas preparadas con la solución de proteínas de 0,25 g/L mostraron burbujas de mayor tamaño que las presentes en las espumas preparadas con 1 g/L de proteína, hecho que podría explicarse si se recuerda que la velocidad de descenso de la tensión superficial fue menor en la solución de menor concentración de proteínas (Tabla 4.1). Las imágenes de las espumas obtenidas con la solución 4 g/L fueron diferentes al resto, detectándose dos poblaciones de burbujas, una de tamaño pequeño y otra constituida por burbujas muy grandes, lo que le otorga a la espuma un aspecto inhomogéneo. La alta concentración de proteína permite comprender la presencia de burbujas de menor tamaño. En esta situación, como se indicó previamente, se incrementa la relación área/volumen, lo que llevaría a una mayor incorporación de líquido en la espuma. Este fenómeno no fue observado en nuestras experiencias (Figura 4.60), debido posiblemente, a la mayor viscosidad de la solución que desfavorecería la migración de líquido a la espuma.

Las espumas preparadas con la dispersión total fueron similares a aquellas preparadas conteniendo igual concentración de proteína soluble

4.3.2. Características del espumado y su relación con las propiedades interfaciales.

Distintos autores han mostrado la utilidad de la tensiometría interfacial como herramienta para caracterizar y predecir las propiedades espumantes (Tamm y col., 2012; Marinova y col., 2009). Kitabatake y Doi (1988) mostraron la existencia de una relación entre la espumabilidad y la tensión superficial. Estos autores observaron que cuando las moléculas que migran a la interface son proteínas, esta relación no depende de la tensión superficial en el equilibrio sino de la velocidad de descenso de la misma. No obstante, en la actualidad no está claro si es el descenso de la tensión superficial o la adsorción de la proteína a la interface, el parámetro que mejor se relaciona con la capacidad espumante (Wierenga y Gruppen, 2010).

De acuerdo a la ecuación de Prins (1988) (4.6) una mayor velocidad de descenso de la tensión superficial generaría espumas de menor radio hidrodinámico.

En los ensayos realizados en este trabajo siempre se utilizó la misma placa fritada, caudal de gas fijo y soluciones de proteína de 1 g/L de igual densidad, por lo tanto es esperable que las diferencias encontradas en la tensión superficial se deban solo a diferencias en la velocidad de descenso de la misma.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las cinéticas de adsorción de las proteínas de amaranto a la interface, en las diferentes condiciones de ensayo utilizadas, planteamos la siguiente hipótesis: las burbujas presentes en las espumas formuladas a pH ácido serán de menor tamaño que las correspondientes a espumas de pH 8, igual tendencia ocurrirá para las espumas formuladas a alta fuerza iónica respecto a las de baja fuerza iónica. Esta disminución en el tamaño medio de las burbujas traería aparejado un aumento de la relación área/volumen y en consecuencia un aumento del líquido incorporado en la espuma.

La hipótesis planteada fue confirmada dado que para las espumas preparadas con la fracción soluble se halló una relación lineal entre v_0 (velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma) y el descenso de la tensión superficial a los 3 s (π_{3s}) de formada la interface, obteniéndose una mayor velocidad de incorporación de líquido cuanto mayor es la capacidad de las proteínas para descender la tensión superficial a tiempos cortos.

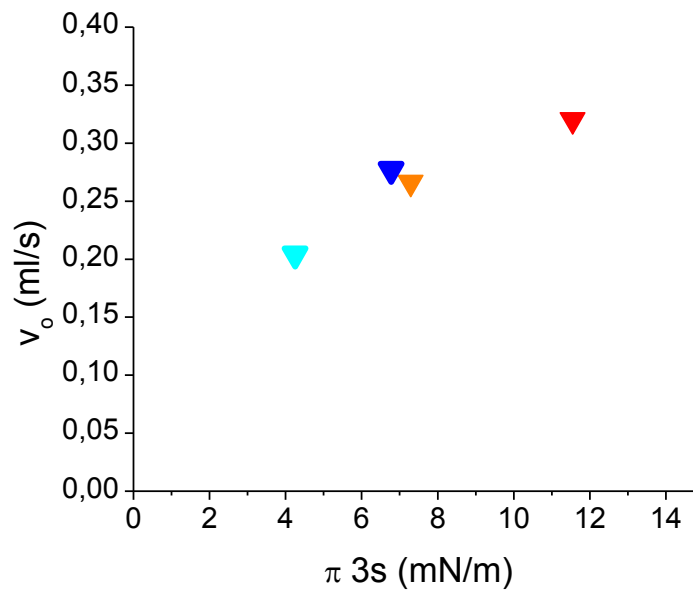


Figura 4.64. Relación entre la velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_o) y el aumento de la presión superficial a los 3 segundos de creada la interface (π_{3s}) a partir de la solución de proteína 1 g/L en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

4.3.3. Estabilidad de la espuma

Planteada la intención de utilizar proteínas de amaranto en la formulación de alimentos espumados, surge la necesidad de evaluar y eventualmente aumentar la estabilidad de las espumas obtenidas.

La desestabilización de una espuma ocurre por distintos mecanismos simultáneos, entre los que podemos mencionar el drenado gravitacional, la desproporción y el colapso. Tal como se indicó previamente la estabilidad de las espumas formadas en las distintas condiciones de pH y μ se estimó a través de dos parámetros. Uno de ellos, el *tiempo medio de la espuma* ($t_{1/2}$), que corresponde al tiempo necesario para drenar la mitad del volumen del líquido incorporado. El otro es el *volumen de líquido remanente en la espuma a los 10 min del cese del burbujeo* (VLE_{10min}). Además para cada condición de ensayo se obtuvieron imágenes digitales en diferentes momentos y se analizaron las correspondientes a $t_{1/2}$, a 90 s y a 600 s después del cese del burbujeo. La cinética de drenado del líquido de la espuma, tal como se indicó en Materiales y métodos, se modeló mediante el ajuste de los datos experimentales a una ecuación que describe un fenómeno exponencial bifásico de primer orden, donde el primer parámetro se relaciona con el drenado del

líquido y el segundo con la desproporción y colapso de las burbujas (Wright y Hemmant, 1987; Yu y Damodaran, 1991).

4.3.3.1. Parámetros estimativos de la estabilidad de la espuma ($t_{1/2}$ y VLE_{10min})

En la Figura 4.65 se presentan los valores de $t_{1/2}$ determinados en las espumas estudiadas. Como ya hemos mencionado, se prepararon espumas con soluciones y dispersiones proteicas, 1 g/L en las condiciones de pH y fuerza iónica de interés.

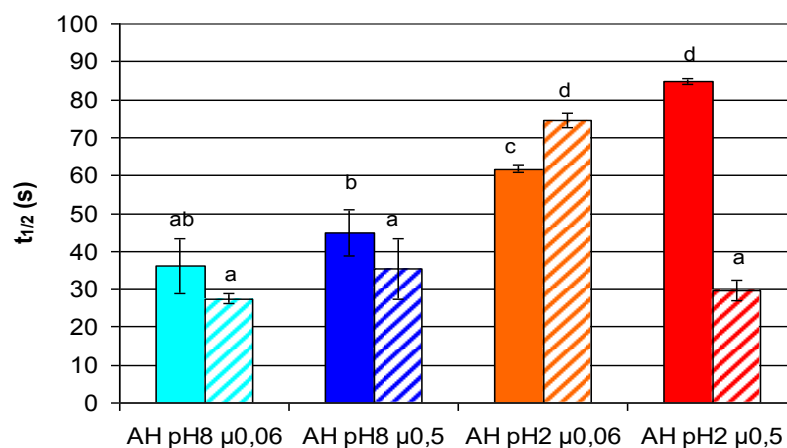


Figura 4.65. Tiempo medio de desestabilización de la espuma ($t_{1/2}$ (s)) preparada a partir de la solución de proteína 1 g/L (barra llena) y de la dispersión total 1 g/L (barra rayada) en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Los valores de $t_{1/2}$ hallados para las espumas preparadas con la proteína soluble, indicados con barras llenas en la Figura 4.65, mostraron diferencias significativas entre los dos niveles de pH y de μ ensayados. Las espumas formadas a pH 2 fueron más estables que las preparadas a pH 8, particularmente a μ 0,5.

Las espumas preparadas con la fracción soluble (barras llenas) presentaron una mayor estabilidad que las formadas con igual concentración de proteína total (soluble + insoluble, barras rayadas). Este resultado coincide con las descripciones bibliográficas en las que se indica que a mayor cantidad de proteína soluble, se espera un mejor desempeño en las propiedades interfaciales (Murray y Ettelaie, 2004; Murray y col., 2011). Claramente el contenido de proteína soluble es mayor en una solución 1 g/L que en una dispersión de la misma concentración. Sin embargo, la espuma formulada a partir de la dispersión total preparada a pH 2 y μ 0,06 presentó $t_{1/2}$ mayor que la correspondiente a la solución preparada en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica. Cabe

recordar que la dispersión a μ 0,06 posee un 13 % p/p de proteína insoluble, mientras que la dispersión a igual pH y μ 0,5 presenta 74,7 % p/p de proteína insoluble. En los últimos años se ha comenzado a hablar de la importancia de las partículas insolubles como estabilizantes de espumas (Dickinson, 2010). Algunos autores han observado una relación positiva entre la pérdida de solubilidad inicial y la mejora en las propiedades interfaciales y espumantes (Murray y Ettelaie, 2004; Damodaran 2005; Rullier y col., 2009; Rawel y Muschiolik, 1994). Con este concepto se establecería una situación de compromiso, ya que si bien es ampliamente conocida la relación de la solubilidad proteica con las propiedades espumantes, algunos sistemas refuerzan su estabilidad por el aporte de la fracción insoluble, tal como se observó para pH 2 μ 0,06.

Las espumas preparadas a partir de proteína soluble mostraron distintos valores de VLE_{10min} dependiendo del pH y μ en los que se solubilizaron las muestras, reteniendo mayor cantidad de líquido aquellas espumas preparadas a pH 2 y μ 0,06 (Figura 4.66).

El volumen de líquido retenido en las espumas preparadas con la dispersión total a pH 8 no presentó diferencia significativa con respecto al retenido por las espumas preparadas con la fracción soluble; mientras que en las espumas preparadas a pH 2 y μ 0,06 se detectó un efecto positivo de la presencia de proteína insoluble. En tanto que la fracción insoluble repercutió negativamente en el volumen de líquido retenido a los 10 min, en las espumas preparadas al mismo pH pero a μ 0,5. Esto podría deberse por un lado a la composición de la fracción de proteína insoluble así como a su cantidad.

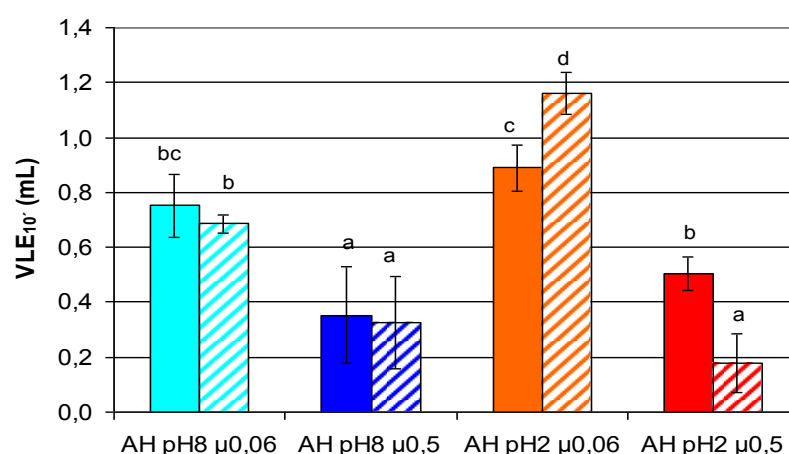


Figura 4.66. Volumen de líquido retenido en la espuma a los 10 minutos del cese del burbujeo (VLE_{10min}).

Las espumas fueron preparadas a partir de soluciones (barra llena) y de dispersiones (barra rayada) de proteína 1 g/L y en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

A baja fuerza iónica y en ambas condiciones de pH las espumas retuvieron mayor cantidad de líquido luego de 10 min de detenido el burbujeo, aunque a μ 0,06 las espumas drenan más rápidamente la mitad del volumen del líquido incorporado ($<t/2$).

4.3.3.2. Modelado de la desestabilización de la espuma

El ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico exponencial de primer orden (4.7) facilitó la interpretación del proceso de desestabilización de la espuma. Este modelo explica la desestabilización con dos procesos simultáneos, el drenado gravitacional y la difusión de gas interburbuja que conduce a la desproporción y colapso de las mismas. Esta simplificación fue asumida por otros autores (Wright y Hemmant, 1987; Yu y Damodaran, 1991), considerando a estos dos mecanismos como los principales responsables de la desestabilización de una espuma (Damodaran, 1990).

$$VLE(t) = V_g e^{\left(\frac{-t}{\tau_g}\right)} + V_{dc} e^{\left(\frac{-t}{\tau_{dc}}\right)} \quad \text{ec. 4.7}$$

En la ecuación 4.7, VLE(t) indica el volumen de líquido que permanece en la espuma al tiempo t, V_g y V_{dc} son los volúmenes de líquido remanente que serán eliminados por los procesos de drenado gravitacional, y desproporción y colapso respectivamente, mientras que τ_g y τ_{dc} son los tiempos de relajación para los mismos procesos.

El modelo permitió ajustar el parámetro de volumen de líquido drenado en cada proceso (gravitacional y desproporción-colapso) y la velocidad con que ocurre.

El líquido incorporado a las espumas se separa de ellas de diferente manera. Las espumas más inestables presentaron una tendencia a eliminar más líquido por el proceso de drenado gravitacional con respecto al drenado por desproporción y colapso (Figura 4.67).

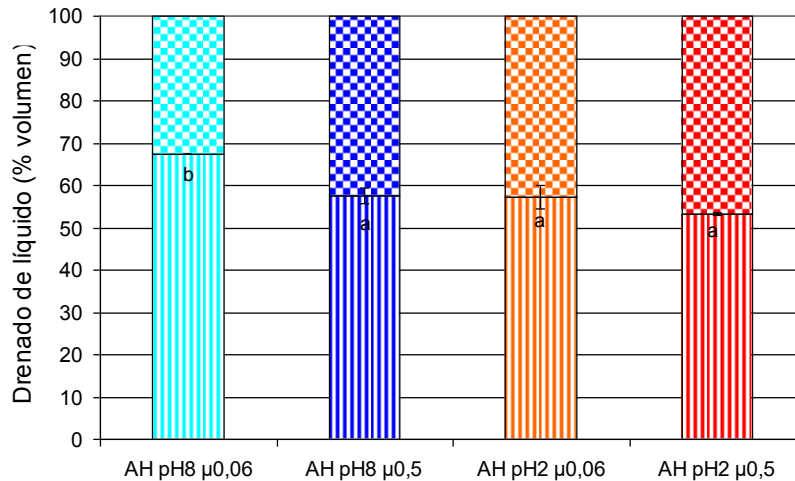


Figura 4.67. Porcentaje de líquido drenado en las espumas por el proceso gravitacional (barra rayada) y por la desproporción y colapso (barra cuadrículada). Las espumas fueron preparadas a partir de soluciones de proteína 1 g/L en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Para analizar la velocidad con la que ocurren dichos procesos se ajustaron los tiempos de relajación del modelo (τ_g y τ_{dc}) a los datos experimentales. En las ecuaciones de primer orden el factor $1/\tau$ corresponde a la constante de velocidad, con lo cual un mayor tiempo de relajación implica una menor velocidad de proceso.

Al comparar ambos procesos de drenado se observó que los tiempos de relajación del drenado gravitacional (Figura 4.68) fueron un orden de magnitud menor que los tiempos de relajación del drenado por desproporción y colapso (Figura 4.69). Esto estaría de acuerdo con lo informado por Yu y Damodaran (1991) quienes describieron que la magnitud del decaimiento de la espuma por difusión de gas entre burbujas (desproporción) es significativo solo cuando se está por debajo de un espesor crítico de la lamela alcanzado por el drenado gravitacional de líquido.

Los tiempos de relajación del proceso de drenado gravitacional fueron menores a pH 8 que a pH 2. Mientras no se detectaron diferencias entre los valores de τ_g a pH alcalino, a pH 2 se hallaron diferencias significativas, con un tiempo τ_g mayor a μ 0,5 (Figura 4.68). A menores tiempos de relajación, en consecuencia mayores velocidades de drenado, se observó una mayor proporción de líquido eliminado por este proceso (Figura 4.67), lo cual en conjunto condujo ineludiblemente a un menor valor de $t_{1/2}$ (Figura 4.65). Esta menor estabilidad a pH 8 con respecto a pH 2 coincidió con una menor elasticidad interfacial.

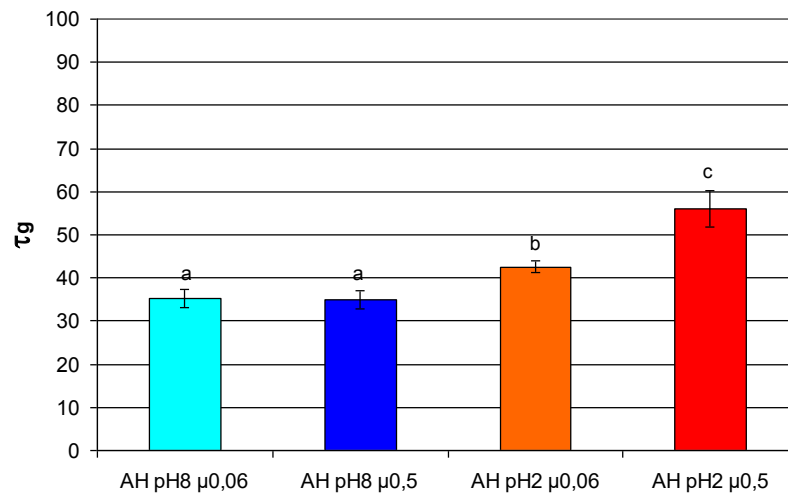


Figura 4.68. Tiempo de relajación del proceso de drenado gravitacional (τ_g (s)). Las espumas fueron preparadas a partir de soluciones de proteína 1 g/L en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

El líquido remanente en la espuma que no es eliminado por el drenado gravitacional podría participar en el proceso de drenado por desproporción y colapso. Como ya mencionamos anteriormente este es un proceso un orden de magnitud más lento que el drenado gravitacional, con lo cual la mayor proporción de líquido drenado por este proceso implicaría un drenado más lento que sólo se podrá observar en las espumas más estables.

Al analizar los tiempos de relajación de este proceso (τ_{dc}) no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las espumas preparadas a los dos pHs estudiados. Sin embargo fueron más estables las espumas preparadas con soluciones a μ 0,06. Esta menor velocidad de drenado por desproporción y colapso podría deberse a la presencia de una lamela más gruesa a baja fuerza iónica, lo cual retardaría la difusión de gas a través de la misma, y la consecuente desproporción y colapso. A baja fuerza iónica existe mayor repulsión eléctrica entre las interfaces de la lamela, característica que limitaría el adelgazamiento de la misma. Este último proceso no solo favorece la difusión de líquido entre burbujas si no que aumenta la probabilidad de formación de poros en la lamela los cuales permiten el paso libre de gas.

La menor velocidad del proceso de desproporción y colapso se relaciona bien con la mayor cantidad de líquido remanente en la espuma a los 10 minutos del cese del burbujeo, independientemente de la velocidad de drenado gravitacional.

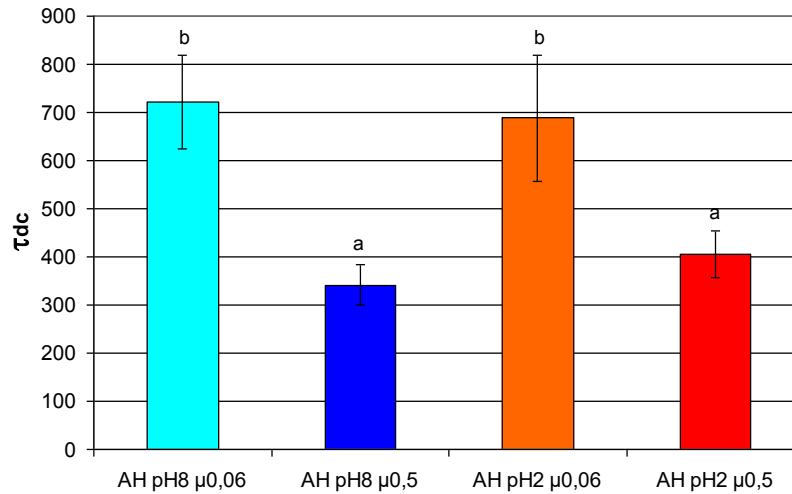


Figura 4.69. Tiempo de relajación del proceso de drenado por desproporción y colapso (τ_{dc} (s)). Las espumas fueron preparadas a partir de soluciones de proteína 1 g/L en las condiciones pH 8 μ 0,06 (cian), pH 8 μ 0,5 (azul), pH 2 μ 0,06 (naranja), pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C.

Estos resultados permiten observar distintos mecanismos de desestabilización con distintos factores interviniendo en los mismos. Teniendo mayor significancia el drenado gravitacional, por ser el que ocurre a mayor velocidad y en mayor proporción, un factor clave en el análisis de estabilidad de la espuma.

Utilizando el modelo antes mencionado se calculó la proporción de líquido drenado por los distintos procesos a $t = t_{1/2}$ (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Proporción de líquido drenado al tiempo $t_{1/2}$ por drenado gravitacional (% $V_{1/2}$ g) y por desproporción y colapso (% $V_{1/2}$ dc).

	AH pH8 μ 0,06	AH pH8 μ 0,5	AH pH2 μ 0,06	AH pH2 μ 0,5
% $V_{1/2}$ g	97	89	92	82
% $V_{1/2}$ dc	3	11	8	18

En todas las condiciones se observó que la mayor proporción de líquido fue drenada por el proceso gravitacional. Esto estaría en consonancia con un proceso más rápido, por lo tanto inicial en la desestabilización. El drenado por desproporción y colapso incrementa su importancia en las espumas más estables, donde el drenado gravitacional es más lento. La menor contribución de la desproporción y el colapso a la desestabilización de las espumas ocurre a μ 0,06.

Dado que el drenado gravitacional y la desproporción y colapso no tienen el mismo efecto sobre la distribución de tamaño de las burbujas, la intervención de cada proceso en la desestabilización de la espuma debería verse reflejada en la misma.

El drenado gravitacional relacionado con el drenado del líquido alojado en la lamela produce un acercamiento de las burbujas entre sí, sin modificar los tamaños relativos. La desproporción debida al pasaje de gas entre burbujas, genera burbujas más grandes a expensas de otras que se encogen, formando así una población más inhomogénea con una distribución de tamaño de burbujas más amplia. En cambio el colapso basado en la ruptura de la interface y formación de una única burbuja a partir de dos o más, conduce a un desplazamiento de la distribución hacia mayores tamaños de burbujas.

Durante nuestro trabajo no fue posible realizar un análisis que permita obtener parámetros a partir de las imágenes digitales de las espumas obtenidas a lo largo del tiempo. No obstante mediante la exploración visual se obtuvieron algunas conclusiones que se discutirán en el siguiente punto.

4.3.3.3. Análisis de imágenes

A diferencia de lo que ocurre con las emulsiones, en las espumas la determinación de la distribución de tamaño de burbujas es difícil ya que no es posible hacer diluciones de la muestra (Murray, 2007). Es por esto que se abordó el análisis de tamaños de burbujas por medio de imágenes de las espumas obtenidas a distintos tiempos desde la finalización del burbujeo, tiempo medio ($t_{1/2}$), 90 s y 600 s (10 min), tomando la imagen de finalización del burbujeo (t_0) como referencia.

Al analizar las imágenes de las espumas preparadas a partir de las soluciones de proteína (1 g/L) en función del tiempo (Figura 4.70) se observó que la población de burbujas de las espumas obtenidas a alta fuerza iónica (μ 0,5) fue menos homogénea que las preparadas con soluciones proteicas a baja fuerza iónica (μ 0,06) independientemente del pH. Esto estaría de acuerdo con la mayor proporción de líquido drenado a causa de la desproporción y el colapso en las condiciones de alta fuerza iónica discutido precedentemente. Las imágenes a los 600 s desde la finalización del burbujeo muestran burbujas completamente poliédricas y de diferentes tamaños.

Como hemos visto las espumas preparadas a baja fuerza iónica retuvieron mayor cantidad de líquido 10 minutos después del cese del burbujeo (VLE_{10min}) (Figura 4.66). Este resultado podría explicarse si la relación área/volumen de la burbuja aumenta, es decir si se observan burbujas más

pequeñas. La presencia de burbujas más chicas impactaría en la cantidad de líquido en la lamela, que sería mayor, o en una lamela más gruesa debido a la repulsión electrostática de la proteína anclada en las dos interfaces. El análisis de las imágenes (Figura 4.70) permite observar una distribución de burbujas de pequeño tamaño en la espuma preparada con la solución proteica a pH 2 y μ 0,06. No obstante en el resto de las condiciones no resulta fácil arribar a una conclusión. Queda como perspectiva futura realizar un análisis matemático/computacional de las imágenes de las espumas que permita obtener parámetros cuantitativos que describan la distribución de tamaño de burbujas.

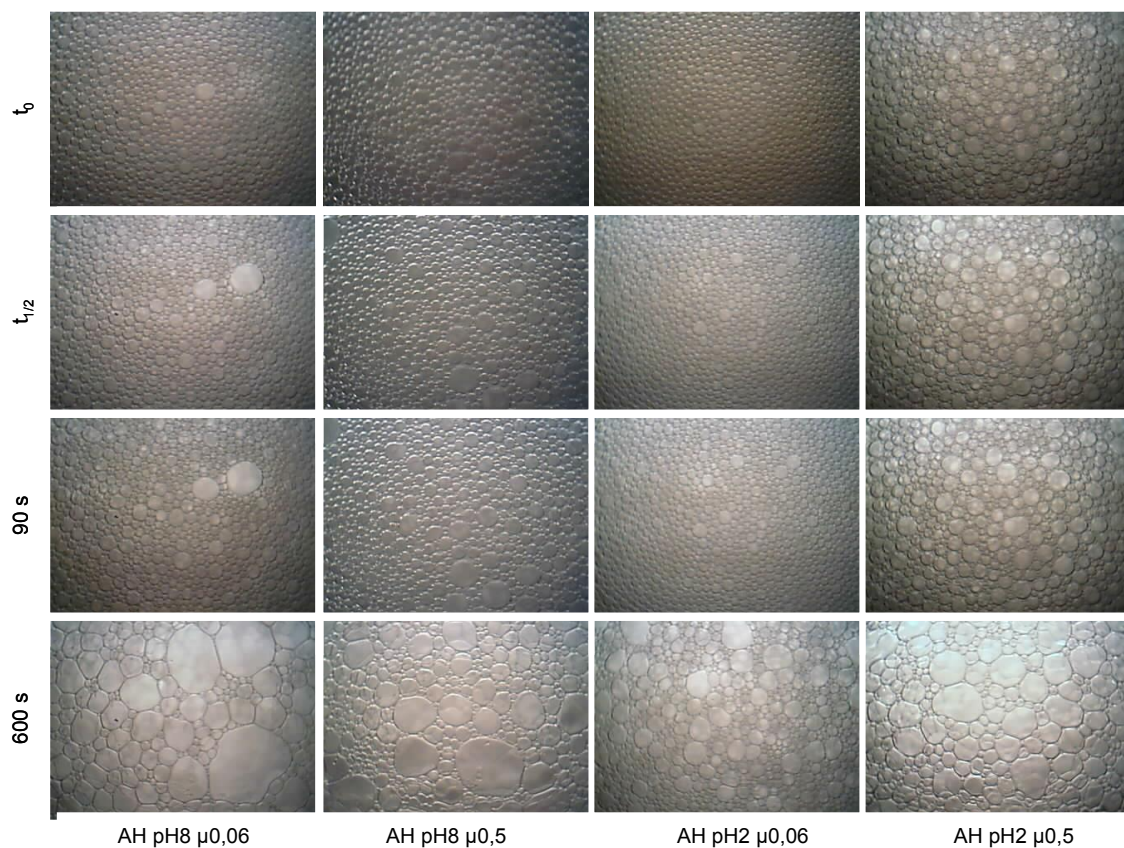


Figura 4.70. Imágenes de las espumas tomadas a t_0 (cese del burbujeo), $t_{1/2}$ (tiempo de drenado de la mitad del líquido incorporado en la espuma), 90 s y 600 s. Las espumas fueron preparadas a partir de soluciones de proteína 1 g/L en las condiciones pH 8 y pH 2, μ 0,06 y μ 0,5 a 25 °C.

Las imágenes de las espumas obtenidas con dispersiones de proteína 1 g/L muestran una tendencia similar a la hallada en las espumas preparadas solo con la fracción soluble (Figura 4.71).

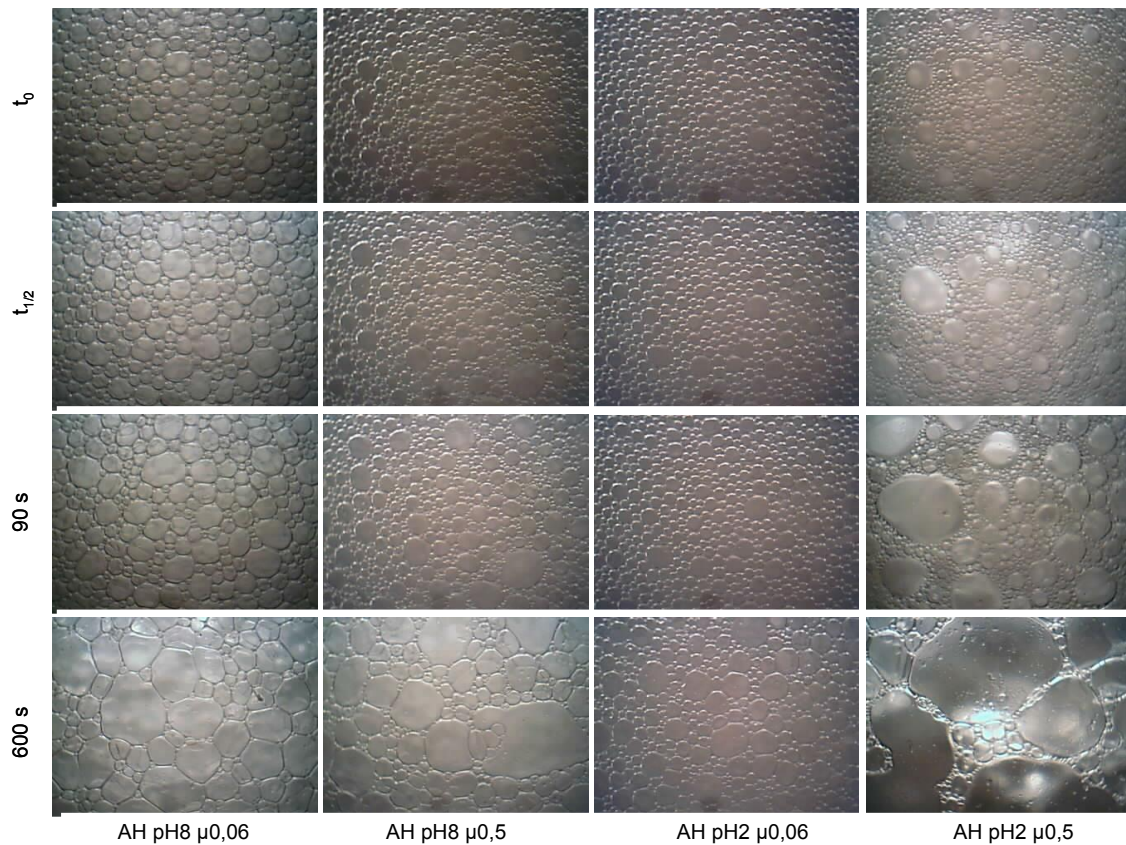


Figura 4.71. Imágenes de las espumas tomadas a t_0 (cese del burbujeo), $t_{1/2}$ (tiempo de drenado de la mitad del líquido incorporado en la espuma), 90 s y 600 s. Las espumas fueron preparadas a partir de dispersiones 1 g/L en las condiciones pH 8 y pH 2, μ 0,06 y μ 0,5 a 25 °C.

4.3.3.4. Estabilidad de la espuma en la condición pH 2 μ 0,5 a distintas concentraciones. Efecto de la fracción insoluble.

Como fuera previamente presentado para las propiedades de formación de las espumas, se analizó el efecto de la concentración sobre la estabilidad de la espuma preparada en la condición AH pH 2 μ 0,5, que resultó la condición en la cual las soluciones presentaron buenas propiedades espumantes, interfaciales y reológicas.

Se utilizaron las mismas concentraciones que las indicadas previamente (punto 4.3.1.2): 0,25, 1 y 4 g/L, para la fracción soluble y 1 y 4 g/L para la dispersión total. En los ensayos anteriores se compararon las espumas preparadas a partir de igual concentración de proteína soluble y proteína total (proteína soluble e insoluble), lo cual equivaldría a un reemplazo parcial de proteína soluble por proteína insoluble. En esos ensayos se observó una menor estabilidad de la espuma preparada a partir de la dispersión total. Con el fin de dilucidar esta cuestión, y teniendo en cuenta que la

solubilidad de las proteínas a pH ácido y alta fuerza iónica es aproximadamente 25 %, se eligió incrementar la concentración anterior 4 veces tal como se indicó previamente (punto 4.3.1.2).

En la Figura 4.72 se puede observar que el $t_{1/2}$ se incrementa a medida que aumenta la concentración de proteína soluble (barras llenas). Al comparar la condición 0,25 g/L de proteína soluble, con 1 g/L de dispersión total (ambas contienen 0,25 g/L de proteína soluble), y 1 g/L de proteína soluble con 4 g/L de la dispersión total (ambas contienen 1 g/L de proteína soluble) no se observaron diferencias significativas en los valores de $t_{1/2}$.

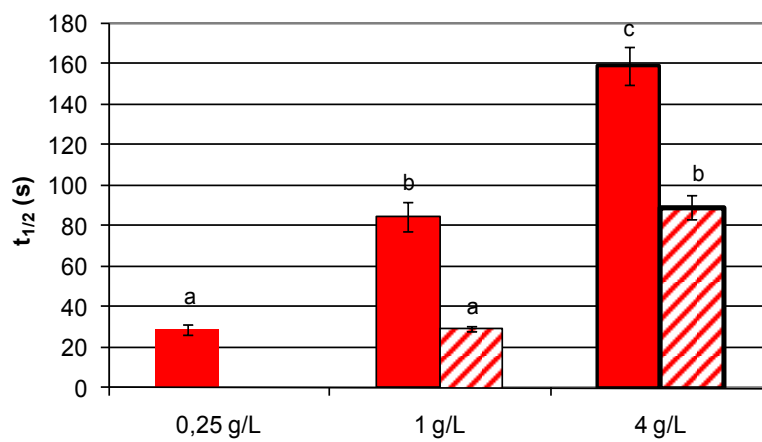


Figura 4.72. Tiempo medio ($t_{1/2}$ (s)) de la espuma en la condición pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

Esto permite concluir que la fracción insoluble no contribuye a la estabilidad de la espuma evaluada por medio de $t_{1/2}$, pero tampoco la empeora.

La misma tendencia fue observada para el parámetro VLE_{10min} . (Figura 4.73). Se obtuvieron espumas que retuvieron mayor cantidad de líquido con el aumento de la concentración proteica sin que se pueda inferir una contribución neta de la fracción insoluble al parámetro VLE_{10min} .

A pesar de que no pudimos observar un efecto significativo neto en los parámetros estudiados al incluir la fracción insoluble, no podemos descartar que estén sucediendo varios fenómenos que produzcan efectos contrapuestos de modo que no se observen cambios definidos en la estabilidad.

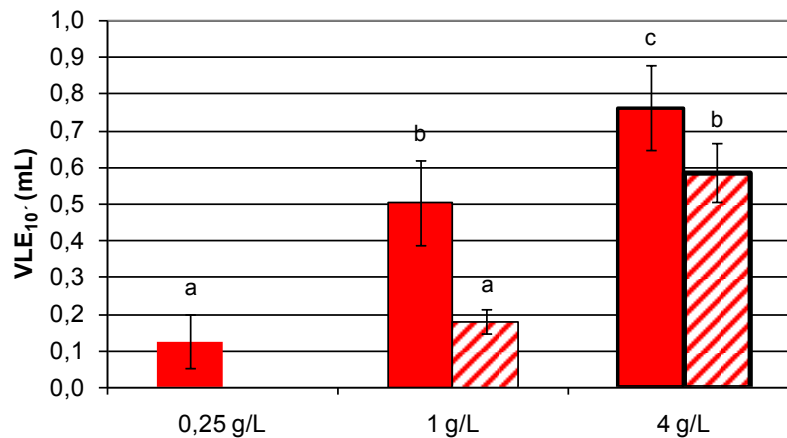


Figura 4.73. Volumen de líquido remanente en la espuma a los 10 minutos del cese del burbujeo (VLE_{10mn}) en la condición $pH\ 2\ \mu\ 0,5$ (rojo) a $25\ ^\circ C$ a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

Al analizar la proporción de líquido drenado por los distintos procesos, mediante la aplicación del modelo de desestabilización bifásico utilizado previamente (Figura 4.74), se observó un aumento de la proporción de líquido drenado por desproporción y colapso al aumentar la concentración de proteína. Como ya hemos mencionado, el drenado por desproporción y colapso, es un proceso más lento que el drenado gravitacional, y toma relevancia después de éste.

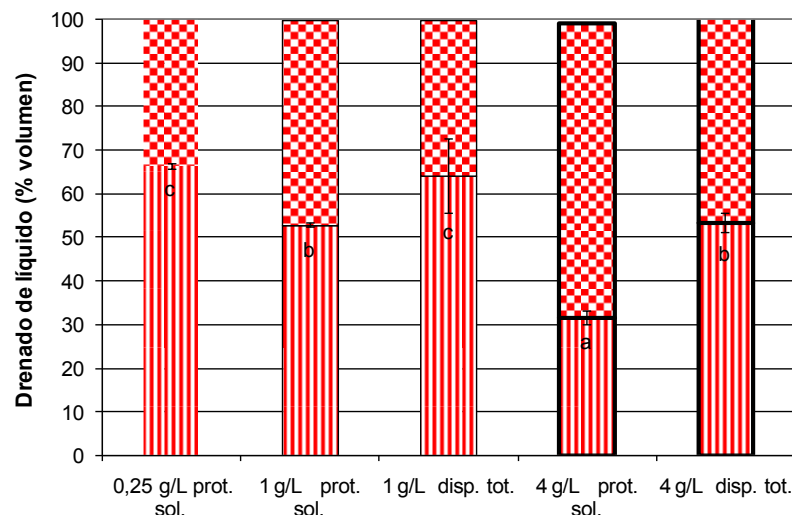


Figura 4.74. Porcentaje de líquido drenado en las espumas por el proceso gravitacional (barra rayada) y por la desproporción y colapso (barra cuadrícula). Las espumas se prepararon en la condición $pH\ 2\ \mu\ 0,5$ (rojo) a $25\ ^\circ C$ en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L de proteína soluble y de dispersión total. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

La adición de la fracción insoluble sobre la solución de espumado no modificó la proporción de líquido drenado por cada proceso, sosteniendo la hipótesis de que la fracción insoluble no ejerce ningún efecto en las propiedades de espumado.

Los tiempos de relajación de correspondientes al drenado gravitacional (Figura 4.75 A) aumentaron con la concentración de proteína hasta 4 g/L; mientras que en el caso de drenado por desproporción y colapso los tiempos de relajación se incrementaron hasta 1g/L de proteína soluble. A 4 g/L no se observó un cambio significativo respecto a la condición anterior (Figura 4.75 B). Los tiempos de relajación de los procesos de desestabilización modelados, tampoco reflejaron ningún efecto de la fracción de proteína insoluble sobre el comportamiento de la solución de espumado.

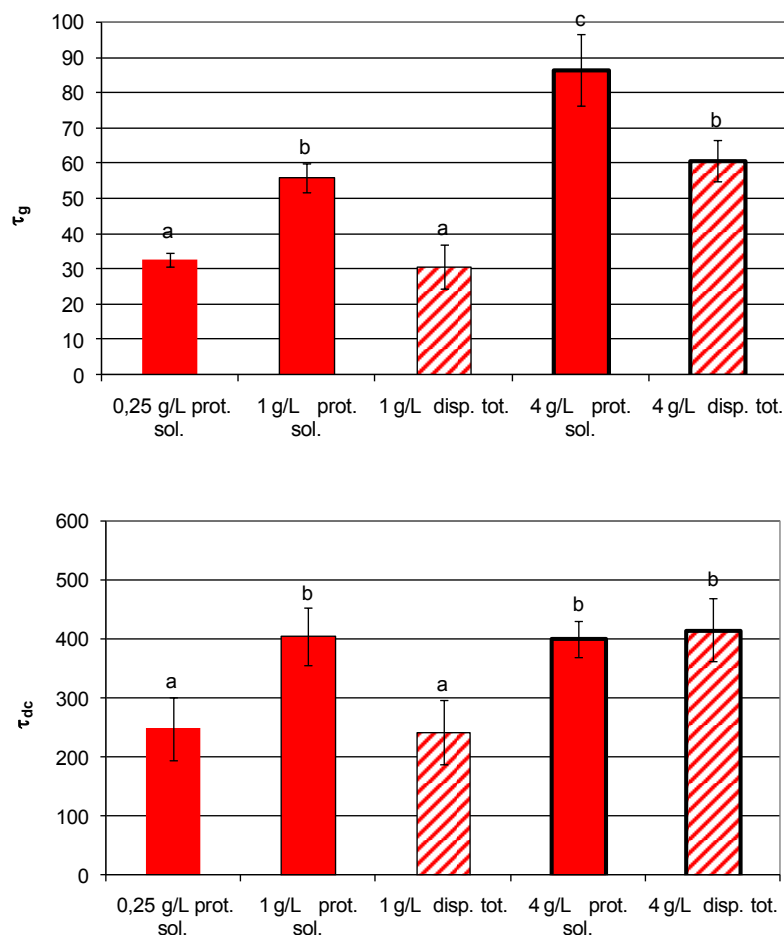
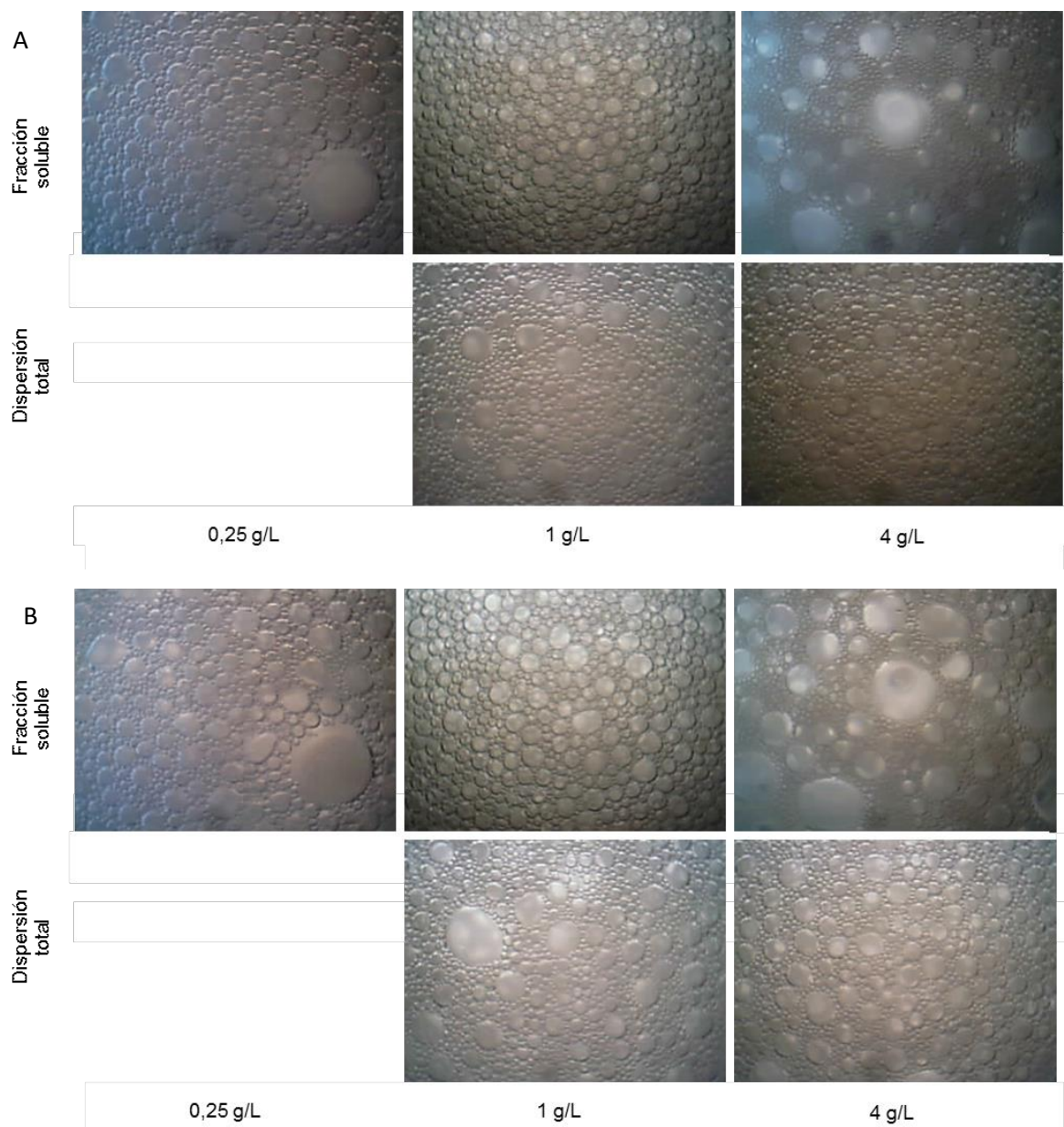


Figura 4.75. Tiempo de relajación del proceso A) de drenado gravitacional (τ_g (s)) y B) de desproporción y colapso (τ_{dc} (s)). Las espumas se prepararon en la condición pH 2 μ 0,5 (rojo) a 25 °C a partir de la solución de proteína (barra llena) y de la dispersión total (barra rayada) en las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L. El espesor del borde de las barras se incrementó en función de la concentración de proteínas de la solución.

También se tomaron imágenes digitales de estas espumas. Como fuera previamente mencionado, las espumas formadas con soluciones más concentradas resultaron ser las menos homogéneas al momento de finalizar el burbujeo (t_0). Cuando comparamos las imágenes de las espumas a los distintos tiempos se hallaron diferencias entre las obtenidas con la solución y con la dispersión de 4 g/L. Las imágenes de las espumas preparadas con la dispersión proteica más concentrada, presentaron mayor similitud con la espuma preparada con 1 g/L de proteína soluble que con la de 4 g/L de proteína soluble, reforzando la hipótesis de que no hay efecto de la fracción insoluble, tal como se observó anteriormente por métodos físicos.



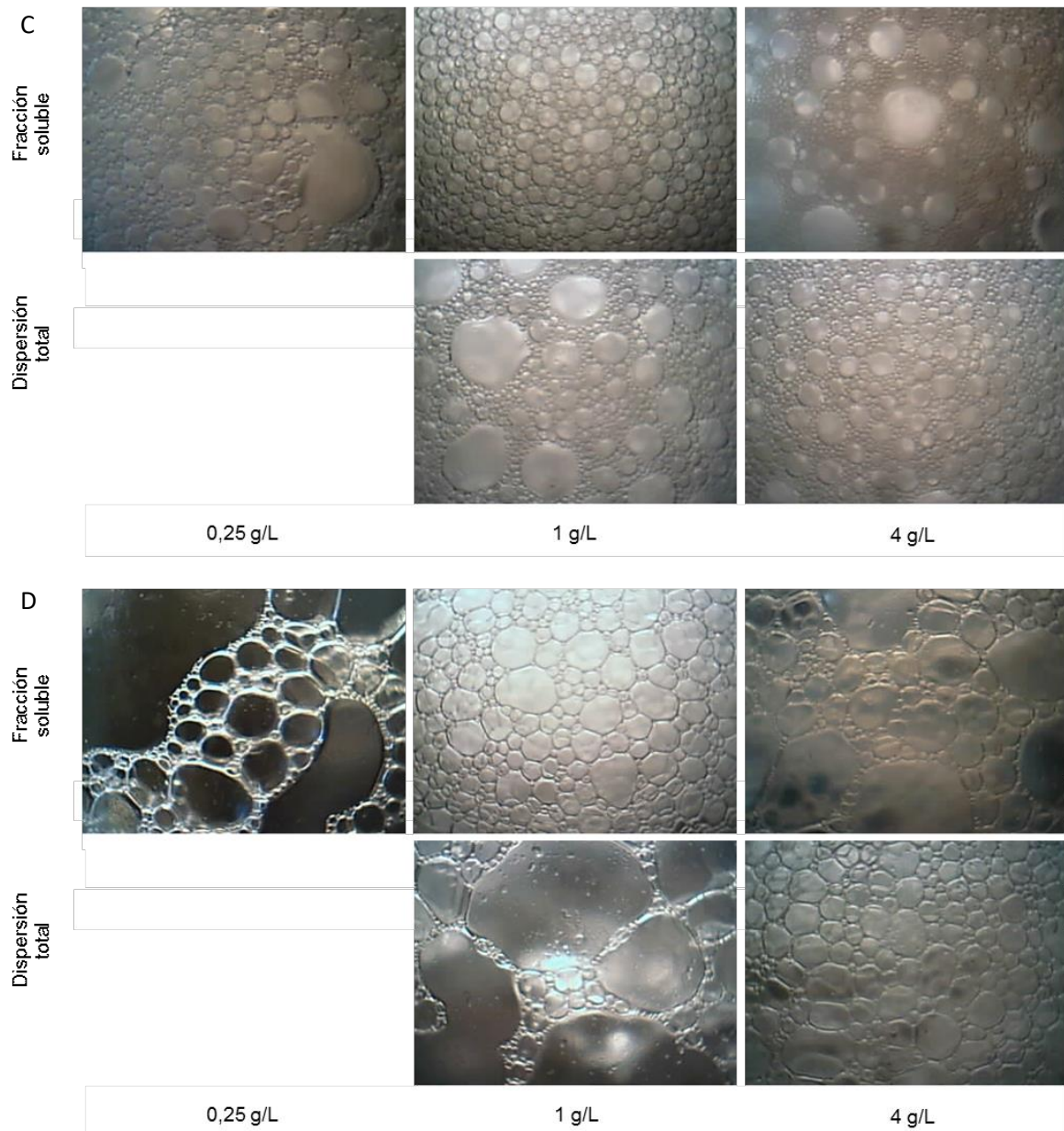


Figura 4.76. Imágenes de las espumas preparadas a partir de la fracción soluble y de la dispersión total en la condición pH 2 μ 0,5 para las concentraciones 0,25 g/L, 1 g/L y 4 g/L a 25 °C. Las imágenes se tomaron A) al finalizar el burbujeo, B) $t_{1/2}$, C) 90 s y D) 600 s.

4.3.4. Reología interfacial y su relación con la estabilidad de la espuma.

Dentro de los diversos factores que caracterizan la interface son varios los que influyen sobre las propiedades espumantes. Se conoce que son distintos los mecanismos que intervienen en el proceso de formación y en el de desestabilización, con lo cual son diferentes características de la interface las que interesan analizar en cada caso.

En el punto 4.3.2 se evaluó la relación entre la capacidad de formación de espuma y la migración de la proteína a la interface. La elasticidad de la película de proteína adsorbida sobre la superficie de las burbujas ha sido descrita como una de las características de la interface con mayor impacto en la estabilidad de la espuma (Langevin, 1999; Wilde, 2000; Bhattacharyya y col., 2000; Malysa y Lunkenheimer, 2008). El proceso de desestabilización, en términos globales, está relacionado con la resistencia de la película a deformarse en el tiempo. Distintos estudios han demostrado la existencia de una relación entre la reología de las interfaces y la estabilidad de las espumas obtenidas. Sonin y col. (1994) demostraron que las interfaces más elásticas se corresponden a espumas con menor velocidad de drenado por efecto del borde de Plateau. En tanto que Gandolfo y Rosano (1997) evidenciaron una disminución en el transporte de gas lo que conduce a un descenso del proceso de desproporción y Kim y col. (2005) una reducción del colapso con el aumento de la viscoelasticidad interfacial. En el último tiempo algunos autores han reconsiderado la utilidad de la reología interfacial para predecir la estabilidad de la espuma, mostrando que este estudio no es suficiente para explicar por completo el fenómeno de la estabilidad, y que es necesario contemplar la influencia de otros parámetros para realizar una buena predicción (Wierenga y col., 2009). Martin y col. (2002) mostraron estudios sobre reología interfacial y propiedades espumantes de β -caseína y glicinina de soja con tratamiento ácido, encontrando distintas características en la película interfacial mientras que las espumas obtenidas presentaban estabilidad similar. Así también Ipsen y col. (2001) mostraron que aunque la estabilidad de las espumas preparadas con β -lactoglobulina hidrolizada aumenta con el aumento de la hidrólisis la reología interfacial empeora.

En nuestros ensayos fue posible observar módulos viscoelásticos mayores a pH 2 que a pH 8, en concordancia con mayor tiempo de relajación del drenado gravitacional y espumas de mayor estabilidad. Esta relación entre el módulo elástico y la estabilidad también ha sido descrita para β -caseína (Valderrama, 2005), β -lactoglobulina (Rullier y col., 2009) y seroalbúmina bovina (Yu y Damodaran, 1991), entre otras proteínas.

4.4. Propiedades superficiales y espumantes de las proteínas modificadas por tratamiento térmico e hidrólisis

Con el objetivo de mejorar las propiedades espumantes de las proteínas de amaranto se recurrió a la modificación de las mismas por tratamiento térmico e hidrólisis enzimática.

Algunos autores han demostrado mejoras en las propiedades espumantes por ambos tratamientos para otras proteínas. Tratamientos térmicos mejoraron las propiedades espumantes de las proteínas de suero lácteo (Zhu y Damodaran, 1994) y de clara de huevo (Nicorescu y col., 2011), mientras que por hidrólisis se obtuvieron mejoras en el desempeño funcional de proteínas de soja (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Molina Ortiz y Wagner, 2002). En este último ejemplo la funcionalidad mejoró principalmente por el incremento de la solubilidad, propiedad relacionada directamente con la capacidad de formación de espumas. Condés y col. (2009) demostraron un incremento en la densidad y estabilidad de espumas formadas a pH 8,5 a partir de aislados de amaranto hidrolizados con tripsina. Son varios los mecanismos de hidrólisis y enzimas estudiados con resultados promisorios (Govindaraju y Srinivas, 2006), entre ellas se encuentran la alcalasa y la tripsina, las cuales fueron seleccionadas en nuestro trabajo para realizar el proceso de hidrólisis.

4.4.1. Caracterización estructural

4.4.1.1. Calorimetría diferencial de barrido

En la Tabla 4.6 se presentan los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. Tanto en el aislado calentado (HA Q) como en los aislados hidrolizados con alcalasa (1,7 AHH y 9,5 AHH) y con tripsina (2,2 THH) se observó la desaparición del primer pico de desnaturalización, cercano a 71 °C, observado en el aislado. Esto era de esperar ya que, tanto el aislado térmicamente modificado como los hidrolizados, en los que la reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento, se trataron a 85 °C durante 10 min. En estas condiciones la fracción proteica cuya T_d es 71 °C desnaturalizó de manera irreversible.

El segundo pico observado en el aislado se encuentra en estas muestras desplazado hacia mayores temperaturas debido al efecto protector que las sales, que se encuentran en mayor presencia en las muestras tratadas (cenizas 28,2 %), ejercen sobre la conformación de las proteínas. Además la entalpía detectada en estas muestras resultó mayor a la entalpía del proceso en el HA.

Tabla 4.6. Análisis térmico de las muestras. Cantidad de endotermas, temperatura de desnaturalización (Td, °C) y entalpía de desnaturalización (ΔH , J/g) de dispersiones proteicas preparadas al 20 % p/v en buffer fosfato 35 mM pH 7,5 y μ 0,5.

Muestra	Endoterma	Td (°C)	ΔH (J/g)
HA	1	71 \pm 1	1,6 \pm 0,2
	2	98 \pm 2	6,4 \pm 0,2
HA Q	1	-	-
	2	105 \pm 2	8,2 \pm 0,2
1,7 AHH	1	-	-
	2	105 \pm 2	9,7 \pm 0,3
9,5 AHH	1	-	-
	2	104 \pm 2	12,2 \pm 0,2
2,2 THH	1	-	-
	2	102 \pm 1	11,5 \pm 0,4

4.4.1.2. Análisis de la composición polipeptídica

Se analizó la composición polipeptídica de las muestras mediante electroforesis. En todos los casos se realizaron electroforesis en condiciones nativa, desnaturalizante en presencia de SDS y desnaturalizante en condiciones reductoras por tratamiento previo con 2-ME.

(1) Análisis de la composición polipeptídica en condición nativa

Tal como se ha mencionado anteriormente mediante electroforesis nativa, los polipéptidos se separan por su relación carga/masa manteniendo la estructura terciaria y secundaria. Las muestras tratadas se analizaron tomando como referencia HA.

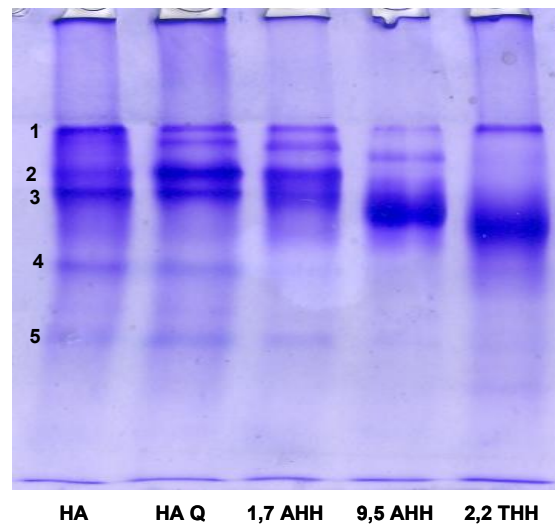


Figura 4.77. Electroforesis nativa de las fracciones solubles a pH 7,8 μ 0,1

Los perfiles electroforéticos de las muestras tratadas difieren en menor o mayor medida del obtenido para el aislado. HA se separa en cinco bandas de diferente intensidad, indicadas con números en la Figura 4.77. En HA Q se observó la aparición de una nueva banda entre la 1 y la 2, y el aumento de la intensidad de la banda 2 con respecto a la banda 3. En los hidrolizados con alcalasa (1,7 AHH y 9,5 AHH) se observó la presencia de la banda entre la 1 y la 2, y un aumento de la movilidad de las bandas incrementado con el grado de hidrólisis. El hidrolizado con tripsina (2,2 THH) mostró la banda 1, y luego una única banda de mayor movilidad. El aumento en la movilidad de las bandas de los hidrolizados podría deberse a la disminución del tamaño de las proteínas y/o polipéptidos que la componen, a un incremento de la carga neta negativa o a ambos factores combinados. Las bandas 4 y 5 indicadas en HA se conservan en HA Q, pero se tornan menos definidas para el 1,7 AHH y casi ausentes en el 9,5 AHH. El hidrolizado obtenido con tripsina presenta bandas de similar movilidad y una más móvil aún.

(2) Análisis de la composición polipeptídica mediante electroforesis bidimensional

Para profundizar en el conocimiento de las muestras modificadas se realizaron electroforesis bidimensionales, empleando PAGE en la primera dimensión y SDS-PAGE (A) o SDS-PAGE en condiciones reductoras (B).

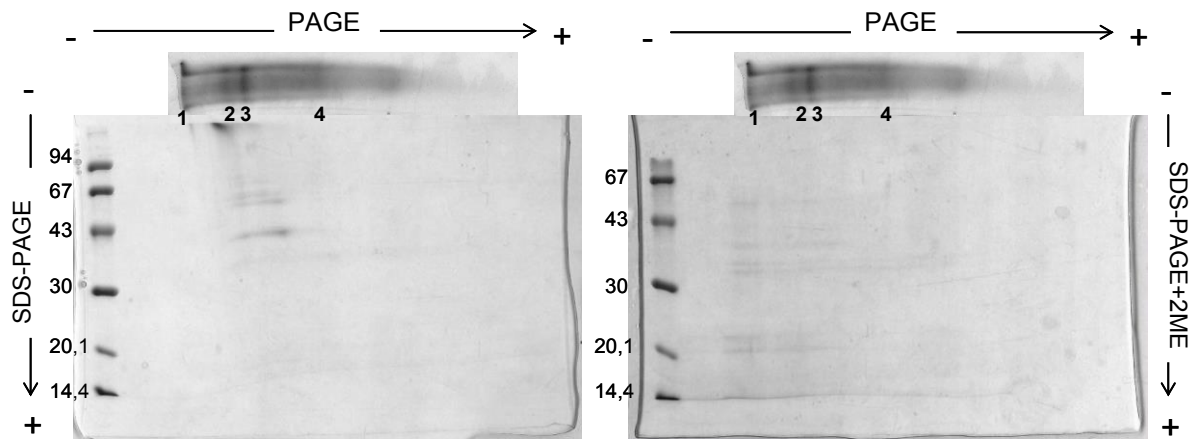
-HA Q

Figura 4.78. Electroforesis bidimensional del aislado calentado (HA Q) a pH 7,5 μ 0,5. Primera dimensión nativa, segunda dimensión A) desnaturalizante, B) desnaturalizante reductora.

En este ensayo la electroforesis de la primera dimensión del HA Q en condición nativa reveló algunas bandas menos que las descritas en la Figura 4.77. Esto último podría deberse a una baja carga proteica o a cierta agregación ya que, aunque con muy baja intensidad, se observan varios polipéptidos en la segunda dimensión cuando se redujeron los puentes disulfuro (Figura 4.78-B). De modo similar a la descripción realizada para HA (punto 4.1.2.1) la banda de menor movilidad (1) correspondería a agregados formados por las globulinas de reserva y las dos bandas siguientes (bandas 2 y 3) corresponderían a las globulinas P, 11S y 7S, ya que en la segunda dimensión (Figura 4.78-A) se observaron polipéptidos de peso molecular 52-56 kDa (dímeros A-B), 32-34 kDa (péptido tipo A), 20-22 kDa (péptido tipo B) y 56 kDa (globulina P) (Martínez y col., 1997). En presencia de 2-ME (Figura 4.78-B) se detectó una disminución en la intensidad de la banda de 52-56 kDa y un incremento en las correspondientes a 20-22 kDa y 32-34 kDa, lo cual sugiere la rotura de los enlaces disulfuro intercatenarios de la subunidad A-B.

-1,7 AHH

El aislado hidrolizado con alcalasa de 1,7 % de grado de hidrólisis presentó en la segunda dimensión los péptidos de 52-56 kDa provenientes de las bandas 2, 3 y 4 (Figura 4.79-A). A causa de la baja cantidad de proteína presente en la banda 1, no se observan spots en la segunda dimensión. En la banda 4 se observó la presencia de un péptido de 43 kDa que podría corresponder a la proteína 7S.

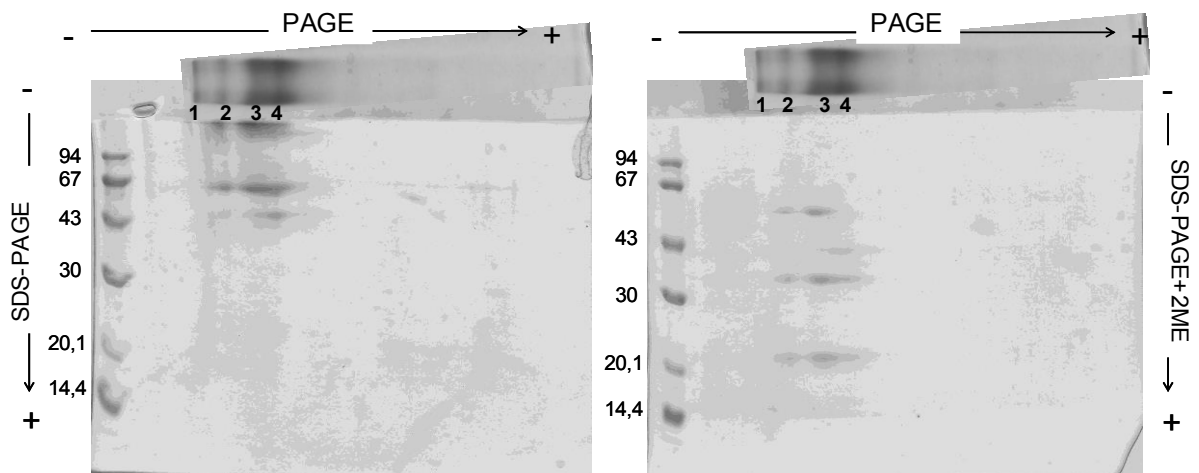


Figura 4.79. Electroforesis bidimensional del hidrolizado con alcalasa grado de hidrólisis 1,7 % (1,7 AHH) a pH 7,5 μ 0,5. Primer dimensión nativa, segunda dimensión A) desnaturalizante, B) desnaturalizante reductora.

En la segunda dimensión desnaturalizante reductora (Figura 4.79-B) se observan varios polipéptidos que podrían corresponder a A y B pertenecientes a la globulina 11S, 43 kDa de 7S y de 52-54 kDa de Gb-P, lo que sugiere que en la muestra hay globulinas intactas a pesar de haber realizado el tratamiento enzimático.

-9,5 AHH

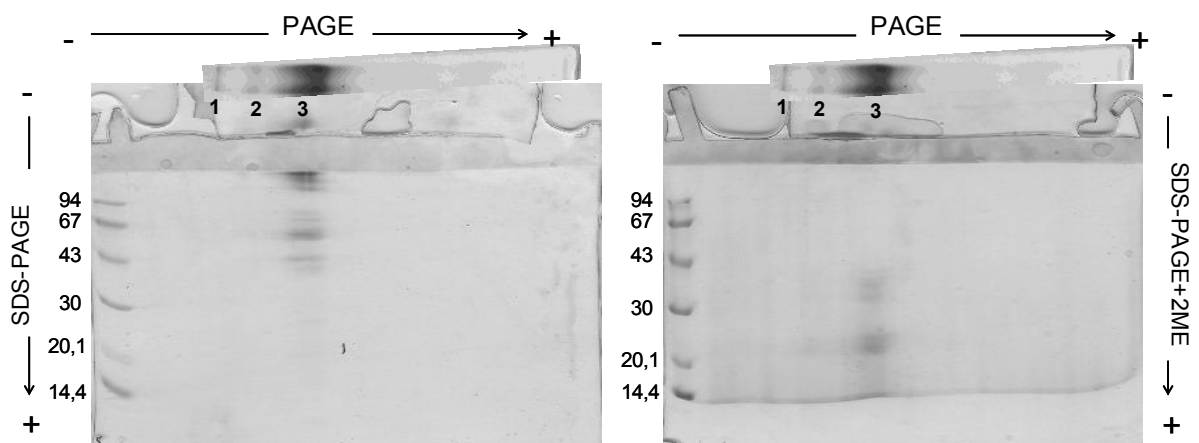


Figura 4.80. Electroforesis bidimensional del hidrolizado con alcalasa grado de hidrólisis 9,5 % (9,5 AHH) a pH 7,5 μ 0,5. Primer dimensión nativa, segunda dimensión A) desnaturalizante, B) desnaturalizante reductora.

En la segunda dimensión que se presenta en la Figura 4.80 se observa que la banda 3 está constituida por polipéptidos de masa molecular inferior a 43 kDa, la mayoría de los cuales se

encuentran unidos a otros por enlaces disulfuro. Cabe mencionar que no se observan los polipéptidos de masa molecular 56 kDa correspondiente a la globulina P, ni el de 43 kDa integrante de la globulina 7S, que han resultado hidrolizados.

-2,2 THH

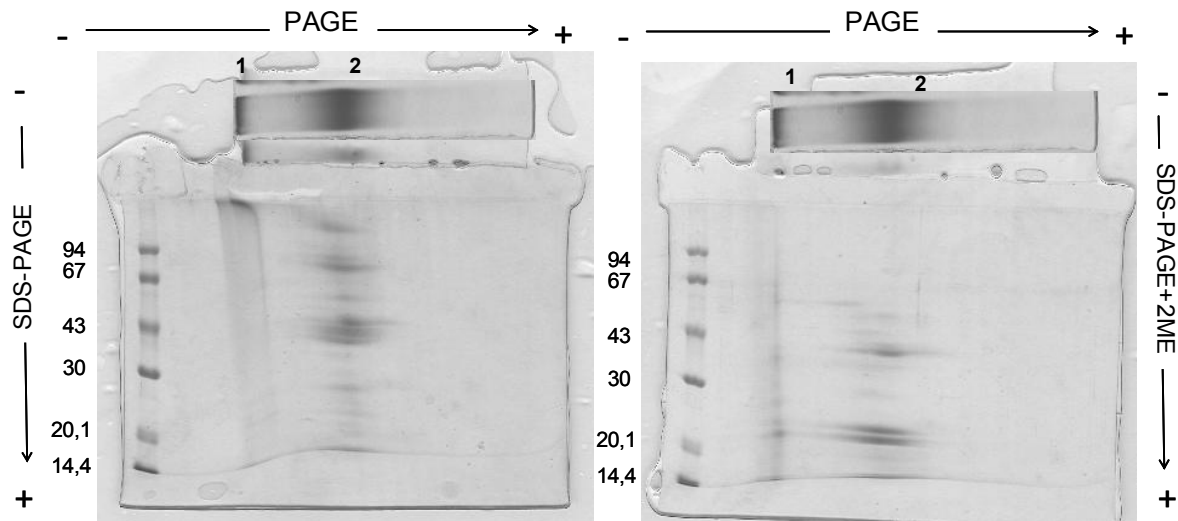


Figura 4.81. Electroforesis bidimensional del hidrolizado con tripsina grado de hidrólisis 2,2 % (2,2 THH) a pH 7,5 μ 0,5. Primer dimensión nativa, segunda dimensión A) desnaturizante, B) desnaturizante reductora.

Las proteínas de este hidrolizado se ubican en la primera dimensión formando una única banda ancha. Sin diferenciarse totalmente en su movilidad, en la segunda dimensión podemos apreciar que está integrada por diferentes polipéptidos y describir tres zonas solapadas entre sí. La parte más móvil contiene los polipéptidos de 52, 43, y los de alrededor de 20 kDa presentes en distinta cantidad, revelándose más intensamente los péptidos más livianos. La zona intermedia presentó un producto de hidrólisis de masa molecular entre 52 y 43 kDa y también de los de masa molecular 43, 30, y los cercanos a 20 kDa. En la zona de menor movilidad se observó principalmente el polipéptido de 54 kDa. Estos resultados demuestran que en el hidrolizado coexisten péptidos de amaranto intactos con otros resultantes de la hidrólisis.

4.4.2. Propiedades superficiales

Se analizó el efecto del tratamiento térmico e hidrolítico de las proteínas sobre las propiedades superficiales en la interface aire-agua. Los ensayos se realizaron sobre las proteínas modificadas térmicamente (HA Q) y por tratamiento de hidrólisis con alcalasa (1,7 AHH y 9,5 AHH) y tripsina (2,2 THH) solubles a pH 2 y pH 8, μ 0,5, 25 °C.

4.4.2.1. Adsorción y reordenamiento en la interface aire-agua

La evaluación dinámica de la tensión superficial permitió el estudio de la adsorción y reordenamiento de la proteína en la interface. De todas las etapas del proceso de adsorción se estudió la adsorción propiamente dicha (penetración y anclaje) y el reordenamiento. Como se utilizaron las mismas concentraciones que las empleadas para evaluar las propiedades espumantes (1 g/L), el proceso no está limitado por la difusión, razón por la cual no puede estudiarse esta etapa.

Como fuera realizado para el aislado proteico nativo (HA), los datos experimentales se ajustaron al modelo matemático bifásico exponencial de primer orden (Panizzolo, 2005), descripto previamente (Punto 3.3.1.3).

Adsorción

En la Tabla 4.7 se presentan los valores de la constante de velocidad (k_a) y de la amplitud del proceso (γ_a) para dos de las condiciones estudiadas (pH 2 y 8, μ 0,5). El tratamiento térmico y el enzimático provocaron un incremento en el valor de k_a a pH 8, respecto al aislado control, lo cual podría ser atribuido al desplegamiento (Damodaran y Song, 1988; Davis y col., 2005) y al aumento de la flexibilidad proteica provocado por dichos tratamientos (Graham y Phillips, 1979). Para el caso de los hidrolizados, el tratamiento enzimático podría favorecer la disminución del tamaño medio de las partículas y el consecuente aumento de la entropía interfacial, lo que favorecería la penetración y anclaje de la proteína a la interface (Miller, 2000). A pH 2 no se observó ningún cambio significativo respecto al valor de HA.

Tabla 4.7. Constante de velocidad (k_a) y amplitud del proceso de adsorción (γ_a) correspondientes al modelado de los datos experimentales de HA Q, 1,7 AHH, 9,6 AHH, 2,2 THH y HA a pH 2 y pH 8, μ 0,5, 25 °C.

	k_a		γ_a	
	pH 8	pH 2	pH 8	pH 2
HA	0,161 ± 0,021 ^a	0,359 ± 0,028 ^c	17,1 ± 1,3 ^a	17,3 ± 1,6 ^a
HA Q	0,302 ± 0,018 ^{bc}	0,297 ± 0,024 ^{bc}	18,8 ± 1,2 ^a	17,0 ± 1,5 ^a
1,7 AHH	0,287 ± 0,034 ^{bc}	0,363 ± 0,026 ^c	17,0 ± 2,0 ^a	19,4 ± 1,7 ^a
9,5 AHH	0,211 ± 0,026 ^a	0,316 ± 0,037 ^{bc}	16,0 ± 1,4 ^a	17,5 ± 2,2 ^a
2,2 THH	0,262 ± 0,028 ^b	0,363 ± 0,030 ^c	19,3 ± 1,8 ^a	18,2 ± 1,8 ^a

La amplitud del proceso (γ_a) no se modificó significativamente con los tratamientos realizados a ninguno de los pHs ensayados.

Reordenamiento

La velocidad de reordenamiento (k_r , Tabla 4.8) se vio incrementada, a ambos pHs, con el tratamiento térmico y en menor grado con la hidrólisis enzimática en bajo grado. La amplitud del proceso de reordenamiento disminuyó, solo a pH 8, para 1,7 AHH sin observarse cambios significativos para el resto de las condiciones de ensayo. Sorpresivamente se detectó un aumento de la amplitud de reordenamiento para 9,5 AHH a pH 2, lo cual podría ser atribuido a un proceso de establecimiento de interacciones intermoleculares en la interface. En el proceso de reordenamiento en la interface se observa un efecto más significativo del pH del medio en el que la proteína se ha solubilizado que del tratamiento al que se sometieron las muestras (calentamiento, HA Q o hidrólisis con alcalasa o tripsina).

Tabla 4.8. Constante de velocidad (k_r) y amplitud del proceso de reordenamiento (γ_r) correspondientes al modelado de los datos experimentales de HA Q, 1,7 AHH, 9,6 AHH, 2,2 THH y HA a pH 2 y pH 8, μ 0,5, 25 °C.

	k_r		γ_r	
	pH 8	pH 2	pH 8	pH 2
HA	0,161 \pm 0,021 ^a	0,359 \pm 0,028 ^c	8,10 \pm 0,68 ^{ed}	3,71 \pm 0,16 ^a
HA Q	0,302 \pm 0,018 ^{bc}	0,297 \pm 0,024 ^{bc}	7,24 \pm 0,20 ^{cd}	4,34 \pm 0,22 ^a
1,7 AHH	0,287 \pm 0,034 ^{bc}	0,363 \pm 0,026 ^c	6,68 \pm 0,37 ^c	3,84 \pm 0,18 ^a
9,5 AHH	0,211 \pm 0,026 ^a	0,316 \pm 0,037 ^{bc}	8,73 \pm 0,53 ^e	5,60 \pm 0,33 ^b
2,2 THH	0,262 \pm 0,028 ^b	0,363 \pm 0,030 ^c	7,62 \pm 0,41 ^{cd}	4,18 \pm 0,19 ^a

El desplegamiento y aumento de la flexibilidad de la estructura proteica, inducidos por el pH de solubilización de la muestra, modificaron la cinética de adsorción de la proteína a la interface. El tratamiento térmico y el bajo grado de hidrólisis permitieron, a pH 8, lograr un mayor valor de presión superficial a los 3 segundos de formada la interface respecto al asilado proteico sin tratar. A pH 2 no se observó este comportamiento (Tabla 4.9).

El menor efecto de las modificaciones proteicas sobre las propiedades interfaciales a pH 2, con respecto a pH 8, podrían estar relacionadas con la activación de la proteasa aspártica presente en

los aislados de amaranto y su acción hidrolítica, la cual podría apantallar el efecto del tratamiento previo, tanto térmico como hidrolítico junto con el efecto que el pH ejerce sobre sobre la conformación de las proteínas.

Tabla 4.9. Valores de presión superficial a los 3 segundos de formada la interface ($\pi_{(3s)}$) y de tensión superficial en el equilibrio (γ_e) obtenidos por interpolación en el modelado de la adsorción de HA Q, 1,7 AHH, 9,6 AHH, 2,2 THH y HA pH 2 y pH 8, μ 0,5, 25 °C.

	$\Pi_{(3s)}$		γ_e	
	pH 8	pH 2	pH 8	pH 2
HA	6,78 ± 0,97 ^d	11,53 ± 0,41 ^{abc}	46,80 ± 0,18 ^c	50,98 ± 0,16 ^g
HA Q	11,52 ± 0,38 ^{abc}	10,15 ± 0,52 ^c	45,94 ± 0,14 ^b	50,64 ± 0,17 ^g
1,7 AHH	10,07 ± 0,72 ^c	12,99 ± 0,41 ^a	48,34 ± 0,15 ^d	48,72 ± 0,18 ^e
9,5 AHH	7,85 ± 0,77 ^d	10,92 ± 0,67 ^{bc}	47,25 ± 0,15 ^c	48,89 ± 0,20 ^e
2,2 THH	10,77 ± 0,75 ^{bc}	12,22 ± 0,21 ^{ab}	45,11 ± 0,18 ^a	49,61 ± 0,19 ^f

4.4.2.2. Isotermas de adsorción de la proteína a la interface

En todas las condiciones de ensayo se observó un comportamiento sigmoideo evidenciado por un aumento de π al incrementarse la concentración proteica hasta alcanzar un valor casi constante (Figura 4.82).

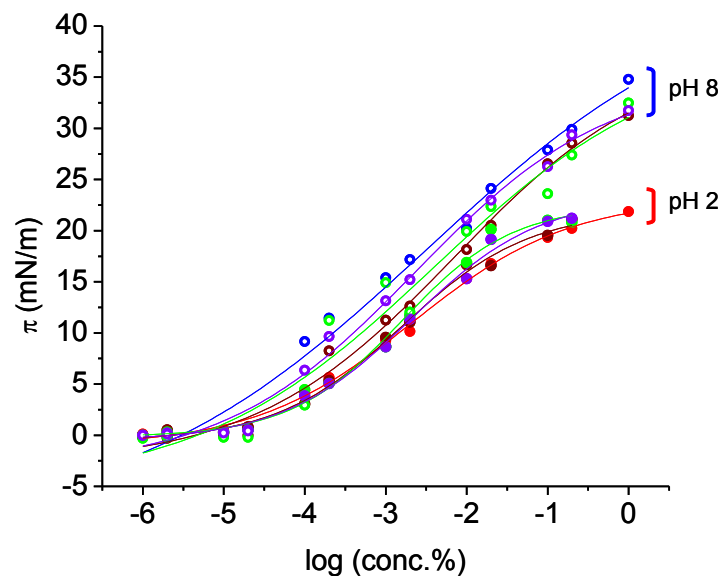


Figura 4.82. Isotermas de adsorción de las fracciones solubles de HA Q, marrón), 1,7 AHH, verde; 2,2 THH, violeta y HA a pH 8 (azul) y pH 2 (rojo), μ 0,5, 25 °C.

Los tratamientos, térmico y de hidrólisis, no condujeron a cambios que se reflejen en las isothermas de adsorción de las proteínas tratadas con respecto a la obtenida para el aislado proteico sin tratar. El pH no modificó la tendencia para las muestras tratadas y el aislado proteico sin tratar

4.4.2.3. Isothermas de compresión de la proteína esparcida en la interface

Las isothermas de compresión se estudiaron en la balanza de Langmuir por medio de la compresión de la película formada por esparcimiento, depositando porciones de la solución proteica directamente en la interface. Las muestras se esparcieron en la cuba con el mismo buffer utilizado para solubilizar la proteína. Las isothermas de compresión de las soluciones de proteína tratada previamente se compararon con la de la proteína sin tratar.

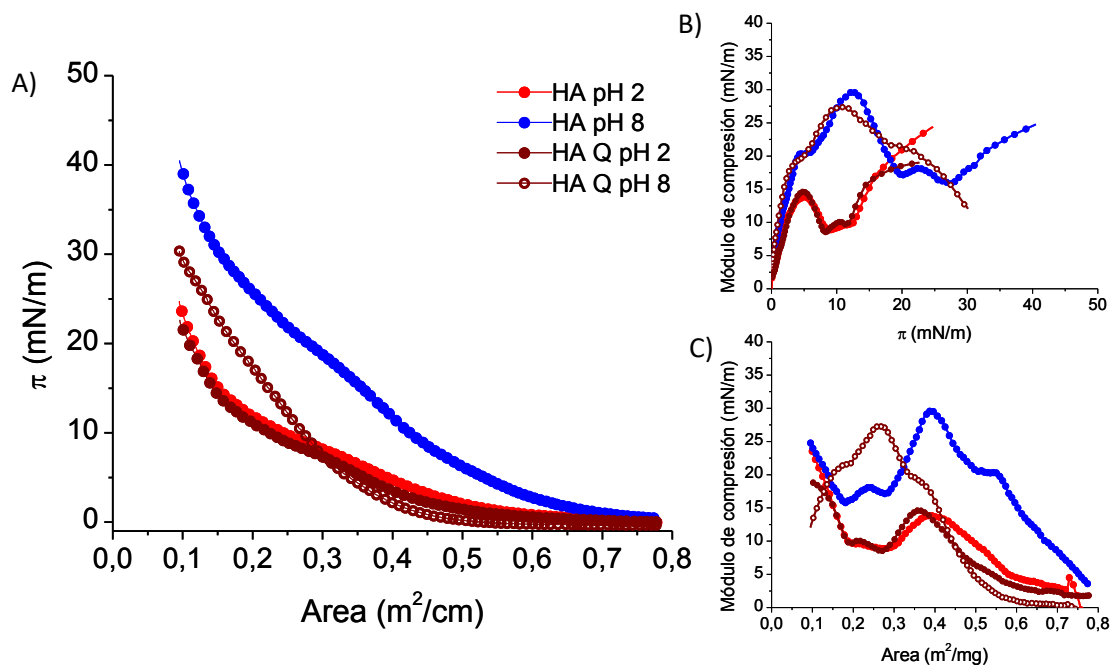


Figura 4.83. A- π (mN/m) en función del área de compresión (m^2/mg); B- Módulo de compresión (mN/m) en función de π (mN/m); C- Módulo de compresión (mN/m) en función del área de compresión (m^2/mg). Las determinaciones se realizaron a μ 0,5, 25 °C.

En todas las condiciones ensayadas al comprimir el área interfacial se observó un aumento de π , característico de las proteínas esparcidas en interface (Graham y Phillips, 1979c).

Con respecto a las proteínas tratadas térmicamente (Figura 4.83), a pH 8, la película interfacial necesitó una mayor compresión para comenzar a incrementar π (Figura 4.83-A). No obstante esto, no se vio modificado el perfil del módulo de compresión en función de π , manteniendo las mismas transiciones interfaciales (Figura 4.83-B). Tanto el retardo en el incremento de π , como

el desplazamiento del perfil del módulo de compresión en función del área (Figura 4.83-C), se deberían al aumento de la desorción de la interface de la proteína tratada térmicamente respecto a la no tratada. Este incremento de la desorción proteica conduciría a una menor concentración de proteína en la interface y a la necesidad de un mayor grado de compresión para alcanzar una concentración dada.

A pH 2 no se observó un cambio significativo en el comportamiento interfacial con el tratamiento térmico (Figura 4.83).

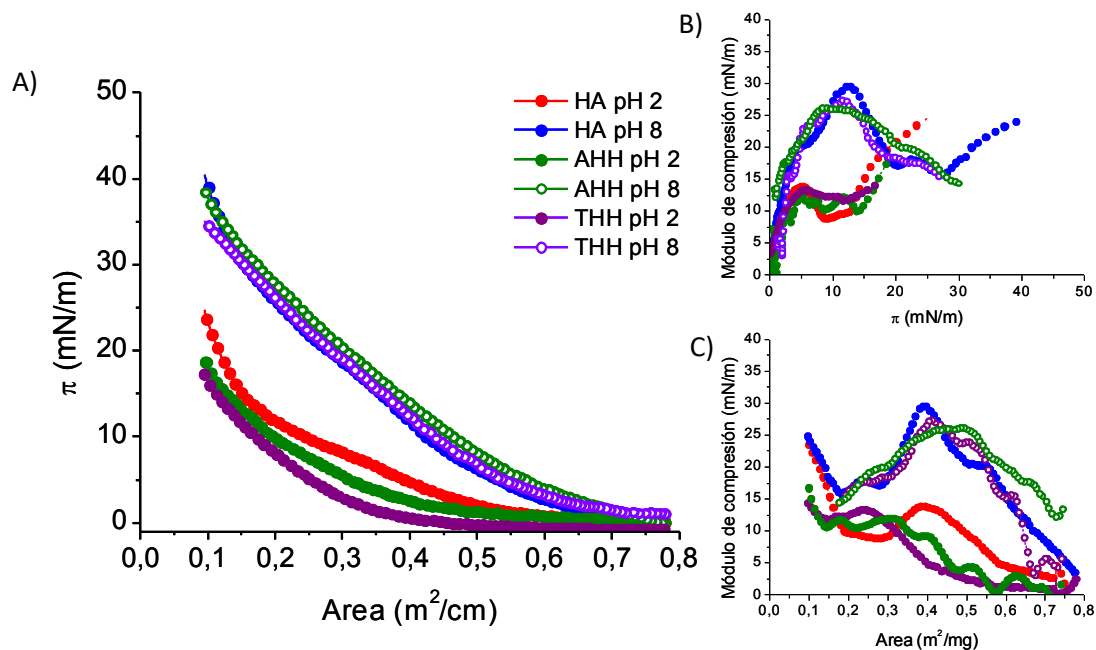


Figura 4.84. A- π (mN/m) en función del área de compresión (m²/mg); B- Módulo de compresión (mN/m) en función de π (mN/m); C- Módulo de compresión (mN/m) en función del área de compresión (m²/mg). Las determinaciones se realizaron a μ 0,5, 25 °C.

La hidrólisis enzimática no modificó significativamente el comportamiento de la proteína esparcida en la interface durante la compresión a pH 8.

A pH 2, los hidrolizados con ambas enzimas, necesitaron una mayor compresión del área para aumentar π y no mostraron las transiciones que se observaron con el aislado nativo a $\pi \approx 6$ mN/m y $\pi \approx 15$ mN/m (Figura 4.84-A). Al analizar el comportamiento del módulo de compresión en función de π (Figura 4.84-C) para las muestras hidrolizadas, no se registran las dos transiciones bien definidas presentadas por el aislado nativo. Esto podría deberse a la mayor proporción de estructura desordenada de los hidrolizados y a la consecuente mayor flexibilidad para reestructurarse paulatinamente con la compresión en la interface.

En el mismo sentido se observó que el tratamiento hidrolítico condujo a un aumento de la desorción interfacial.

Ambos tratamientos aumentaron la desorción de la proteína esparcida en la interface. El tratamiento térmico modificó principalmente el comportamiento de la proteína esparcida en la interface a pH 8, mientras que el tratamiento hidrolítico lo hizo a pH 2. No obstante esto, las principales diferencias en el comportamiento interfacial son debidas al efecto del pH sobre la estructura proteica.

4.4.3. Propiedades espumantes

El tratamiento térmico y de hidrólisis intenta modificar la proteína de manera de mejorar su comportamiento espumante, tanto de formación como de estabilidad de la espuma. Ya han sido discutidos algunos de los factores que incrementan las propiedades espumantes: solubilidad, hidrofobicidad superficial, flexibilidad molecular, tamaño de partículas en solución, interacción proteica interfacial.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado claramente que el tratamiento térmico induce la desnaturalización de las proteínas de amaranto. Ya que la desnaturalización incrementó la velocidad de adsorción de la proteína a la interface, permitiría obtener mejores propiedades espumantes de las proteínas solubles. Por otro lado, hemos demostrado que el tratamiento hidrolítico disminuyó el tamaño medio de los polipéptidos, resultado concordante con el obtenido por Condés y col., (2009), factor que también colabora con el incremento de la velocidad de adsorción de la proteína a la interface. A diferencia del tratamiento térmico, el tratamiento hidrolítico, en nuestras condiciones de ensayo, aumentó la solubilidad proteica. Otros autores han descripto mejoras en las propiedades espumantes de proteínas modificadas por tratamiento térmico e hidrólisis enzimática. Así, por ejemplo, el primero de estos tratamientos ha mejorado las propiedades espumantes de proteínas soja (Sorgentini y col., 1995), suero lácteo (Zhu y Damodaran, 1994) y clara de huevo (Nicorescu y col., 2011), mientras que la hidrólisis enzimática ha mejorado las características de espumas preparadas con proteínas de soja (Molina Ortiz y Wagner, 2002; Martínez y col., 2009), trigo (Bombara y col., 1997), colza (Vioque y col., 2000), girasol (Rodríguez Patino y col., 2007), β -lactoglobulina (Perez y col., 2012) y amaranto (Condés y col., 2009). Para el caso de las proteínas de amaranto se ha descripto una mejora en la estabilidad de las espumas formadas por proteínas hidrolizadas con tripsina (grado de hidrólisis 6

%) a pH 8,5 y μ 0,05. Este resultado podría ser consecuencia del incremento en la proporción de proteína soluble respecto a la proteína total inducido por la hidrólisis.

4.4.3.1. Capacidad de formación de espuma

La capacidad de formación de espumas se evaluó sobre la fracción soluble de las proteínas modificadas previo tratamiento térmico o de hidrólisis. Al igual que lo realizado en el punto 4.3.1 las espumas preparadas con las proteínas modificadas se evaluaron al finalizar el burbujeo. Los parámetros determinados fueron: *volumen de líquido incorporado en la espuma* (VLE), *volumen de espuma* (V_{esp}) y *densidad de la espuma* (δ_{esp} , VLE/V_{esp}), además se obtuvieron imágenes digitales de las espumas formadas. Durante el espumado se evaluó la *velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma* (v_0).

En la Figura 4.85 se muestran los resultados correspondientes al volumen de líquido incorporado a las espumas al cese del burbujeo.

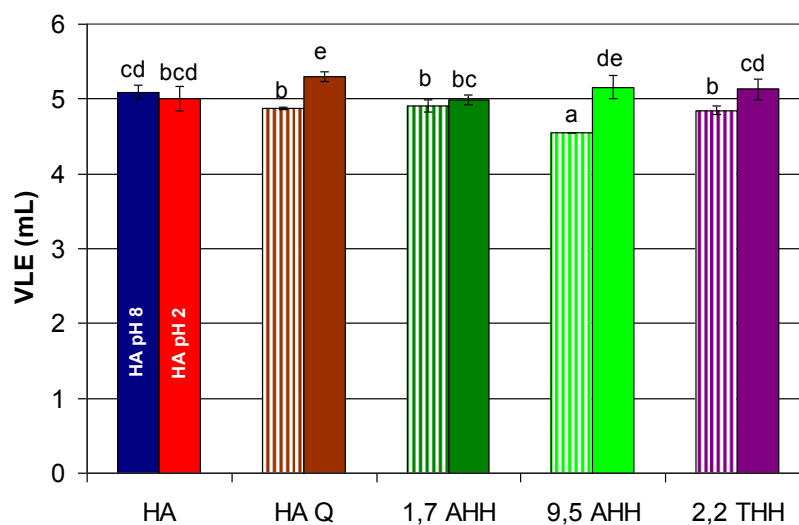


Figura 4.85. Volumen de líquido incorporado en la espuma (VLE) de las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

En términos generales no se observó una mejora significativa en la incorporación de líquido a la espuma, excepto para HA Q a pH 2.

La Figura 4.86 muestra los valores de volumen de espuma obtenidos.

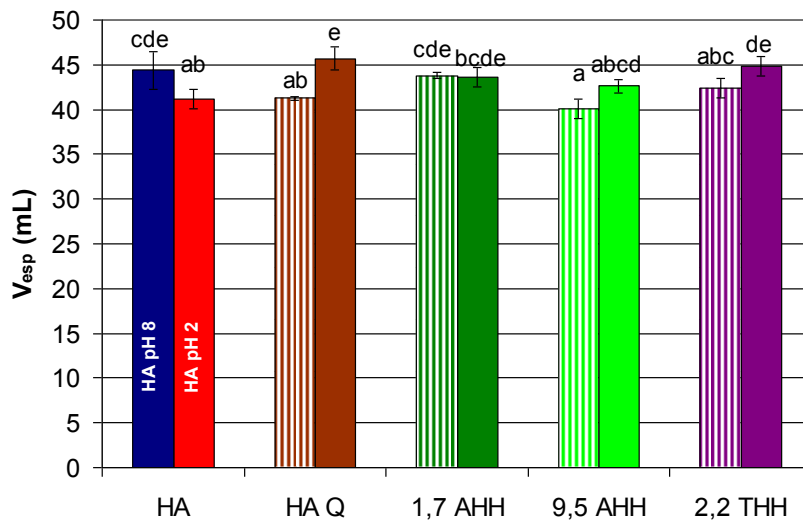


Figura 4.86. Volumen de espuma (V_{esp}) obtenido a partir de las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

El efecto de las modificaciones proteicas sobre el V_{esp} fue similar al discutido para VLE. En este caso se observó una mejora significativa de este parámetro para HA Q a pH 2 y 2,2 THH respecto al correspondiente a HA.

En la Figura 4.87 se muestra la densidad de las espumas preparadas con las proteínas modificadas comparándolas con los respectivos controles.

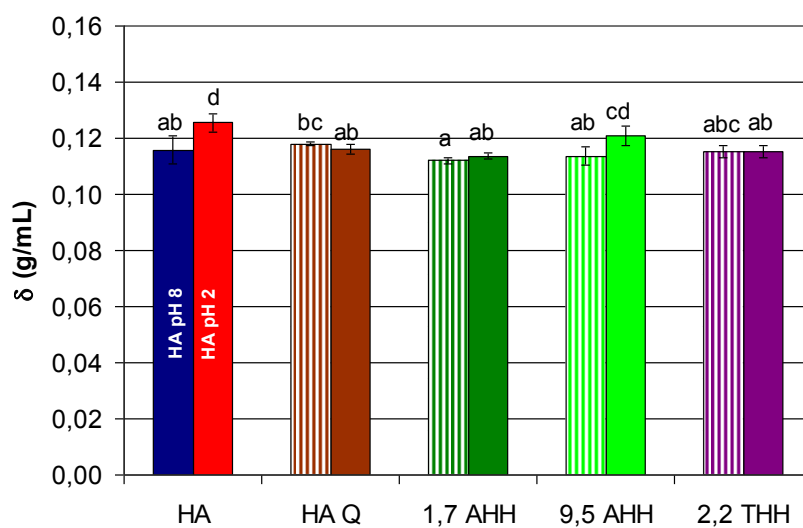


Figura 4.87. Densidad de las espumas (δ_{esp} g/mL) obtenidas con las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

A pH 8 no se observó diferencia significativa en la densidad de las espumas obtenidas con las distintas muestras ensayadas. Esto podría ser atribuido a la tendencia de decaimiento observada a de VLE y V_{esp} para los distintos tratamientos.

A pH 2 se observó un decrecimiento en el parámetro δ_{esp} , lo que podría ser debido a un mayor incremento de V_{esp} con respecto a VLE.

Ninguno de los tratamientos aplicados a las proteínas logró incrementar la densidad de las espumas formadas.

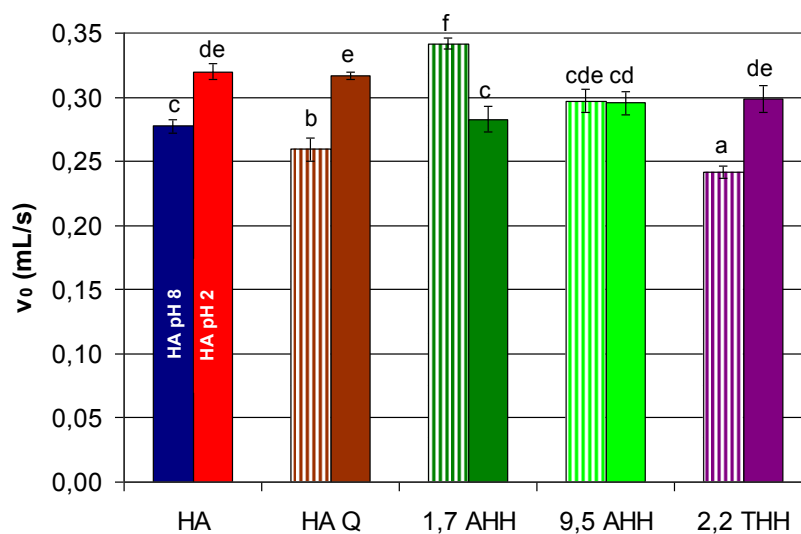


Figura 4.88. Velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma (v_0) formado a partir de las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

Al evaluar la velocidad máxima de incorporación de líquido en la espuma a pH 8 (Figura 4.88) se observa solo un incremento con la fracción soluble de 1,7 AHH. Para el resto de las muestras ensayadas no se observó una mejora significativa de v_0 , y en algunos casos, HA Q y 2,2 THH, el tratamiento realizado a la muestra impactó de manera negativa. A este pH se esperaba un incremento en el parámetro v_0 , dado el aumento registrado en la velocidad de descenso de la tensión superficial a tiempos cortos y su relación, para las soluciones de aislado nativo, con v_0 (punto 4.3.2) (Prins, 1988).

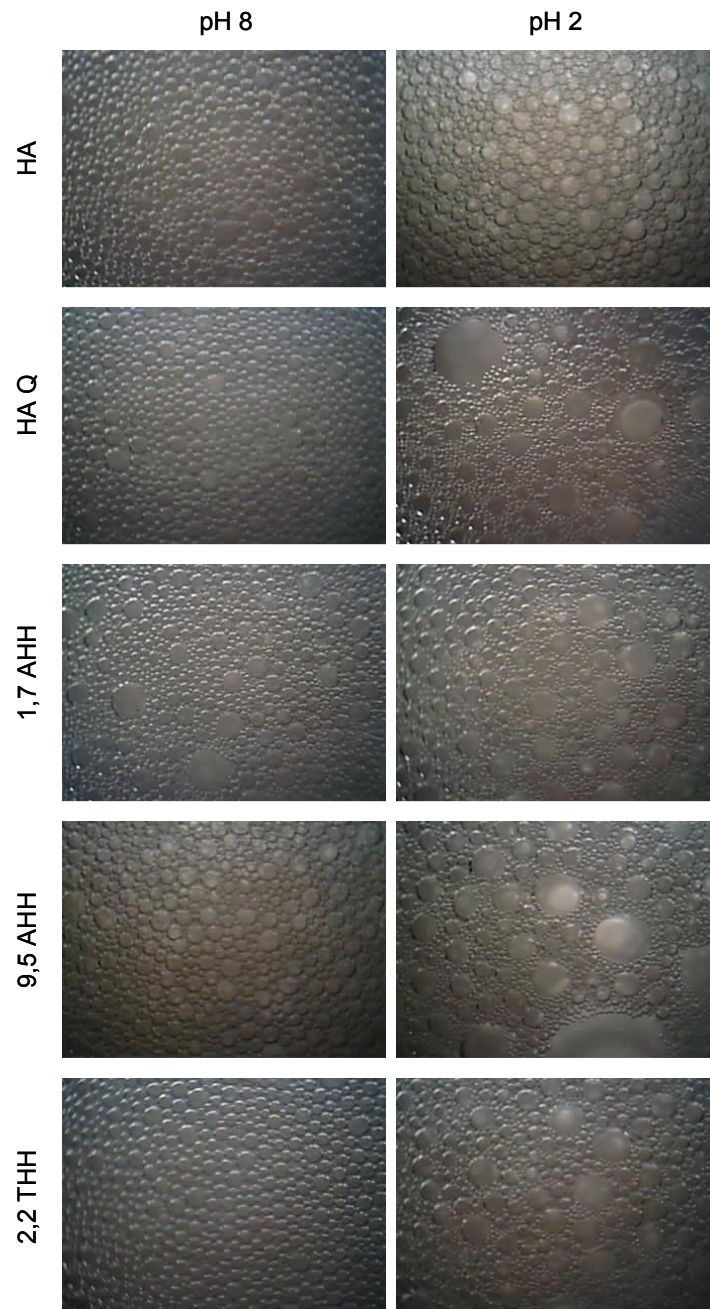


Figura 4.89. Imagen de las espumas obtenidas al finalizar el burbujeo con las diferentes soluciones de proteína 1 mg/mL a pH 8 y pH 2 μ 0,5, 25 °C.

Se analizaron las imágenes digitales tomadas al finalizar el burbujeo, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.89. A pH 8 1,7 AHH formó una espuma menos homogénea que el resto de las muestras ensayadas. Esta misma muestra fue la que mostró un valor de v_0 significativamente mayor que el resto. La falta de homogeneidad observada podría ser debida al rápido descenso de la tensión superficial, lo que se traduce en la formación de burbujas más pequeñas y mayor área

interfacial, y a la mayor demanda de líquido, la que en caso de no ser satisfecha generaría burbujas de mayor tamaño.

La relación encontrada a pH 8 entre inhomogeneidad y el valor de v_0 no se apreció claramente a pH 2. En este caso se observó un decrecimiento del valor de v_0 y de la homogeneidad de todas las espumas formadas. Este aumento de la inhomogeneidad de las burbujas fue significativo para HA Q, muestra que presentó a este pH un mayor incremento del parámetro VLE, como así también del parámetro V_{esp} .

Cabe recordar que la falta de homogeneidad de las burbujas permite presumir una espuma más inestable, dada la presencia de burbujas grandes que inducen el colapso.

4.4.3.2. Estabilidad de la espuma

El estudio de estabilidad se llevó a cabo para las espumas preparadas a partir de la fracción soluble de las proteínas modificadas, previo tratamiento térmico o de hidrólisis, solubilizadas a pH 8 y pH 2, μ 0,5. Los parámetros utilizados para el análisis de la estabilidad de las espumas fueron el *tiempo medio de drenado de líquido de la espuma* ($t_{1/2}$) y el *volumen de líquido remanente en la espuma a los 10 min* (VLE_{10min}), como hemos descripto para las espumas preparadas con el aislado sin modificar (punto 4.3.3).

A pH 8 el $t_{1/2}$ se incrementó en un 82 % en relación a la espuma preparada con la proteína nativa en la muestra térmicamente tratada (Figura 4.90). El tratamiento enzimático disminuyó el valor de este parámetro.

A pH 2 se mejoró la estabilidad de la espuma en un 18 % por medio del tratamiento enzimático con tripsina (2,2 THH). El resto de las condiciones de tratamiento enzimático ensayadas (1,7 AHH y 9,5 AHH) no modificaron la estabilidad de la espuma. Por su parte, el tratamiento térmico tuvo un efecto negativo sobre la estabilidad de la espuma formada.

De todas las condiciones ensayadas de pH y μ , para la proteína nativa y modificada térmicamente o por tratamiento enzimático, la espuma preparada con la proteína hidrolizada con tripsina, a pH 2 y μ 0,5, fue la que presentó el mayor $t_{1/2}$.

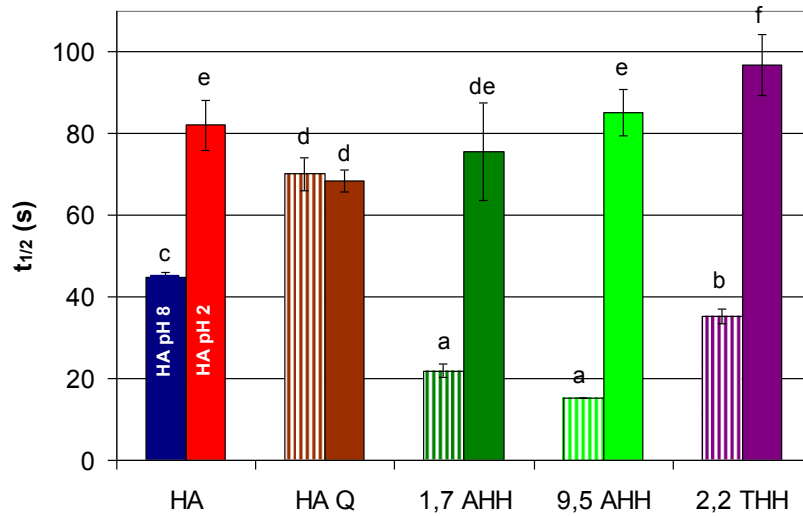


Figura 4.90. Tiempo medio de las espumas ($t_{1/2}$ (s)) formadas con las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

El volumen de líquido remanente en la espuma a los 10 minutos de burbujeo, VLE_{10min} presentó la misma tendencia que $t_{1/2}$. La mejor retención de líquido se logró en las espumas preparadas con las proteínas tratadas térmicamente a pH 8, y con aquellas provenientes de la hidrólisis enzimática con tripsina preparadas a pH 2 (Figura 4.91).

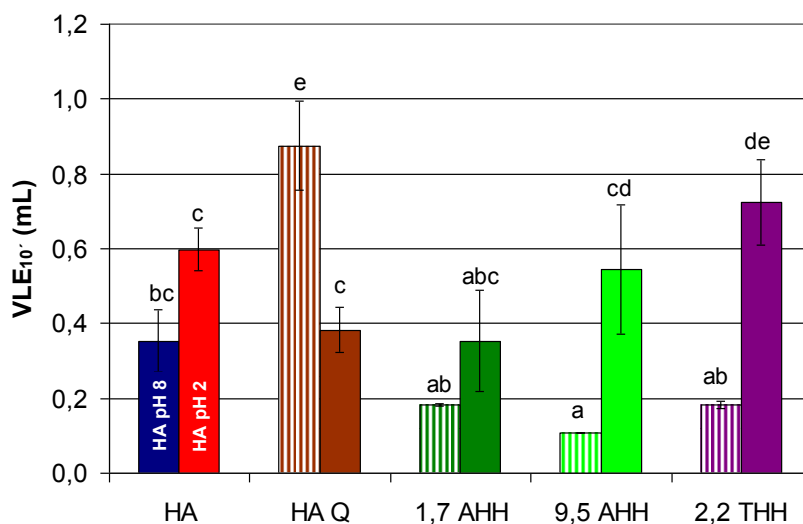


Figura 4.91. Volumen de líquido remanente a los 10 min del cese del burbujeo (VLE_{10min}) para las espumas formadas con las soluciones de proteína 1 g/L a pH 8 (barra rayada) y pH 2 (barra llena), μ 0,5, 25 °C.

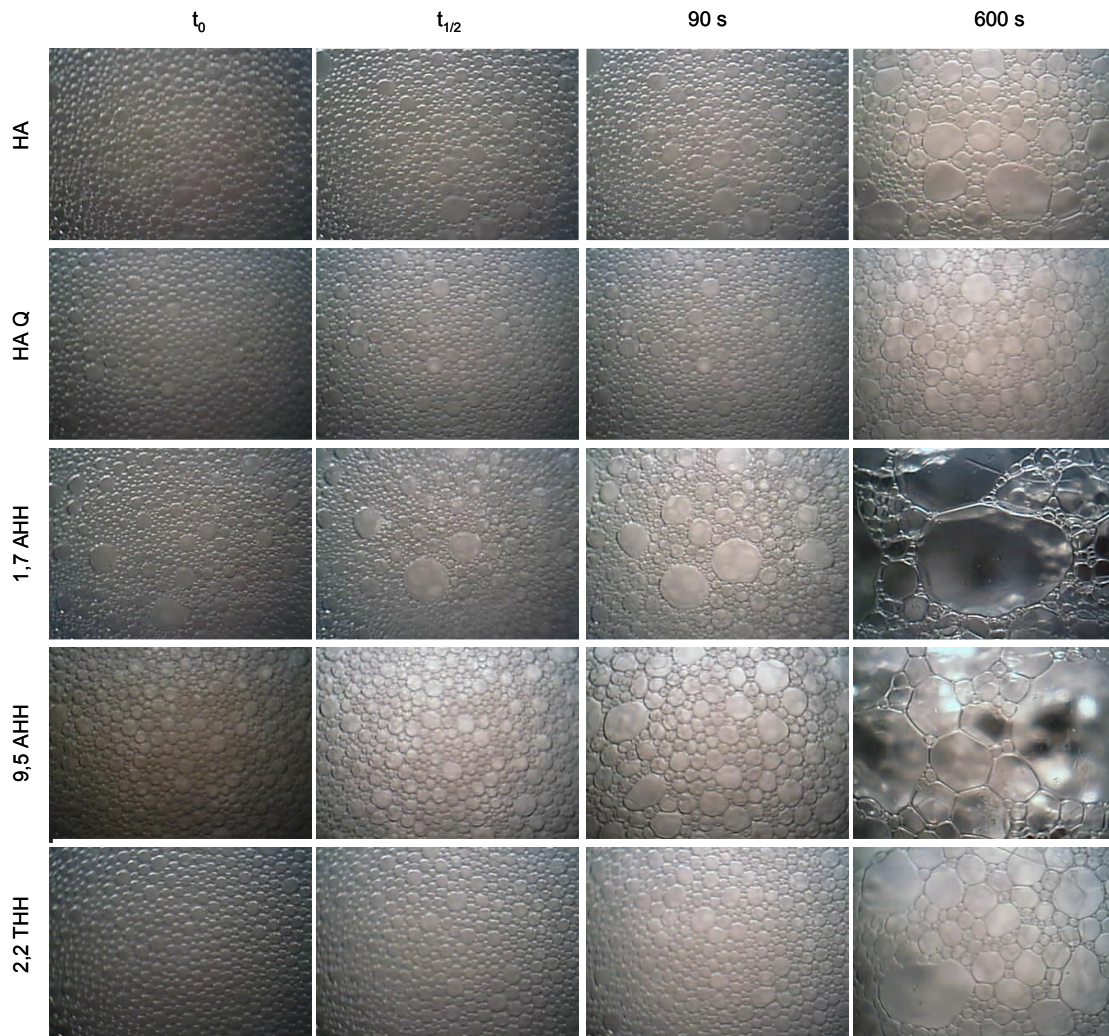


Figura 4.92. Imágenes de las espumas tomadas a t_0 (cese del burbujeo), $t_{1/2}$ (tiempo de drenado de la mitad del líquido incorporado en la espuma), 90 s y 600 s. Las espumas fueron preparadas con soluciones 1 g/L de HA, HA Q; 1,7 AHH, 9,5 AHH y 2,2 THH a pH 8, μ 0,5.

En la Figura 4.92 se muestran las imágenes de las espumas tomadas a diferentes tiempos al cese del burbujeo, al tiempo medio, a los 90 segundos y a los 600 segundos. A pH 8 se observó para HA Q una espuma con una distribución de burbujas más pequeñas que la correspondiente a HA. Así mismo esta espuma se mantuvo más estructurada a los 600 segundos del cese del burbujeo, confirmando visualmente los resultados obtenidos por métodos físicos, los cuales permitieron verificar una mejora en la estabilidad de esta espuma.

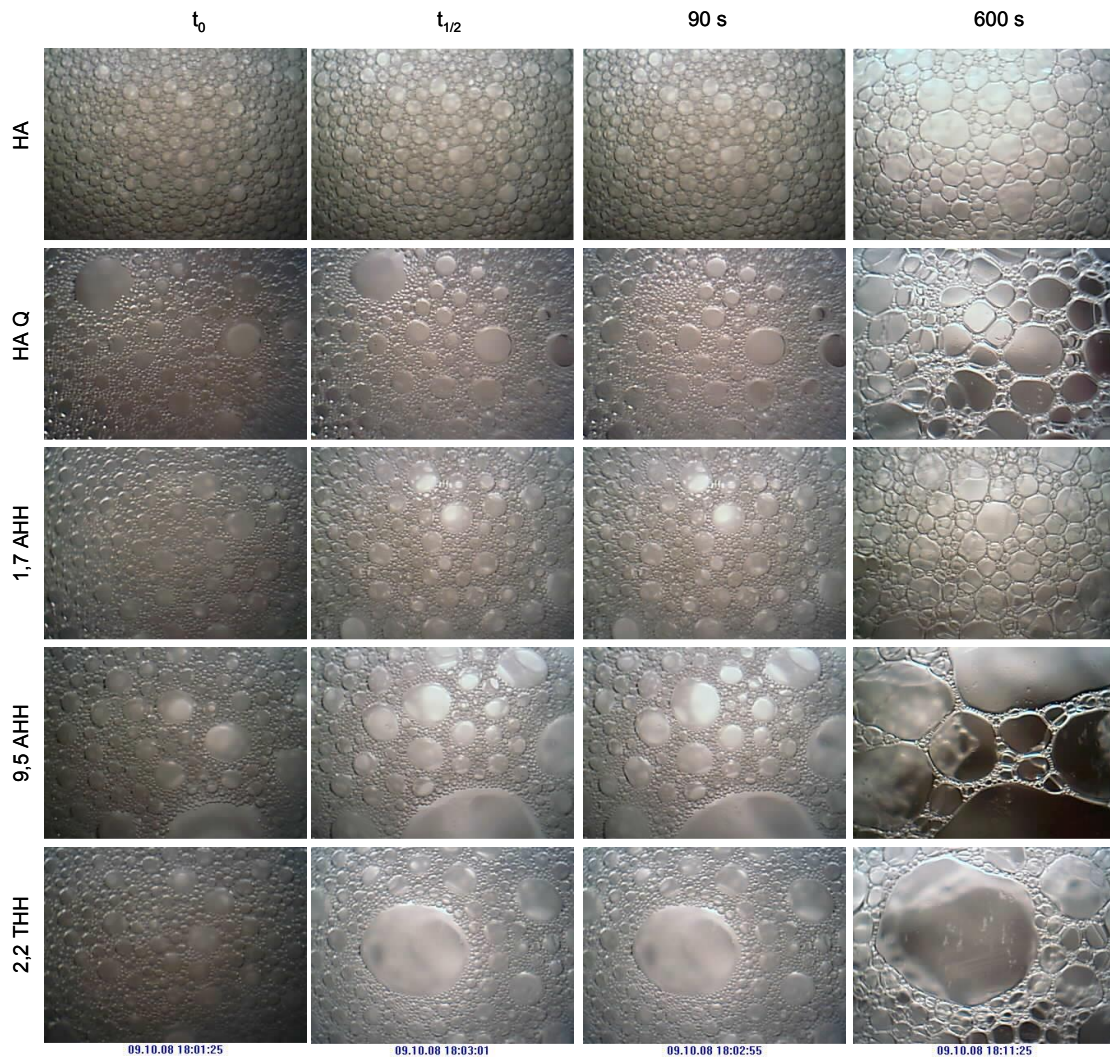


Figura 4.93. Imágenes de las espumas tomadas a t_0 (cese del burbujeo), $t_{1/2}$ (tiempo de drenado de la mitad del líquido incorporado en la espuma), 90 s y 600 s. Las espumas fueron preparadas con soluciones 1 g/L de HA, HA Q; 1,7 AHH, 9,5 AHH y 2,2 THH a pH 2, μ 0,5.

A pH 2 (Figura 4.93) al finalizar el burbujeo (t_0) las espumas formadas con las proteínas previamente hidrolizadas mostraron una menor homogeneidad que las correspondientes al control, lo que permitiría pensar en espumas más inestables. No obstante esto, ya fue demostrado que las espumas formadas con la proteína tratada enzimáticamente con tripsina presentan mayor estabilidad que aquellas preparadas con proteína nativa.

5. Conclusiones

Las proteínas de almacenamiento del grano de amaranto se caracterizan por su estructura compacta y baja solubilidad. Esta última propiedad afecta en forma negativa otras propiedades funcionales de las proteínas, entre ellas su capacidad espumante, propiedad objeto de este estudio. Es por ello que se seleccionaron condiciones experimentales de tratamiento de las proteínas, alta y baja fuerza iónica y pH 2 y 8, que modificaran su estructura y en consecuencia pudieran mejorar su solubilidad.

El análisis estructural realizado permitió constatar ambos pHs la presencia de tres poblaciones principales de partículas. El tratamiento a pH ácido y el aumento de la fuerza iónica provocó el desplegamiento de la estructura compacta de las globulinas de almacenamiento, así como la reducción del tamaño molecular debido a la disociación de las subunidades que conforman estas proteínas y a la acción de una proteasa endógena activa en estas condiciones de pH. A pH 2 se encontró la población de menor radio hidrodinámico coexistiendo con los agregados de mayor tamaño. La población de menor tamaño se ve favorecida por la reacción de hidrólisis mencionada previamente y el aumento de la fuerza iónica que provoca un descenso de la solubilidad y la precipitación de los agregados de mayor tamaño.

Estas modificaciones en el tamaño de partícula en las diferentes condiciones de ensayo estudiadas incidieron en la capacidad de formación de espumas de las proteínas, efectos que pudieron ser verificados a nivel de interface y en la solución como un todo.

La adsorción de las proteínas a la interface se vio favorecida por el menor tamaño de partícula y la menor fuerza iónica, mientras que el proceso de reordenamiento fue mayor a pH 8, pH que se caracteriza por la presencia de polipéptidos de mayor tamaño con una mayor capacidad para modificar su conformación.

Para las soluciones de 0,01 g/L la formación de las interfaces a ambos pHs ocurrió en equilibrio termodinámico, obteniéndose interfaces más flexibles a pH ácido y mayor fuerza iónica. A una concentración proteica mayor, 1 g/L, la formación de la interface se desvió del equilibrio termodinámico, detectándose cambios en la reología interfacial, en particular un aumento del módulo complejo, E^* , a pH 2 y una disminución a pH 8, lo que implica una mayor resistencia a la deformación de la interface formada a pH ácido.

Los ensayos de compresión interfacial realizados permitieron inferir efectos independientes del pH y la fuerza iónica. A pH 2 se logra un mejor acomodamiento de la proteína en la interface y

una menor desorción. Este último efecto fue también reducido por el aumento de la fuerza iónica debido al descenso de la solubilidad y a la menor repulsión de cargas entre las proteínas. El descenso del pH contribuyó a su vez a una modificación de la estructura de la proteína en la interface, particularmente se detectó un aumento de estructura hoja plegada beta y la formación de agregados.

Los cambios en la estructura y tamaño de las proteínas provocados por la modificación del pH y la fuerza iónica afectaron la formación y características del film interfacial y se reflejaron a su vez en las propiedades macroscópicas de las espumas obtenidas.

En cuanto a la capacidad de formación de las espumas se observó una mayor velocidad de incorporación de líquido a pH 2 y alta fuerza iónica, obteniéndose espumas con burbujas de menor radio y tamaño variado lo que se tradujo en una mayor inhomogeneidad a nivel visual. La presencia de proteína insoluble no incidió significativamente en los parámetros de formación de la espuma evaluados.

La velocidad de adsorción de la proteína a la interface presentó una relación directa con la presión superficial a los 3 s de formada la interface, tiempo de formación de una burbuja. Este parámetro a su vez se relacionó directamente con la velocidad máxima de incorporación de líquido a la espuma, lo que permitiría la predicción de la capacidad de formación de espuma.

La estabilidad de las espumas formadas también fue afectada por las condiciones de ensayo. Las espumas fueron más estables a pH 2 que a pH 8, detectándose además una mejora en la estabilidad a pH ácido al incrementarse la fuerza iónica. En todas las espumas durante la etapa de desestabilización la mayor parte del líquido se eliminó por drenado gravitacional, el cual presentó una velocidad un orden de magnitud mayor que la correspondiente al drenado por desproporción y colapso. Este efecto se vio magnificado en las espumas más inestables.

Las espumas preparadas a menor fuerza iónica retuvieron, luego de 10 minutos de formada la misma, una mayor cantidad de líquido que las que poseían alta fuerza iónica. Además estas espumas presentaron una menor velocidad de drenado por desproporción y colapso lo que podría deberse a la mayor repulsión electrostática entre las interfaces de la lamela, el mayor grosor y una menor difusión de gas.

La presencia de proteína insoluble tuvo un efecto favorable en la estabilidad de las espumas formadas, acorde a los valores de $t_{1/2}$ obtenido, a pH 2 y baja fuerza iónica. A alta fuerza iónica e igual pH la fracción insoluble no afectó la estabilidad. Por lo tanto, en nuestras condiciones de ensayo, tanto en términos de formación como de estabilidad, comprobamos que la presencia de

proteína insoluble no afectó negativamente la calidad de la espuma, lo que permitiría obtener espumas a partir de dispersiones proteicas.

El aumento de la concentración de proteínas en todos los casos alargó la vida media de las espumas e incrementó la proporción de líquido drenado por desproporción y colapso en detrimento del eliminado por drenado gravitacional.

Se encontró una relación positiva entre el módulo viscoelástico de la interface y la estabilidad de la espuma, hecho esperado dado que se reducen las posibilidades de ruptura y difusión de gas a través de la interface.

La modificación de la estructura proteica por tratamientos diferentes a la variación del pH y la fuerza iónica, como son el tratamiento térmico y la hidrólisis haciendo uso de enzimas exógenas también fue evaluada. El tratamiento térmico y un bajo grado de hidrólisis de las proteínas permitieron, a pH 8, lograr un mayor descenso de la presión superficial a tiempos cortos de formada la interface. A pH 2 no se observó este comportamiento. Solo a pH 8 1,7 AHH se observó un incremento en v_0 .

El tratamiento térmico provocó una mejora significativa en la estabilidad de la espuma formada a pH 8, tanto en el tiempo medio como en el volumen de líquido retenido en la espuma pasados 10 minutos desde su formación. Este efecto pudo ser apreciado visualmente como una espuma más estructurada. Cuando la proteína fue tratada enzimáticamente se observó un decaimiento en la estabilidad debido probablemente a la reducción del tamaño molecular y a una mayor velocidad de desorción, excepto con el tratamiento con tripsina a pH 2 donde se obtuvieron las mejores espumas.

El tratamiento combinado de pH-fuerza iónica resultó más eficaz para modificar la capacidad de formación y estabilización de espumas preparadas con proteínas de amaranto. Tratamientos como el térmico o la acción de enzimas exógenas tuvieron mayor efecto en las espumas preparadas a pH 8 que a pH 2, dado que pueden modificar la estructura de la proteína prácticamente nativa, así como el grado de flexibilidad de la misma y/o el tamaño molecular.

El variado comportamiento detectado en las espumas preparadas con proteínas de amaranto, debido a las diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y concentración empleadas, así como a los distintos tratamientos aplicados, térmico e hidrolítico, permitiría en principio el uso de estas proteínas en la formulación de diferentes alimentos espumados. Este amplio espectro de aplicación tecnológica tiene como base los cambios de conformación que experimentan estas

proteínas frente a modificaciones del medio y a la repercusión de estos cambios a nivel de la interface aire-agua.

6. Bibliografía

Abugoch, L. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). *Universidad Nacional de La Plata, La Plata*.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27, 1256–1262.

Adler-Nissen, J., & Olsen, H. S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein.

Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science and Technology*, 22 (2), 112-120.

Anand, K., & Damodaran, S. (1995). Kinetics of adsorption of lysozyme and bovine serum albumin at the air–water interface from a binary mixture. *Journal of colloid and interface science*, 176(1), 63-73.

AOAC. (1990). *Official methods of analysis (15th edition)*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC. (1998). *Official methods of analysis (16th edition - 4th revision)*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Barba de la Rosa, A. P., Paredes-Lopez, O., Gueguen, J. (1992). Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 937-940.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.

Bashforth, F., Adams, J. C. (1983) *An Attempt to Test the Theory of Capillary Action*. Cambridge: Cambridge Univ.

Benjamins, J. (2000). *Static and dynamic properties of proteins adsorbed at liquid interfaces*. Wageningen Universiteit.

- Benjamins, J., Cagna, A., Lucassen-Reynders, E. H. (1996). Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 114, 245-254.
- Benjamins, J., Lucassen-Reynders, E. H. (1998). Surface dilational rheology of proteins adsorbed at air/water and oil/water interfaces. En D. Mobius y R. Miller, *Proteins at Liquid Interfaces*. (pp. 341). Elsevier Science B. V.
- Benjamins, J., Lyklema, J., Lucassen-Reynders, E. H. (2006). Compression/expansion rheology of oil/water interfaces with adsorbed proteins. Comparison with the air/water surface. *Langmuir*, 22(14), 6181-6188.
- Bhattacharyya, A., Monroy, F., Langevin, D., Argillier, J. F. (2000). Surface rheology and foam stability of mixed surfactant-polyelectrolyte solutions. *Langmuir*, 16(23), 8727-8732.
- Bombara, N., Añón, M. C., Pilosof, A. M. R. (1997). Functional properties of protease modified wheat flours. *LWT-Food Science and Technology*, 30(5), 441-447.
- Bos, M. A., van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471.
- Bressani, R. 1994. Composition and nutritional properties of amaranth. En O. Paredes-López, *Amaranth: biology, chemistry and technology*. (pp. 185-205) CRC Press, Boca Ratón.
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., Ivkova, M. N. (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 18, 263-279.
- Caessens, P. W., De Jongh, H. H., Norde, W., Gruppen, H. (1999). The adsorption-induced secondary structure of β -casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430(1), 73-83.
- Canella, M., Castriotta, G., Bernardi, A., Boni, R. (1985). Functional properties of individual sunflower albumin and globulin. *LWT-Food Science and Technology*, 18, 288-292.

- Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 407-416.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N., Añón, M. C. (1998). Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(12), 4846-4853.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N., Añón, M. C. (2000). Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5624-5629.
- Chen, S., Paredes-López, O. (1997). Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *Journal of food biochemistry*, 21(6), 53-65.
- Cho, D., Narsimhan, G., Franses, E. I., (1996). Adsorption Dynamics of Native and Alkylated Derivatives of Bovine Serum Albumin at Air-Water Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178(1), 348-357.
- Condés, M. C., Scilingo, A. A., Añón, M. C. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 963-970.
- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. En J. E. Kinsella, W. G. Soucie, *Food Proteins*. (pp 21-51). Champaign, IL: The American Oil Chemists Society.
- Damodaran, S. (1990). Interfaces, protein films, and foams. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34(17), 10.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. *Protein functionality in food systems*, 1-37.
- Damodaran, S. (1996). Aminoacids, peptides and proteins. En O. R. Fennema, *Food Chemistry* (3ra edición), (pp. 321) New York: Marcel Dekker.
- Damodaran, S. (2003). In situ measurement of conformational changes in proteins at liquid interfaces by circular dichroism spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(2), 182-188.

- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, *70*, 54-66.
- Damodaran, S., Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *954*, 253-264.
- Davis, J. P., Foegeding, E. A., Hansen, F. K. (2004). Electrostatic effects on the yield stress of whey protein isolate foams. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *34*(1), 13-23.
- Davis, J. P., Doucet, D., Foegeding, E. A. (2005). Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *288*(2), 412-422.
- De Feijter, J. A., Benjamins, J. (1987). Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface. *Food emulsions and foams*, 72-85.
- Dickinson, E. (1992). An introduction to food colloids. Oxford: Oxford University Press.
- Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*(1), 40-49.
- Dickinson, E., Stainsby, G. (1982). *Colloids in food*. London: Applied Science Publishers.
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, *29*(31), 7133-7155.
- Dukhin, S. S., Kretschmar, G., Miller, R. (1995). *Dynamics of adsorption at liquid interfaces: theory, experiment, application* (Vol. 1). Amsterdam: Elsevier.
- Everett, D. H. (1988). *Basic Principles of Colloid Science*. London: Royal Soc. Chem.
- Fainerman, V. B., Miller, R. (1998). Proteins at liquid interface s monograph. En D. Mobius, R. Miller, *Studies of Interface Science*, (vol. 7 pp. 51-102), Amsterdam: Elsevier.
- Freer, E. M., Yim, K. S., Fuller, G. G., Radke, C. J. (2004). Shear and dilatational relaxation mechanisms of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface. *Langmuir*, *20*(23), 10159-10167.

- Freifelder, D. (1976). *Physical biochemistry; applications to biochemistry and molecular biology*. San Francisco: WH Freeman and Company.
- Gandolfo, F. G., Rosano, H. L. (1997). Interbubble gas diffusion and the stability of foams. *Journal of Colloid and Interface Science*, 194(1), 31-36.
- González-Pérez, S., Vereijken, J. M., Merck, K. B., van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., Voragen, A. G. (2004). Conformational states of sunflower (*Helianthus annuus*) helianthinin: effect of heat and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6770-6778.
- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J., Arruda, P. (1991). Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 851-854.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Friedman, M., Rodriguez, W. A., Martins, P. S., Vello, N. A., Tosello, G. A., Paredes-López, O. (1996). Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chemistry*, 56(2), 131-138.
- Gornall, A. J., Bardawill, C. J., Davis, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.
- Govindaraju, K., Srinivas, H. (2006). Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. *LWT-Food Science and Technology*, 39(1), 54-62.
- Graham, D. E., Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403-414.
- Graham, D. E., Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 415-426.
- Graham, D. E., Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: III. Molecular structures of adsorbed films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 427-439.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to estimate the conformations of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*, 235, 1-10.

- Greenfield, N. J., Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, *8* (10), 4108-4116.
- Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, *13*, 155-203.
- Hambardzumyan, A., Aguié-Béghin, V., Daoud, M., Douillard, R. (2004). β -Casein and symmetrical triblock copolymer (PEO-PPO-PEO and PPO-PEO-PPO) surface properties at the air-water interface. *Langmuir*, *20* (3), 756-763.
- Hermansson, A. M. (1973). Determination of functional properties of protein foods. En J. W. G. Porter, B. A. Rolls, *Protein in Human nutrition*, (pp. 407-437). London: Academic Press.
- Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of colloid and surface chemistry* (Vol. 188). New York: M. Dekker.
- Ipsen, R., Otte, J., Sharma, R., Nielsen, A., Hansen, L. G., Qvist, K. B. (2001). Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of β -lactoglobulin A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *21* (1), 173-178.
- Jeandet, P., Cilindre, C., Jegou, S., Vasserot, Y., Jeandet, M., Parmentier, M., ... Gougeon, R. (2007). Effervescence et mousse du champagne. *Le Vigneron champenois*, *128* (11), 58-76.
- Kato, A., Komatsu, K., Fujimoto, K., Kobayashi, K. (1985). Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *33*, 931-934.
- Kelly S. M., Price N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1338*, 161-185.
- Kelly S. M., Price N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science*, *1*, 349-384.
- Kerth, A., Erbe, A., Dathe, M., Blume, A. (2004). Infrared reflection absorption spectroscopy of amphipathic model peptides at the air/water interface. *Biophysical journal*, *86*(6), 3750-3758.

- Kilara, A., Panyam, D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 607-633.
- Kim, D. A., Cornec, M., Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285(1), 100-109.
- Kim, K. S., Kim, S., Yang, H. J., Kwon, D. Y. (2004). Changes of glycinin conformation due to pH, heat and salt determined by differential scanning calorimetry and circular dichroism. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 385-393.
- Kitabatake, N., y Doi, E. (1988). Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions. *Journal of Food Science*, 53 (5), 1542-1569.
- Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschreft fur Analytische Chemie*, 22, 366-382.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, J., Azumaya, J., Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains, comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (11), 2745-2750.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in protein chemistry*, 38, 181-364.
- Krotov, V. V. (2009). Basics of interfacial rheology. *Interfacial rheology Leiden: Brill*, 1.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lagerge, S. (2002). *Les mousses (moussage et démoussage)*. Paris : EDP.Sciences.
- Langevin, D. (1999). Liquid films, foams and emulsions. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 96 (6), 968-974.
- Langevin, D. (2000). Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 88 (1), 209-222.

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (1993). Principles of BiochemistryWorth Publishers. *New York*, 554-655.
- Loisel, W., Guéguen, J., Popineau, Y. (1993). A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. *Food proteins: Structure and functionality*, 320-323.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lucassen-Reynders, E. H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12(1), 1.
- Lucassen-Reynders, E. H., Benjamins, J., Fainerman, V. B. (2010). Dilational rheology of proteins films adsorbed at fluid interfaces. *Current Opinion in Colloids and Interfaces*, 15, 264-270.
- Lucassen, J., Van Den Tempel, M. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(6), 1283-1291.
- Ma, C. Y., Rout, M. K., Mock, W. Y. (2001). Study of oatglobulin conformation by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3328-3334.
- Mackie, A. R., Husband, F. A., Holt, C., Wilde, P. J. (1999). Adsorption of β -Lactoglobulin variants A and B to the air–water interface. *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (5-6), 509-516.
- MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA: Academic Press.
- Maldonado Valderrama, J. (2006). *Caracterización interfacial de proteínas y tensioactivos: aplicación a dispersiones alimentarias* (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
- Malysa, K., Lunkenheimer, K. (2008). Foams under dynamic conditions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 13 (3), 150-162.
- Mannheim, A., Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(12), 1163-1169.

- Marcone, M. F. (1999). Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chemistry*, *65*(4), 533-542.
- Marcone, M. F. (2000). First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*(2), 378-382.
- Marcone, M. F., & Yada, R. Y. (1992). Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(3), 385-389.
- Marcone, M.F., Yada, R. Y. (1998). Structural analysis of globulins isolated from genetically different Amaranth hybrid lines. *Food Chemistry*, *61* (3), 319-326.
- Marinova, K. G., Basheva, E. S., Nenova, B., Temelska, M., Mirarefi, A. Y., Campbell, B., Ivanov, I. B. (2009). Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: sodium caseinate and whey protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, *23* (7), 1864-1876.
- Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Cohen Stuart, M. A., van Vliet, T. (2002). Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, *254*, 175-183.
- Martin, A. H., Meinders, M. B., Bos, M. A., Cohen Stuart, M. A., van Vliet, T. (2003). Conformational aspects of proteins at the air/water interface studied by infrared reflection-absorption spectroscopy. *Langmuir*, *19*(7), 2922-2928.
- Martínez, E. N., Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44* (9), 2523-2530.
- Martínez, E. N., Castellani, O. F., Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3832-3839.

- Martinez, K. D., Baeza, R. I., Millan, F., Pilosof, A. M. R. (2005). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, *19*(3), 361-369.
- Martínez, K. D., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., & Pilosof, A. M. (2009). Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2149-2157.
- Meinders, M. B., van den Bosch, G. G., de Jongh, H. H. (2000). IRRAS, a new tool in food science. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(6), 218-225.
- Mendelsohn, R., Mao, G., Flach, C. R. (2010). Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1798*(4), 788-800.
- Miller, R., Fainerman, V. B., Makievski, A. V., Krägel, J., Grigoriev, D. O., Kazakov, V. N., Sinyachenko, O. V. (2000). Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, *86*(1), 39-82.
- Miller, R., Fainerman, V. B., Wüstneck, R., Krägel, J., Trukhin, D. V. (1998). Characterisation of the initial period of protein adsorption by dynamic surface tension measurements using different drop techniques. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*, *131*(1), 225-230.
- Molina Ortiz, S. E., Carrera Sánchez, C., Rodriguez Niño, M. R., Añon, M. C., Rodriguez Patino, J. M. (2003). Structural characterization and surface activity of spread and adsorbed soy globulin films at equilibrium. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, *32*(1), 57-67.
- Molina Ortiz, S. E., Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, *35*(6), 511-518.
- Monsalve, A., Schechter, R. S. (1984). The stability of foams: dependence of observation on the bubble size distribution. *Journal of colloid and interface science*, *97*(2), 327-335.

- Moro, A., Báez, G. D., Ballerini, G. A., Busti, P. A., Delorenzi, N. J. (2013). Emulsifying and foaming properties of β -lactoglobulin modified by heat treatment. *Food Research International*, 51 (1), 1-7.
- Murray, B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5), 426-431.
- Murray, B. S., Durga, K., Yusoff, A., Stoyanov, S. D. (2011). Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins. *Food Hydrocolloids*, 25 (4), 627-638.
- Murray, B. S., Ettelaie, R. (2004). Foams stability, proteins and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 314-320.
- Murray, B. S. (2007). Stabilization of bubbles and foams. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4), 232-241.
- Nakai, S., Li-Chan, E., Arteaga, G. E. (1996). Measurement of surface hydrophobicity. En G. M. Hall, *Methods of Testing Protein Functionality*, (pp. 226). New York: Blackie Academic and Professional.
- Nakamura, R., Doi, E. (2000). *Egg processing* (pp. 171-207). Wiley-VCH: New York, NY, USA.
- Narsimhan, G., Uraizee, F. (1992). Kinetics of Adsorption of Globular Proteins at an Air-Water Interface. *Biotechnology progress*, 8(3), 187-196.
- Nicorescu, I., Vial, C., Talansier, E., Lechevalier, V., Loisel, C., Della Valle, D., Riaublanc, A., Djelveh, G., Legrand, J. (2011). Comparative effect of thermal treatment on the physicochemical properties of whey and egg white protein foams. *Food Hydrocolloids*, 25 (4), 797-808.
- Orsini Delgado, M. C., Tironi, V. A., Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1752-1760.
- Ortiz, S. E. M., Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 35(6), 511-518.

Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins*. London: Longmans, Green and Co.

Panizzolo, L.A. (2005). *Modificación de proteínas por vía enzimática, Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos de hidrólisis*. (Tesis doctoral), Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay.

Panyam, D., Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in food science & technology*, 7(4), 120-125.

Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera Sánchez, C., Santiago, L. G., Rodríguez Patino, J. M. (2009). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1253-1262.

Perez, A. A., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Rubiolo, A. C., Santiago, L. G. (2012). Foaming characteristics of β -lactoglobulin as affected by enzymatic hydrolysis and polysaccharide addition: Relationships with the bulk and interfacial properties. *Journal of Food Engineering*, 113(1), 53-60.

Pérez, O. E., Carrera Sánchez, C., Pilosof, A. M. R., Rodríguez Patino, J. M. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 387-402.

Phillips, M. C., Evans, M. T. A., Graham, D. E., Oldani, D. (1975). Structure and properties of protein films adsorbed at the air-water interface. *Colloid and Polymer Science*, 253(5), 424-427.

Phillips, L. G. (2013). *Structure-function properties of food proteins*. San Diego, CA: Academic Press.

Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. En A. M. R. Pilosof, G. B. Bartholomai, *Caracterización estructural y funcional de proteínas*, (pp. 31-40). Buenos Aires: Eudeba.

Prins, A., Dickinson, E., Stainsby, G. (1988). Principles of foam stability. *Advances in food emulsions and foams*, 91-122.

Prud'homme, R. K. (1995). *Foams: Theory: Measurements: Applications* (Vol. 57). CRC Press.

Quiroga, A. V. (2008). *Globulina-P de amaranto. Análisis de estructura y homología con otras proteínas de reserva*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Quiroga, A. V., Martínez, E. N., Rogniaux, H., Geairon, A., Añón, M. C. (2010). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12957-12963.

Razumovsky, L., Damodaran, S. (1999). Surface activity-compressibility relationship of proteins at the air-water interface. *Langmuir*, 15, 1392-1399.

Rawel, H. M., Muschiolik, G. (1994). Effect of structural changes on foaming properties of soy proteins. *Food hydrocolloids*, 8(3), 287-298.

Renault, A., Pezennec, S., Gauthier, F., Vié, V., Desbat, B. (2002). Surface rheological properties of native and S-ovalbumin are correlated with the development of an intermolecular β -sheet network at the air-water interface. *Langmuir*, 18(18), 6887-6895.

Robert, P., Mangavel, C., Renard, D. (2001). Infrared spectroscopy as applied to glycinin film and gel formation kinetics. *Applied Spectroscopy*, 55(6), 781-787.

Rodríguez Niño, M. R., Sánchez, C. C., Fernández, M. C., Rodríguez Patino, J. M. (2001). Protein and lipid films at equilibrium at air-water interface. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(9), 873-879.

Rodríguez Niño, M. R., Carrera Sánchez, C., Ruíz-Henestrosa, V. P., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Milk and soy protein films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 417-428.

Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C., Molina Ortiz, S., Rodríguez Niño, M. R., Añón, M. C. (2004). Adsorption of soy globulin films at the air-water interface. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 1681-1689.

Rodríguez Patino, J. M., Conde, J. M., Linares, H. M., Jiménez, J. J. P., Sánchez, C. C., Pizones, V., Rodríguez, F. M. (2007). Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 21(5), 782-793.

- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Sánchez, C. C. (1999). Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: A rheokinetic study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(6), 2241-2248.
- Rullier, B., Axelos, M. A. V., Langevin, D., Novales, B. (2009). β -Lactoglobulin aggregates in foam films. Correlation between foam films and foaming properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336, 750-755.
- Rullier, B., Novales, B., Axelos, M. A. (2008). Effect of protein aggregates on foaming properties of β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 330 (2), 96-102.
- Salager, J. L., Andérez, J. M. y Forgiarini, A. (2003). Influencia de la formulación sobre las espumas. *Cuaderno Firp 263-A*. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Saunders, R. M., Becker, R. (1984). Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology (USA)*.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. P., Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. En O. Paredes-López, *Amaranth, Biology, chemistry and technology* (pp. 75-106). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L. E., Rodriguez-Nester, C. E., Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1553-1558.
- Sengupta, T., Damodaran, S. (1998). Role of dispersion interactions in the adsorption of proteins at oil-water and air-water interfaces. *Langmuir*, 14, 6457-6469.
- Sengupta, T., Razumovsky, L., Damodaran, S. (1999). Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption. *Langmuir*, 15 (20), 6991-7001.
- Serrien, G., Geeraerts, G., Ghosh, L., Joos, P. (1992). Dynamic surface properties of adsorbed protein solutions: BSA, casein and buttermilk. *Colloids and surfaces*, 68 (4), 219-233.

- Shen, B. W., Scanu, A. M. (1980). Properties of human apolipoprotein A-I at the air-water interface. *Biochemistry*, 19(16), 3643-3650.
- Sonin, A. A., Bonfillon, A., Langevin, D. (1994). Thinning of soap films: The role of surface viscoelasticity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 162(2), 323-330.
- Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., Añón, M. C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2471-2479.
- Sze, C. K. W., Kshirsagar, H. H., Venkatachalam, M., Sathe, S. K. (2007). A circular dichroism and fluorescence spectrometric assessment of effects of selected chemical denaturans on soybean (*Glycine max. L*) storage proteins glycinin (11S) and β -conglycinin (7S). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8745-8753.
- Tamm, F., Sauer, G., Scampicchio, M., Drusch, S. (2012). Pendant drop tensiometry for the evaluation of the foaming properties of milk-derived proteins. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 371-377.
- Tapia, M. E. (1997). *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación* (N° SB185. 7 T17 1997). FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).
- Tavano, O. L., da Silva Jr, S. I., Demonte, A., Neves, V. A. (2008). Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum L.*) seed meal or its protein fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 11006-11010.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Ivanov, I. B., Campbell, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123, 259-293.
- Tripp, B. C., Magda, J. J., Andrade, J. D. (1995). Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension, concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics. *Journal of Colloids and Interface Science*, 173, 16-27.
- Tu, A. T., & Tu, A. T. (1982). Raman spectroscopy in biology: principles and applications. Scientific Teaching Series.

- Utsumi, S., Damodaran, S., Kinsella, J. E. (1984). Heat-induced interactions between soybean proteins, Preferential association of 11S basic subunits and β subunits of 7S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(6), 1406-1412.
- Ventureira, J. L. (2009). *Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata.
- Ventureira, J. L., Martinez, E. N., Añón, M. C. (2012). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 272-279.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. D. M., Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132-136.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., Millán, F. (2000). Bioactive peptides in storage proteins. *Grasas y Aceites*, 51(5), 361-365.
- Vodjani, F. (1996). Solubility. En G. M. Hall, *Methods of testing protein functionality*, (pp. 11-60). London: Chapman.
- Wagner, J. R.. (2000). Propiedades superficiales. En Caracterización funcional y estructural de proteínas (41-74). Buenos Aires: Eudeba.
- Walker, J. M. (2002). Electrophoresis of proteins and peptides and detection in gels. En John M. Walker, *The Protein Protocols Handbook (2ed., Humana Press, 2002)*, (pp. 57). Totowa: Humana Press Inc.
- Walstra, P. (1989). Principles of foam formation and stability. En A. J. Wilson, *Foam, Physics, chemistry and structure*. (pp. 1-16). London: Springer-Verlag.
- Ward, A. F. H., Torday, L. (1946). Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects. *The Journal of Chemical Physics*, 14(7), 453-461.
- Weaire, D. L., Hutzler, S. (2001). *The physics of foams*. Oxford: Oxford University Press.
- Wei, A. P., Herron, J. N., Andrade, J. D. (1986). En B. J. A. Crommelin, H. Schellekens, *From Clone to Clinic*, (pp. 305). Amsterdam: Kluwer Academic.

- Wierenga, P. A., van Norél, L., Basheva, E. S. (2009). Reconsidering the importance of interfacial properties in foam stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 344(1), 72-78.
- Wierenga, P. A., Gruppen, H. (2010). New views on foams from protein solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(5), 365-373.
- Wilde, P. J. (2000). Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3), 176-181.
- Wilde, P. J., Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. *Methods of testing protein functionality*, 1, 110-152.
- Wright, D. J., Hemmant, J. W. (1987). Foaming properties of protein solutions: Comparison of large-scale whipping and conductimetric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(4), 361-371.
- Wüstneck, R., Krägel, J., Miller, R., Fainerman, V. B., Wilde, P. J., Sarker, D. K., Clark, D. C. (1996). Dynamic surface tension and adsorption properties of β -casein and β -lactoglobulin. *Food hydrocolloids*, 10(4), 395-405.
- Xu, S., Damodaran, S. (1992). The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air-water interface. *Langmuir*, 8(8), 2021-2027.
- Yu, M. A., & Damodaran, S. (1991). Kinetics of protein foam destabilization: evaluation of a method using bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9), 1555-1562.
- Yampolskaya, G., Platikanov, D. (2006). Proteins at fluid interfaces: adsorption layers and thin liquid films. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128, 159-183.
- Zhu, H., Damodaran, S. (1994). Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 846-855.
- Zuidema, H., & Waters, G. (1941). Ring Method for Determination of Interfacial Tension. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(5), 312-313.

