

Tesis de Posgrado

Propiedades funcionales y físico-químicas de las proteínas en relación a su comportamiento en las emulsiones alimenticias

Elizalde, Beatriz Emilia

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Elizalde, Beatriz Emilia. (1987). Propiedades funcionales y físico-químicas de las proteínas en relación a su comportamiento en las emulsiones alimenticias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2089_Elizalde.pdf

Cita tipo Chicago:

Elizalde, Beatriz Emilia. "Propiedades funcionales y físico-químicas de las proteínas en relación a su comportamiento en las emulsiones alimenticias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2089_Elizalde.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

"PROPIEDADES FUNCIONALES Y FISICO-QUIMICAS DE LAS PROTEINAS EN
RELACION A SU COMPORTAMIENTO EN LAS EMULSIONES ALIMENTICIAS"

Beatriz Emilia Elizalde

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Química

(Orientación Bromatología y Tecnología de Alimentos)

Director: Dr. Gualterio B. Bartholomai

-1987-

- 2089 -
y. 2

Agradecimientos

Al Dr. Gualterio B. Bartholomai por el apoyo y constante estímulo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana M.R. Pilosof, quien por la particular dedicación, apoyo incondicional y valiosa colaboración prestada con su asesoramiento durante todas las etapas de este trabajo, fue la guía certera que hizo posible la conclusión del mismo.

A la Dra. Rosa Jagus de Kanterewicz por la colaboración prestada en el tratamiento estadístico de los resultados experimentales.

Al Departamento de Industrias por haber permitido la realización del trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, la cual a través del otorgamiento de la beca hizo posible la realización de este trabajo.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Secretaría de Ciencia y Tecnología (Programa Nacional de Tecnología de Alimentos) por la financiación parcial de esta Tesis.

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| I. <u>OBJETIVOS</u> | 1 |
| II. <u>INTRODUCCION</u> | 7 |
| II.1. Teoría de la emulsificación | 7 |
| II.2. Mecanismos de desestabilización de emulsiones | 21 |
| II.2.1. Cremado | 22 |
| II.2.2. Floculación o agregación | 24 |
| II.2.3. Coalescencia | 28 |
| II.2.4. Maduración de Ostwald | 30 |
| II.2.5. Inversión | 32 |
| II.3. Métodos de emulsificación | 34 |
| II.4. Propiedades de emulsificación de las proteínas | 37 |
| II.5. Reología de emulsiones | 44 |
| II.5.1. Características reológicas generales de los fluidos | 45 |
| II.5.2. Propiedades de flujo de las disper- siones proteicas | 53 |
| II.5.3. Propiedades de flujo de las emulsiones | 56 |
| III. <u>PARTE EXPERIMENTAL</u> | 64 |
| III.1. Materiales | 64 |
| III.1.1. Proteínas | 64 |

| | Página |
|---|--------|
| III.1.2. Aceite | 68 |
| III.1.3. Carboximetilcelulosa (CMS) | 68 |
| III.2. Métodos para determinar las propiedades de emulsificación | 68 |
| III.2.1. Equipo para emulsificar | 68 |
| III.2.2. Preparación de las dispersiones proteicas | 70 |
| III.2.3. Determinación de la capacidad de emulsificación (CE) | 70 |
| III.2.4. Estandarización del método de determinación de la capacidad de emulsificación (CE) | 72 |
| III.2.5. Determinación de la estabilidad de las emulsiones | 76 |
| III.3. Determinación de las propiedades reológicas de las emulsiones y dispersiones proteicas | 77 |
| III.3.1. Determinación de las curvas de flujo | 77 |
| III.3.2. Determinación del umbral de fluencia (τ_0) de las emulsiones | 79 |
| III.4. Determinación de las propiedades funcionales y físico-químicas de las proteínas | 79 |
| III.4.1. Determinación de la capacidad de absorción de agua | 79 |

| | |
|--|----|
| III.4.2. Determinación de la capacidad de absorción de aceite | 80 |
|--|----|

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

| | |
|---|----|
| IV.1. Capacidad de emulsificación y estabilidad de emulsiones en relación a las propiedades físico- químicas de las proteínas usadas para su formu- lación | 83 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| IV.1.1. Relación entre las propiedades físico- químicas de las proteínas y la capacidad y eficiencia de emulsificación de las mismas | 83 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| IV.1.1.1. Efecto de la concentración de pro- teína sobre la capacidad y eficiencia de emulsificación | 83 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| IV.1.1.2. Relación entre la capacidad de absor- ción de agua y aceite de las proteínas y la capacidad y eficiencia de emul- sificación de las mismas | 89 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| IV.1.1.3. Correlación entre la capacidad de emulsificación, eficiencia de emulsi- ficación y el índice de absorción de agua y aceite | 99 |
|---|----|

| | Página |
|--|--------|
| IV.1.2. Relación entre las propiedades físico- químicas de las proteínas y sus habi- lidad para estabilizar emulsiones | 106 |
| IV.1.2.1. Relación entre la capacidad de ab- sorción de agua, de aceite y visco- sidad de la fase continua y la es- tabilidad de las emulsiones | 106 |
| IV.1.2.2. Modelos de regresión para predecir la desestabilización de emulsiones formuladas con proteínas de dife- rente origen | 111 |
| IV.1.3. Conclusiones | 118 |
| IV.2. Cinética de desestabilización de emulsiones formuladas con proteínas alimenticias de di- ferente origen | 123 |
| IV.2.1. Ecuación para describir el proceso de desestabilización en función del tiempo | 123 |
| IV.2.2. Cinética del proceso de desestabi- lización | 129 |
| IV.2.3. Conclusiones | 134 |
| IV.3. Efecto de la concentración de proteína y aceite y la temperatura de almacenamiento en | 138 |

| | Página |
|--|---------|
| la cinética de desestabilización de emul- siones formuladas con proteína de soja | |
| IV.3.1. Efecto de la concentración de pro- teína y aceite sobre el índice de inestabilidad y la velocidad de desestabilización | 138 |
| IV.3.2. Efecto de la temperatura sobre el índice de inestabilidad y la veloci- dad inicial de desestabilización | 164 |
| IV.4. Efecto de la concentración de aceite y pro- teína en los parámetros reológicos de emul- siones formuladas con proteína de soja | 168 |
| IV.4.1. Descripción matemática de las curvas de flujo | 168 |
| IV.4.2. Efecto de la concentración de pro- teína y de aceite sobre los paráme- tros reológicos (τ_0 , K , n , η_{app}) | 175 |
| IV.4.3. Conclusiones | 190 |
| V. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u> | 192 |
| VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 196 |

I. OBJETIVOS

Los alimentos proteicos de origen animal son o resultan caros en términos de requerimientos de tierra y precios de mercado. Debido a la necesidad que existe en todo el mundo de aumentar las proteínas en la dieta, particularmente en los grupos de bajos ingresos, se han prodigado numerosos esfuerzos para desarrollar alimentos proteicos de bajo costo. Esto ha conducido a que numerosos investigadores se hayan dedicado al estudio de las denominadas proteínas "no convencionales" tales como las provenientes de algas, granos, oleaginosas, levaduras, etc. (Mattil, 1971).

En el desarrollo de proteínas provenientes de esas fuentes el criterio primordial seguido para su elección ha sido el nutricional. Si bien esta es una importante característica, no es suficiente para garantizar la aceptabilidad de un producto alimenticio. En efecto la aceptabilidad de un producto nuevo depende de sus propiedades sensoriales (sabor, color, aroma y textura) las cuales a su vez están determinadas por las propiedades funcionales de los ingredientes usados para su elaboración. Por lo tanto, las nuevas proteínas a desarrollar deben poseer alta calidad nutricional y también adecuadas propiedades funcionales.

Entre las propiedades funcionales de las proteínas, las propiedades de emulsificación tienen especial importancia ya que son mu-

chas las emulsiones alimenticias en las cuales éstas podrían ser utilizadas. La mayoría de las emulsiones alimenticias son del tipo aceite en agua (el agua es la fase externa, continua o dispersante y el aceite o grasa la interna o dispersa), sin embargo debido a diferencias en composición y a problemas de estabilidad asociados a este tipo de emulsiones podemos distinguir tres tipos de emulsiones (Tabla 1).

Tabla 1

Emulsiones alimenticias

| | |
|----------------|--|
| aceite en agua | <ul style="list-style-type: none"> - Emulsiones cárnicas: salchichas, salchichones, mortadelas, paté, etc. - Emulsiones de baja viscosidad y contenido graso: leche, bebidas saborizadas - Emulsiones de alta viscosidad y contenido graso: mayonesa, aderezo para ensaladas, cremas, helados |
| agua en aceite | <ul style="list-style-type: none"> manteca margarina |

En las "emulsiones cárnicas" la función de la proteína es múlt-

multiple pues además de ser el agente emulsificante (que es la miosina), contribuye a la absorción de agua y grasa, dando la consistencia y textura típica del producto final. Las emulsiones cárnicas no constituyen emulsiones verdaderas, pues la grasa se encuentra en estado sólido, atrapada por una matriz semisólida formada por las proteínas.

Las emulsiones de alta viscosidad y contenido graso, tienen un contenido graso superior a 65% y un contenido proteico de 2%. En la mayonesa el agente emulsificante es la proteína del huevo y la lecitina. Como en el caso de las emulsiones cárnicas, los helados no son una emulsión verdadera aceite/H₂O sino que están formadas por 2 sistemas dispersos: una emulsión de aceite en agua y una dispersión de aire en agua (espuma). En las mismas las propiedades emulsionantes y espumantes son debidas a la caseína, la albúmina de huevo y las proteínas del suero de la leche.

Las emulsiones de baja viscosidad y bajo contenido graso poseen un contenido graso que oscila entre 2 a 25% y la concentración de proteína varía entre 2 a 3%. La leche es un ejemplo típico de este tipo de emulsión. Emulsiones alimenticias del tipo agua en aceite son mucho menos frecuentes (manteca y margarina).

Cada tipo de emulsión alimenticia requiere proteínas con diferentes propiedades de emulsificación debido a la diferente composición de las mismas y condiciones a las cuales será sometida durante el almacenamiento.

Proteínas de origen diferente varían ampliamente en sus propiedades emulsificantes lo que refleja diferencias en composición, conformación, rigidez estructural y carga neta. Debido probablemente a la diversidad de características de las proteínas, existe información limitada acerca de la relación entre la estructura de las mismas y su aptitud para actuar como agentes emulsificantes en los alimentos.

Otros factores, además de la proteína "per se", afectan las propiedades de emulsificación de las proteínas: concentración de proteína, pH, temperatura, método de emulsificación, sales, azúcares y lípidos.

El objetivo del presente trabajo fue:

- a) Estudiar la capacidad de emulsificación y la estabilidad de emulsiones aceite en agua formuladas con proteínas alimenticias de diferente origen (con énfasis en proteínas de soja) en relación a las propiedades físico-químicas de estas últimas.
- b) Estudiar la cinética de desestabilización de las emulsiones formuladas con dichas proteínas.
- c) Estudiar el efecto de la concentración de proteína, aceite y de la temperatura en la cinética de desestabilización de emulsiones formuladas con proteínas de soja.

d) Estudiar el comportamiento reológico de las emulsiones anteriores.

Se espera que los resultados sean de utilidad en el aspecto básico y aplicado. Estos contribuirán a un mayor conocimiento de la relación entre las propiedades moleculares de las proteínas y su función como agentes emulsificantes. Aportarán información respecto a los mecanismos involucrados en la desestabilización de emulsiones alimenticias.

Permitirán estimar cuantitativamente el efecto de la composición de la emulsión (concentración de proteína y aceite) y de la temperatura en la estabilidad de las mismas.

El conocimiento del comportamiento reológico de las emulsiones proporcionará información respecto de la estructura y estabilidad de las mismas. Desde el punto de vista práctico los parámetros reológicos son necesarios para el diseño de máquinas y operaciones industriales, así como también para controlar la calidad del producto terminado.

El conocimiento de las propiedades moleculares necesarias para asegurar adecuadas propiedades emulsificantes es desde el punto de vista tecnológico, muy importante ya que permite determinar el tipo de procesamiento al que debe someterse la proteína para lograr dichas características. Estos procesos pueden incluir la modifica-

ción de la estructura a través de la desnaturalización modifica
ciones químicas enzimáticas de la proteína

II. INTRODUCCION

II.1. Teoría de la emulsificación

Una emulsión es un sistema heterogéneo, formado por lo menos por un líquido inmiscible disperso íntimamente en otro en forma de gotas cuyo diámetro está comprendido entre 0,1 a 100 μm (Becher, 1965).

La fase que está presente en forma de gotas finamente divididas se denomina fase dispersa o interna; la fase que forma la matriz en la cual están suspendidas las gotas se denomina fase externa o continua.

El proceso de formación de una emulsión se realiza bajo condiciones de inestabilidad termodinámica debido a que dos líquidos inmiscibles tienden a permanecer en fases separadas, proceso este que es termodinámicamente favorable.

Para poder comprender dicho fenómeno es conveniente introducir en primer lugar el concepto de tensión superficial (γ), (o sea la tensión interfacial entre un líquido y un gas, por ejemplo aire/agua), que se define como la fuerza en dinas que actúa en cada punto y en todas las direcciones a lo largo de la superficie de un líquido, sobre una línea de 1 cm de longitud. Imagínese un proceso reversible en el cual se desea aumentar el área superficial, llevando las moléculas desde el seno del líquido a la su-

perficie (en contra de las fuerzas de atracción hacia adentro). El trabajo reversible a presión y temperatura constante, necesario para incrementar el área superficial y permitir que las moléculas de la masa líquida entren en esta interfase es igual a la variación de energía libre del sistema (dG_{pT}):

$$dG_{pT} = \gamma dA \quad (1)$$

donde: dA = variación del área superficial

Expresando la energía libre superficial como energía libre por unidad de superficie (G^S) resulta:

$$G^S = \gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A}\right)_{P,T} \quad (2)$$

de donde se deduce que γ puede definirse como la energía libre superficial para incrementar el área superficial en 1 cm^2 . Sus unidades son (Erg/cm^2). La tendencia de un líquido a contraerse puede entonces considerarse como una manifestación de esta energía libre, ya que un proceso espontáneo a P y T constantes debe ir acompañado por una disminución en la energía libre. La tensión superficial es numérica y dimensionalmente igual a la energía de superficie, por lo tanto puede considerarse que es una medida de la energía libre superficial. Análogamente el trabajo reversible necesario para agrandar la superficie de separación entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles,

se denomina energía libre interfacial y es numéricamente igual a la tensión interfacial (γ_i). Las unidades son las mismas que las de la tensión superficial. La misma es el resultado del desbalance que existe, en las fuerzas de interacción entre las moléculas, en la interfase. De acuerdo a la regla de Antonoff (1907), la tensión interfacial (γ_{AB}) entre dos líquidos A y B, con tensiones γ_A y γ_B respectivamente está dada por:

$$\gamma_{AB} = \gamma_B - \gamma_A \quad (3)$$

Puesto que las tensiones superficiales (y de interfase) son siempre positivas, la tensión de interfase es menor que la mayor de las dos tensiones superficiales, esto es debido a que la atracción mutua a través de la interfase entre las moléculas de ambos líquidos, tiende a reducir la atracción hacia el seno de las mismas. Cuando mayor es la atracción molecular entre dos líquidos menor es la tensión de interfase.

La tensión superficial e interfacial disminuyen al elevarse la temperatura, alcanzando un valor muy bajo al acercarse al punto crítico.

Para formar una emulsión un líquido es dispersado, en otro, dando lugar a que se formen un gran número de gotas pequeñas. Esto produce un aumento notable en el área superficial de la fase dispersa. Por ejemplo si una gota de 1 ml (superficie esféri-

ca = 4,83 cm² y diámetro = 1,24 cm), es dispersada para formar 2,39x10¹¹ gotas con diámetro de 2 μm, el área interfacial aumenta a 30.000 cm² o sea 6.210 veces (Schuster, 1981). Esto da lugar a que la energía libre superficial (dGs)_{PT} se incremente en una cantidad igual a γdA. Por lo tanto para producir una emulsión es necesario proporcionar un trabajo W = γdA. Sin embargo la energía requerida para formar la emulsión es mucho mayor. Esto es debido a la existencia de la presión de Laplace que se opone a la deformación de las gotas, paso previo para producir la fragmentación de las mismas en gotas más pequeñas (Walstra, 1983). Esta presión de Laplace es una consecuencia de la tensión interfacial y determina que la presión en el lado cóncavo de una superficie esférica sea mayor que del lado convexo por una cantidad:

$$P = \frac{2\gamma}{r} \quad (4)$$

donde r es el radio de una gota esférica. Este gradiente de presión (ΔP), es proporcionado al igual que el trabajo W = γ.A, por medio de agitación mecánica. Esta cantidad de energía mecánica necesaria para producir la emulsión puede ser disminuída en 10 o más veces por el agregado de los denominados agentes emulsificantes que disminuyen la tensión interfacial entre dos líquidos (Walstra, 1983).

Los agentes emulsificantes además de bajar la tensión interfacial y por lo tanto facilitar la formación de la emulsión, desarrollan barreras eléctricas y/o estéricas en la interfase, impidiendo de esta forma la reunión de las gotas de la fase dispersa para formar una fase continua.

Los agentes emulsificantes se caracterizan por poseer una estructura anfifílica conteniendo en su molécula una porción hidrofóbica o lipofílica y una porción hidrofílica o lipofóbica.

Esta estructura permite a los agentes emulsificantes orientarse en la interfase aceite/agua, con su parte hidrofílica hacia el agua y la parte hidrofóbica hacia la fase aceite. Esta interacción entre los grupos hidrofílicos del agente emulsificante y las moléculas de agua y la parte hidrofóbica y las moléculas de aceite es la que produce la disminución de la tensión interfacial y permite la adsorción del emulsificante en la interfase. Este proceso conduce a la formación de un film interfacial constituido por las moléculas del agente emulsificante.

La relación entre la cantidad de emulsificante adsorbido en la interfase (aceite/agua; agua/aire) y la variación de la tensión interfacial (superficial) con la concentración del agente emulsificante está dada por la ecuación de Gibbs:

$$\Gamma_2 = - \frac{a_2}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial a_2} \right)_T \quad \circ$$

$$\Gamma_2 = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma_i}{\partial \ln a_2} \right)_T \quad (5)$$

donde:

γ_i : tensión superficial o interfacial

a_2 : actividad del emulsificante en la solución

Γ_2 : exceso superficial

Este se define como el número de moléculas de agente emulsificante por unidad de área interfacial, presentes en la interfase en exceso respecto de las que existen en el seno de la solución donde está disuelto el agente emulsificante. Para el caso de adsorción de macromoléculas tales como proteínas, a partir de soluciones diluídas, Γ_2 es la concentración del agente emulsificante medida en la interfase y la actividad es igual a la concentración o sea $a_2 = c_2$, con lo cual la expresión (5) resulta:

$$\Gamma_2 = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma_i}{\partial \ln c_2} \right)_T \quad (6)$$

Como Γ_2 es siempre positivo para los agentes emulsificantes $\left(\frac{\partial \gamma_i}{\partial \ln c_2} \right)_T$ ó $\left(\frac{\partial \gamma_i}{\partial c_2} \right)_T$ debe ser negativo o sea que la tensión interfacial o superficial disminuye al aumentar la concentración del agente emulsificante.

Este proceso por el cual los agentes emulsificantes se adsorben en la interfase y disminuyen la tensión interfacial (acei-

te/H₂O) o la tensión superficial (agua/aire) comprende 3 etapas (Schuster, 1981): una primera etapa (A) en que las moléculas se orientan y adsorben en la interfase, produciendo una gran disminución de la tensión superficial (interfacial) (Fig. 1); una segunda etapa (B) en la cual la adición de más agente emulsificante da lugar a que la superficie del agua o la interfase aceite/agua se cubra completamente con una monocapa del agente emulsificante. En esta zona la reducción de la tensión superficial (interfacial) es directamente proporcional al ln de la concentración del agente emulsificante o sea el exceso superficial es constante y alcanza su máximo valor (ver ec. (5)). Por último una tercera etapa (C) en que la adición de más agente emulsificante no produce prácticamente cambio en la tensión superficial (interfacial). La concentración en la que ocurre esto se denomina concentración crítica micellar (CCm). Pasada dicha concentración las moléculas del emulsificante, no encuentran espacio libre en la interfase aceite/agua o agua/aire y por lo tanto permanecen en el agua orientándose para dar lugar a una condición termodinámicamente más favorable. Las partes lipofílicas se asocian y las hidrofílicas se orientan hacia el agua formándose las micellas (Fig. 1).

Los emulsificantes pueden ser clasificados de acuerdo a:

- a) su carga eléctrica en sistemas acuosos
- b) su solubilidad

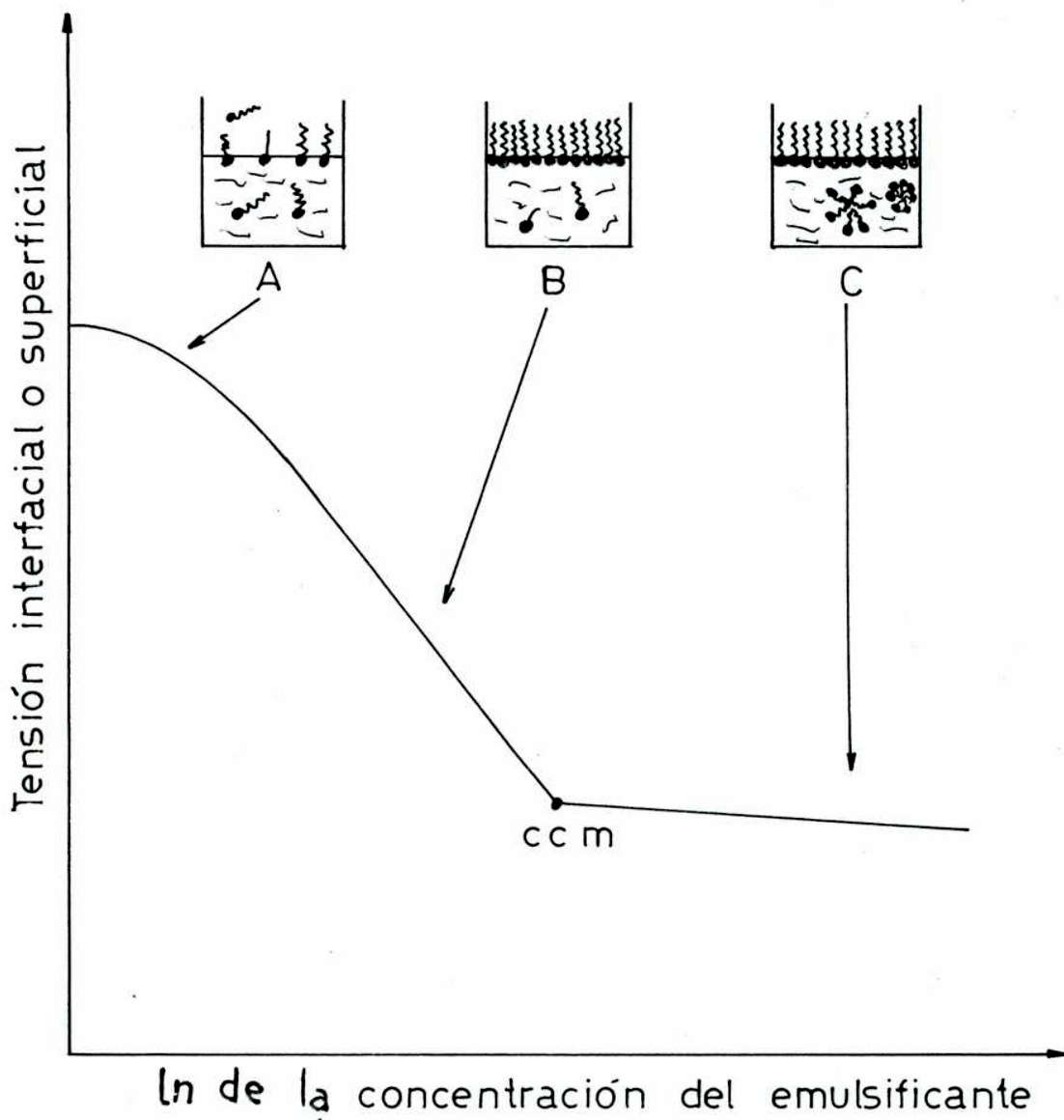


Figura 1: Mecanismo de actividad interfacial de los emulsificantes (Schuster, 1981)

- c) la relación que existe entre los grupos hidrofílicos y lipofílicos
- d) los grupos funcionales por los que están formados

De acuerdo a su carga eléctrica se subclasifican en iónicos (catiónicos, aniónicos, anfotéricos) y no iónicos. En la Tabla 2 se muestran cuáles son los grupos químicos responsables de la actividad superficial (interfacial) en cada caso (Schuster, 1981).

Esta clasificación tiene interés desde el punto de vista práctico, ya que el grupo que sea responsable de la actividad superficial (interfacial), va a determinar el rango de pH en que los mismos pueden usarse y por lo tanto el sistema en el cual los mismos son efectivos como tensioactivos.

En la Fig. 2 se muestra la actividad superficial de los diferentes tipos de emulsificantes en función del pH. Los emulsificantes aniónicos son efectivos en la zona alcalina, los catiónicos en la zona ácida, los anfotéricos, como forman iones positivos y negativos en agua son efectivos en todo el rango de pH, salvo en la zona del pH isoeléctrico. Los emulsificantes no iónicos son efectivos en todo el rango de pH puesto que no forman iones en agua.

Para propósitos tecnológicos, es muy útil la clasificación de los agentes emulsificantes, de acuerdo a la relación

Tabla 2

Clasificación de los agentes emulsificantes de acuerdo a su carga eléctrica en sistemas acuosos (Schuster, 1981)




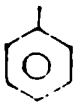

| Grupos lipofílicos terminales | Grupos hidrofílicos intermedios | Grupos hidrofílicos terminales | Tipo |
|---|---|---|---------------------------|
|  | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---} \end{array}$ grupo hidroxilo | -COO- carboxilato | emulsificantes aniónicos |
| residuo alquílico | -COO- grupo ester | -SO ₃ sulfonato -OPO ₃ ²⁻ fosfato -OSO ₃ ⁻ sulfato lactato citrato tartrato | |
|  | -SO ₂ NH- grupo sulfamida | | |
| residuo alquilo no saturado | -CONH- grupo amida -(-CONH-) _n - grupo poliamida | $\begin{array}{c} \text{---NH}_3^+ \\ \\ \text{---N}^+ \text{---} \\ \end{array}$ sal de amina compuesto de amonio cuaternario | emulsificantes catiónicos |

Tabla 2 (continuación)

| | | | |
|--|--|--|-----------------------------------|
|  <p>residuo alquilo ramificado</p> | <p>-N= grupo amino</p> <p>--(-NH-)_n grupo poliamina</p> <p>-O- grupo éter</p> <p>--(-O-)- polietéer</p> <p>glicerol</p> <p>sorbitol</p> | <p>COO- +NH₃</p> <p>anfólito</p> <p>COO- N⁺</p> <p>betaina</p> | <p>emulsificantes anfotéricos</p> |
| <p>residuo arilo</p>  <p>residuo alquil-arilo</p>  | <p>emulsificantes no iónicos</p> | | |

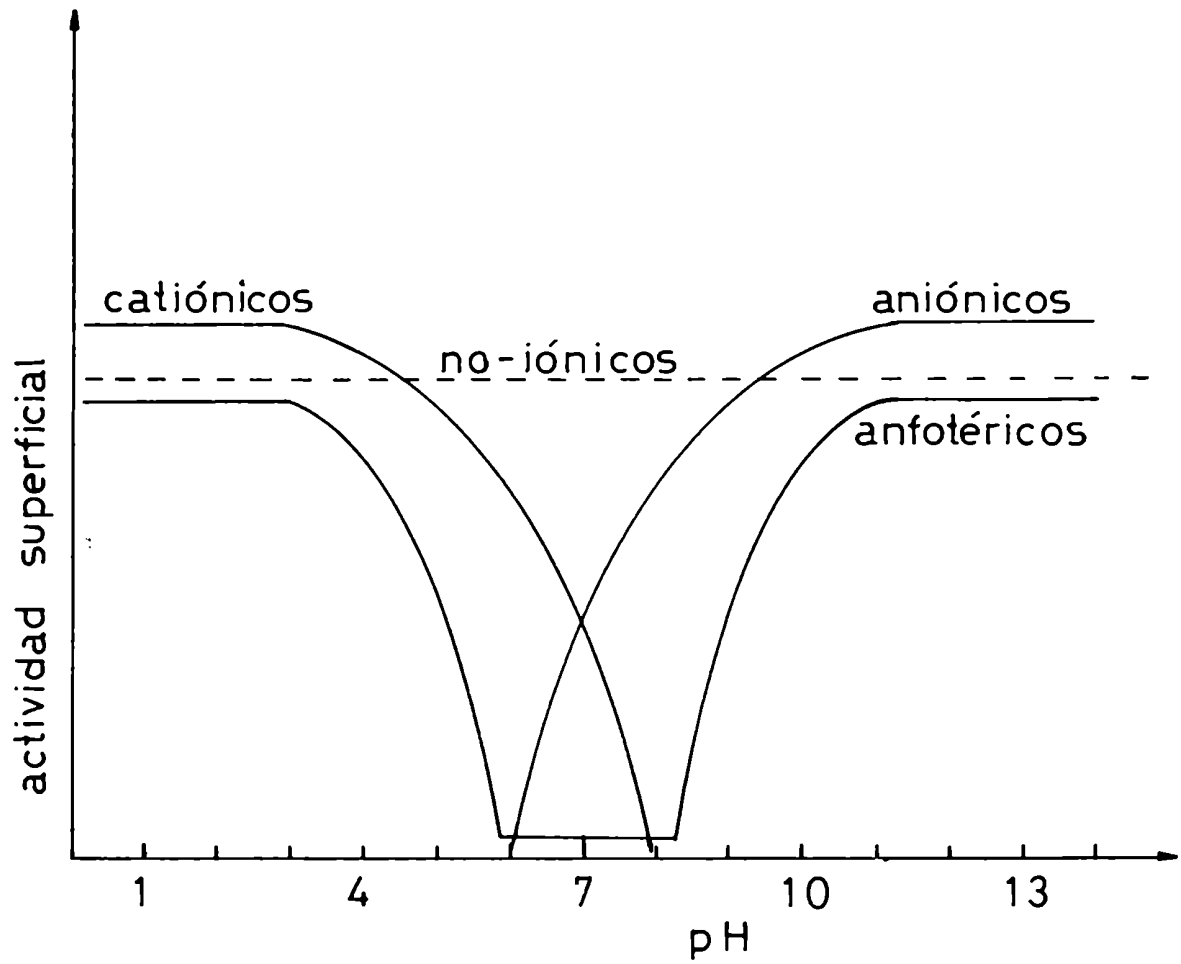


Figura 2: Actividad interfacial de diferentes tipos de emulsificantes en función del pH (Schuster, 1981)

entre los grupos hidrofílicos y lipofílicos que presentan. La aptitud para estabilizar un dado sistema disperso, está determinada por la relación entre las características lipofílicas e hidrofílicas que posea el agente emulsificante. El valor óptimo de dicha relación va a depender de la aplicación particular a que se lo destine. Esto fue cuantificado por Griffin (1949), quien introdujo una escala semiempírica para seleccionar el emulsificante más eficiente. Esta escala se denomina balance hidrofílico-lipofílico (BHL) y es una medida de la atracción relativa simultánea del emulsificante por el agua y el aceite (o sea del % relativo de los grupos hidrofílicos a lipofílicos). Luego de un gran número de experimentos, Griffin, le asignó a los agentes emulsificantes valores de BHL. Usando una escala que va de 1 a 20, desde el más lipofílico al más hidrofílico, asignó, en forma arbitraria, el valor 1 al ácido oleico y el 20 al oleato de sodio. Becher (1965) y Sherman (1968) resumieron varios métodos para evaluar el BHL. El valor del BHL es una medida de la aplicación potencial del emulsificante. En la Tabla 3 se muestran los valores de BHL de emulsificantes, su aplicación potencial de acuerdo al valor del mismo y su comportamiento en agua (Schuster, 1981).

Un ejemplo de la aplicación del concepto de BHL lo constituyen los trabajos de Van Eerd (1971) y Aoki y col. (1981). Van Eerd trabajó con emulsiones cárnicas de salchichas y asignó números de BHL a las diferentes fracciones de proteínas cárnicas y

Tabla 3

Valores de BHL de diferentes agentes emulsificantes (Schuster, 1981)

| Balace BHL | Comportamiento en agua | Campo de aplicación |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | | 1 agentes |
| 2 | | 3 antiespumantes |
| 4 | leve dispersión | emulsiones agua/aceite |
| 6 | | 6 |
| 8 | dispersión lechosa | 7 agentes 8 |
| 10 | dispersión lechosa estable | 9 mojantes |
| 12 | | emulsiones |
| 14 | | 13 detergentes aceite/agua |
| 16 | | 15 solubilizantes |
| 18 | | 18 18 |
| 20 | | |

números BHL "requeridos" a las grasas animales (El número BHL "requerido" de un dado aceite indica el número BHL del emulsificante que da la estabilidad máxima de la emulsión aceite/agua). Usando el método de Griffin (1949) determinó que, el número BHL "requerido" de numerosas grasas animales era de 14 ± 1 a 55°C . El número BHL de las diversas fracciones proteicas oscilaba entre 13 y 14,6. El agregado de emulsificantes no iónicos (Tween, Span) aumenta la estabilidad de la emulsión cárnica, sólo cuando el emulsificante tiene un número BHL mayor que 15. Un trabajo similar fue efectuado por Aoki y col. (1981), pero trabajando con emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas de soja.

Las proteínas son emulsificantes iónicos (polielectrolitos) anfotéricos. A un dado pH, el balance existente entre las cargas positivas y negativas da lugar a que la molécula de proteína posea una gran cantidad de cargas, pero que la carga neta sea muy pequeña. Cuando la carga neta es cero la molécula se encuentra en el pH isoeléctrico.

II.2. Mecanismos de desestabilización de emulsiones

El proceso de desestabilización de una emulsión va acompañado de ciertas modificaciones que se manifiestan en las propiedades físicas y macroscópicas de la misma. Básicamente cuatro son los mecanismos por los cuales la estructura de una emulsión puede

cambiar:

- a) cremado/sedimentación
- b) floculación o agregación
- c) coalescencia
- d) maduración de Ostwald

II.2.1. Cremado: Este proceso conduce a la formación de un gradiente de equilibrio en la concentración de las gotas de aceite dentro de la emulsión, sin cambio en el número, tamaño y forma de las gotas. El resultado final de este proceso es la formación de dos emulsiones, una que es más rica y otra que es más pobre en aceite que la emulsión original. Si la fase dispersa es más densa que la fase continua, la emulsión más rica en la primera, se deposita en el fondo (sedimentación); por el contrario si la fase dispersa es menos densa que la continua (como es el caso de las emulsiones aceite en agua), se ubica en la parte superior (cremado). Un ejemplo típico de cremado lo constituye la separación de la crema en la leche no homogenizada.

Este fenómeno se produce por la acción de fuerzas externas (gravitatorias, eléctricas, centrífugas, etc.) que actúan sobre el sistema. Debido a que las gotas de la fase dispersa conservan su identidad, el proceso es reversible y la simple agitación puede restaurar la emulsión original.

Suponiendo que las gotas de aceite son esferas no deformables y que no interactúan con las demás, la velocidad de cremado (V) puede ser obtenida igualando la fuerza gravitatoria con la fuerza hidrodinámica dada por la ley de Stokes:

$$v = \frac{2 \Delta\rho g r^2}{\eta_o} \quad (7)$$

donde:

r = radio de la gota

$\Delta\rho$ = diferencia de densidades entre la fase continua (ρ_o)
y dispersa (ρ_i) = ($\rho_o - \rho_i$)

g = aceleración de la gravedad

η_o = viscosidad de la fase continua

En muchos casos de interés práctico el objetivo es disminuir la velocidad de cremado. La ecuación (7) indica que esto puede ser logrado aumentando la viscosidad de la fase continua (η_o) o disminuyendo la diferencia de densidades ($\Delta\rho$). Lo primero puede ser logrado por la adición de los denominados "agentes espesantes" o "gelificantes" tales como polímeros de alto peso molecular (hidrocoloides) o partículas (sílica, arcilla). Lo segundo por la adición de un solvente adecuado a la fase continua de forma tal que $\Delta\rho$ disminuya.

Debido a que las gotas de aceite pueden deformarse, a

///

que existe una distribución de tamaño de gota y se producen interacciones mutuas, las emulsiones se alejan del comportamiento ideal. La ecuación (7), por lo tanto debe modificarse, para contemplar dichas situaciones (Tadros y Vincent,1983).

Otro factor que también afecta la velocidad de cremado, es que simultáneamente con el cremado, puede producirse floculación y/o coalescencia. En el caso que el proceso que ocurra sea la floculación, como los agregados que se forman se comportan como una unidad, la velocidad de cremado aumenta.

Si además las gotas coalescen, el tamaño medio de las gotas aumenta y por lo tanto la velocidad de cremado, también se incrementa.

II.2.2. Floculación o agregación

Este proceso tampoco produce cambio en el tamaño y número de gotas, pero conduce a la formación de agregados de gotas dentro de la emulsión. En cada agregado las gotas conservan su identidad.

La velocidad con que se produce este proceso depende del balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas que existen entre las partículas. Este balance es la base de la teoría conocida como DLVO propuesta independientemente por Derjaguin-Landau y luego por Verwey-Overbeek (Tadros y Vincent,1983) para explicar la

estabilidad de coloides. Esta teoría fue aplicada posteriormente por diversos investigadores para explicar el proceso de floculación de una emulsión.

Las fuerzas repulsivas de origen electrostático son estabilizantes ya que tienden a mantener a las gotas separadas. Las cargas eléctricas presentes en las gotas de las emulsiones se pueden originar por ionización, adsorción o contacto por fricción (Petrowsky, 1976). En la ausencia de agentes emulsificantes las cargas se originan por el último mecanismo mencionado. La razón de esto es que cuando una sustancia es puesta en contacto con otra, que posee una constante dieléctrica diferente, adquiere una carga, cuyo signo depende de la magnitud relativa de las constantes dieléctricas. Para el caso aceite-agua, como el aceite posee una constante dieléctrica menor que el agua resulta cargada positivamente.

Esto da lugar (Petrowsky, 1976), a la posibilidad de la existencia de una doble capa eléctrica a cada lado de la interfase aceite/agua.

Van den Tempel (1953) estudió la caída de potencial a través de la interfase aceite-agua en ausencia de agentes emulsificantes, en presencia de agentes emulsificantes iónicos y en presencia de estos últimos pero con la adición de electrólitos a la fase acuosa. En ausencia de agentes emulsificantes si bien la caída de potencial

es apreciable a ambos lados de la interfase, la menor caída de potencial se produce en la fase acuosa (externa). Esto explica porqué tales sistemas son sumamente inestables y muestran gran tendencia a agregarse y coalescer.

La adición de un agente emulsificante que se concentra en la interfase, modifica marcadamente la distribución de potencial de la doble capa eléctrica. En efecto si bien la diferencia de potencial entre el interior de las dos fases no cambia, la mayor parte de la carga se concentra en la fase acuosa, dando lugar a un potencial zeta suficientemente alto como para que resulte una emulsión aceite/agua estable. Por otro lado si a la fase acuosa se le adiciona un electrólito, parte de la carga de la doble capa eléctrica, del lado acuoso, es neutralizada por los iones del electrolito de carga opuesta a los del agente emulsificante. Por lo tanto la caída de potencial del lado de la fase acuosa disminuye produciendo un valor menor en la energía de repulsión y la emulsión se torna menos estable.

La principal fuente de la energía potencial de atracción entre las gotas es debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals o fuerzas de dispersión de London. Aunque son de corto alcance respecto a los átomos considerados individualmente, cuando se efectúa la suma sobre todos los átomos que forman las gotas, son fuerzas de largo alcance. La expresión de la misma es la siguiente:

$$V_A = - A a_o / 6 H_o \quad (8)$$

Donde V_A = Energía potencial de atracción

A = es la constante de Hamaker

a_o = es el tamaño de la gota y H_o es la distancia entre la superficie de las gotas.

Así cuanto mayor es el tamaño de las gotas menos estable es la emulsión.

La energía total de interacción (V), será la suma de la energía potencial de repulsión (V_R) y la energía potencial de atracción (V_A) o sea:

$$V = V_A + V_R$$

El valor de dicha energía neta de interacción (V) se modifica de acuerdo al tamaño de las gotas y la fuerza iónica del medio. Así a altas fuerzas iónicas predomina la energía de atracción (no existe casi repulsión).

En conclusión para lograr la estabilidad máxima respecto a la floculación, la energía potencial de repulsión (V_R) debe ser aumentada y la de atracción (V_A) minimizada de forma de obtener el máximo valor de V posible.

///

II.2.3. Coalescencia

En el proceso de coalescencia, las gotas dentro de cada agregado en el seno de la fase continua o en la capa cremada se unen para formar gotas de mayor tamaño. Esto produce un cambio en la distribución inicial de tamaño de gota y una disminución en el número de las mismas. Este proceso es irreversible y el resultado final del mismo es la separación de la emulsión en las dos fases que la forman o sea la ruptura de la emulsión. El proceso de coalescencia involucra la eliminación del delgado film de líquido de fase continua o la ruptura del film interfacial que separa las gotas dependiendo de si el proceso de emulsificación se ha llevado a cabo en ausencia o presencia de un agente emulsificante.

El proceso de coalescencia va a estar determinado por el comportamiento del film interfacial de agente emulsificante. Para ello es necesario considerar dos aspectos: 1) La naturaleza de las fuerzas que actúan a través del film (que determinan cuando el film es estable, metaestable o inestable), 2) Los aspectos cinéticos asociados con las fluctuaciones locales (térmicos o mecánicos) del espesor del film.

De acuerdo a Phillips (1981), la condición de equilibrio que debe cumplirse para que el film sea estable es que la suma de las fuerzas actuantes en la interfase sea cero.

La condición de equilibrio (Phillips, 1981) está dada por la siguiente ecuación:

$$\pi_V + \pi_E + \pi_H + \pi_S = 0 \quad (9)$$

Donde π_V está determinada por la fuerza de atracción (Van der Waals) entre las 2 caras del film; π_H es la fuerza debida a la presión hidrostática. Estas dos fuerzas son negativas y actúan adelgazando el film hasta su ruptura. π_E y π_S son la repulsión electrostática y estérica respectivamente entre las dos superficies del film, ambas son positivas y se oponen al adelgazamiento del film.

Cuando se cumple la ecuación anterior el film está en un estado metaestable y la ruptura del film depende de la existencia de perturbaciones externas, tales como golpe térmico o vibración.

En una emulsión estabilizada por proteínas, cuando los términos π_E y π_S son insuficientes para compensar las fuerzas de atracción, el film tiende a disminuir de espesor, hasta un valor crítico en el que se produce la ruptura del mismo.

En la zona del pH isoeléctrico de la proteína, $\pi_E + \pi_S$ es mínima por lo tanto la estabilidad del film está en su valor mínimo y las gotas coalescen.

Sin embargo existen otros factores además del

pH que deben ser tenidos en cuenta para explicar el rol de las proteínas en estabilizar emulsiones, por formación de un film interfacial: la concentración de iones que pueden modificar la carga superficial y/o establecer uniones intramoleculares, la presencia de agentes oxidantes o reductores que afectan el enlace S-S y las dimensiones moleculares, el balance entre los grupos hidrofílicos y lipofílicos, etc.

Phillips (1981) también demostró que las características mecánicas del film interfacial juegan un rol importante. Así pese a que en el pH isoeléctrico η_E y η_S son mínimos, la viscosidad y el módulo de elasticidad del film son máximos en dicho pH, por lo tanto el film es estable y no se produce su ruptura.

II.2.4. Maduración de Ostwald

Esta es una forma alternativa por la cual el tamaño medio de gota puede cambiar, además del proceso ya mencionado de coalescencia. El mismo tiene lugar si los dos líquidos que forman la emulsión son parcialmente miscibles y la emulsión es polidispersa (hay gotas de tamaños diferentes). En toda la discusión previa hemos considerado que los líquidos son totalmente inmiscibles, pero esto es una situación hipotética ya que todos los líquidos, aún los considerados inmiscibles, muestran una cierta solubilidad mutua. Si la emulsión es monodispersa (todas las gotas

tienen igual tamaño), el hecho que los líquidos sean parcialmente miscibles no produce ningún efecto en la estructura de la emulsión. Sin embargo si la emulsión es polidispersa, se forman gotas más grandes a expensas de las más pequeñas debido al proceso conocido como maduración de Ostwald. Este proceso se va a producir hasta que el sistema llegue a un estado de equilibrio, en el que todas las gotas alcancen el mismo tamaño.

El fenómeno de maduración de Ostwald se produce debido a que en un sistema polidisperso las gotas de menor tamaño son más solubles que las de mayor tamaño por el efecto de la curvatura sobre la energía libre superficial.

En síntesis el proceso de maduración de Ostwald está asociado con la diferencia de potenciales químicos que existe entre gotas de diferente tamaño (Tadros y Vincent, 1983).

La mayor dificultad que se presenta en el estudio del proceso de desestabilización de una emulsión es la separación de los cuatro procesos mencionados anteriormente: cremado, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald. Indudablemente en un sistema real los cuatro procesos ocurren simultáneamente o en forma secuencial en cualquier orden. La forma en que esto ocurre depende de la relación que exista entre las constantes de velocidad de los cuatro procesos mencionados. La velocidad del proceso como un todo va a estar determinada por la velocidad del proceso más lento. La única excepción es que la coalescencia es la

etapa que siempre sigue a la floculación o cremado; sin embargo las constantes de velocidad de los cuatro procesos no son independientes, ya que, por ejemplo la velocidad con que se produce la sedimentación (cremado) va a depender del grado de floculación, coalescencia y maduración de Ostwald alcanzado.

II.2.5. Inversión

La inversión es otra forma por la cual la estructura de una emulsión puede cambiar y consiste en la transformación de una emulsión aceite/agua en otra agua/aceite o viceversa. Esto se produce por cambios de temperatura o concentración de algunos de los componentes de la emulsión.

De acuerdo a Tadros y Vincent (1983) no es correcto incluir este proceso como un mecanismo de ruptura de la emulsión separado de los otros cuatro mencionados. En primer lugar no es un proceso único sino que está compuesto de otros, principalmente coalescencia y maduración de Ostwald. En segundo lugar se puede decir que la emulsión no sufre una ruptura en el sentido generalmente aceptado de la palabra, ya que se forma una emulsión nueva, cuyo estado de dispersión puede en ciertos casos ser más alto que el de la emulsión original (Tadros y Vincent, 1983).

El ejemplo típico de inversión lo constituye la transformación de la crema (emulsión aceite/agua) en manteca (emul-

si3n agua/aceite). La tendencia de una emulsi3n a invertirse, depende de la fracci3n en volumen de la fase dispersa y de la concentraci3n del agente emulsificante.

El proceso en general no es espont3neo, requiriendo grandes cantidades de energía mec3nica.

Las primeras teorías de inversi3n de fase postulaban que la inversi3n se producía como consecuencia de la dificultad de empaquetamiento de las gotas de la fase dispersa cuando la fracci3n en volumen de esta última superaba un cierto valor. De acuerdo a Ostwald (1910) un conjunto de esferas rígidass de igual radio están empaquetadas lo más densamente posible; cuando ocupan un volumen igual a 74% del volumen total (fracci3n en volumen $\phi = 0,74$). Por lo tanto cualquier incremento en la fracci3n en volumen de la fase dispersa encima de este valor, ocasionará una distorsi3n de las gotas, ruptura e inversi3n de la emulsi3n. Numerosas investigaciones han demostrado que dicho argumento no es cierto. Por ejemplo Sherman (1968) ha demostrado que la fracci3n en volumen de aceite a la cual ocurre la inversi3n depende de la naturaleza y concentraci3n del agente emulsificante. Las principales limitaciones de la teoría de Ostwald es que la misma se aplica solamente para el caso de esferas rígidass no deformables y de igual tamaño. Las gotas de una emulsi3n aunque resistentes a la deformaci3n, son en general de tamaños diferentes. La amplia distribuci3n de tamaños de gotas presentes en una emulsi3n hace posible alcan-

zar una fracción en volumen de fase dispersa mayor debido a que las gotas más pequeñas pueden ubicarse en los intersticios que quedan entre las gotas de mayor tamaño. Si a esto se adiciona el hecho que las gotas pueden adquirir forma poliédrica, es aún posible un empaquetamiento más denso.

II.3. Métodos de emulsificación

Durante la formación de una emulsión un líquido es dispersado en otro por aplicación de energía. Las fases que forman una emulsión pueden ser puestas juntas en diversas formas: el agua puede ser agregado al aceite o viceversa; ambas fases pueden ser introducidas simultáneamente, el agua y el aceite pueden introducirse en forma alternada.

El emulsificante puede disolverse en ambas fases o en una sola. Generalmente las emulsiones aceite/agua se preparan más fácilmente por adición de aceite a la fase acuosa y las emulsiones agua/aceite por agregado de agua a la fase aceite.

El factor que más afecta la distribución de tamaño de gota es la intensidad y el medio por el cual se produce la agitación. El aumento de temperatura facilita la emulsificación porque disminuye la tensión interfacial y la viscosidad.

De acuerdo a Gopal (1968) el proceso de emulsificación comprende 3 etapas:

- a) La ruptura de una interfase plana para dar "hebras" de un líquido en otro.
- b) La ruptura de un "jet" de uno de los líquidos en el otro.
- c) La fragmentación de gotas de gran tamaño en gotas más pequeñas como las que se encuentran presentes en una emulsión.

Durante el proceso de emulsificación el proceso es turbulento. Los procesos a) y c) ocurren consecutivamente cuando el aceite y el agua son colocados juntos y agitados manualmente en un recipiente cerrado. Sin embargo no existe una división neta entre los diferentes mecanismos. La agitación vigorosa e intermitente efectuada manualmente da lugar a emulsiones polidispersas y con gran tamaño de gota (el menor tamaño de gota obtenido varía en el rango de 20-50 μm). Para preparar emulsiones finamente dispersas es necesario recurrir al uso de los denominados equipos para emulsificar o "emulsores".

Existen diversas maquinarias con tal fin pero los de uso más comun son(Dickinson y Stainsby, 1982);

- a) Homogenizador de alta presión: Los líquidos son dispersados forzando a la mezcla de líquidos a pasar a través de un pequeño orificio (ancho 15-300 μm) bajo elevada presión (4-40 MN m^{-2}). Este tipo de equipo es usado para transformar gotas de gran tamaño en más pequeñas (diámetro < 1 μm) y también para obtener emulsiones monodispersas.

La aplicación más conocida es la reducción del tamaño de los glóbulos de grasa en la leche.

- b) Molino coloidal: Los líquidos son dispersados en una estrecha abertura (100 μm) ubicada entre la superficie de un estator y un rotor que gira a alta velocidad (10^3 - 10^4 min^{-1}). Las altas velocidades de flujo que se alcanzan entre el rotor y el estator son las que producen la dispersión en forma de gotas pequeñas de un líquido en otro. El tamaño menor de gota que puede obtenerse con este equipo es 2 μm .
- c) Agitadores simples: Abarcan los agitadores a propulsión y los agitadores a turbina. La emulsificación usando estos equipos es más efectiva que la agitación manual pero menos efectiva que la lograda con un molino coloidal o un homogenizador de alta presión. El diámetro medio de las gotas es del orden de 5 μm .
- d) Emulsificadores ultrasónicos: En este tipo de emulsores una corriente de líquido es impulsado sobre una delgada lámina de metal, la cual es puesta a vibrar a alta frecuencia (20 K Hz). Las oscilaciones producidas en esta forma se transmiten al líquido produciéndose de esta forma la ruptura de la corriente lí-

quida en pequeñas gotas.

El hecho que la energía ultrasónica se concentre en un extremo de la lámina, hace que esta máquina sea más eficiente comparada con los homogenizadores a alta presión. Las gotas producidas tienen tamaños menores a $0,1 \mu\text{m}$, no obstante se obtiene una distribución de tamaño de gota bastante amplio.

II.4. Propiedades de emulsificación de las proteínas

La aptitud de las proteínas y otros agentes emulsificantes se caracteriza a través de dos propiedades fundamentales: la capacidad de emulsificación y la estabilidad. Mientras que la primera representa la máxima cantidad de aceite que puede emulsificar un dado emulsificante, la segunda indica la aptitud del mismo para mantener la emulsión estable en el tiempo. Desde el punto de vista práctico, esta última es sin duda la propiedad más importante.

a) Capacidad de emulsificación

El método más comúnmente usado para evaluar la capacidad de emulsificación de proteínas es el desarrollado por Swift y col. (1961). Consiste básicamente en la adición continua de aceite o grasa fundida a la dispersión proteica con agitación simultánea, hasta que se produce la inversión de la emulsión, lo que

se detecta por la disminución brusca de la viscosidad. Numerosas modificaciones de este método han sido usadas por otros investigadores. Estas se diferencian en la velocidad de agregado del aceite, volumen de la dispersión proteica usada, velocidad de agitación y forma de detectar el punto final (Carpenter y Saffle, 1964; Pearson y col., 1965; Ivey y col., 1970; Webb y col., 1970; Crenwelge y col., 1974; Quaglia, 1980).

La mayoría de las condiciones usadas para evaluar la capacidad de emulsificación han sido elegidas arbitrariamente por los diferentes investigadores, por lo cual la comparación de los valores de la capacidad de emulsificación obtenidos por los mismos es dificultosa.

b) Estabilidad

Diferentes métodos han sido usados para evaluar la estabilidad de las emulsiones. Algunos implican el calentamiento de la emulsión a 80°C durante 15 minutos seguido de centrifugación. La cantidad de aceite separada, es una medida de la estabilidad; cuanto más aceite se separa menos estable es la emulsión (Inkelaar y Fortuin, 1969).

Este método fue modificado por Yatsumatsu y col. (1972a) en su estudio sobre la estabilidad de emulsiones formuladas con diferentes derivados de soja, quienes cambiaron las condiciones del

calentamiento y/o centrifugación; en lugar de definir la estabilidad como la cantidad de aceite separada, la definieron como el porcentaje de la fase emulsificada remanente después de la centrifugación.

Pearson y col. (1965) usaron otro procedimiento para evaluar la estabilidad de las emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteinato de soja, caseinato de sodio y leche descremada. Las emulsiones se almacenaron a temperatura ambiente hasta que la separación del aceite se hizo evidente. El período de tiempo necesario para que ello ocurriera fue tomado como un índice de la estabilidad de la emulsión.

Acton y Saffle (1970) determinaron la estabilidad de la siguiente forma: 5 ml de la emulsión recién preparada, se pesan y se determina su contenido de agua inicial (q_0) de acuerdo al método de la AOAC (1980). La emulsión se almacena en tubos graduados de 10 ml a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales, se determina el contenido de agua de los 5 ml del fondo del tubo ($q_{24 \text{ hs}}$). Con estos valores Acton y Saffle definieron la Tasa de Estabilidad:

$$\text{Tasa de estabilidad} = \frac{100 - \% \text{ agua } 24 \text{ horas}}{100 - \% \text{ agua inicial}} 100 \quad (10)$$

Diversos investigadores han estudiado sistemáticamente los distintos factores que afectan la capacidad emulsionante y

propiedades estabilizantes de las proteínas cárnicas.

Algunos de ellos fueron enumerados por Saffle (1968). Condiciones tales como la forma y dimensión del mezclador, la velocidad del agitador y del agregado de aceite, la temperatura, pH, fuente de proteína, solubilidad y concentración de la misma, presencia de sales y azúcares, etc. afectan la capacidad de emulsificación de las proteínas cárnicas.

Swift y col. (1961) y Swift y Sulzbacher (1963) estudiaron la influencia del pH, sales, y el contenido de proteína soluble en agua, sobre la efectividad de las proteínas cárnicas como emulsificantes.

Carpenter y Saffle (1964) determinaron en detalle el efecto de la cantidad de proteína total y soluble, la velocidad de agitación, el tipo de aceite y velocidad de adición del mismo en la capacidad de emulsificación de diferentes proteínas cárnicas; concluyeron que la cantidad de proteína soluble determina la capacidad de emulsificación de las mismas.

Pearson y col. (1965) estudiaron la capacidad de emulsificación y estabilidad de emulsiones formuladas con, proteína de soja, caseinato de sodio y leche descremada. Inklaar y Fortuin (1969) estudiaron el efecto del tiempo de dispersión, cantidad de aceite; proteína y agua, temperatura y pH sobre la capacidad de emulsificación de aislados de soja, caseinato de sodio, proteínas de pescado y cárnicas. Hallaron que la capacidad emulsionante es-

taba relacionada con la solubilidad de las proteínas. Crenwelge y col. (1974) determinaron las capacidades de emulsificación de concentrados de proteína de soja, hemoglobina bovina y leche descremada en función de la concentración, solubilidad de la proteína, y pH encontrando que el perfil de solubilidad-pH, tenía la misma forma que el de capacidad de emulsificación-pH concluyendo que la capacidad de emulsificación estaba correlacionada con la solubilidad.

En general se ha encontrado que la eficiencia de las proteínas como agentes emulsificantes disminuye a medida que la concentración de las mismas aumenta. Esto fue encontrado para proteínas cárnicas (Ivey y col., 1970), para caseinato de sodio, leche descremada y aislado de proteína de soja (Pearson y col., 1974), para proteínas de soja (Franzen y Kinsella, 1976), para proteínas de cotiledones de alfalfa (Wang y Kinsella, 1976) para proteínas de nuez (Ramanathan, 1978).

Los distintos derivados de soja (harina, concentrados y aislados), pueden ser usados por sus excelentes propiedades de emulsificación en una gran variedad de productos, tales como mayonesas, emulsiones cárnicas y bebidas en reemplazo total o parcial de las proteínas convencionales (Rakosky, 1970 ; Smith y Circle 1972; Wolf, 1972).

Las propiedades de emulsificación de las proteínas de soja han sido extensamente estudiadas por numerosos investigadores

(Hutton y Campbell, 1977; Tornberg, 1978 a,b; Mc Watters y Holmes, 1979a y b; Volkert y Klein, 1979; Stone y Campbell, 1980; Mc Watters y Cherry, 1981).

En las etapas iniciales de emulsificación las proteínas de soja se adsorben rápidamente en la interfase aceite/agua formando multicapas, pero al disminuir el tamaño de las gotas de aceite e incrementarse el área interfacial, a medida que progresa la emulsificación, el espesor del film disminuye (Tornberg, 1979).

Si bien la eficiencia emulsionante disminuye al aumentar la concentración de proteína, la estabilidad se incrementa, lo que indica la formación de films de proteína densos alrededor de las gotas de aceite (Pearson y col., 1965; Inklaar y Fortuin, 1969; Lin y col., 1974; Crenwelge y col., 1974). En muchas aplicaciones existe un exceso de proteína disponible para formar films densos.

El tipo y método de obtención de la proteína afecta la formación y estabilidad de la emulsión. Así, los aislados de soja, son superiores a los concentrados. Shemer y col. (1978) hallaron que la inclusión de una pequeña cantidad de bisulfito en el medio de extracción da un aislado de soja con propiedades de emulsificación superiores.

Varios investigadores han demostrado que existen correlaciones positivas entre las propiedades de emulsificación y la solubilidad de los distintos derivados de soja (Yatsumatsu y col., 1972a; Mc Watters y Holmes, 1979). La solubilidad es un factor im-

portante en emulsiones fluidas de baja viscosidad (Kinsella y col. 1985). Sin embargo en emulsiones espesas y viscosas tales como las emulsiones cárnicas, proteínas de soja con un 50% de solubilidad aseguran una capacidad de emulsificación adecuada y la estabilidad es obtenida por la gelificación que se produce por efecto del calor.

El pH y la fuerza iónica de la fase acuosa influyen también en las propiedades de emulsificación de las proteínas de soja. Así las propiedades de emulsificación de los aislados de soja de las globulinas 11S y 7S muestran máximas propiedades de emulsificación alrededor de pH 10 (Aoki y col., 1980). Entre pH 3 y 6 las emulsiones preparadas con proteínas nativas o desnaturalizadas son inestables (Kamat y col., 1978). Pearson y col. (1965) encontraron que las capacidades de emulsificación máximas para las proteínas de soja están en la zona de pH que va de 7 a 9.

La fuerza iónica debido a que modifica las interacciones electrostáticas, afecta las propiedades de emulsificación de las proteínas de soja. El calentamiento de las proteínas de soja o más disminuye en forma progresiva las propiedades de emulsificación de las mismas. Las proteínas de soja no calentadas forman emulsiones viscosas y espesas, a medida que la proteína es desnaturalizada por calentamiento, la viscosidad de la emulsión disminuye progresivamente (Mc Watters y Holmes, 1979).

La modificación química o enzimática de las proteínas

de soja puede mejorar sus propiedades de emulsificación. Así la succinilación incrementa la capacidad de emulsificación y estabilidad de la emulsión, debido probablemente a que produce un aumento en las interacciones electrostáticas y estéricas (Franzen y Kinsella, 1976a). Las propiedades de emulsificación de las proteínas de soja calentadas pueden mejorarse por hidrólisis enzimática limitada (Rham y col., 1978; Zakaria y Mc Feeters, 1978). Una hidrólisis excesiva da lugar a la formación de péptidos pequeños, lo que facilita la formación de la emulsión, pero disminuye la estabilidad, debido probablemente a la baja cohesión de las moléculas de proteína en el film interfacial.

II.5. Reología de emulsiones

La resistencia al flujo que presentan las emulsiones es quizás una de sus propiedades macroscópicas más importantes, tanto desde el punto de vista práctico como teórico. El interés práctico surge como consecuencia de que las emulsiones industriales deben ser comercializadas con una determinada viscosidad. Esta exigencia es necesaria para asegurar la estabilidad y otras características sensoriales (textura, cremosidad, gomosidad) que determinan la aceptabilidad del producto en el mercado.

El conocimiento del comportamiento reológico por otra parte provee información de la estructura de las emulsiones y por

lo tanto está íntimamente vinculado a la estabilidad de las mismas, como ha sido demostrado por numerosos investigadores (Sherman, 1963; Acton y Saffle, 1970, 1971; Halm y Ericksen, 1980).

Además los parámetros reológicos son necesarios para el diseño de máquinas, procesos y operaciones industriales, así como también para controlar la calidad del producto terminado.

II.5.1. Características reológicas generales de los fluidos

La resistencia interna al flujo que presenta un líquido y que determina que al ser sometido a un esfuerzo no fluya indefinidamente se denomina viscosidad. Cuando se aplica una fuerza F (Fig. 3), en un plano a la distancia dy por encima de la superficie inferior, la respuesta de un fluido viscoso ideal, si la superficie se mueve a una velocidad $(u + du)$ y la inferior a u , esta dado por la ley de Newton:

$$\tau = - \eta \frac{du}{dy} \quad (11)$$

donde:

τ = esfuerzo de corte o fuerza por unidad de área (tensión tangencial o cizalladura)

$\frac{du}{dy} = D$ = gradiente de velocidades que existe entre las dos superficies y es equivalente a la velocidad de de-

formación (D)

η = coeficiente de viscosidad del fluido

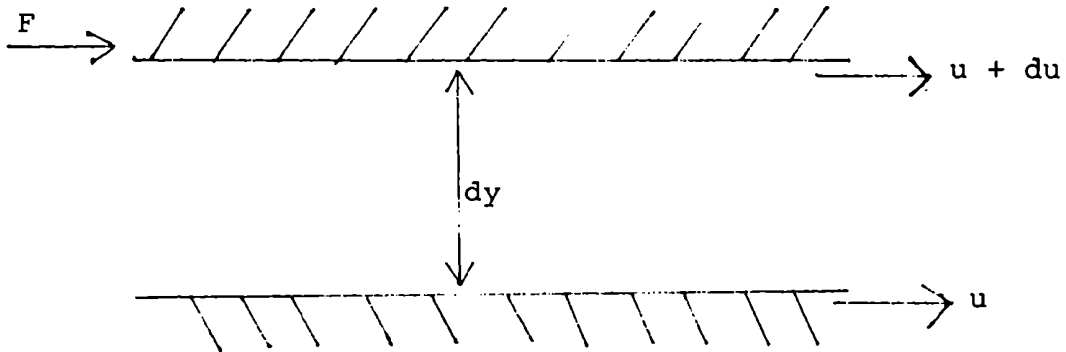


Fig. 3: Representación esquemática del flujo Newtoniano

Los fluidos que cumplen con esta ecuación se llaman Newtonianos. La relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación es constante y representa la viscosidad del líquido (η). Para fluidos Newtonianos la viscosidad es independiente de la velocidad de deformación. Las soluciones verdaderas, dispersiones diluidas de macromoléculas y emulsiones diluidas presentan este comportamiento. Los fluidos para los cuales la relación entre la tensión tangencial y la velocidad de deformación no es constante se denominan fluidos no Newtonianos. La relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación para estos fluidos se denomina "viscosidad aparente" y depende de la velocidad de deformación.

De acuerdo a Rha (1978) la viscosidad aparente se puede definir de dos maneras:

- a) Como la relación $\frac{\tau}{D}$ en cada punto, lo que es dimensionalmente correcto.
- b) Como $\partial\tau/\partial D$ que da más información acerca del comportamiento de flujo alrededor de la velocidad de deformación en estudio.

La elección de la velocidad de deformación para determinar la viscosidad aparente depende de la aplicación práctica que se haga de su determinación.

Es posible distinguir cuatro tipos de fluidos no Newtonianos:

- a) Pseudoplásticos: La velocidad de deformación aumenta más rápidamente que la tensión tangencial de forma que la viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta la velocidad de deformación.

Este comportamiento es el más común en los alimentos. Indica una continua disgregación y reacomodación de la estructura del material, que produce una disminución de la resistencia al flujo. Este tipo de flujo es debido a:

- compuestos de alto peso molecular o partículas grandes a concentraciones suficientemente altas.

- alta interacción entre las partículas, lo que causa agregación o asociación a través de enlaces secundarios.
 - orientación de las partículas en el sentido de la deformación.
- b) Dilatantes: En este caso se produce un fenómeno de espesamiento opuesto a la pseudoplasticidad. La viscosidad aparente aumenta al incrementarse la velocidad de deformación. Este tipo de comportamiento es menos frecuente. Ejemplos del mismo lo constituyen los extractos de salchichas y manteca de cacao homogenizada.
- c) Plásticos de Bingham: Estos tipos de fluidos no fluyen hasta que el valor del esfuerzo de corte no cede un cierto valor (τ_0). Por encima de este valor fluyen con una ecuación de estado como la de Newton, pero el coeficiente de proporcionalidad se denomina "viscosidad plástica". El valor del esfuerzo de corte a partir del cual comienzan a fluir (τ_0) se denomina umbral de fluencia. Pocos sistemas alimenticios exhiben este tipo de comportamiento; un ejemplo es el ketchup.
- d) Tipo mixto: Este tipo de fluidos presentan un comportamiento pseudoplástico o dilatante, pero luego que se superó el umbral de fluencia. Ejemplos de esto son las mermeladas y jaleas.

En las Figs. 4 y 5 quedan resumidos los distin-

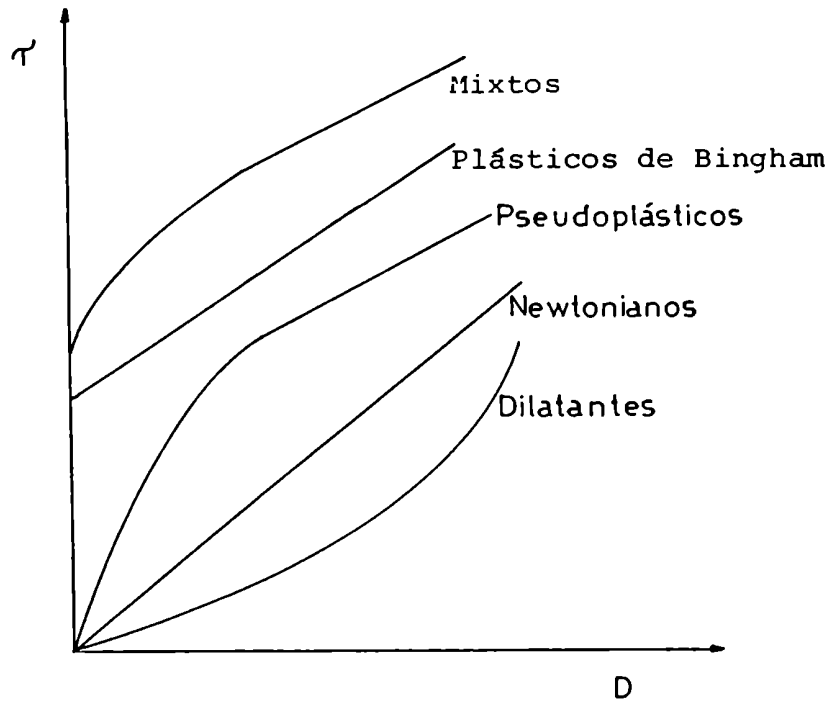


Figura 4: Curvas de flujo para fluidos Newtonianos y no-Newtonianos

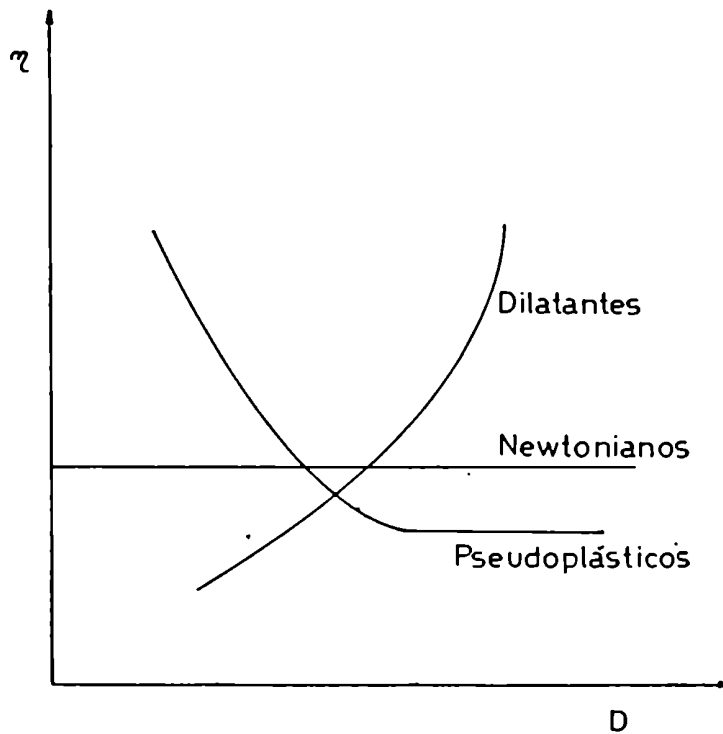


Figura 5: Dependencia de la viscosidad (η) con la velocidad de deformación (D) para fluidos Newtonianos y no-Newtonianos

tos tipos de fluidos.

El modelo matemático más usado para describir el flujo de fluidos dilatantes o pseudoplásticos es la denominada ley de la potencia

$$\tau = K D^n \quad (12)$$

donde:

K = índice de consistencia

n = índice de comportamiento de flujo.

Este último parámetro es una medida del grado de desviación del comportamiento newtoniano; si $n = 1$ el fluido es newtoniano y K coincide con el coeficiente de viscosidad, si $n > 1$ se produce espesamiento y el líquido es dilatante, si $n < 1$ se produce disminución de la consistencia y el fluido es pseudoplástico.

En el caso de fluidos que presentan un comportamiento mixto o tipo plástico de Bingham se requiere un tercer parámetro, para caracterizarlos completamente: el umbral de fluencia (τ_0).

La expresión para estos fluidos es:

$$\tau = \tau_0 + K D^n \quad (13)$$

///

Este modelo es denominado en la literatura modelo de Herschel-Bulkley. En el caso de plásticos de Bingham $n = 1$, y K es igual a la "viscosidad plástica".

Otro modelo a 2 parámetros que también ha resultado útil para describir el flujo de jugos de frutas (naranja, manzana) y de chocolate fundido es el de Casson (1959).

$$\tau^{1/2} = K_0 + K_c D^{1/2} \quad (14)$$

Donde: K_0 y K_c son constantes. K_0^2 ha sido usado por numerosos investigadores (Mizrahi y Berk, 1972; Vitali y Rao, 1984; Bianchi y col., 1985) como el umbral de fluencia. Esto es de suma utilidad especialmente en el caso de que el mismo no pueda determinarse experimentalmente.

Dependencia del flujo con respecto al tiempo

Algunos fluidos muestran una dependencia de sus propiedades de flujo con respecto al tiempo. Pueden exhibir un incremento o disminución en el esfuerzo de corte y viscosidad aparente al ser sometidos a velocidades de deformación constante.

Si el esfuerzo de corte o la viscosidad aparente con el tiempo aumentan se denominan reopecticos, si disminuyen, tixotrópicos.

En general son muy pocos los materiales que se espesan con el tiempo. En los alimentos y en particular en los sistemas proteicos, así como en las emulsiones, el comportamiento característico es el tixotrópico. Los fluidos tixotrópicos están formados en general por moléculas asimétricas en dispersión que interactúan a través de enlaces de unión secundarios para formar una estructura tridimensional o agregado cuando están en reposo. Cuando son sometidos a un flujo continuo a velocidad de deformación constante, estos enlaces secundarios, se rompen con el tiempo oponiendo menos resistencia al flujo y el esfuerzo de corte llega a un valor constante luego de un cierto tiempo. Como la velocidad de deformación es constante puede interpretarse como una disminución de la viscosidad aparente.

Si se suspende la agitación; las partículas pueden reestructurarse y luego de un dado tiempo se recupera la estructura y consistencia original; esto se denomina tixotropía reversible.

Para determinar la viscosidad aparente en los sistemas tixotrópicos es necesario llevar a cabo las determinaciones bajo condiciones especiales ya que la viscosidad no depende solo de la velocidad de deformación, sino también de la duración de la misma.

Se han propuesto distintos métodos para evaluar cuantitativamente la tixotropía siendo el más común el ciclo de

histeresis. Este método da una idea cualitativa, sencilla y clara de la tixotropía a través del área encerrada entre las curvas de ascenso y descenso de τ vs. D .

Otro método más cuantitativo se basa en la disminución de la tensión de corte con el tiempo a gradiente de deformación constante.

II.5.2. Propiedades de flujo de las dispersiones proteicas

Las dispersiones proteicas forman la fase continua de muchas emulsiones alimenticias y por lo tanto sus características reológicas afectan las propiedades de flujo de las emulsiones.

Las propiedades de flujo de las dispersiones proteicas dependen de la composición así como de la forma, tamaño y carga de las moléculas de proteína; son afectadas por las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura) y condiciones a las que fue sometida la proteína durante su obtención.

Numerosos investigadores han estudiado el comportamiento de flujo de dispersiones proteicas de origen diferente, encontrando que las mismas presentaban comportamiento pseudoplástico. A este respecto cabe mencionar los trabajos de Circle y col (1964) sobre proteína de soja; Tung y col. (1971)

sobre albúmina de huevo; Hermansson (1975b) sobre caseinato y concentrado de proteína de suero.

El modelo matemático usado para describir las curvas de flujo, en general ha sido la ley de la potencia o el modelo de Herschel-Bulkley.

El efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de flujo (viscosidad aparente, umbral de fluencia, índice de consistencia e índice de comportamiento de flujo) de dispersiones proteicas, ha sido evaluado por numerosos investigadores. En general, éstos encontraron que la viscosidad aumentaba exponencialmente con el incremento de la concentración de proteína. Por ejemplo, para caseinato de sodio (Hayes y Müller, 1961; Hermansson y col., 1975b), para proteínas de soja (Circle y col., 1964; Ehninger y Pratt, 1974; Hermansson, 1975b); para proteínas miofibrilares de pescado (Groninger, 1973); para proteínas de girasol (Fleming y col, 1974); para concentrado de proteína de suero (Hermansson, 1975b).

El pH tiene un efecto notable en las propiedades de flujo de las dispersiones de proteínas. Para Promina D (proteína de soja) un incremento en el pH de 5,9 a 10,9 produce un aumento en el umbral de fluencia y en la viscosidad aparente (Hermansson, 1975b). Esto fue atribuido a un aumento en la solubilidad a medida que el pH se aleja del pH isoeléctrico (pH \approx 4,5).

Las condiciones de procesamiento a que fue sometida la proteína durante su obtención influyen también marcadamente en las propiedades de flujo. Fleming y col. (1974) encontraron que la consistencia de las harinas de soja aumenta notablemente durante la obtención de la proteína en medio alcalino. Este tratamiento de pH puede contribuir a la consistencia alta del aislado final, ajustando el pH de la harina de soja a 12 y luego llevándola a 6. Este tratamiento aparentemente aumenta la capacidad de absorción de agua y produce un aumento en la consistencia.

Bianchi y col. (1985) estudiaron el efecto de la desnaturalización en la reología de las proteínas de soja. Las propiedades reológicas de las dispersiones proteicas también se ven afectadas por el método de preparación; en particular cuando se adicionan solutos. Pilosof y col. (1987) demostraron usando un aislado de soja que la viscosidad aparente de las dispersiones proteicas se ve afectada por el orden de agregado de los solutos.

Existen otros agentes además de las sales que también afectan las propiedades reológicas de las dispersiones proteicas. A este respecto cabe mencionar el efecto de aquellos agentes que producen la ruptura de la estructura cuaternaria de la proteína. Estos interfieren en la habilidad de la proteína para formar puentes disulfuros o hidrógeno; produciendo de esta

forma una reducción en la viscosidad de la dispersión. Ejemplos típicos de dichos agentes lo constituyen el sulfito y el ácido tioglicólico.

Las dispersiones proteicas presentan comportamiento tixotrópico por encima de 12% (P/P) (Hermansson, 1975b). Se han planteado diferentes modelos para evaluar la tixotropía de las dispersiones proteicas. Un modelo que ha dado resultados satisfactorios es el de Umstätter (Figoni, 1981). El comportamiento tixotrópico de una proteína de soja comercial (Purina 500E) fue estudiado en detalle por Aeberhard y col. (1983).

II.5.3. Propiedades de flujo de las emulsiones

El comportamiento de flujo que presentan las emulsiones depende fundamentalmente de la fracción en volumen de la fase dispersa (ϕ). Las emulsiones muy diluídas, presentan comportamiento newtoniano. Así Cox (1952) y Fernández y Martín (1972) encontraron que la leche se comporta como un fluido newtoniano. Fernández y Martín trabajaron con leche entera, descremada, semidescremada y sus concentrados. Considerando una dependencia entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación dada por la ley de la potencia encontraron que el índice de comportamiento de flujo (n) variaba entre 0,9 y 1, que para los

fines prácticos puede considerarse como newtoniana.

En emulsiones más concentradas, con concentraciones de aceite superiores a 10% en volumen, las emulsiones se apartan del comportamiento newtoniano, y se comportan como fluidos pseudoplásticos. Un ejemplo típico de ello lo constituye la crema de leche. Prentice (1972) encontró que la crema de leche se comporta como un fluido pseudoplástico que obedece la ley de la potencia.

Emulsiones más concentradas pueden presentar flujo mixto.

La influencia de la fracción en volumen de aceite (ϕ) sobre el comportamiento de flujo de las emulsiones y la dependencia de la viscosidad relativa de la emulsión (η_R), definida como la relación entre la viscosidad aparente de la emulsión y la viscosidad de la fase continua, se muestra en la Fig. 6. (Sherman, 1983). Las emulsiones con elevada concentración en volumen de aceite pueden presentar también comportamiento tixotrópico. Así Tiu y Boger (1974) encontraron que la mayonesa (80% de aceite en volumen), exhibía umbral de fluencia, comportamiento pseudoplástico y tixotrópico.

El comportamiento reológico de una emulsión depende de su composición y de la naturaleza química de sus ingredientes. Varios de los factores que afectan el mismo han sido descritos por Becher, (1965); Sherman, (1970); Dickinson y Stainsby,

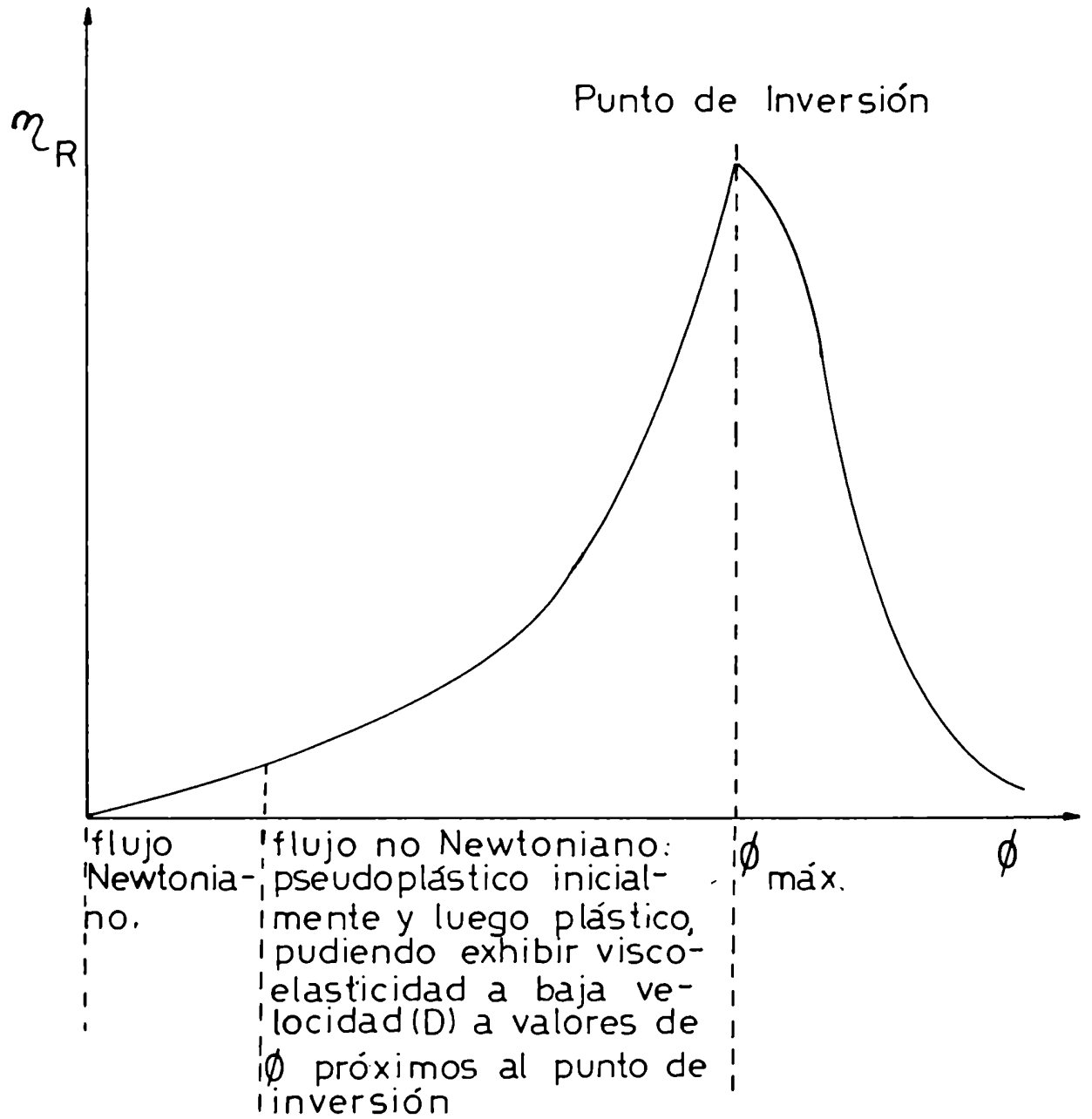


Figura 6: Efecto de la fracción en volumen de aceite (ϕ) sobre la viscosidad relativa (η_R) de emulsiones (Sherman, 1983)

(1982).

En la Tabla 4 se muestran los factores que influyen en las propiedades reológicas de las emulsiones.

El efecto de los factores mencionados en la Tabla 4 sobre el comportamiento reológico de emulsiones aceite/agua ha sido estudiado por algunos investigadores. Sherman (1959) estudió el efecto de la concentración del agente emulsificante sobre la viscosidad de emulsiones aceite/agua estabilizadas por laurato y sorbitato sesquioleato. Aoki y col. (1980) estudiaron la influencia del porcentaje de aceite y de la concentración de proteína sobre el esfuerzo de ruptura de emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas de soja 7S y 11S. Hennok y col. (1984) y Gladwell y col. (1985a, 1985b) estudiaron la reología de emulsiones aceite/agua estabilizadas por goma xántica.

Tabla 4

Factores que influyen en el comportamiento reológico de las emulsiones

Factores que influyen en las propiedades reológicas

I Fase dispersa

- | | |
|--|---|
| a) Fracción en volumen (ϕ) | Influye en la interacción hidrodinámica entre las gotas de aceite, y en el grado de floculación que da lugar a la formación de agregados. |
| b) Viscosidad (η_i) | Afecta la deformación de las gotas de aceite, durante el flujo. En las emulsiones concentradas, que presentan un alto grado de empaquetamiento, influye en la viscosidad de la emulsión. |
| c) Tamaño, forma y distribución de tamaño de las gotas de aceite | Influye en la viscosidad de la emulsión y también afecta la velocidad de floculación y formación de agregados. El tamaño de gota, forma, etc. afecta el número de glóbulos de aceite por unidad de volumen. |

Tabla 4 (continuación)

| | |
|-------------------------|---|
| d) Constitución química | Afecta las fuerzas de interacción entre las gotas de aceite y la distribución del tensioactivo entre las 2 fases. |
|-------------------------|---|

II Fase continua

| | |
|---|--|
| a) Viscosidad (η_0) | Afecta la viscosidad de la emulsión en forma directamente proporcional. |
| b) Constitución química pH, polaridad | Afecta la viscosidad de la emulsión pues influye en la energía potencial de interacción entre las gotas de aceite. También influye en la partición del agente tensioactivo entre las 2 fases. |
| c) Electrólitos (Si el medio es polar) | Afecta la solubilidad del agente tensioactivo en la fase continua y como modifica la carga del film interfacial de proteína que rodea a las gotas de aceite, modifica la energía de interacción entre las gotas y por lo tanto la viscosidad de la emulsión. |

Tabla 4 (continuación)

III Agente tensioactivo
(proteína en nuestro caso)

- | | |
|-------------------------|--|
| a) Constitución química | Determina la solubilidad en la fase grasa y acuosa, la partición entre las dos fases y la adsorción en la interfase. |
| b) Concentración | Afecta la viscosidad, tipo de emulsión, inversión de la emulsión y la formación de micellas del mismo en la fase continua; por lo tanto va a afectar la energía de interacción. |
| c) Film interfacial | Espesor: determina el tamaño de las gotas de aceite, rodeadas por el film interfacial y por lo tanto afecta la viscosidad; también influye en la interacción entre las gotas de aceite. Las características reológicas del mismo afectan la deformación de las gotas de aceite al ser obligadas a fluir. |

Tabla 4 (continuación)

| | |
|---|--|
| IV <u>Agentes estabilizantes</u> <u>adicionales</u> (Pigmentos, hidrocoloides, etc.) | Depende de cuál sea el agente; puede actuar de formas diversas: modifi- cando la interacción hidrodinámica, aumentando la viscosidad de la fase continua, etc. |
|---|--|

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiales

III.1.1. Proteínas

Proteínas de soja. Se usaron los siguientes aislados proteicos de origen comercial:

- Proteinmax 90NB (P90NB) y Proteinmax 90HG (P90HG) de Sambra S.A., San Pablo, Brasil.
- Proteína Purina 760 (PP760), 630 (PP630), 500E (PP500E), 660 (PP660), 710 (PP710) de Ralston Purina Co., St. Louis, U.S.A.
- Un aislado proteico de soja (APS). Fue obtenido a partir de harina de soja desgrasada de origen comercial de acuerdo al siguiente método: Se hizo una extracción acuosa a pH 8 de la harina de soja desgrasada (relación harina:agua 1:15); seguidamente se clarificó el extracto por centrifugación y precipitación de la proteína a pH 4,5 con HCl diluido. El coágulo proteico fue entonces lavado con agua; se ajustó el pH a 7 con NaOH diluido y se secó por spray. El contenido de proteína (Nx6,25) fue 90% en base seca.

Aislado proteico de porotos alubia (APP).

Fue obtenido de acuerdo al procedimiento de Pilosof y col. (1982).

La proteína fue extraída de la harina de porotos (*Phaseolus Vulgaris*, variedad Alubia) por suspensión de la misma en agua destilada (relación harina:agua 1:10). El pH se ajustó a 10 por agregado de solución diluida de NaOH. La suspensión se agitó por 1 hora a 2.000 rpm en una centrifuga Rolco de 3 litros de capacidad. El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman N° 41, se ajustó el pH a 3,75 con solución diluida de HCl y luego se centrifugó por 30 minutos a 2.000 rpm. El coágulo proteico se lavó dos veces con agua destilada y se centrifugó cada vez por 30 minutos a 2.000 rpm. Luego se neutralizó con NaOH diluido y se congeló a -40°C en una congeladora de placas; se liofilizó a temperatura ambiente por 30 horas en una liofilizador Stokes.

Proteínas cárnicas solubles en soluciones salinas (PCSS). Las mismas fueron obtenidas por el procedimiento de extracción descrito por Acton y Saffle (1970). Se usó carne magra (bola de lomo) previamente picada en una multiprocesadora Moulinex. Se colocaron en un vaso de precipitados de 250 ml 75 g de carne y 150 ml de solución ClNa 3% (P/V), dispersándose la carne con una espátula. A continuación se llevó a pH 6, usando una solución de Na(OH) 0,1 N en ClNa 3% (P/V). El extracto así obtenido fue luego colocado en un mezclador, llevado a un volumen final de 300 ml con solución de ClNa 3% (P/V) y sometido a agitación durante 2 minutos a 5.700 rpm, dos veces, con un período de reposo de 2 minutos entre cada agitación. Durante esta etapa la

temperatura fue mantenida entre 10 y 14°C. A continuación fue centrifugado a 12000xG durante 24 minutos y a una temperatura de 0°C. El sobrenadante fue filtrado 2 veces a través de papel Whatman N° 4; la solución límpida obtenida fue congelada en un freezer y luego liofilizada durante 24 horas a temperatura ambiente en un liofilizador Stokes.

Albúmina Bovina (AB), de Química Sigma, USA.

Caseinato de Sodio (CS) de Laboratorios Argentinos Farmesa S.A.

Gelatina (G) (grado alimenticio) de Stauffer Rioplatense S.A., Argentina.

Concentrado de proteína de zapallo (CPZ). Fue obtenido de acuerdo al procedimiento de Vigo y col. (1973). Se partió de harina desgrasada de semillas de zapallo que se obtuvo por agotamiento con hexano técnico (Soxhlet) de la semilla entera o previamente molida procedente de diferentes variedades de zapallo (Cucurbita pepo variedad Angola y Cucurbita máxima variedades comerciales Ingles, Pink Banana, Pink Banana Jumbo, Red Hubbard, Criollo y Plomo Criollo). El contenido proteico de la misma fue 80%.

Para efectuar la extracción se suspendió la harina en agua (relación harina:agua 1:20) y se ajustó el pH a 10,5 con Na(OH) diluído, se agitó durante 1 hora a 30°C y se centrifugó durante 30 minutos a 2.800 rpm. El líquido sobrenadante

se trasvasó a un recipiente aforado a través de una malla de acero inoxidable. El residuo se lavó por agitación con agua previamente ajustada a pH 10,5 (relación g harina:ml agua 1:5) y se centrifugó por 20 minutos a 2.800 rpm. El líquido decantado se reunió con el anterior y sobre el residuo insoluble se efectuaron dos extracciones sucesivas al mismo valor de pH; las cuales se llevaron a cabo en las mismas condiciones operatorias y con las relaciones harina:agua 1:10 y 1:5 respectivamente, centrifugando al final de cada período de extracción. Los líquidos decantados provenientes de las tres extracciones y lavados se reunieron y sobre los mismos se procedió a precipitar las proteínas llevando el pH a 5 por agregado de HCl 5N y ajuste final con HCl diluido. Los precipitados así obtenidos se separaron por centrifugación (30 minutos, 2.800 rpm), lavando en todos los casos con la mínima cantidad de agua destilada ajustada a pH 5 y centrifugando por 15 minutos a 2.800 rpm después de cada lavado.

La purificación de los coágulos de proteína obtenidos se efectuó por suspensión de los mismos 3 veces sucesivas en etanol 96° (relación g proteína:ml etanol 96° 1:20), centrifugando por 15 minutos a 2.800 rpm, después de cada tratamiento. Finalmente las proteínas se suspendieron en éter, separándose las por centrifugación. El secado final se efectuó a 45°C en vacío (5 Torr) hasta constancia de peso.

Concentrado de clara de huevo (PCH). Fue obtenido a partir de la clara de huevos frescos por congelación a -25°C y posterior liofilización en un liofilizador Stokes a temperatura ambiente.

III.1.2. Aceite

Se usó aceite de maíz Mazzola de Refinerías de Maíz, S.A.I.C.F.

III.1.3. Carboximetil celulosa (CMS) de BDH Chemicals Ltd., England.

III.2. Métodos para determinar las propiedades de emulsificación

III.2.1. Equipo para emulsificar

En la Fig. 7 se muestra un esquema del equipo usado para preparar las emulsiones. El mismo consta de: un recipiente mezclador (1) que consiste en un frasco de 150 ml de capacidad, altura = 7 cm, diámetro = 5,5 cm; un agitador a paletas (2); un autotransformador variable (3), conectado al agitador, por medio del cual se varió la velocidad de agitación; un baño de

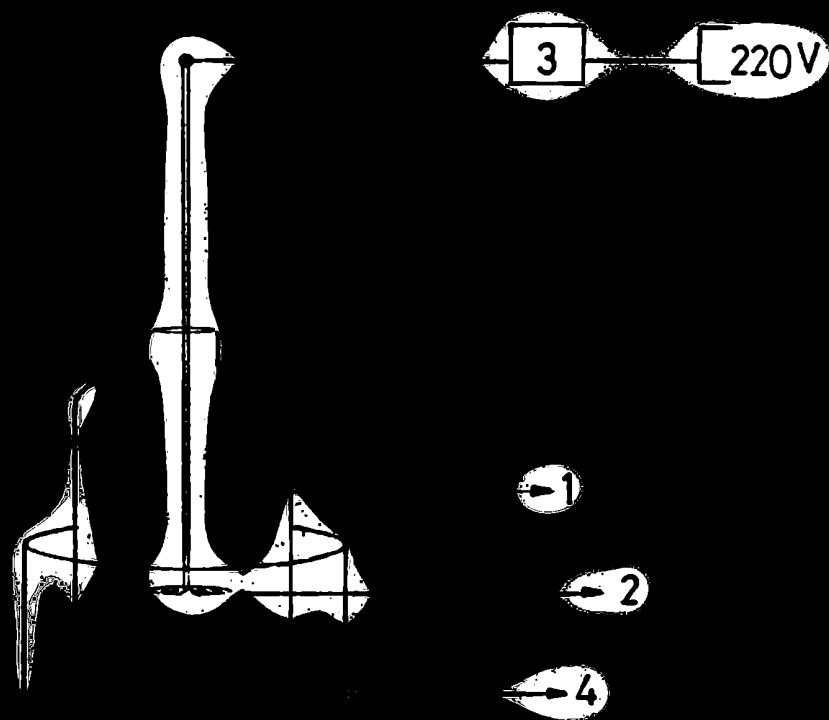


Figura 7: Esquema del equipo para emulsificar

hielo/agua, contenido en un recipiente de telgopor (4), dentro del cual se sumerge el frasco mezclador durante la emulsificación.

La velocidad de agitación se midió con un tacómetro.

III.2.2. Preparación de las dispersiones proteicas

Todas las dispersiones proteicas se obtuvieron por suspensión de las cantidades apropiadas de proteína en agua destilada y agitación de la misma a 6.000 rpm durante 3 minutos. El equipo usado para tal fin fue el mostrado en la Fig. 7. El pH de las dispersiones proteicas (1% (P/P)) osciló entre 6,8 a 7. La densidad de las dispersiones proteicas determinada por picnometría fue 1g/cm^3 .

III.2.3. Determinación de la capacidad de emulsificación (CE)

En la bibliografía figuran varios métodos para determinar la capacidad de emulsificación (o sea el punto en que la emulsión se invierte). Básicamente todos ellos se basan en el método de Swift y col. (1961). El mismo consiste en agregar a la dispersión proteica el aceite desde una bureta y a una dada velocidad de goteo, agitando simultáneamente, hasta que la emulsión se invierte. El volumen de aceite agregado hasta ese momen-

to expresado como porcentaje de aceite sobre el volumen total de la emulsión representa la CE. La forma en que se detecta el punto final es la principal diferencia que existe entre los investigadores; así Swift y col. (1961), Carpenter y Saffle (1964), Pearson y col. (1965), Ivey y col. (1970), utilizaron como medida del punto final la disminución brusca de viscosidad asociada a la inversión de la emulsión. Webb y col. (1970), utilizaron mediciones de conductividad. Crenwelge y col. (1974), lo determinaron por mediciones amperométricas. En todos estos métodos el volumen final y el tiempo de emulsificación dependen de la capacidad de emulsificación de la proteína en estudio.

En este trabajo se adoptó el método recomendado por Quaglia (1980) en el cual el volumen total y el tiempo de emulsificación permanecen constantes.

Básicamente el método consiste en colocar en un mezclador proporciones diferentes de aceite y soluciones proteicas de forma tal que el volumen final (volumen de aceite más volumen de la solución proteica) permanezca constante. Dichas muestras después se agitan durante un tiempo determinado y a una dada velocidad. La máxima relación aceite/agua antes que se produzca la inversión de la emulsión, lo que se observa visualmente pues la emulsión pasa de blanca y densa (emulsión aceite en agua) a fluida y amarillenta (emulsión agua en aceite), representa la capacidad de emulsificación (CE).

Expresión de resultados

La capacidad de emulsificación (CE) se expresó como:

$$CE = \frac{\text{ml de aceite}}{\text{ml de aceite} + \text{ml dispersión proteica}} 100 = \% \text{ en volumen de aceite}$$

Eficiencia del agente emulsificante (EE)

A partir del valor experimental de la CE se calculó la eficiencia $\left(\frac{\text{ml de aceite}}{\text{g de proteína}}\right)$.

$$EE = \frac{CE \cdot 100}{(100 - CE) \frac{\text{g proteína}}{100 \text{ g solución}}} \quad (15)$$

III.2.4. Estandarización del método de determinación de la CE

La capacidad de emulsificación determinada tal como se describió en el párrafo anterior, está afectada por variables tales como, temperatura de emulsificación, velocidad, tiempo de agitación y volumen total de la emulsión. El valor adecuado de estos tres últimos factores depende fundamentalmente de la geometría y tamaño del sistema usado para emulsificar. Por lo

tanto para establecer las condiciones a utilizar en la determinación de la capacidad de emulsificación y la preparación de las emulsiones, se procedió a estudiar el efecto de dichas variables. Para estos ensayos se usaron dispersiones proteicas al 2% (P/P) de la proteína Proteinmax 90 NB.

a) Efecto del tiempo de agitación

En estos ensayos la velocidad de agitación fue de 6.000 rpm. Los tiempos empleados fueron 1, 3 y 6 minutos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos. Se puede apreciar que entre 2 y 6 minutos no hay diferencias en lo que respecta a la CE, entonces por razones de índole práctica (menor tiempo) se eligió 3 minutos como tiempo de trabajo o emulsificación.

Tabla 5

Efecto del tiempo de agitación sobre CE

| CE (% de aceite en volumen) | | | |
|--------------------------------|----|----|----|
| Tiempo (minutos) | | | |
| 1 | 2 | 3 | 6 |
| No alcanza a formarse emulsión | 62 | 62 | 62 |

b) Efecto de la velocidad de agitación

Manteniendo constante el tiempo de agitación en 3 minutos se procedió a variar la velocidad de agitación por medio del autotransformador variable.

En la Tabla 6 se consignan los valores experimentales hallados.

Tabla 6

Efecto de la velocidad de agitación sobre la CE

| CE (% de aceite en volumen) | | | |
|---|------|------|------|
| Velocidad de agitación (rpm) | | | |
| 4000 | 5000 | 6000 | 8700 |
| No se forma la emulsión mezclado insuficiente | 62 | 62 | 62 |

La Tabla 6 permite concluir que entre 5000 y 8700 rpm no hay modificación de la CE, entonces se eligió 6000 rpm como velocidad de trabajo.

c) Efecto del volumen total de la emulsión (tamaño de la muestra)

Usando un tiempo de agitación de 3 minutos y una velocidad

;

de agitación de 6000 rpm se procedió a variar el volumen total de la emulsión (volumen de aceite + volumen solución proteica). En la Tabla 7 se resumen los resultados experimentales obtenidos

Tabla 7

Efecto del volumen total de la emulsión sobre CE

| CE (% de aceite en volumen) | | | |
|-----------------------------|----|----|---|
| Volumen total (ml) | | | |
| 25 | 50 | 75 | 100 |
| 62 | 62 | 62 | Debido a las dimensiones geométricas del agitador no se forma la emulsión |

Por exigencias de los ensayos de estabilidad que se efectuaron posteriormente, se eligió como volumen total de la emulsión 50 ml.

En base a los resultados obtenidos se normalizó el método para determinar la capacidad de emulsificación, adoptándose las siguientes condiciones:

- a) Tiempo de agitación: 3 minutos
- b) Velocidad de agitación: 6000 rpm
- c) Volumen total de la emulsión: 50 ml
- d) El aceite se usó a 4°C, manteniéndose durante la emulsificación el recipiente que contiene la muestra a emulsificar en un baño de hielo/agua (temperatura entre 4 a 6°C).

III.2.5. Determinación de la estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones puede evaluarse usando diferentes índices; algunos de ellos implican el calentamiento de la emulsión durante un cierto tiempo y a una dada temperatura, seguido de centrifugación (Tornberg y Hermansson, 1977; Volkert y Klein, 1979) o bien solo la centrifugación de la emulsión recién preparada (Yatsumatsu y col., 1972). El principal inconveniente de estos métodos es que:

- 1) no permiten detectar inestabilidades parciales en los casos en que no hay un neta separación de fases.
- 2) Introducen en el sistema una perturbación como es la aplicación de una fuerza centrífuga o el calentamiento a una alta temperatura.

Por estas razones, la determinación de la estabilidad se hizo de acuerdo al método de Acton y Saffle (1970), que es una modificación del método de Titus y col. (1968). Se tomaron 5 ml de la emulsión recién preparada y se determinó el porcentaje de agua de la misma (q_0) ($\text{g H}_2\text{O}/100 \text{ g emulsión}$). Luego se colocaron 10 ml de la emulsión preparada en tubos graduados de 10 ml y se almacenaron en estufa a temperatura constante. Las temperaturas de almacenamiento fueron 37, 45 y 60°C.

Para cada tiempo de almacenamiento se utilizó un tubo; al cabo del tiempo prefijado se tomaron 5 ml del fondo del tubo mediante una jeringa, se pesaron y se determinó el contenido de agua q_t ($\frac{\text{g agua}}{100 \text{ g emulsión}}$).

El contenido de agua se determinó de acuerdo al método de la AOAC (1980).

III.3. Determinación de las propiedades reológicas de las emulsiones y dispersiones proteicas

III.3.1. Determinación de las curvas de flujo

Las curvas de flujo (esfuerzo de corte (τ) en función de la velocidad de deformación (D)) de las emulsiones y dispersiones proteicas se determinaron en un viscosímetro de cono y plato marca Brookfield, modelo L.V.T.

La principal ventaja de este instrumento es que requiere muy pequeña cantidad de muestra (0,5 a 2 ml dependiendo del cono utilizado) y que permite obtener valores absolutos de viscosidad.

Para las emulsiones se usaron los conos cp 52 (diámetro 2,4 cm, 3°) y cp 41 (diámetro 1,8 cm, 3°). Las muestras de la emulsión recién preparada se colocaron entre el plato y el cono, se termostataron a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y luego de 10 minutos, el cono fue puesto en funcionamiento, registrándose el torque ejercido por la muestra luego de 1 minuto. Las mediciones se hicieron por triplicado, en el sentido de las velocidades crecientes y en el rango de 0,6 a 120 s^{-1} .

El esfuerzo de corte (τ) fue calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$\tau \text{ (N/m}^2\text{)} = \frac{T}{\text{sup. del cono}} = \frac{T}{\frac{2}{3} \pi r^3} \quad (16)$$

donde $T = \% \text{ del Torque} = \frac{\text{Torque máximo} \times \text{lectura}}{100}$

Torque máximo = 6737×10^{-5} N.m para el LVT

r = radio del cono

El esfuerzo de corte se calculó como el promedio de las 3 determinaciones efectuadas a cada velocidad de deformación.

///

Las curvas de flujo de las dispersiones proteicas fueron obtenidas en forma análoga pero usando el cono cp 40 (diámetro = 4,8 cm, 0,8°).

III.3.2. Determinación del umbral de fluencia (τ_0) de las emulsiones

El umbral de fluencia (τ_0) de las emulsiones se determinó experimentalmente de acuerdo a la técnica usada por Mizrahi y Berk (1971). El mismo consiste en prender y apagar intermitentemente el viscosímetro a muy baja velocidad ($0,6 \text{ S}^{-1}$) registrándose el valor del torque producido en cada caso. El valor del torque por encima del cual se observa disminución del mismo luego de haber desconectado el viscosímetro se toma como el umbral de fluencia. La lectura obtenida en la escala del viscosímetro fue multiplicado por el factor de escala adecuada (según el cono usado) para obtener el valor en Newton/m^2 .

III.4. Determinación de las propiedades funcionales y físico-químicas de las proteínas

III.4.1. Determinación de la capacidad de absorción de agua

La absorción espontánea de agua de las pro-

tefnas fue determinada de acuerdo a Pilosof y col (1985) usando el equipo propuesto por Torgersen y Toledo (1977), que es una modificación del aparato diseñado por Bauman (1966).

En la Fig. 8 se muestra un esquema del mismo. Está constituido por un monitor bacteriológico de plástico (Millipore Co.) (1) lleno de agua y que soporta un papel de filtro humedecido, sobre el cual se esparcen 50 mg de la proteína. El monitor está conectado a través de un tubo de plástico flexible (2) a una pipeta de 1 ml (3) en posición horizontal y al mismo nivel que el papel de filtro. La cantidad de agua absorbida por la proteína en función del tiempo se siguió por el corrimiento de la columna de agua de la pipeta hasta llegar al equilibrio.

La determinaciones se hicieron por duplicado y a temperatura ambiente. El volumen de agua absorbido en ml/g proteína cuando se alcanza el equilibrio representa la capacidad de absorción de agua (C.A.A.).

III.4.2. Determinación de la capacidad de absorción de aceite

Se determinó en forma similar a la capacidad de absorción de agua usando el mismo equipo. La diferencia consistió en que se usó un papel de filtro de fibra de vidrio

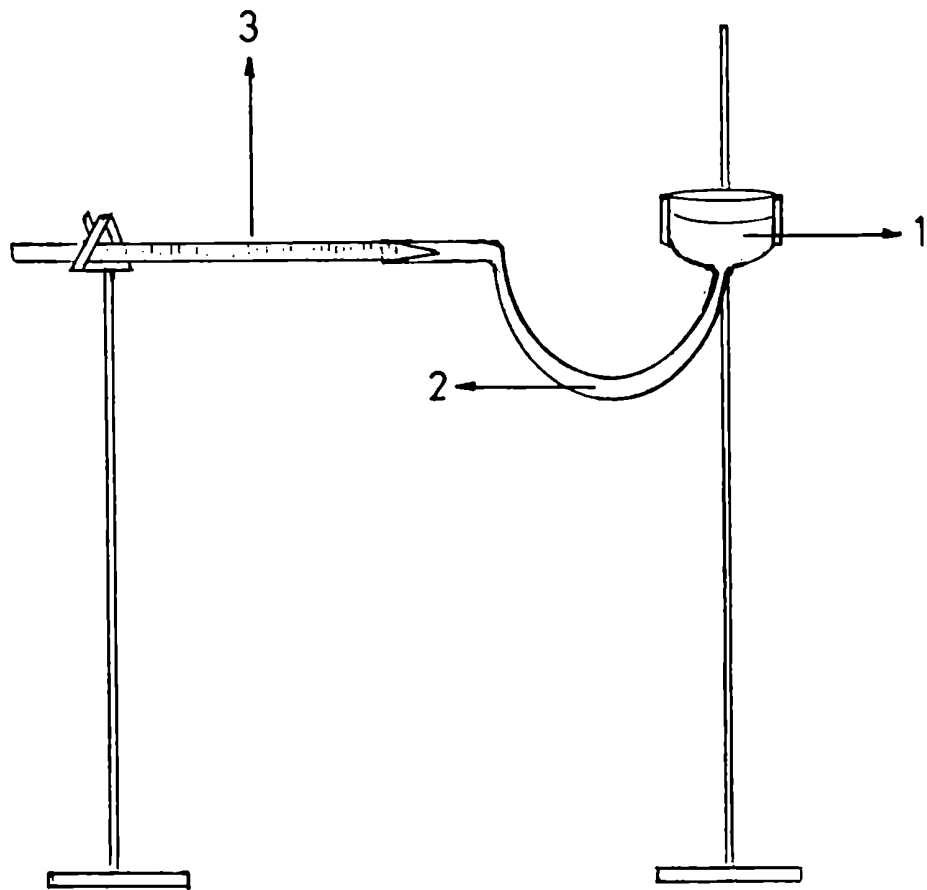


Figura 8: Esquema del equipo para medir la absorción espontánea de agua y aceite

(Whatman 6 F/C) en lugar del papel de filtro común y el aparato se llenó de aceite.

El volumen de aceite absorbido en ml/g proteína una vez alcanzado el equilibrio representa la capacidad de absorción de aceite (CAAc) de las proteínas. Las determinaciones se hicieron por duplicado y a temperatura ambiente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. Capacidad de emulsificación y estabilidad de emulsiones en relación a las propiedades físico-químicas de las proteínas utilizadas para su formulación

IV.1.1. Relación entre las propiedades físico-químicas de las proteínas y la capacidad y eficiencia de emulsificación de las mismas.

IV.1.1.1. Efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad y eficiencia de emulsificación

Los parámetros químicos más importantes que afectan la capacidad de emulsificación y eficiencia de emulsificación son los que se refieren a la naturaleza y concentración del agente emulsificante (proteína), ya que este último es el que facilita la formación de la emulsión, por reducción de la tensión interfacial permitiendo la formación de un área interfacial mayor con menor requerimiento de energía mecánica.

Se determinó la capacidad de emulsificación (CE) y la eficiencia de emulsificación (EE) para proteínas de origen diferente. La concentración de la dispersión proteica usada fue 1% (P/P) en todos los casos.

En la Tabla 8 se muestran los valores de la capacidad de emulsificación y eficiencia de emulsificación obtenidos. Se puede observar que la capacidad de emulsificación y eficiencia de emulsificación presentan un rango amplio de variación entre las diferentes proteínas. Así la PP710 presentó los valores más altos de CE y EE en tanto que la Proteinmax 90NB fue la que mostró los valores más bajos de CE y EE. El caseinato de sodio, concentrado de proteína de suero y aislado de proteína de poroto por su parte mostraron valores semejantes en CE y EE.

La capacidad de emulsificación y eficiencia también varían con la concentración de proteína. En la Fig. 9 se ha representado la capacidad de emulsificación y la eficiencia de emulsificación en función de la concentración de proteína para distintas proteínas de soja. La capacidad de emulsificación varía en un rango muy estrecho al incrementarse la concentración de proteína de 0,5 a 4% (P/P), para todas las proteínas de soja estudiadas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Acton y Saffle (1972) para proteínas cárnicas quienes sugirieron entonces, que la capacidad de emulsificación expresada de esta forma serviría para comparar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores ya que minimizan el efecto de la concentración de proteína, y con los de Wang y Kinsella (1976) para proteínas de cotiledones de alfalfa.

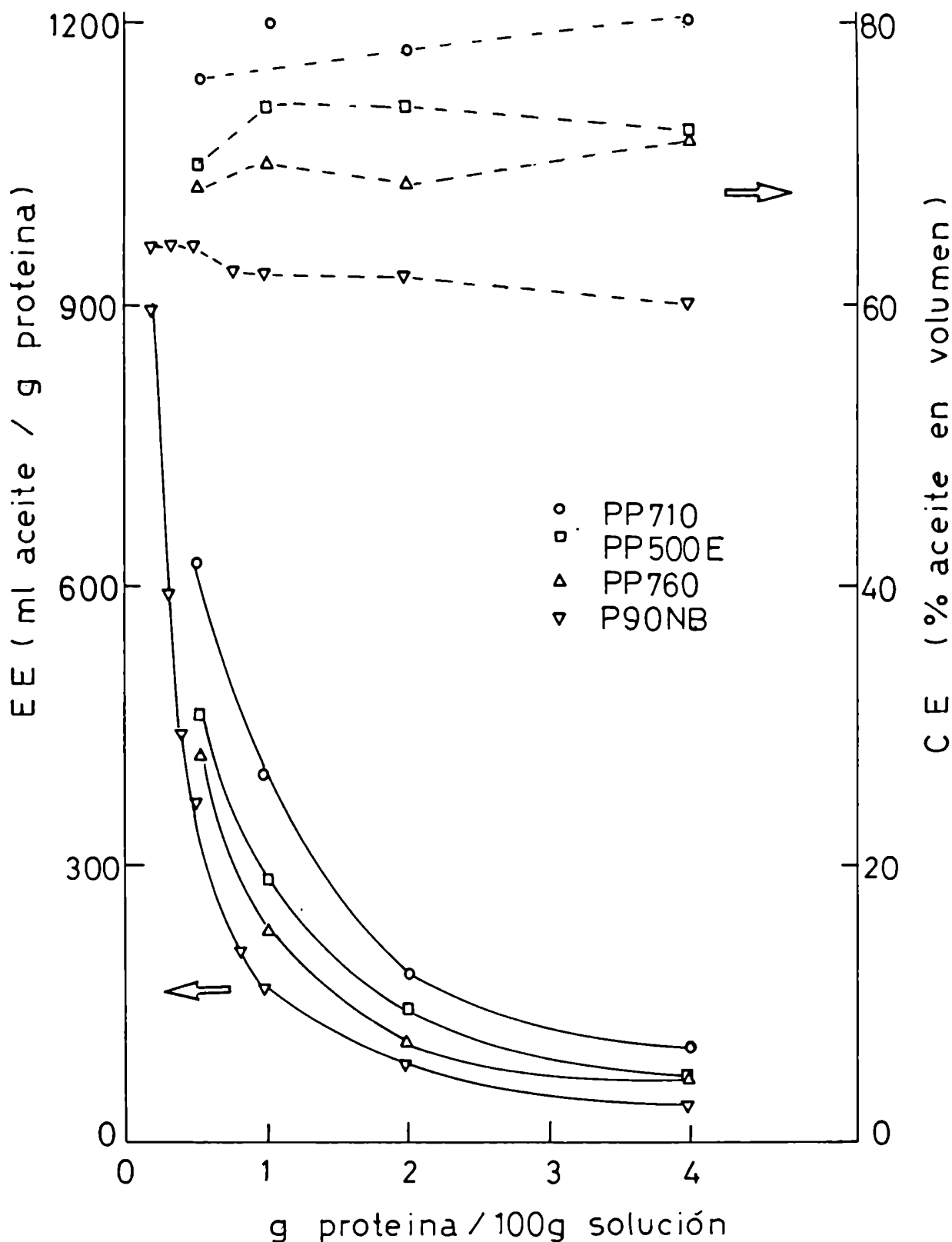


Figura 9: Efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad de emulsificación (CE) y eficiencia de emulsificación (EE). PP710: aislado de proteína de soja Purina 710; PP500E: aislado de proteína de soja Purina 500E; PP760: aislado de proteína de soja Purina 760; P90NB: aislado de proteína de soja Proteinmax 90NB

Tabla 8

Valores de capacidad de emulsificación (CE) y eficiencia de emulsificación (EE) de proteínas de diferente origen

| Proteína | CE (% aceite en volumen) | EE $\frac{\text{ml de aceite}}{\text{g proteína}}$ |
|-------------------------------------|-----------------------------|---|
| Purina 710 | 80 | 400 |
| Caseinato de sodio | 78 | 355 |
| Concentrado de proteína de suero | 76 | 320 |
| Aislado proteína de poroto | 75 | 300 |
| Proteínas cárnicas | 74 | 285 |
| Purina 500E | 74 | 285 |
| Clara de huevo | 72 | 257 |
| Concentrado proteína de zapallo | 71 | 240 |
| Purina 760 | 70 | 233 |
| Albúmina bovina | 70 | 230 |
| Gelatina | 64 | 180 |
| Proteinmax 90NB | 62 | 163 |

La eficiencia de emulsificación disminuye al aumentar la concentración de proteína. Kinsella (1976) sugirió que este comportamiento es debido, a que al disminuir la concentración de proteína las cadenas proteicas se desenrollan en proporción mayor como consecuencia de la agitación que tiene lugar durante el proceso de emulsificación, facilitando la interacción de la parte hidrófoba de la proteína con los glóbulos de aceite. Esto da como resultado neto una mayor relación volumen/area disponible de la proteína y entonces la eficiencia aumenta.

Otros investigadores han encontrado también que la eficiencia de emulsificación de las proteínas disminuye al aumentar la concentración de proteína: Swift y col. (1961), Inklaar y Fortuin (1969), Ivey y col. (1970), Tsai y col. (1972), Acton y Saffle (1972) para proteínas cárnicas; Pearson y col. (1965) para caseinato de sodio, leche en polvo descremada y proteinato de soja; Lin y col. (1974) para proteínas de girasol; Franzen y Kinsella (1976a) para aislados y concentrados de proteína de soja; Wang y Kinsella (1976) para proteínas de cotiledones de alfalfa; Ramanathan y col. (1978) para proteínas de nuez y Halm y Ericksen (1980) para concentrado de proteína de papa y PP500E.

La variación de la eficiencia para un dado aumento de la concentración de proteína fue mayor a bajas concentraciones, observándose por encima de una concentración de

2% (P/P) disminuciones muy pequeñas. A partir de esta concentración probablemente la interfase aceite/agua se satura (o sea todos los glóbulos de aceite quedan cubiertos con un film de proteína) y por lo tanto la eficiencia se hace independiente de la cantidad de proteína presente (Ivey y col., 1970). Wang y Kinse-lla (1976) consideraron que a esta concentración el film interfa-cial alcanza un estado estable (o sea la velocidad con que lle-gan las moléculas de proteína a la superficie de la gota de acei-te y se adsorben es igual a la velocidad con que abandonan dicha superficie) y denominaron a dicha concentración "concentración estable", proponiendo que la comparación de la eficiencia de di-ferentes proteínas debía efectuarse a dicha "concentración esta-ble".

La PP710 presentó una CE y EE mayor a las otras tres proteínas de soja en el rango de concentraciones de 0,5 a 4% (P/P), en tanto que la Proteinmax 90NB fue la que mostró los valores más bajos de eficiencia de emulsificación y CE, en el mismo rango de concentraciones.

En el caso de la Proteinmax 90NB se determi-nó la CE y eficiencia de emulsificación hasta una concentración de 0,2% (P/P). Para las otras proteínas, dichos valores no pudieron obtenerse, debido a que las emulsiones eran muy fluidas a esta concentración, lo cual impidió detectar la disminución brusca de viscosidad que ocurre en el punto de inversión.

A esa concentración (0,2% (P/P)) la Proteinmax 90NB superó la eficiencia de emulsificación de la PP710 a 0,5%. Sin embargo a esta concentración tan baja, la estabilidad de la emulsión (que es la otra característica de la emulsión que debe tenerse en cuenta al elegir un agente emulsificante) puede ser tan baja que carece de interés práctico el hecho que pueda emulsionar tanto aceite. Además las emulsiones en general, contienen o se preparan con concentraciones de aceite inferiores a las del punto de inversión, factor este que también afecta la estabilidad de la emulsión.

IV.1.1.2. Relación entre la capacidad de absorción de agua y aceite de las proteínas y la capacidad y eficiencia de emulsificación de las mismas

Las características de las emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas están fundamentalmente determinadas por las propiedades intrínsecas de las mismas.

La secuencia y disposición de aminoácidos, el tamaño, forma, conformación y flexibilidad de la molécula, polaridad, carga superficial e hidrofobicidad, varían ampliamente de una proteína a otra. Además los tratamientos como la desnaturalización por calentamiento o pH, hidrólisis, modificación química

por adición de grupos hidrofílicos o lipofílicos, pueden modificar drásticamente sus propiedades físico-químicas. Generalmente las propiedades de emulsificación han sido relacionadas con la solubilidad de las proteínas en la fase acuosa (Kinsella, 1976). Sin embargo otros investigadores han encontrado que la solubilidad no es el factor determinante de las propiedades de emulsificación (Mc Watters y Cherry, 1975; Wang y Kinsella, 1976; Mc Watters y Holmes, 1979a, 1979b; Aoki y col., 1980; Flint y Johnson, 1981).

En la última década, la hidrofobicidad, ha sido considerada un factor importante pues las interacciones hidrofóbicas son primordiales en determinar las propiedades de emulsificación de las proteínas alimenticias (Keshavarz y Nakai, 1979; Kinsella, 1979; Kato y col., 1980, 1981; Nakai y col., 1980; Aoki y col., 1981; Li-Chan y col., 1984, 1985).

Varios de ellos han utilizado la hidrofobicidad y la solubilidad como parámetros para predecir las propiedades de emulsificación. En general, el análisis de dichas investigaciones, permite concluir que las propiedades de emulsificación están correlacionadas positivamente con la solubilidad e hidrofobicidad. Sin embargo, como señaló Li-Chan y col. (1985) la inclusión en la ecuación de correlación múltiple de términos de interacción y cuadráticos de las variables mencionadas (solubilidad e hidrofobicidad) revelan que para asegurar una funcio-

nalidad adecuada es necesario un balance óptimo entre dispersibilidad, hidrofobicidad y los parámetros estructurales y no simplemente un valor elevado de cada una de las variables independientes.

Los resultados confirman el concepto de que para obtener propiedades emulsificantes óptimas, es necesario que la proteína posea un balance adecuado entre sus características hidrofílicas y lipofílicas.

El balance hidrofílico-lipofílico (BHL) introducido por Griffin (1949) ha sido usado ampliamente para describir las propiedades surfactantes o emulsionantes. Este número es empírico y carece de significado como valor absoluto. El BHL de algunas proteínas ha sido estimado comparando la estabilidad de emulsiones preparadas con aceite cuyos BHL "requeridos" eran conocidos (Van Eerd, 1971; Aoki y col., 1981). No obstante, tal procedimiento es dificultoso y demanda mucho tiempo.

En base a esto se consideró necesario hallar un índice adecuado para describir el carácter hidrofílico-lipofílico de una proteína que permita predecir las propiedades emulsificantes de la misma.

En la mayoría de los trabajos que figuran en la bibliografía el carácter hidrofílico de una proteína ha sido identificado con su solubilidad o dispersibilidad, en tanto que el carácter lipofílico con la hidrofobicidad.

La hidrofobicidad de las proteínas ha sido

en general determinada de manera indirecta por diferentes métodos; cromatográficamente (Keshavarz y Nakai, 1979); por técnicas fluorométricas (Kato y Nakai, 1980), suponiendo que lo que se medía era representativo del fenómeno de interacción aceite-proteína en la interfase.

La teoría de emulsiones interpreta el fenómeno que ocurre en la interfase agua-aceite en presencia de un agente emulsificante como un proceso de adsorción del mismo. En el caso de una proteína una vez que ésta ha difundido a la interfase, se adsorbe en la misma ocurriendo un desenrollamiento de las cadenas proteicas, orientándose con las zonas hidrofílicas dirigidas hacia la fase acuosa y las hidrofóbicas hacia la fase aceite.

Esta representación física sugiere que la solubilidad no sería la propiedad funcional más adecuada para describir la interacción agua-proteína en la interfase. La propiedad que mejor describiría la afinidad de la proteína por el agua en la interfase sería la capacidad de absorción de agua (CAA) o absorción espontánea de agua.

En forma análoga la habilidad de la proteína para interactuar con el aceite podría ser evaluada por la capacidad de absorción espontánea de aceite (CAAc).

En las Figs.10 y 11 se muestra la absorción espontánea de agua de algunas de las proteínas estudiadas. Todas

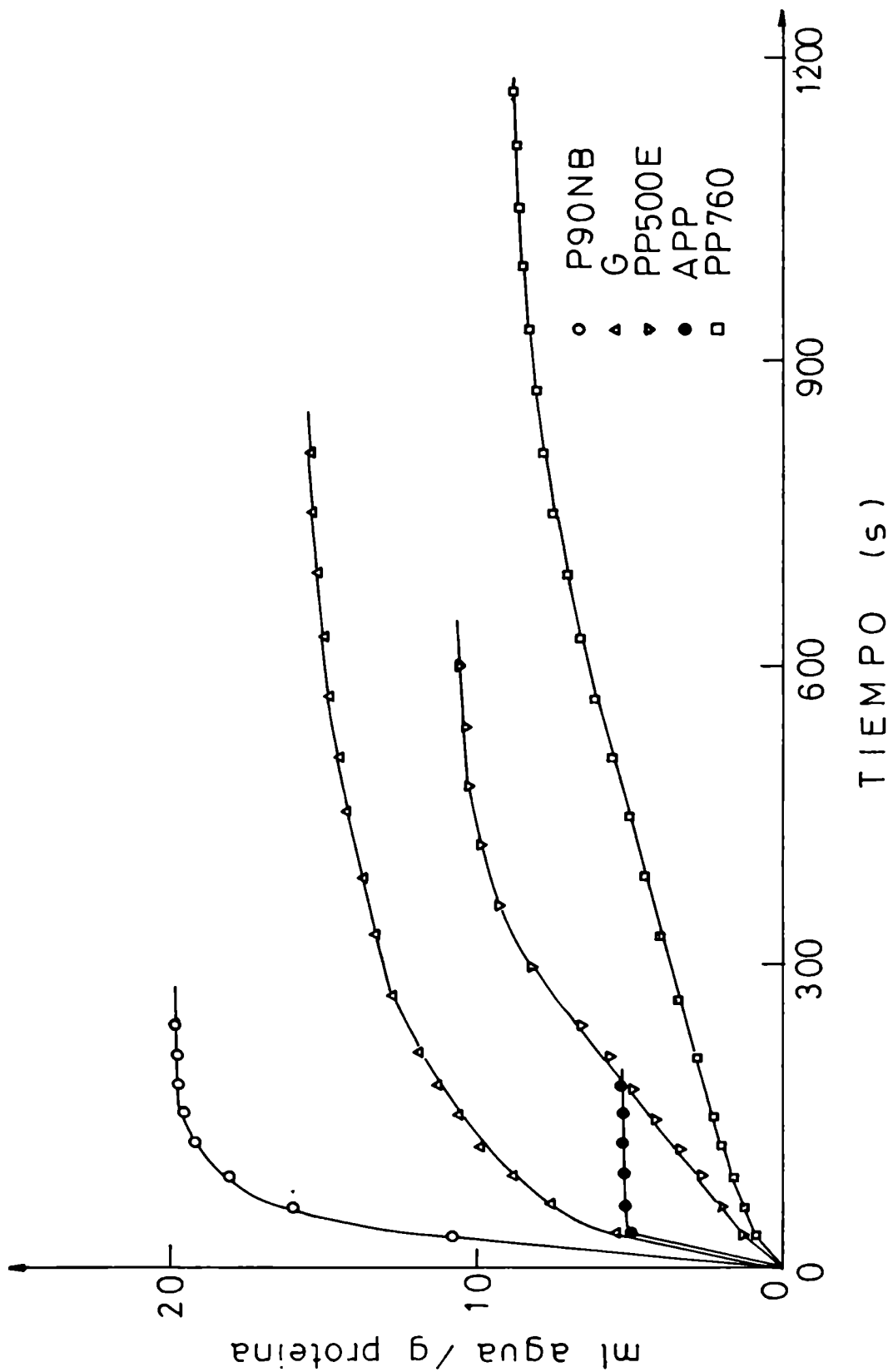


Figura 10: Absorción espontánea de agua de diferentes proteínas
P90NB: aislado de proteína de soja Proteinmax 90NB; G: gelatina; PP500E: aislado de proteína de soja Purina 500E; APP: aislado de proteína de poroto (Phaseolus Vulgaris); PP760: aislado de proteína de soja Purina 760

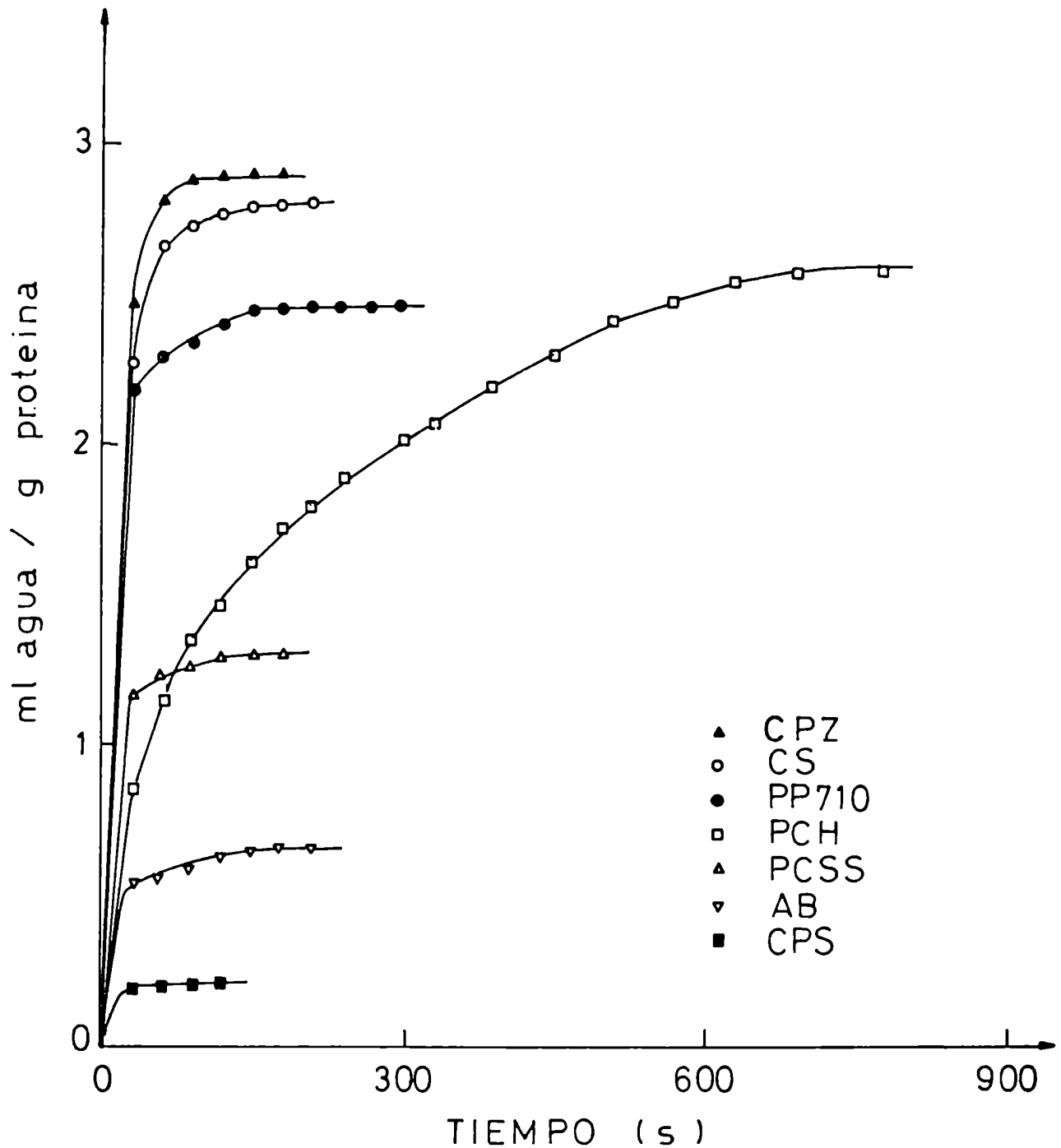


Figura 11: Absorción espontánea de agua de diferentes proteínas
CPZ: concentrado de proteína de zapallo; CS: caseína de sodio; PP710: aislado de proteína de soja Purina 710; PCH: proteína de clara de huevo; PCSS: proteínas cárnicas solubles en solución salina; AB: albúmina bovina; CPS: concentrado de proteína de suero

las muestras fueron químicamente estables en presencia de agua, por lo tanto se alcanzó el equilibrio y las curvas llegaron a una meseta. El volumen de agua/g de proteína absorbido una vez alcanzado el equilibrio representa la capacidad de absorción de agua (CAA).

Desde que Hermansson (1972) adoptó el aparato de Bauman para medir la absorción espontánea de agua de algunas proteínas alimenticias, el método ha sido usado posteriormente por varios investigadores (Torgersen y Toledo, 1977; Wallingford y Labuza, 1983). Pilosof y col. (1985) utilizaron dicho método para determinar la capacidad de absorción de agua de proteínas animales, vegetales y almidones. Ellos hallaron una ecuación matemática para describir la absorción de agua en función del tiempo y determinaron la cinética del proceso.

En las Figs. 12 a 14 se muestran las curvas de absorción de aceite obtenidas para las mismas proteínas. Como en el caso de la absorción de agua, en todos los casos se alcanzó el equilibrio. El tiempo necesario para alcanzar el mismo varió entre 3 y 12 minutos según la proteína. Sin embargo la velocidad de absorción en todos los casos fue rápida al comienzo y luego disminuyó a medida que las curvas se aproximan al equilibrio. El volumen de aceite/g de proteína absorbida cuando se alcanza el equilibrio representa la capacidad de absorción de aceite (CAAc).

El balance hidrofílico-lipofílico de las pro-

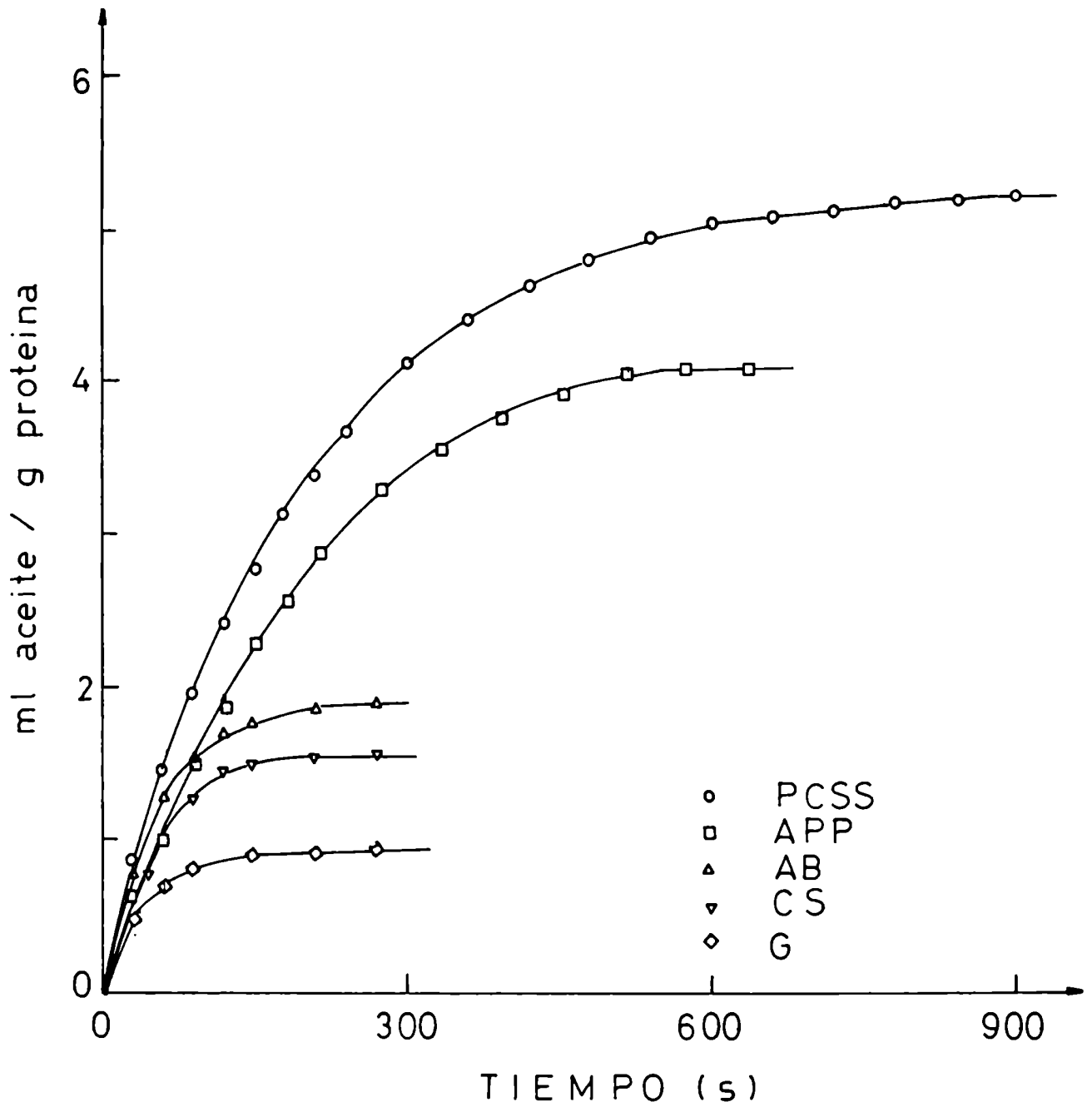


Figura 12: Absorción espontánea de aceite de diferentes proteínas
 PCSS: Proteínas cárnicas solubles en solución salina;
 APP: Aislado de proteína de poroto (*Phaseolus vulgaris*);
 AB: Albúmina Bovina; CS: Caseinato de sodio; G: Gelatina

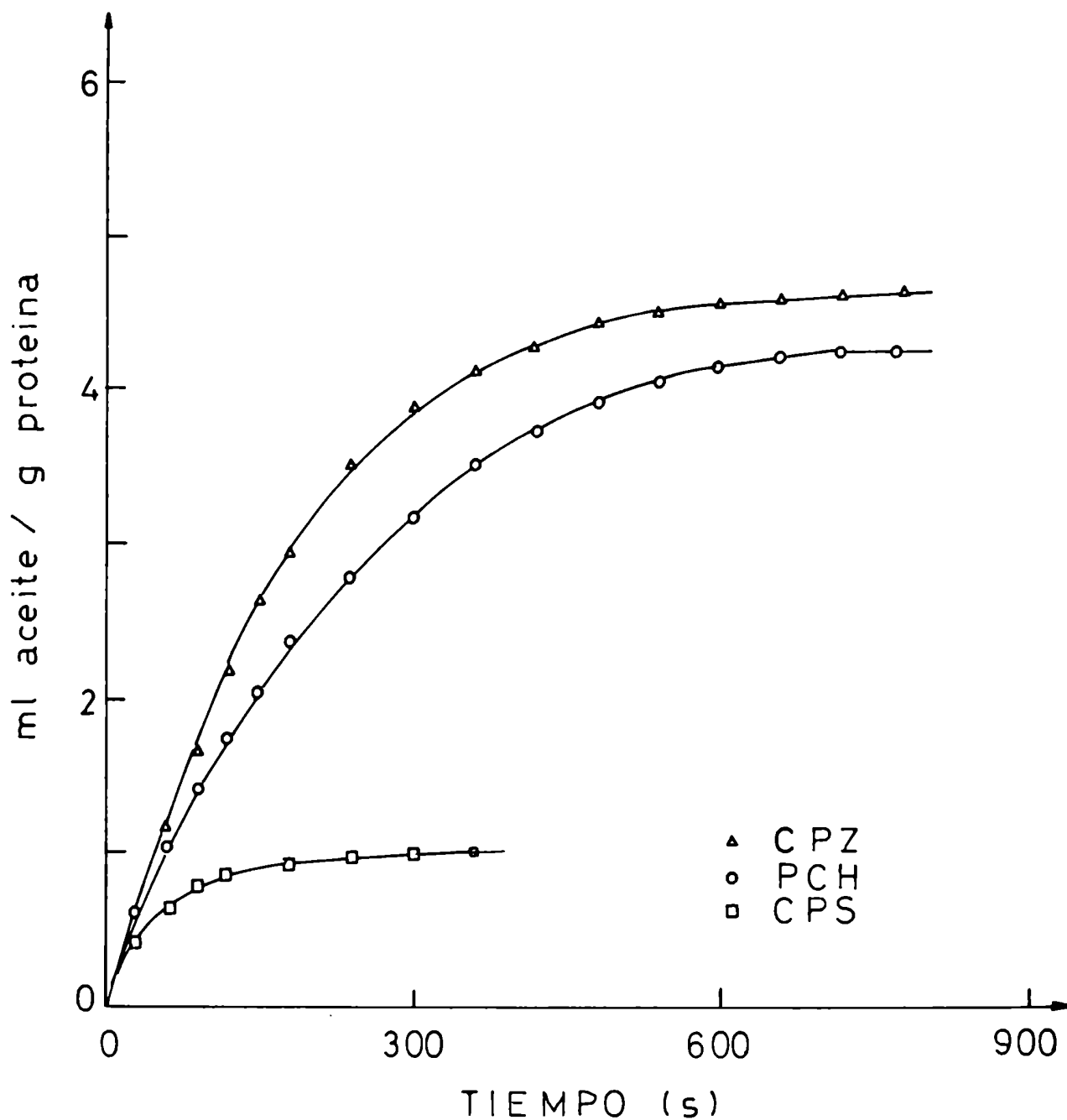


Figura 13: Absorción espontánea de aceite de diferentes proteínas
 CPZ: Concentrado de proteína de zapallo;
 PCH: Proteína de clara de huevo;
 CPS: Concentrado de proteína de suero

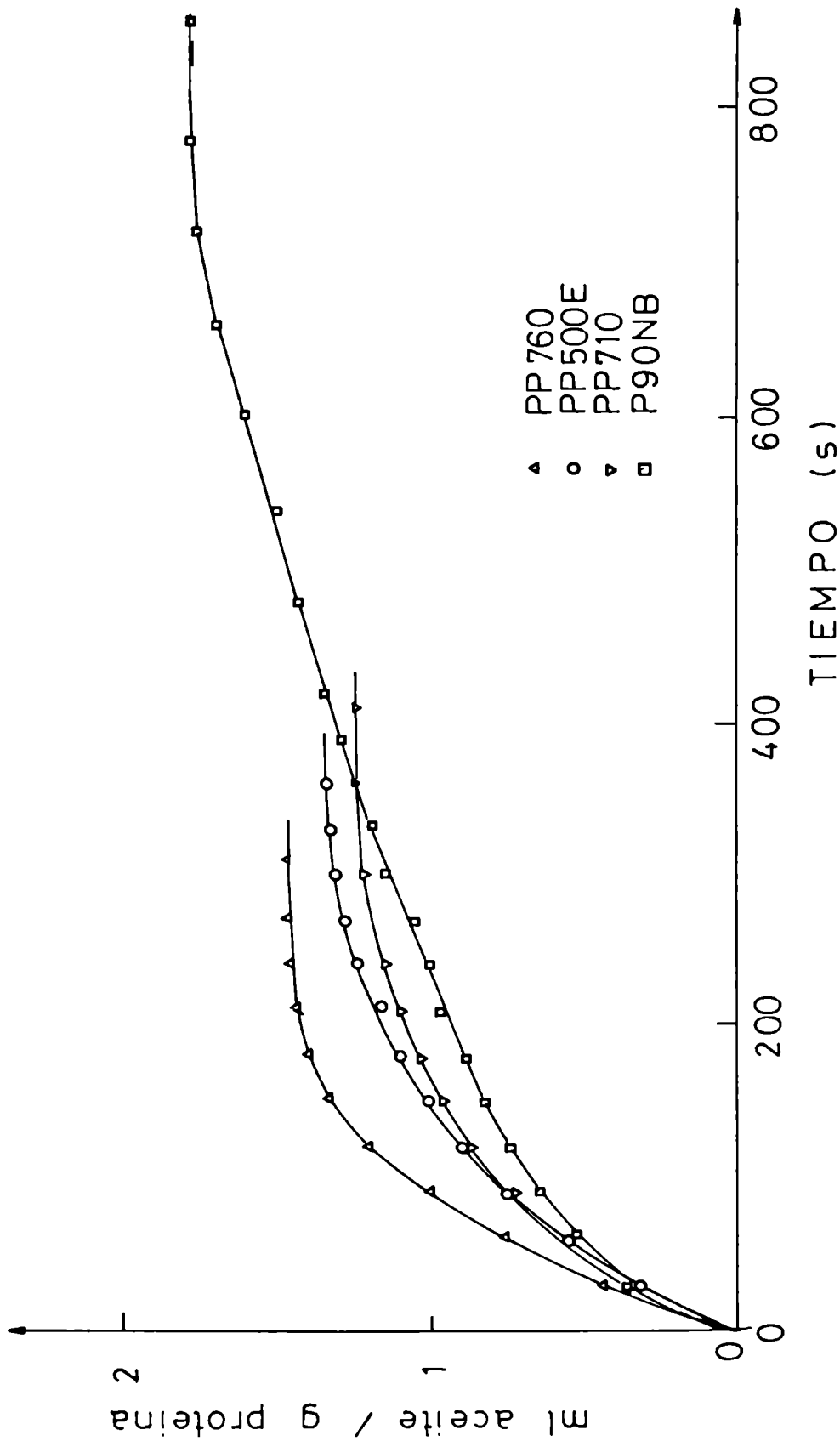


Figura 14: Absorción espontánea de aceite de diferentes protefina
PP760: aislado de protefina de soja Purina 760; PP500E: aislado de protefina de
soja Purina 500E; PP710: aislado de protefina de soja Purina 710; P90NB: aislado
de protefina de soja Proteinmax 90NB

teínas se evaluó a través de la relación entre la capacidad de absorción de agua y la capacidad de absorción de aceite. Dicha relación se denominó índice de absorción de agua y aceite (IAAAC) o sea:

$$\text{IAAAC} = \frac{\text{CAA}}{\text{CAAC}} \quad (17)$$

En la Tabla 9 se muestran los valores de la capacidad de absorción de agua y aceite y los índices de todas las proteínas usadas.

Las capacidades de absorción de agua y aceite presentaron un rango amplio de variación entre las diferentes proteínas. Así la Proteinmax 90NB presentó el valor más alto de CAA y el menor de CAAC; en tanto que las proteínas cárnicas solubles en solución salina presentaron el valor más elevado de la CAAC. Sin embargo el IAAAC que es una medida del carácter hidrofílico-lipofílico de la proteína varió desde 0,20 para el concentrado de proteína de suero a 12,47 para la gelatina.

IV.1.1.3. Correlación entre la capacidad de emulsificación, eficiencia de emulsificación y el Índice de absorción de agua y aceite

En la Fig. 15 se ha representado la CE y EE en función del IAAAC para las proteínas incluidas en la Tabla 9.

Tabla 9

Capacidad de absorción de agua y aceite de proteínas y sus respectivos IAAAc

| Proteína | CAA | CAAc | IAAAc ^a |
|------------------------------------|--|--|---|
| | $\frac{\text{ml agua}}{\text{g proteína}}$ | $\frac{\text{ml aceite}}{\text{g proteína}}$ | $\frac{\text{ml agua}}{\text{ml aceite}}$ |
| Concentrado de proteína de suero | 0,20 | 0,97 | 0,20 |
| Proteínas cárnicas | 1,48 | 5,25 | 0,28 |
| Albúmina bovina | 0,65 | 1,90 | 0,34 |
| Clara de huevo | 2,58 | 4,22 | 0,61 |
| Concentrado de proteína de zapallo | 2,89 | 4,66 | 0,62 |
| Aislado de proteína de poroto | 5,16 | 4,07 | 1,27 |
| Caseinato de sodio | 2,80 | 1,55 | 1,80 |
| Purina 710 | 2,48 | 1,26 | 1,97 |
| Purina 500E | 7,90 | 1,80 | 4,39 |
| Purina 760 | 8,75 | 1,45 | 6,03 |
| Proteinmax 90NB | 19,90 | 1,90 | 10,47 |
| Gelatina | 11,60 | 0,93 | 12,47 |

a. El IAAAc fue obtenido como relación entre CAA y CAAC

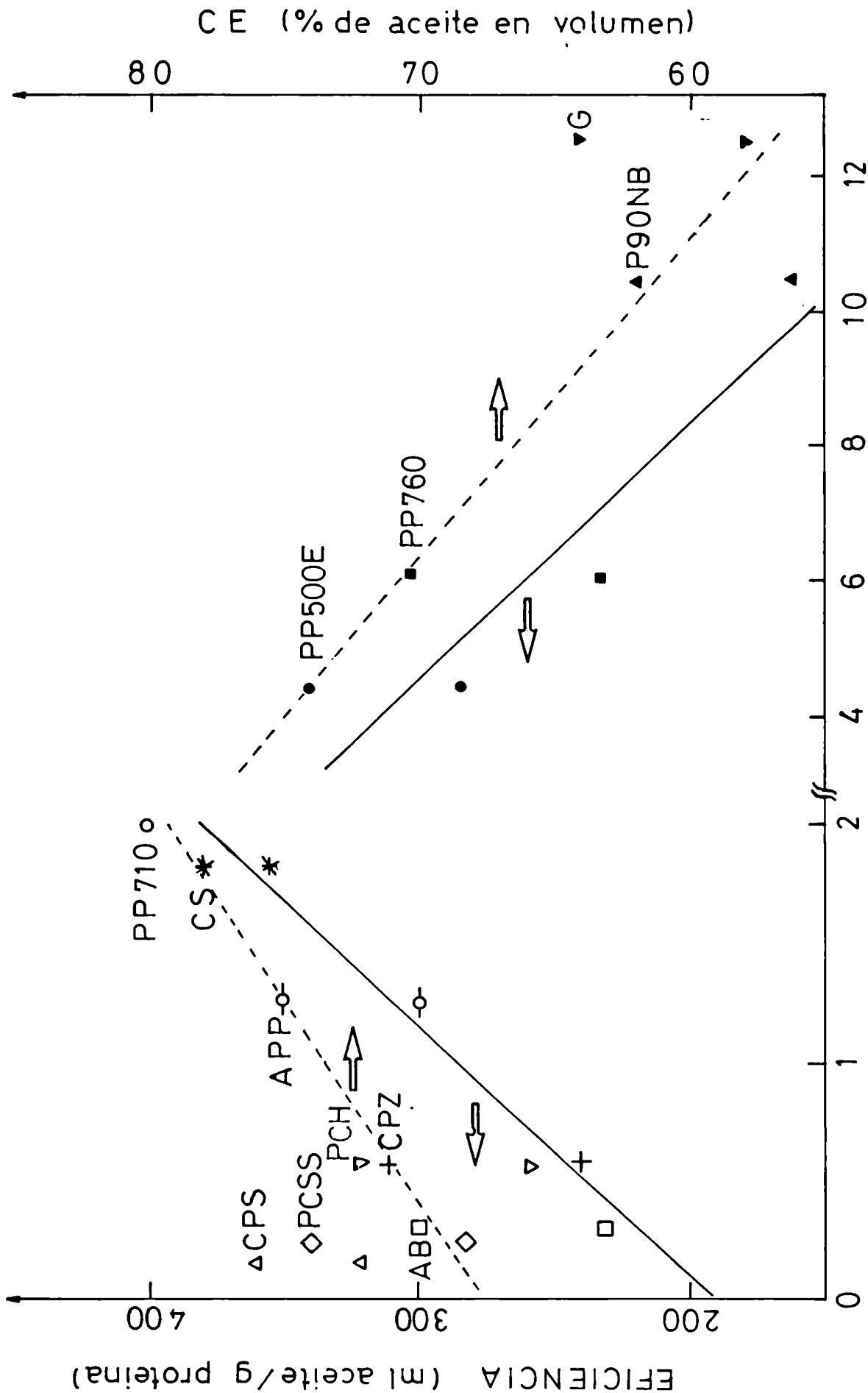


Figura 15: Correlación entre la capacidad de emulsificación (CE) o eficiencia de emulsificación (EE) y el índice de absorción de agua y aceite (IAAAC).

AB: Albúmina bovina; APP: Aislado de proteína de poroto (Phaseolus vulgaris); CPZ: Concentrado de proteína de zapallo; PCH: Proteína de clara de huevo; PCSS: Proteínas cárnicas solubles en solución salina; CPS: Concentrado de proteína de suero; CS: Caseinato de sodio; PP710, PP760, PP500E: Aislados comerciales de proteína de soja Purina 710, 760 y 500E respectivamente; P90NB: Aislado de proteína de soja Proteinmax 90NB; G: Gelatina

En ambos casos se aprecia que existe una correlación definida para la mayoría de las proteínas. La máxima eficiencia y capacidad emulsionante se obtuvo cuando el IAAAc tiene un valor cercano a dos, es decir cuando la proteína absorbe dos veces más agua que aceite. Las rectas de la derecha incluyen las proteínas que absorben más agua que aceite; un aumento en el índice por encima de dos, indica que la proteína se hace más hidrofílica, lo que produce una disminución en la CE y eficiencia. A la inversa, las rectas de la izquierda incluyen a las proteínas con carácter lipofílico creciente y a medida que la proteína se hace más lipofílica ($IAAAc \leq 2$) la CE y EE disminuyen.

Las ecuaciones de regresión obtenidas para las rectas de la derecha y la izquierda (excluyendo por motivos que se explicarán más adelante a la gelatina, concentrado de proteína de suero y proteínas cárnicas) fueron:

para la eficiencia de emulsificación

$$EE = 422,5 - 26,7 (IAAAc) \quad R = 0,956 \quad (P < 0,05) \quad IAAAc \geq 2 \quad (18)$$

$$EE = 192,2 + 96,7 (IAAAc) \quad R = 0,981 \quad (P < 0,01) \quad IAAAc \leq 2 \quad (19)$$

y para la capacidad de emulsificación

$$CE = 83,5 - 2,01 (IAAAc) \quad R = 0,996 \quad (P < 0,01) \quad IAAAc \geq 2 \quad (20)$$

$$CE = 67,7 + 5,94 (IAAAc) \quad R = 0,973 \quad (P < 0,01) \quad IAAAc \leq 2 \quad (21)$$

///

La magnitud relativa de las pendientes de las ecuaciones de regresión, indican que las proteínas incluidas en la recta de la izquierda (mayor carácter lipofílico), son más afectadas por variaciones en el IAAAc que las incluidas en la recta de la derecha. Esto se verifica tanto para la eficiencia como para la capacidad de emulsificación.

El CPS y las PCSS no cumplen las correlaciones halladas entre CE y EE y el índice IAAAc. Dichas proteínas pese a poseer un índice de absorción de agua y aceite muy bajo, presentan una capacidad emulsionante y eficiencia inesperadamente elevada. Esto puede ser explicado por la alta concentración de lactosa presente en el CPS y de NaCl en las PCSS. Los solutos pueden afectar la capacidad de absorción de agua (López de Ogara y col., 1987); además estos solutos pueden modificar la carga superficial de las proteínas y modificar la tensión interfacial entre el aceite y el agua (Flint y Johnson, 1981).

Si se analizan los resultados obtenidos para las proteínas de soja (Tabla 9) se puede ver que la PP500E y la P90NB que son proteínas de soja desnaturalizadas, absorben igual cantidad de aceite, sin embargo la P90NB adsorbe dos veces más agua que la primera. Esto hace que la P90NB sea más hidrofílica (alto IAAAc), lo que da lugar a que la misma presente una capacidad y eficiencia de emulsificación muy bajas (como puede apreciarse en la Fig. 15).

Estos resultados indicarían que para obtener una capacidad de emulsificación y eficiencia elevadas, la desnaturización de las proteínas de soja debe ser llevada a cabo, bajo condiciones que impidan un incremento excesivo de la CAA o sea del carácter hidrofílico de la proteína. Zakaria y Mc Feeters (1978) y Li-Chan y col. (1985) observaron que una desnaturización excesiva ocasiona una disminución en las propiedades de emulsificación de las proteínas.

La PP710 presenta la CE y EE más elevadas. Esto fue logrado reduciendo el tamaño de la molécula por hidrólisis. Dicho proceso provoca una disminución marcada de la CAA (Tabla 9) y entonces se obtiene un IAAAc óptimo.

En IV.1.1.1. se determinó la eficiencia y capacidad de emulsificación en función de la concentración para cuatro proteínas de soja (P90NB, PP710, PP760, PP500E).

Estos datos fueron usados con el objeto de determinar el efecto de la concentración de proteína sobre la correlación entre la eficiencia y el IAAAc. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 16. En la misma se observa que al aumentar la concentración de proteína desde 0,5 a 4% (P/P) el efecto del Índice sobre la eficiencia disminuye (las pendientes disminuyen). A 0,5% que es la concentración más baja estudiada se observa una pequeña desviación de la linealidad.

No se efectuó un estudio similar sobre la CE,

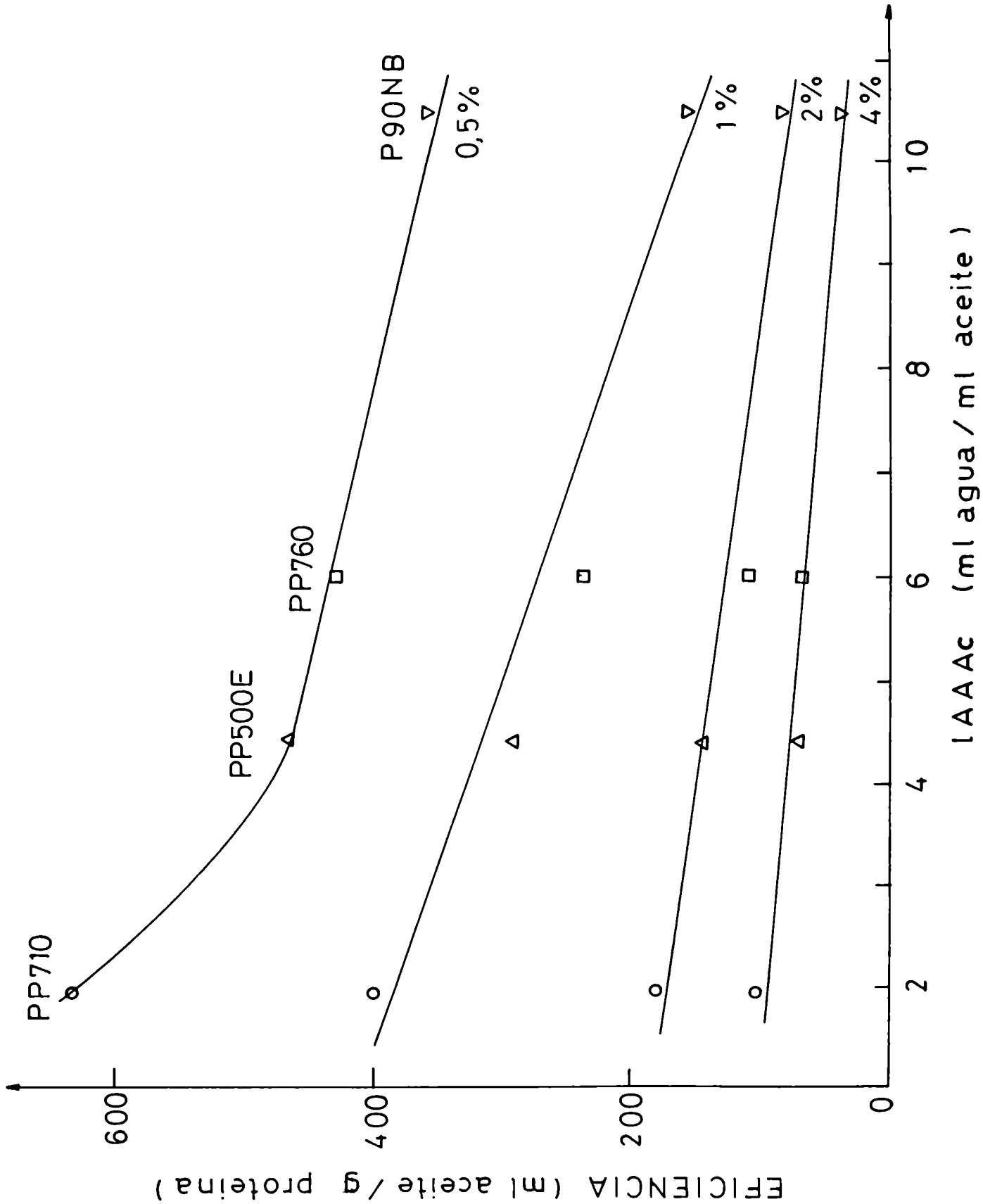


Figura 16: Efecto de la concentración de proteína en la correlación entre la eficiencia de emulsificación y el índice de absorción de agua y aceite (IAAAc)
PP710: aislado de proteína de soja Purina 710; PP500E: aislado de proteína de soja Purina 500E; PP760: aislado de proteína de soja Purina 760; P90NB: aislado de proteína de soja Pro-

porque como ya se mostró en el capítulo IV.1.1. la misma varía en un rango muy estrecho al modificarse la concentración de proteína de 0,5 a 4% P/P. Por lo tanto la dependencia de la misma del IAAc va a ser prácticamente la misma a todas las concentraciones estudiadas (0,5 a 4% P/P).

IV.1.2. Relación entre las propiedades físico-químicas de las proteínas y su habilidad para estabilizar emulsiones

IV.1.2.1. Relación entre la capacidad de absorción de agua, de aceite y viscosidad de la fase continua y la estabilidad de las emulsiones

Las proteínas contribuyen a estabilizar las emulsiones por medio de diversos efectos, éstos incluyen las características del film interfacial y la formación de una doble capa cargada en la interfase aceite/agua.

Proteínas de origen diferente varían ampliamente en su habilidad para estabilizar emulsiones, lo que refleja las diferencias en composición, conformación y rigidez estructural que existe entre las mismas.

Estas diferencias en las características intrínsecas de las proteínas son responsables de que las mismas

presenten propiedades físico-químicas diferentes.

Dado que la absorción de agua y aceite son propiedades físico-químicas adecuadas para explicar el comportamiento de las proteínas en cuanto a su capacidad de emulsificar aceite, tal como se mostró anteriormente, es de esperar que sean también responsables en gran medida de la estabilidad de las emulsiones.

Se sabe además que el incremento de la viscosidad de la fase continua (η_0) produce un aumento en la estabilidad de las emulsiones (Becher, 1965). Este efecto es especialmente importante cuando se agregan agentes coloidales ya que éstos se disuelven en la fase continua (Hennock y col., 1984; Gladwell y col., 1985a, 1985b).

Con el objeto de comprobar en que medida la estabilidad de una emulsión depende de la CAA, CAAC de la proteína y de la viscosidad de la fase continua, se determinó la estabilidad a 45°C de emulsiones con un contenido de aceite de 50% en volumen y concentración de proteína 1% (P/P).

La habilidad de las proteínas para estabilizar la emulsión se caracterizó por el Índice de Inestabilidad (II) definido como:

$$II = \frac{q^{24 \text{ hs}} - q_0}{q_0} 100 \quad (22)$$

Donde $q^{24 \text{ hs}}$ es el % de agua de la fase inferior de la emulsión al cabo de 24 horas de almacenamiento y q_0 el % de agua inicial de la emulsión.

La viscosidad aparente (η_0) de las dispersiones proteicas (1%(P/P)) se determinó a 450 s^{-1} y se calculó como:

$$\eta_0(450 \text{ s}^{-1}) = \frac{\tau_{450 \text{ s}^{-1}}}{450 \text{ s}^{-1}} \quad (23)$$

Donde $\tau_{450 \text{ s}^{-1}}$ es el esfuerzo de corte correspondiente a una velocidad de deformación de 450 s^{-1} .

En la Tabla 10 se muestra la CAA, CAAC, $\eta_{0,450 \text{ s}^{-1}}$ e índice de inestabilidad de varias proteínas. En la misma se incluye además de las proteínas que figuran en la Tabla 9, 3 aislados comerciales de proteínas de soja: Purina 630 (PP630), Purina 660 (PP660), Proteinmax 90HG (P90HG) y un aislado de proteína de soja obtenido en laboratorio (APS).

Estas se incluyeron para aumentar el grado de certeza de las ecuaciones de regresión que se usaran posteriormente para predecir el grado de inestabilidad de las emulsiones.

En dicha Tabla se observa que las dispersiones proteicas 1% (P/P) de las proteínas de soja (salvo la PP710), las proteínas cárnicas solubles en soluciones salinas y el caseinato de sodio presentaron una viscosidad más elevada que las de-

Tabla 10

Relaciones entre el índice de inestabilidad, viscosidad, capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite e índice de absorción de agua y aceite

| Protefna | η_o (450 s ⁻¹) | CAA ($\frac{\text{ml de agua}}{\text{g protefna}}$) | CAAC ($\frac{\text{ml de aceite}}{\text{g protefna}}$) | IAAAC ($\frac{\text{ml de agua}}{\text{ml de aceite}}$) |
|----------|---------------------------------|--|---|--|
| CPS | 50,4 | 1,11 | 0,20 | 0,97 |
| PCSS | 44,0 | 1,47 | 1,48 | 5,25 |
| AB | 48,0 | 1,14 | 0,65 | 1,90 |
| CPZ | 44,3 | 1,23 | 2,89 | 4,66 |
| APP | 43,4 | 1,07 | 5,16 | 4,07 |
| CS | 45,8 | 1,57 | 2,80 | 1,55 |
| PP710 | 46,0 | 1,16 | 2,48 | 1,26 |
| APS | 35,6 | 1,86 | 5,45 | 1,72 |
| PP 660 | 39,5 | 2,00 | 6,00 | 1,40 |
| PP 500 E | 36,0 | 1,24 | 7,90 | 1,80 |
| PP 630 | 43,9 | 1,50 | 6,20 | 1,28 |
| PP 760 | 32,0 | 1,85 | 8,75 | 1,45 |
| P 90 HG | 31,8 | 1,35 | 7,55 | 0,77 |
| P 90 NB | 26,0 | 9,22 | 19,9 | 1,90 |

a: Luego de 24 horas de almacenamiento se observó la aparición de aceite (0,1-0,5 ml) en la parte superior de los tubos

más proteínas.

La viscosidad de las dispersiones proteicas es función del tamaño, forma y flexibilidad de la molécula, grado de hidratación e interacciones moleculares. La desnaturalización, en general disminuye la solubilidad y aumenta la capacidad de absorción de agua de las proteínas (Kinsella, 1979; López de Ogara y col., 1986).

El aumento de la CAA se produce probablemente debido a una apertura de la molécula que da lugar a que haya más residuos de aminoácidos hidrofílicos expuestos y que normalmente se encuentran ubicados en el interior de la molécula nativa (Voutsinas y col., 1983).

Las capacidades de absorción de agua y viscosidades elevadas de los aislados comerciales de proteína de soja, han sido atribuidos a diferentes grados de desnaturalización de la proteína de soja nativa. Por ejemplo la PP500E es una proteína de soja completamente desnaturalizada (Hermansson, 1979), en tanto que la PP710 que es un aislado comercial de peso molecular reducido por hidrólisis presenta una CAA y viscosidad baja.

Hermansson (1975b) relacionó la viscosidad de un aislado de proteína de soja, caseinato de sodio y concentrado de proteína de suero con las capacidades de absorción de agua de las mismas. Urbanski y col. (1983) y López de Ogara y col., (1986) encontraron que las capacidades de absorción de agua

de aislados comerciales de proteína de soja estaban correlacionados positivamente con la viscosidad de las dispersiones de dichas proteínas.

En la Fig. 17 se ha representado la viscosidad de las dispersiones proteicas (1%(P/P)) en función de la capacidad de absorción de agua para las proteínas incluidas en la Tabla 10. La ecuación de regresión hallada fue:

$$\eta_o \text{ (cp)} = - 0,041 + 0,366 \text{ CAA} \quad (R = 0,862 \quad (P < 0,001)) \quad (24)$$

IV.1.2.2. Modelos de regresión para predecir la desestabilización de emulsiones formuladas con proteínas de diferente origen

En la Tabla 10 se puede observar que la proteína PP710 es la que presenta una capacidad de absorción de aceite, de agua y viscosidad baja, es además la que da la emulsión más inestable entre las proteínas de soja (II más elevado). Sin embargo la que presenta el mayor porcentaje de inestabilidad es la emulsión formulada con el concentrado de proteína de suero, en tanto que la Proteinmax 90NB es la que da la emulsión más estable (II más bajo). En la Tabla 10 se incluye el índice de absorción de agua y aceite (IAAAc) de dichas proteínas. En IV.1.3. se demostró que dicho índice era una medida de la habilidad de la pro-

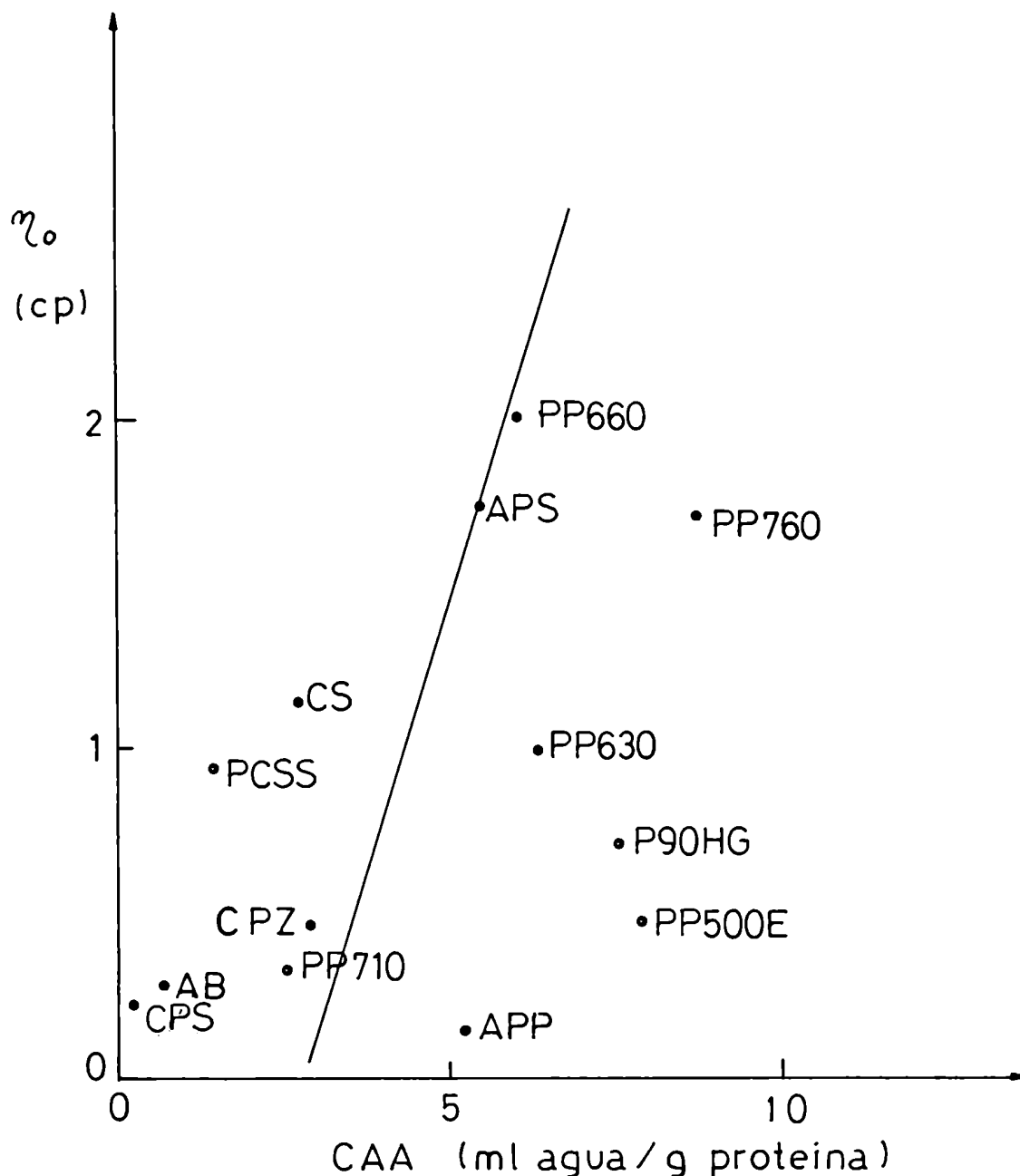


Figura 17: Correlación entre la capacidad de absorción de agua (CAA) de diferentes proteínas alimenticias y la viscosidad (η_0) de dispersiones 1% (P/P) de las mismas.
AB: albúmina bovina; APP: aislado de proteína de poroto (Phaseolus vulgaris); CPZ: concentrado de proteína de zapallo; CPS: concentrado de proteína de suero; PCH: proteína de clara de huevo; G: gelatina; CS: caseinato de sodio; APS: aislado de proteína de soja; PP710, PP500E, PP630, PP660, PP760: aislados comerciales de proteína de soja Purina 710, 500E, 630, 660 y 760 respectivamente; P90NB, P90HG: aislados comerciales de proteína de soja Proteinmax 90NB y 90HG respectivamente

teína para atraer simultáneamente agua y aceite y podía usarse para predecir la capacidad de emulsificación de las proteínas.

Un balance adecuado entre las características hidrofílicas y lipofílicas (IAAAC próximo a dos) permitía obtener la capacidad de emulsificación máxima. Sin embargo, puede observarse a partir de la Tabla 10 que no existe ninguna relación entre el índice IAAAc y el II de las emulsiones. Se propusieron modelos de regresión simple y múltiple, para cuantificar la relación que existe entre el Índice de Inestabilidad de las emulsiones formuladas con las diferentes proteínas y las diferentes variables independientes (CAAc, CAA, η_0). Dichos modelos se muestran en las Tablas 11 y 12.

Para efectuar este análisis las proteínas fueron divididas en dos grupos de acuerdo al valor del índice de absorción de agua y aceite: proteínas con un IAAAc lipofílico (IAAAcL) que son aquellas que absorben 2 veces o menos agua que aceite (en la Tabla 10 se incluyen a las 7 primeras) y proteínas con un IAAAc hidrofílico (IAAAcH) que son aquellas que absorben 2 veces o más agua que aceite (las ocho últimas en la Tabla 10).

Para las emulsiones formuladas con proteínas de índice IAAAcL se halló que modelos de regresión lineal simple entre II y CAAc e II y CAA presentaban coeficientes de determinación (R^2) altamente significativos ($P < 0,05$) en ambos casos (Tabla 11). Un modelo de regresión lineal múltiple entre el II y

Tabla 11

Modelos de regresión para predecir la pérdida de estabilidad de emulsiones formuladas con protefnas con índice de absorción de agua y aceite lipofílico (IAAAcL)

| Modelo de regresión | Variable Independiente | R ² | Coefficiente de regresión | Valor t de Student | β |
|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| Lineal simple | Constante | | 28,831 | | |
| | CAAC | 0,619 ^a | -0,566 | | |
| Lineal simple | Constante | | 26,373 | | |
| | CAA | 0,616 ^a | -0,525 | | |
| Lineal múltiple | Constante | | 50,060 | | |
| | CAAC | 0,881 ^a | -0,780 | 2,99 ^b | -0,563 |
| | CAA | | -0,840 | 2,97 ^b | -0,559 |
| Lineal múltiple | Constante | | 53,62 | | |
| | CAAC | | -0,710 | 2,99 ^c | -0,510 |
| | CAA | 0,930 ^a | -0,880 | 3,52 ^b | -0,590 |
| | η_o | | -2,930 | 1,46 | -0,288 |

a: N = 7 ; P < 0,05

b: P < 0,05

c: P < 0,01

Tabla 12

Modelos de regresión para predecir la pérdida de estabilidad de emulsiones formuladas con protefnas con índice de absorción de agua y aceite hidrofílico (IAAACH)

| Modelo de regresión | Variable Independiente | R ² | Coefficiente de regresión | Valor t de Student | β |
|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| Lineal simple | Constante | 0,668 ^a | 31,194 | | |
| | CAA | | -0,637 | | |
| Lineal simple | Constante | 0,428 ^b | 12,269 | | |
| | η_o | | -0,269 | | |
| Lineal múltiple | Constante | 0,760 ^c | 47,711 | | |
| | CAA | | -2,066 | 2,63 ^d | -1,611 |
| | η_o | | 2,066 | 1,39 | 0,850 |

a: N = 8 ; P < 0,01

b: N = 8 ; P < 0,1

c: N = 8 ; P < 0,05

d: P < 0,05

CAA, CAAC mostró que las variables mencionadas estaban correlacionadas con un alto grado de significancia ($P < 0,05$). El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,881, lo que indica que el 88,1% de las variaciones en el Índice de Inestabilidad de las proteínas estudiadas pueden ser explicadas por las dos variables independientes: CAA y CAAC.

Los valores t de Student de los coeficientes de regresión parciales tienen un elevado grado de significancia ($P < 0,05$), lo que indica que tanto CAA como CAAC, afectan la inestabilidad de la emulsión, en forma significativa.

La inclusión de la viscosidad en el modelo de regresión múltiple como tercera variable independiente, elevó el valor de R^2 a 0,930, lo que significa que en este último modelo el 93% de las variaciones del II pueden ser explicadas por las 3 variables independientes CAA, CAAC y η_0 .

Los valores negativos de los coeficientes de regresión parciales indican que para disminuir la inestabilidad de la emulsión es necesario un aumento de la capacidad de absorción de aceite, agua y viscosidad de la fase continua.

La importancia relativa de las variables independientes incluidas en el modelo, que está dada por los valores de los coeficientes β (coeficientes de regresión estandarizados) indican que la capacidad de absorción de aceite y agua contribuyen en igual medida a determinar el grado de inestabilidad

de la emulsión. El valor del coeficiente β para la viscosidad es menor que para la CAA y CAAC, lo cual puede ser atribuido a que dentro de este grupo de proteínas (IAAACL) las variaciones de la viscosidad es pequeña.

En la Tabla 12 se muestran los modelos de regresión lineal simple y múltiple, entre el II y las diferentes variables independientes, para el grupo de proteínas con un IAAAC hidrofílico (IAAAC_H). Se encontró que la primera variable independiente que debía ser considerada era la CAA. El valor del coeficiente de determinación (R^2), correspondiente a dicha correlación fue 0,668 ($P < 0,01$), lo que indica que dicha variable explica el 66,8% de las variaciones del II.

El segundo modelo de regresión simple que incluyó a la viscosidad como variable independiente, mostró que la misma está correlacionada negativamente con el II. El grado de significancia fue elevado ($P < 0,1$) y da cuenta del 42,8% de las variaciones del II.

Estos resultados indican que como para el grupo de las proteínas con un IAAAC_H, para reducir la inestabilidad de la emulsión, es necesario que la proteína tenga una capacidad de absorción de agua y viscosidad elevadas. En base a esto se aplicó entonces un modelo de regresión lineal múltiple, que incluyó a la viscosidad y la capacidad de absorción de agua como variables independientes. El valor del coeficiente de determina-

ción (R^2) fue 0,760 ($P < 0,05$).

Al incluir a la capacidad de absorción de aceite como tercera variable independiente, no se observó incremento alguno en el coeficiente de determinación (R^2). Este se debe probablemente a que entre las proteínas con un IAAAc, la capacidad de absorción de aceite varía en un rango muy pequeño (Tabla 10).

Los modelos de regresión múltiple hallados indican que la capacidad de absorción de agua y aceite y la viscosidad de la fase continua son propiedades físico-químicas importantes que determinan la habilidad de las proteínas para estabilizar emulsiones. No obstante, el coeficiente de determinación, $R^2 = 0,76$ obtenido para las proteínas con un IAAACH y que incluye a todas las de soja, indica que existen otros factores que determinan las propiedades estabilizantes de las mismas. Entre ellos puede mencionarse la propiedad que tienen las proteínas de soja de asociarse entre ellas fuertemente, en la interfase aceite-agua para formar un film denso y continuo alrededor de los glóbulos de aceite.

IV.1.3. Conclusiones

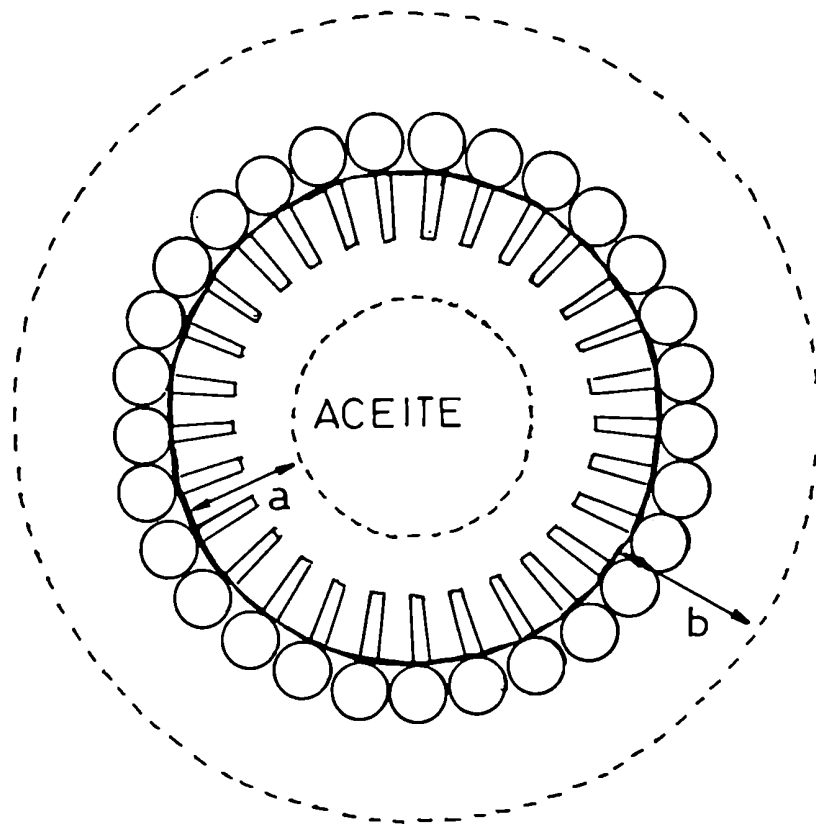
Los resultados obtenidos muestran que la estabilidad de las emulsiones se ve favorecida por capacidades de absorción de agua y aceite elevadas. Esto indica que la molécula

de proteína actúa como un mediador en la formación de una emulsión estable, ligando agua y aceite simultáneamente para formar barreras densas, que impiden la coalescencia de las gotas de aceite. Estos resultados, en ciertos aspectos coinciden con los hallados por Watanabe y Arai (1981). Estos investigadores encontraron una correlación muy buena entre los valores de estabilidad de las emulsiones y la disminución de la movilidad de los protones de las moléculas de agua y aceite, después del proceso de emulsificación.

Así, la condición que existe por ejemplo en una emulsión aceite en agua estabilizada por una proteína puede ser representada esquemáticamente por el modelo de doble capa representado en la Fig. 18.

En este modelo, las proteínas difunden y se reorientan en la interfase aceite-agua con los grupos hidrofílicos orientados hacia la fase acuosa y los hidrofóbicos hacia el aceite. De esta manera, se forma una doble capa en la cual la proteína actúa como un mediador ligando moléculas de agua y aceite. De este modo las propiedades físico-químicas del agua y aceite ligados en la doble capa pueden diferir de las del seno de la fase aceite y la fase continua (dispersión proteica). El espesor de la doble capa interfacial depende de la capacidad de absorción de agua, aceite y de la concentración de la proteína. Las dimensiones de la doble capa y no su estructura precisa parecen determinar la

AGUA



a: capa de aceite ligada
b: capa de agua ligada

Figura 18: Representación esquemática del modelo de doble capa

estabilidad de las emulsiones. Además, las interacciones protefna-protefna pueden aumentar las fuerzas de cohesión entre las protefnas y de este modo aumentar la rigidez y resistencia mecánica de la doble capa, previniendo de este modo su ruptura e impidiendo la coalescencia de las gotas de aceite.

La inclusión de la viscosidad en el modelo de regresión lineal múltiple de ambos grupos de protefnas estudiados indica que un valor de viscosidad alto, es otro factor que contribuye a aumentar la estabilidad de las emulsiones.

Un valor de viscosidad alto de la fase continua produce una disminución del movimiento browniano y por consiguiente la probabilidad de que foculen y coalescan las gotas de aceite, decrece (Becher, 1965; Tadros y Vincent, 1983). Además la velocidad de cremado, también disminuye (Petrowsky, 1976).

Los resultados obtenidos, respecto a la relación entre las propiedades físico-químicas de las protefnas y la capacidad de emulsificación, eficiencia de emulsificación y estabilidad de las emulsiones formuladas con las mismas contribuyen a proporcionar una nueva interpretación del fenómeno de emulsificación. Se puede concluir lo siguiente:

- La capacidad de emulsificación y eficiencia de las protefnas

depende de la existencia de un balance adecuado entre las características hidrofílicas y lipofílicas de la proteína y no se incrementan al aumentar el carácter hidrofílico o lipofílico de la proteína. El índice de absorción de agua y aceite (IAAAc), que indica el balance que existe entre las características lipofílicas e hidrofílicas, es una medida de la habilidad de la proteína de reducir la tensión interfacial entre el agua y el aceite permitiendo la formación de la emulsión con un requerimiento energético menor.

- La estabilidad de las emulsiones no depende del balance entre las características lipofílicas e hidrofílicas sino de la magnitud de dichas características. Es decir que la estabilidad se incrementa al aumentar la CAA y/o la CAAC.

Esta interpretación permite explicar muchos de los resultados contradictorios que figuran en la bibliografía. En particular el hecho de que la solubilidad y las propiedades de emulsificación no están correlacionadas (Mc Watters y Cherry, 1975; Wang y Kinsella, 1976; Mc Watters y Holmes, 1979a, 1979b; Aoki y col., 1980; Flint y Johnson, 1981).

///

Además el hecho que la capacidad de absorción de agua y aceite de la proteína y no la solubilidad determinan la estabilidad de las emulsiones, permite explicar la efectividad de numerosos agentes no tensioactivos tales como las gomas y los sólidos finamente divididos de estabilizar emulsiones.

IV.2. Cinética de desestabilización de emulsiones formuladas con proteínas alimenticias de diferente origen

IV.2.1. Ecuación para describir el proceso de desestabilización en función del tiempo

La estabilidad de las emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas alimenticias ha sido evaluada de formas diferentes: midiendo la cantidad de aceite o crema que se separa de la emulsión luego de un cierto tiempo a una temperatura de almacenamiento especificada; o bien determinando el tiempo necesario para que se produzca un dado grado de ruptura de la emulsión (Ver II.5.). Estos métodos aunque útiles desde el punto de vista práctico, no proporcionan información respecto al proceso total de desestabilización de dichas emulsiones. Para ello es necesario estudiar la cinética de desestabilización de las emulsiones que permitirá cuantificar y comparar la habilidad de proteínas de diferente origen, para estabilizar emulsiones aceite/agua.

Además puede contribuir a esclarecer cuáles son los mecanismos involucrados en la desestabilización de las emulsiones. Para estudiar la cinética de pérdida de estabilidad de las emulsiones se adoptó el siguiente procedimiento: se prepararon emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas de diferente origen, de acuerdo a la técnica descrita en III.2.4. Todas las emulsiones se formularon con un contenido de proteína de 1% (P/P) y de aceite de 50% (V/V). La temperatura de almacenamiento fue de 45°C.

La pérdida de estabilidad de las emulsiones durante 24-30 horas de almacenamiento se evaluó como el incremento de agua de la fase inferior ($q(t) - q_0$) de la emulsión en función del tiempo. En las Figs. 19 y 20 se muestra el incremento del porcentaje de agua de la fase inferior de la emulsión en función del tiempo para las emulsiones preparadas usando proteínas de origen diferente.

Todas las emulsiones presentaron una desestabilización limitada ya que todas las curvas alcanzaron un valor máximo.

El tiempo necesario para alcanzar esta condición de pseudo-equilibrio depende de la proteína y varió entre 1 hora para la PP500E a aproximadamente 10 horas para el caseinato de sodio. Sin embargo la velocidad de desestabilización en todos los casos fue rápida al comienzo, disminuyendo luego a medida que transcurre el tiempo y las curvas se aproximan al valor

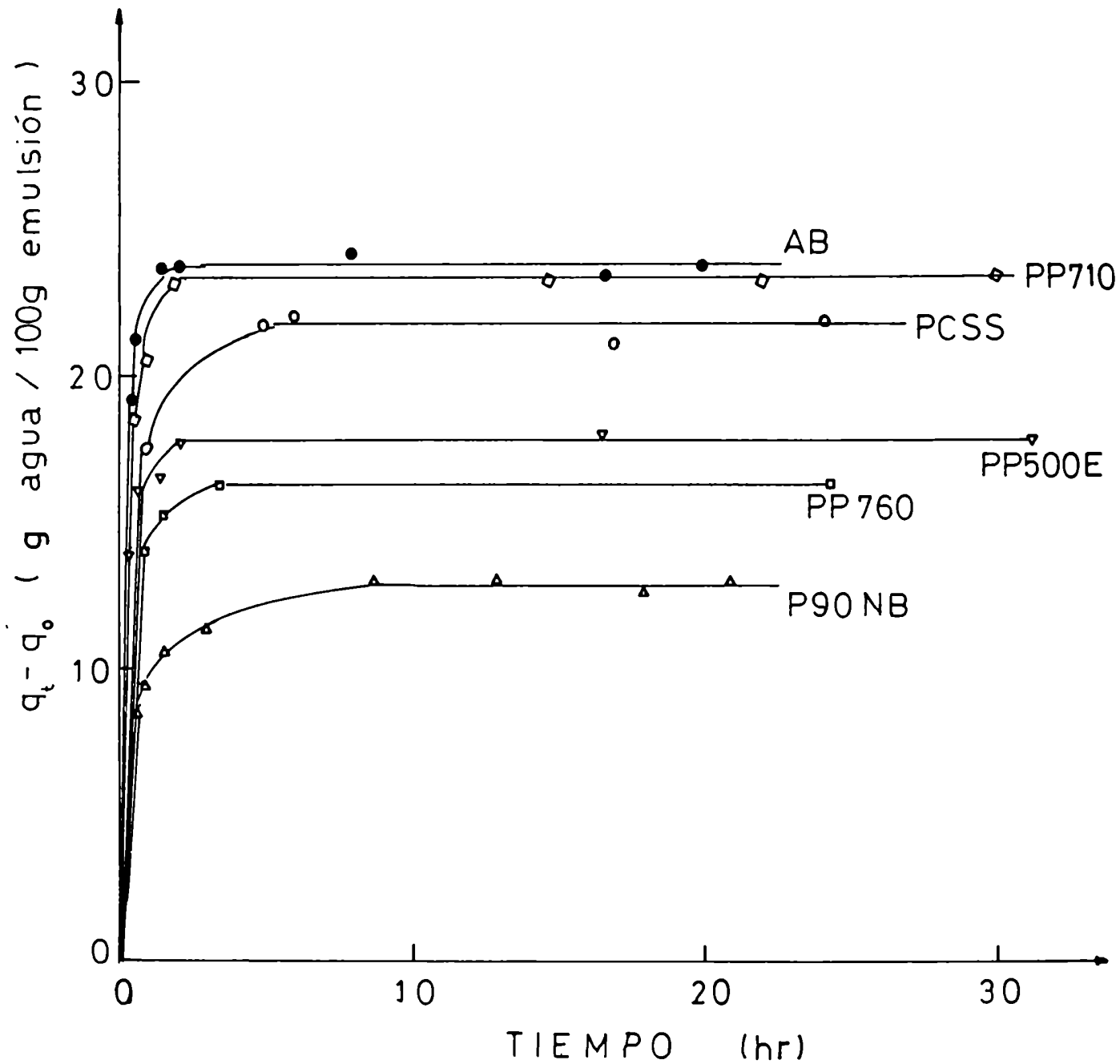


Figura 19: Desestabilización a 45°C de emulsiones formuladas con diferentes proteínas (ϕ : 0,5; C = 1% (P/P))

AB: albúmina bovina; PCSS: proteínas cárnicas solubles en solución salina; PP500E: aislado de proteína de soja Purina 500E; PP760: aislado de proteína de soja Purina 760; P90NB: aislado de proteína de soja Proteinmax 90NB

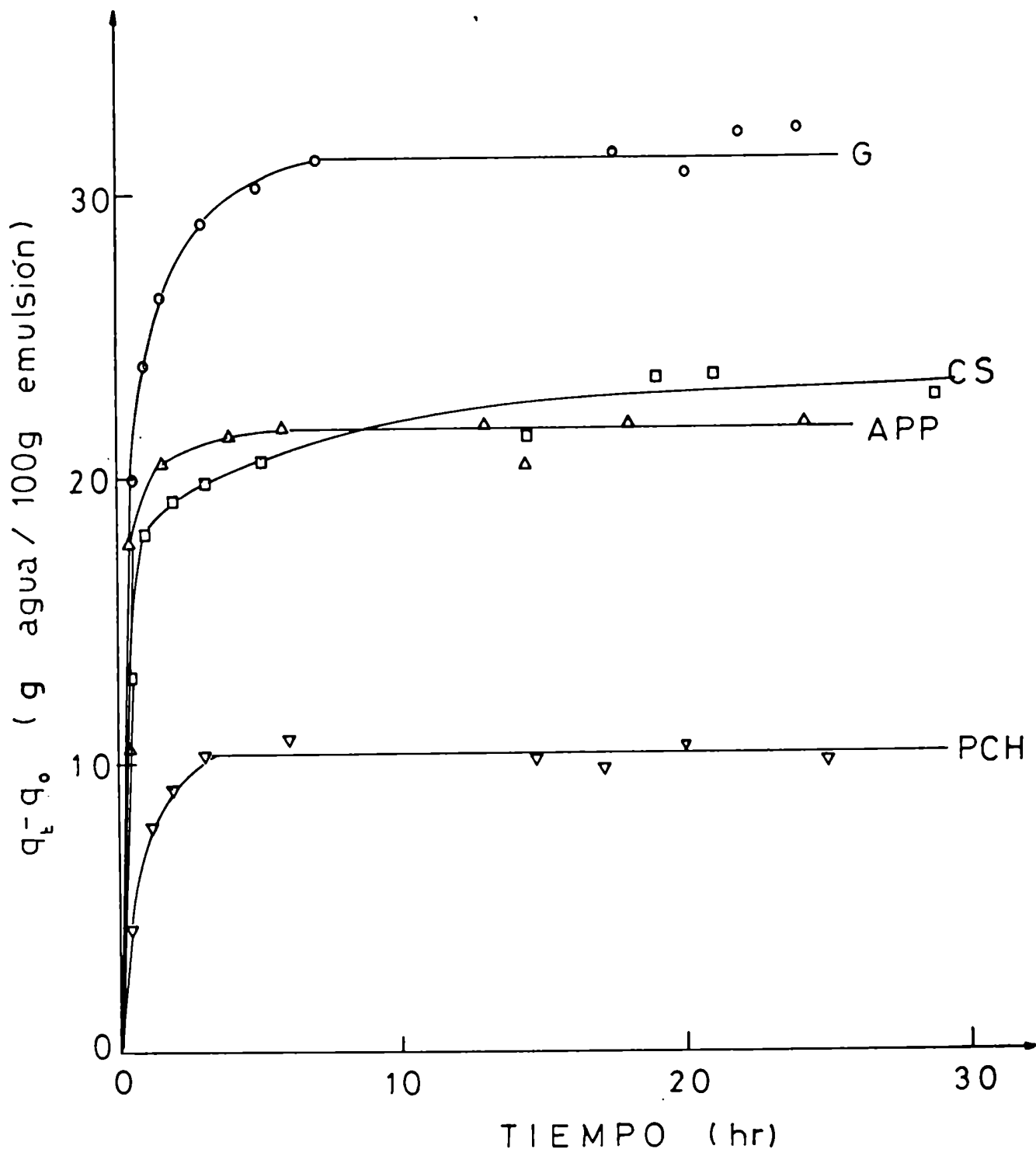


Figura 20: Desestabilización a 45°C de emulsiones formuladas con diferentes proteínas ($\phi = 0,5$; $C = 1\%$ (P/P))
G: gelatina; CS: caseinato de sodio; APP: aislado de proteína de poroto (*Phaseolus vulgaris*); PCH: Proteína de clara de huevo

de pseudo-equilibrio.

El incremento del porcentaje de agua de la fase inferior correspondiente al punto en que las curvas alcanzan el valor de pseudo-equilibrio, representa el incremento de agua máximo (Q) de la fase inferior de las emulsiones.

Para describir matemáticamente las curvas de las Figs. 19 y 20 se propuso la siguiente ecuación a dos parámetros

$$q'(t) = q(t) - q_0 = \frac{Q t}{B + t} \quad (25)$$

donde: q_0 = porcentaje de agua de la emulsión recién preparada

t = tiempo

$q(t)$ = porcentaje de agua de la fase inferior a cada tiempo (t)

Q = es el incremento máximo del contenido de agua de la fase inferior de la emulsión

B = tiempo necesario para que la fase inferior gane una cantidad de agua igual a $Q/2$.

Para hallar los valores de los parámetros estadísticos \hat{Q} y \hat{B} que dan el mejor ajuste de la ecuación (25) a los datos experimentales (q'_i, t_i) , se exigió que la función siguiente

///

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n (q'_i - \frac{\hat{Q} t_i}{\hat{B} + t_i})^2 \quad (26)$$

fuera mínima. Para ello se aplicó un programa de regresión no lineal (Ralston and Jennrich, 1978) procesándose los datos en una computadora IBM PC.

Los estimadores de las desviaciones estandar de \hat{Q} y \hat{B} fueron obtenidos aplicando la matriz de covarianza siguiente:

$$C \approx \begin{vmatrix} \hat{\sigma}_Q^2 & \hat{\sigma}_{QB} \\ \hat{\sigma}_B & \hat{\sigma}_B^2 \end{vmatrix} \quad (27)$$

Donde: $\hat{\sigma}_Q$ y $\hat{\sigma}_B$ representan los estimadores de las desviaciones estandar de \hat{Q} y \hat{B} respectivamente y $\hat{\sigma}_{QB}$ representa la correlación entre \hat{Q} y \hat{B} .

Con el fin de evaluar el grado de ajuste de la ecuación (25) a los datos experimentales, se calculó el error relativo porcentual ($\epsilon\%$) como:

$$\epsilon\% = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{q'_i - \frac{\hat{Q} t_i}{\hat{B} + t_i}}{q'_i} \right| \quad (28)$$

///

En la Tabla 13 se muestran los valores de \hat{Q} , \hat{B} , los estimadores de sus desviaciones estandar ($\hat{\sigma}_Q$ y $\hat{\sigma}_B$) y el $\epsilon\%$ obtenido aplicando el tratamiento matemático descrito anteriormente a las emulsiones formuladas con proteínas de diferente origen.

Se observa que el ajuste de la ecuación (25) a los datos experimentales es satisfactorio ya que el $\epsilon\%$ oscila entre 1 y 7%.

Los valores de $\hat{\sigma}_B$ y $\hat{\sigma}_Q$ indican que el parámetro \hat{B} está más indeterminado que \hat{Q} . Esto puede ser debido a la dificultad de obtener valores experimentales del incremento de agua de la fase inferior de la emulsión para tiempos inferiores a 30 minutos, que es un tiempo superior en todos los casos al parámetro \hat{B} (que está comprendido entre 3 minutos para la PP500E y 22 minutos para el caseinato de sodio).

El máximo valor de \hat{Q} se obtuvo para la gelatina y el menor para la clara de huevo, esto último debido a la capacidad de gelificación de las proteínas de la clara a la temperatura de almacenamiento.

IV.2.2. Cinética del proceso de desestabilización

La velocidad de desestabilización fue obtenida diferenciando la ecuación (25) respecto al tiempo:

Tabla 13

Parámetros que describen la desestabilización de emulsiones formuladas con protefnas de diferente origen

| Protefna | N° de datos | $\hat{Q} \pm \hat{\sigma}_Q$ g de agua 100 g de emulsión | $\hat{B} \pm \hat{\sigma}_B$ horas | $\epsilon\%$ |
|-------------------------------|-------------|--|---------------------------------------|--------------|
| Clara de huevo | 10 | 10,3 \pm 0,2 | 0,246 \pm 0,006 | 7 |
| Proteinmax 90 NB | 8 | 13,21 \pm 0,05 | 0,342 \pm 0,002 | 3 |
| Purina 760 | 5 | 16,5 \pm 0,2 | 0,153 \pm 0,001 | 2 |
| Purina 500 E | 5 | 17,70 \pm 0,01 | 0,045 \pm 0,003 | 4 |
| Protefnas cár- nicas | 6 | 21,80 \pm 0,02 | 0,213 \pm 0,003 | 6 |
| Aislado protefna de poroto | 9 | 21,7 \pm 0,2 | 0,099 \pm 0,001 | 3 |
| Albúmina bovina | 8 | 23,7 \pm 0,7 | 0,073 \pm 0,001 | 4 |
| Purina 710 | 5 | 23,7 \pm 0,7 | 0,113 \pm 0,001 | 2 |
| Caseinato de sodio | 9 | 23,2 \pm 0,2 | 0,370 \pm 0,003 | 4 |
| Gelatina | 10 | 32,1 \pm 0,1 | 0,312 \pm 0,001 | 1 |

$$\frac{dq'(t)}{dt} = \frac{QB}{(B + t)^2} \quad (29)$$

Introduciendo luego en esta última ecuación la expresión del tiempo obtenida a partir de la ecuación (25) se obtuvo la siguiente expresión cinética para la velocidad de desestabilización:

$$\frac{dq'(t)}{dt} = \frac{1}{BQ} (Q - q'(t))^2 \quad (30)$$

Donde $(Q - q'(t))$ representa la cantidad de agua que aún puede ganar la fase inferior de las emulsiones para alcanzar el valor correspondiente a la desestabilización máxima.

El factor $(QB)^{-1}$ es la constante específica (K) de velocidad del proceso de desestabilización. Entonces \hat{K} puede ser calculada como:

$$\hat{K} = \frac{1}{\hat{Q} \hat{B}} \quad (31)$$

Con lo cual la expresión de velocidad (ec. (30)) resulta:

$$\frac{dq'(t)}{dt} = K(Q - q'(t))^2 \quad (32)$$

El estimador de la desviación estándar de \hat{K} fue calculado usando la siguiente expresión:

///

$$\sigma_K^2 = (\partial K/\partial Q)^2 \hat{\sigma}_Q^2 + (\partial K/\partial B)^2 \hat{\sigma}_B^2 + 2(\partial K/\partial Q)(\partial K/\partial B) \hat{\sigma}_{QB} \quad (33)$$

$\hat{\sigma}_{QB}$ fue obtenido a partir de la matriz de covarianza (27).

Las constantes específicas de velocidad del proceso de desestabilización de las emulsiones, así como los estimadores de la desviación estandar de \hat{K} y $\hat{\sigma}_{QB}$ se muestran en la Tabla 14. En la misma se puede apreciar que los valores de \hat{K} están predichos con una certeza aceptable.

Velocidad inicial de desestabilización

La misma se obtuvo diferenciando la ecuación (25) respecto al tiempo y evaluándola a tiempo cero ($t = 0$).

$$R_0 = \left(\frac{dq'(t)}{dt} \right)_{t=0} = \frac{\hat{Q}}{\hat{B}} \quad (34)$$

Los valores de R_0 correspondientes a las emulsiones estabilizadas por protefnas de distinto origen se incluyen en la Tabla 14.

La determinación de la velocidad inicial para evaluar la pérdida de estabilidad de las emulsiones ha sido usado por otros investigadores (Pearce y Kinsella, 1978; Kato y col., 1985).

///

Tabla 14

Constantes específicas de velocidad y velocidades iniciales de desestabilización de emulsiones formuladas con protefnas de diferente origen

| Protefna | $\hat{\sigma}QB$ $(\frac{\text{ml de agua}}{100 \text{ g emulsión}} \text{ hr})$ | $\hat{K} \pm \hat{\sigma}K$ $(\frac{\text{g de H}_2\text{O}}{100 \text{ g emulsión}} \text{ hr})^{-1}$ | R_0 $(\frac{\text{g de H}_2\text{O}}{100 \text{ g de emulsión}}) \text{ hr}^{-1}$ |
|----------------------------|---|---|--|
| Clara de huevo | 0,026 | 0,39 \pm 0,02 | 42 |
| Proteinmax 90 NB | 0,0058 | 0,22 \pm 0,02 | 39 |
| Purina 760 | 0,012 | 0,40 \pm 0,01 | 108 |
| Purina 500 E | 0,046 | 1,25 \pm 0,03 | 393 |
| Protefnas cárnicas | 0,014 | 0,215 \pm 0,001 | 102 |
| Aislado protefna de poroto | 0,011 | 0,46 \pm 0,03 | 220 |
| Albúmina bovina | 0,017 | 0,57 \pm 0,01 | 325 |
| Purina 710 | 0,014 | 0,38 \pm 0,02 | 210 |
| Caseinato de sodio | 0,017 | 0,117 \pm 0,001 | 63 |
| Gelatina | 0,0035 | 0,0996 \pm 0,0001 | 103 |

IV.2.3. Conclusiones

Los resultados indican que cuatro criterios pueden ser usados para evaluar la habilidad de proteínas de origen diferente para estabilizar una emulsión:

- a) La cantidad máxima de agua ganada por la fase inferior de la emulsión (Q).
- b) El tiempo necesario para ganar la mitad de la cantidad máxima (B).
- c) La constante específica de velocidad del proceso de desestabilización (K).
- d) La velocidad inicial de desestabilización (R_0).

Q es un criterio adecuado para evaluar la máxima desestabilización que puede ocurrir durante un período largo de almacenamiento de la emulsión. Desde este punto de vista la clara de huevo es la proteína que muestra la propiedad estabilizante más elevada; por el contrario la emulsión formulada con gelatina es la que presenta el grado más alto de desestabilización.

Sin embargo los valores de Q por si solos no describen completamente el proceso de desestabilización de una emulsión ya que no proporcionan ninguna información respecto a la velocidad con que se produce dicho proceso. Para caracterizar

la velocidad con que se produce la desestabilización es necesario recurrir a los valores de B o K.

A partir de la ecuación (31) se observa que K depende de Q y B. Sin embargo como las variaciones en los valores de Q son muy pequeñas en relación a las variaciones de B, resulta que las constantes específicas de velocidad están determinadas principalmente por los valores del parámetro B.

En efecto una correlación significativa fue obtenida ($R = 0,763$; $P < 0,01$) entre las constantes específicas de velocidad y los valores de B de las distintas emulsiones. Así la emulsión estabilizada por la PP500E que tiene el valor de B menor, presenta la constante específica de velocidad de desestabilización más elevada.

La emulsión estabilizada por la gelatina pese a que presenta el valor más alto de Q, muestra la constante de velocidad menor debido a que el valor de B es elevado. Las emulsiones formuladas con las proteínas cárnicas solubles en solución salina y el caseinato de sodio, también muestran valores muy pequeños de constantes específicas de velocidad de desestabilización, debido a la misma razón (altos valores de B).

Por otra parte si lo que interesa, es determinar las primeras etapas de la desestabilización, el parámetro más adecuado como índice de inestabilidad es R_0 ya que el mismo mide la velocidad inicial de desestabilización. Como se puede apreciar

a partir de la Tabla 14 para la gelatina y la clara de huevo las velocidades iniciales de desestabilización no están correlacionadas con la constante específica de velocidad del proceso total de desestabilización.

Los procesos cinéticos que determinan la velocidad total de la desestabilización incluyen cremado, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald. En los sistemas reales estos cuatro procesos pueden ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden (Tadros y Vincent, 1983). La velocidad total del proceso de desestabilización va a estar determinada por la velocidad del proceso más lento de los cuatro mencionados.

Las velocidades de cremado dependen de la diferencia de densidades entre la fase continua y dispersa, de los pesos moleculares, de la presencia o ausencia de electrólitos, así como también de la viscosidad de la fase continua (Tadros y Vincent, 1983). La velocidad de floculación está determinada por el balance existente entre las fuerzas de atracción de Van der Waals y las de repulsión de naturaleza eléctrica (que determina la energía potencial entre las gotas en función de la distancia de separación de acuerdo a la teoría de DLVO) y las fuerzas de difusión térmica y convección que tienden a que las gotas se pongan en contacto. La velocidad de coalescencia depende de la ruptura del film de proteína adsorbida en la interfase aceite-agua

y por lo tanto va a depender del espesor y propiedades viscoelásticas del mismo, principalmente. La velocidad del proceso de maduración de Ostwald dependerá fundamentalmente del grado de polidispersibilidad de la emulsión.

Una velocidad del proceso de desestabilización de orden cero (Hahn y Vold, 1975) indica que la coalescencia de las gotas de aceite en la interfase entre la emulsión y la fase aceite es la determinante de la velocidad del proceso total de desestabilización. Una velocidad del proceso de orden uno indica que la velocidad de coalescencia de las gotas de aceite en el seno de la emulsión, es la etapa más lenta y por lo tanto la determinante de la velocidad del proceso total y por último una velocidad de desestabilización de segundo orden es debido a que la etapa determinante de la velocidad del proceso total de desestabilización es la floculación. En el caso de las emulsiones estabilizadas por las proteínas estudiadas aquí, la floculación podría ser la etapa determinante de la velocidad del proceso total de desestabilización. En efecto la ecuación (30) o su análoga (32) muestran una dependencia de orden dos de la velocidad de desestabilización.

IV.3. Efecto de la concentración de proteína y aceite y la temperatura de almacenamiento en la cinética de desestabilización de emulsiones formuladas con proteína de soja

IV.3.1. Efecto de la concentración de proteína y aceite sobre el índice de inestabilidad y la velocidad inicial de desestabilización

La habilidad de una proteína para estabilizar una emulsión está determinada en primer término por las propiedades físico-químicas de la misma tal como se ha demostrado en IV.1.2. Sin embargo la concentración de la fase dispersa y de proteína son factores que también afectan la estabilidad de la emulsión.

Para estudiar la influencia de la concentración de aceite y proteína en la estabilidad de las emulsiones se eligió una proteína de soja (Proteinmax 90NB) que demostró tener una buena aptitud para estabilizar emulsiones aceite de maíz/agua en el rango de concentraciones de aceite y de proteína de interés. Las emulsiones se prepararon de acuerdo a la técnica descrita en la parte experimental (III.2.4). La concentración de la P90NB en las dispersiones acuosas fue de 0,5, 1 y 2% (P/P), y la fracción en volumen de aceite (\emptyset) de la emulsión se varió de 0,30 a

0,58. El estudio de la estabilidad de las emulsiones se efectuó a 37, 45 y 60°C.

La pérdida de estabilidad de las emulsiones, durante 24 horas de almacenamiento se determinó como el incremento del contenido de agua de la fase inferior de las mismas ($q(t) - q_0$) en función del tiempo.

En las Figs. 21-25 se muestran las curvas obtenidas para emulsiones de distinto contenido de proteína y aceite y almacenadas a distintas temperaturas. Todas las emulsiones presentaron una desestabilización limitada. La velocidad de desestabilización fue rápida al comienzo, disminuyendo a medida que el incremento del contenido de agua ($q(t) - q(0)$), se aproxima al valor de equilibrio.

Aplicando un tratamiento matemático análogo al utilizado en IV.2.1 se verificó que dichas curvas podían describirse por la ecuación (25).

En la Tabla 15 se muestran los valores de los parámetros estadísticos \hat{Q} y \hat{B} los estimadores de sus desviaciones estandar $\hat{\sigma}_Q$ y $\hat{\sigma}_B$ y el grado de ajuste de la ecuación (25) a los datos experimentales ($\epsilon\%$) para todas las emulsiones estudiadas. Los valores del error porcentual ($\epsilon\%$) indican que en la mayoría de los casos el ajuste fue muy bueno. En el caso de emulsiones muy estables (emulsiones cuya fracción en volumen de aceite es 0,5 ó 0,58 a 37°C), el grado de ajuste fue menor ($\epsilon\%$ osciló

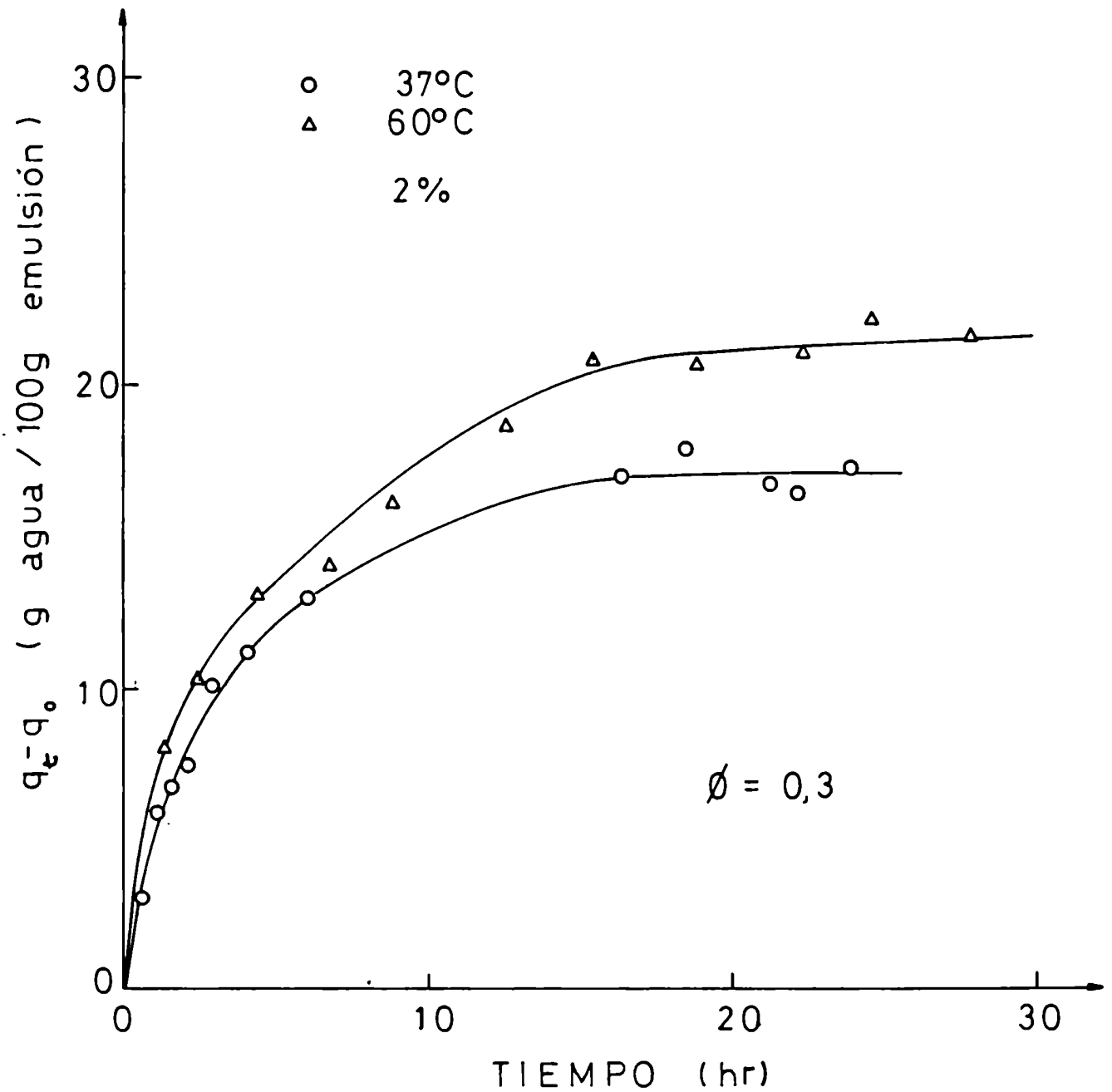


Figura 21: Desestabilización a 37 y 60°C de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 2% (P/P))

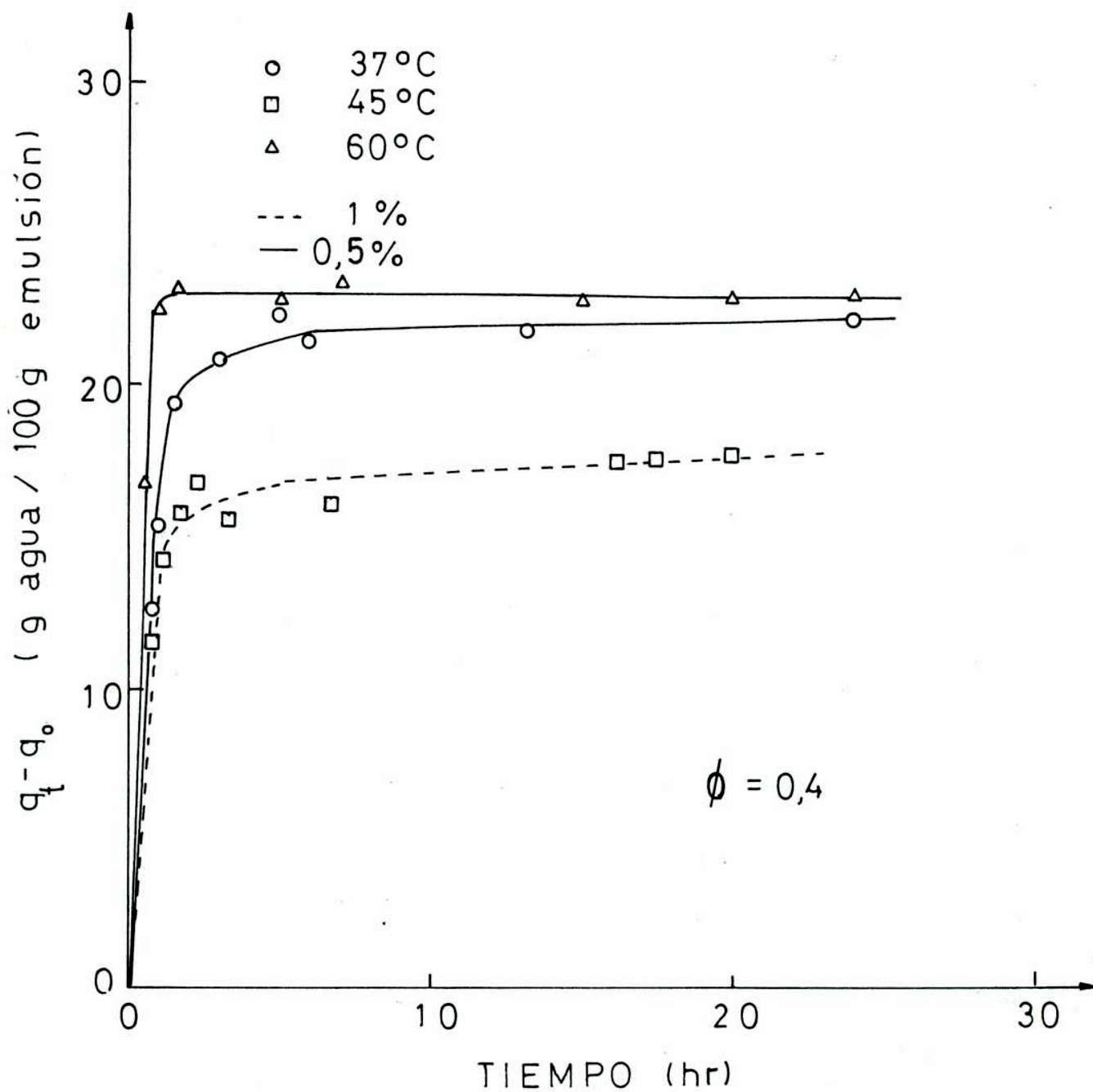


Figura 22: Desestabilización a 60 y 45°C de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 1 ó 0,5% (P/P))

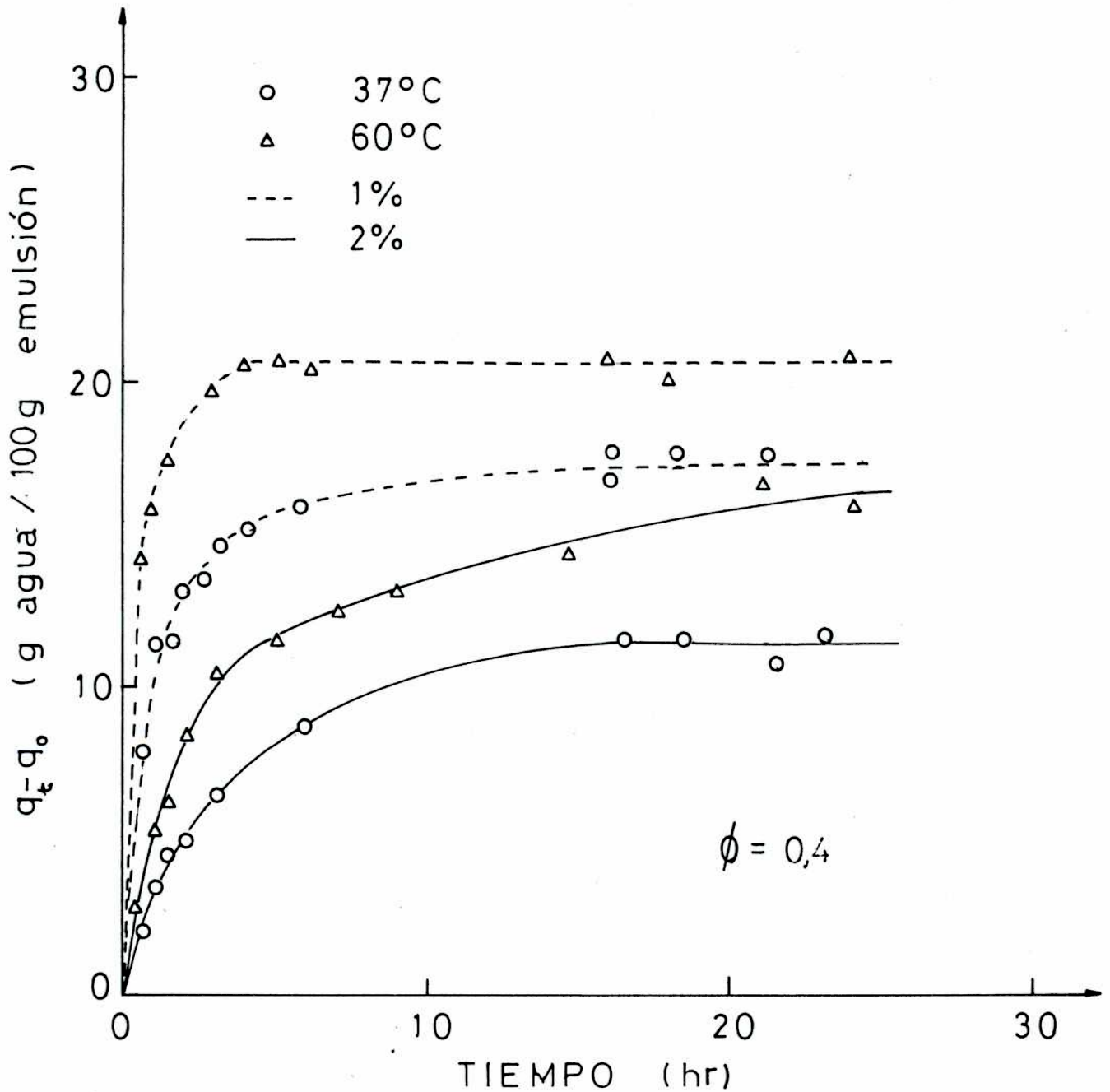


Figura 23: Desestabilización a 37 y 60°C de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 1 ó 2% (P/P))

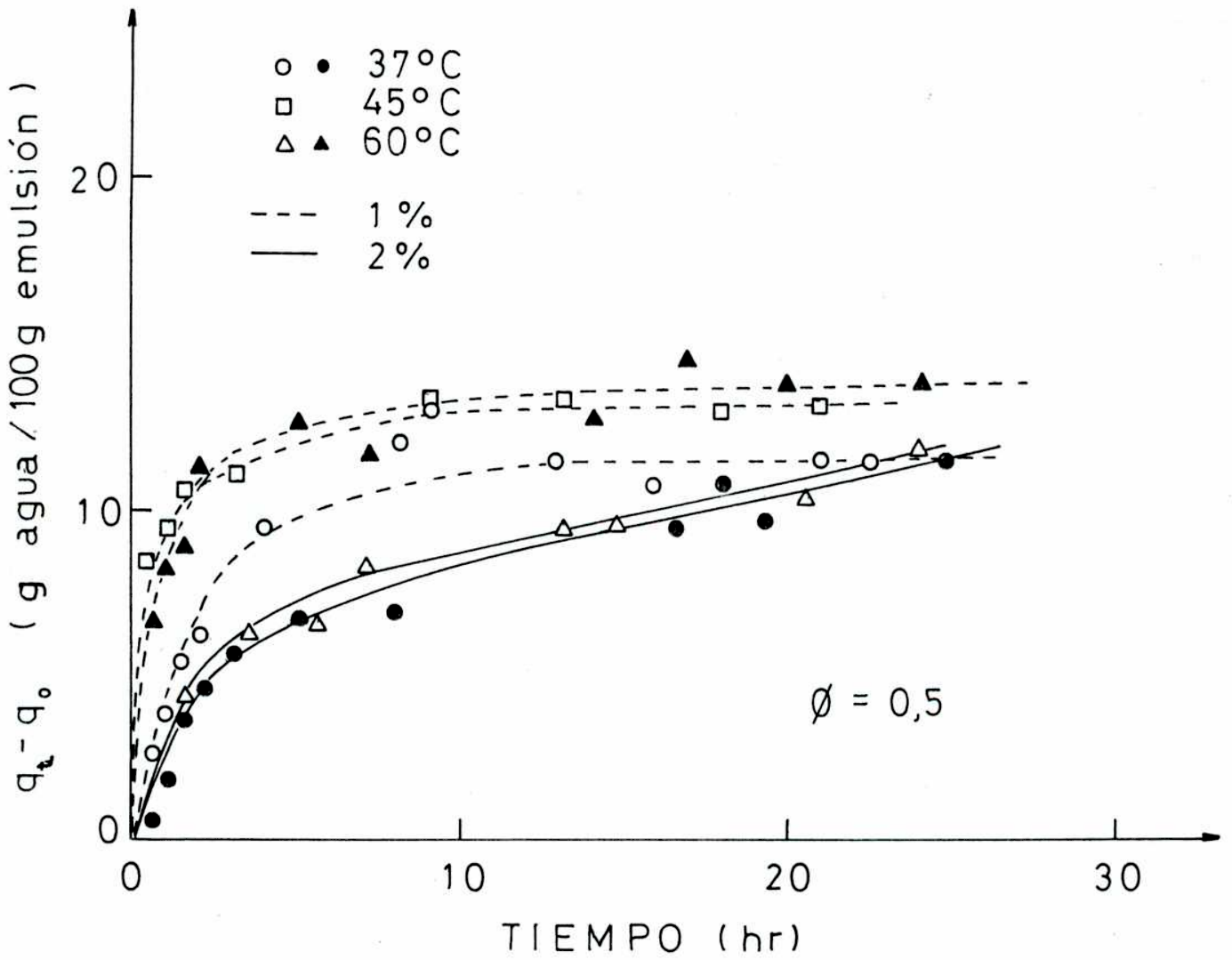


Figura 24: Desestabilización a 37, 45 y 60°C de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 1 ó 2% (P/P))

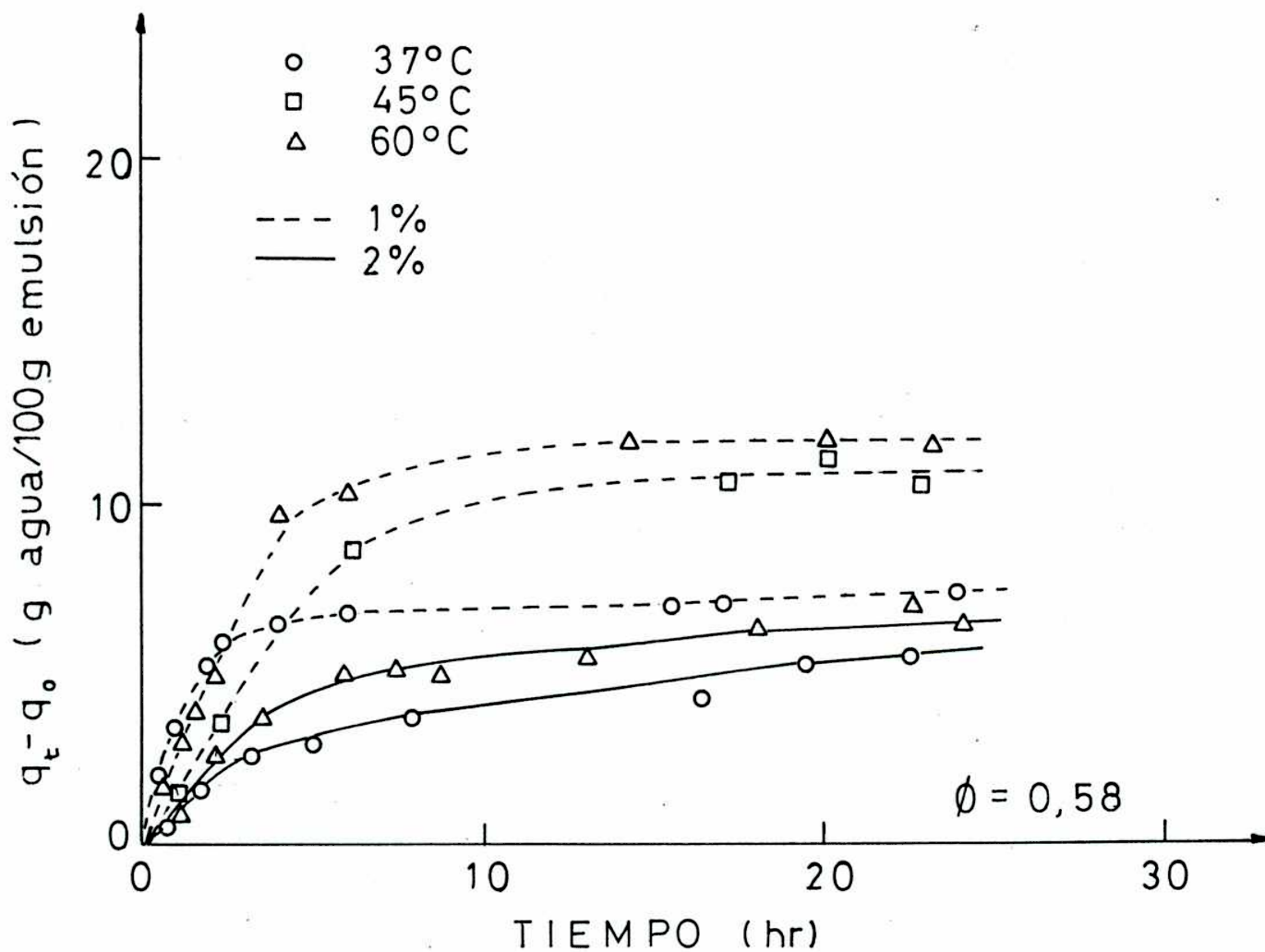


Figura 25: Desestabilización a 37, 45 y 60°C de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 1 ó 2% (P/P))

Tabla 15

Parámetros que describen la desestabilización de emulsiones con concentración de aceite y proteína de soja variable
Fracción en volumen de aceite

| Temp. (O°C) | Concentración de proteína (% P/P) | 0,30 | | | 0,40 | | |
|----------------|---|--|--------------------------------------|--------------|--|--------------------------------------|--------------|
| | | $\hat{Q} \pm \hat{\sigma Q}$ ($\frac{g \text{ agua}}{g \text{ emul.}}$) | $\hat{B} \pm \hat{\sigma B}$ (hr) | $\epsilon\%$ | $\hat{Q} \pm \hat{\sigma Q}$ ($\frac{g \text{ agua}}{g \text{ emul.}}$) | $\hat{B} \pm \hat{\sigma B}$ (hr) | $\epsilon\%$ |
| 37 | 0,5 | --- | --- | - | 23,6 [±] 0,8 | 0,406 [±] 0,007 | 5 |
| | 1 | --- | --- | - | 18,1 [±] 0,1 | 0,725 [±] 0,008 | 3 |
| | 2 | 19,4 [±] 0,2 | 2,72 [±] 0,06 | 4 | 13,0 [±] 0,1 | 2,95 [±] 0,06 | 4 |
| 45 | 1 | --- | --- | - | 17,5 [±] 0,1 | 0,25 [±] 0,04 | 3 |
| 60 | 0,5 | --- | --- | - | 23,7 [±] 0,3 | 0,14 [±] 0,02 | 4 |
| | 1 | --- | --- | - | 21,47 [±] 0,09 | 0,291 [±] 0,007 | 3 |
| | 2 | 24,4 [±] 0,9 | 3,7 [±] 0,3 | 6 | 17,3 [±] 0,3 | 2,42 [±] 0,06 | 5 |

Tabla 15 (continuación)

Fracción en volumen de aceite

| Temp. (0°C) | Concentración de proteína (% P/P) | 0,50 | | | 0,58 | | |
|----------------|---|---|-------------------------------------|--------------|---|-------------------------------------|--------------|
| | | $\hat{Q} \pm \hat{\sigma}Q$ ($\frac{g \text{ agua}}{g \text{ emul.}}$) | $\hat{B} \pm \hat{\sigma}B$ (hr) | $\epsilon\%$ | $\hat{Q} \pm \hat{\sigma}Q$ ($\frac{g \text{ agua}}{g \text{ emul.}}$) | $\hat{B} \pm \hat{\sigma}B$ (hr) | $\epsilon\%$ |
| | 0,5 | --- | --- | -- | --- | --- | -- |
| 37 | 1 | 12,7 \pm 0,4 | 1,9 \pm 0,1 | 9 | 8,2 \pm 0,1 | 1,25 \pm 0,05 | 8 |
| | 2 | 13 \pm 1 | 6 \pm 1 | 20 | 7,1 \pm 0,5 | 5,6 \pm 1,0 | 13 |
| 45 | 1 | 13,2 \pm 0,05 | 0,342 \pm 0,006 | | 11,8 \pm 0,7 | 2,3 \pm 0,6 | 5 |
| | 0,5 | --- | --- | -- | --- | --- | -- |
| 60 | 1 | 14,2 \pm 0,2 | 0,69 \pm 0,01 | 6 | 14,3 \pm 0,4 | 3,3 \pm 0,5 | 8,5 |
| | 2 | 12,6 \pm 0,7 | 3,9 \pm 0,8 | 8 | 8,1 \pm 0,3 | 4,7 \pm 0,8 | 10 |

entre 13 y 20%).

El hecho de que en la Tabla 15 no figuren los valores correspondientes a las emulsiones cuya fracción en volumen \emptyset es 0,3 y la concentración de proteína 0,5 ó 1%, se debió a que estas emulsiones se desestabilizan muy rápidamente.

En IV.2.3 se demostró que existen diferentes criterios cuantitativos para caracterizar la estabilidad de una emulsión.

En la Tabla 16 se muestran dos índices que permiten caracterizar la estabilidad de la emulsión:

a) El Índice de Inestabilidad de la emulsión (II)

$$II = \left(\frac{q^{24} - q_0}{q_0} \right) \cdot 100$$

donde: q^{24} : es el % de agua de la fase inferior de la emulsión al cabo de 24 horas de almacenamiento

q_0 : es el % de agua inicial de la emulsión

b) La velocidad inicial de desestabilización:

$$R_0 = \frac{\hat{Q}}{\hat{B}}$$

donde \hat{Q} y \hat{B} son los parámetros de regresión de la ecuación (25).

Tabla 16

Indice de inestabilidad y velocidad inicial de desestabilización de emulsiones con concentración de aceite y protefina de soja variable

| | | II ± σII | | R ₀ ± σR ₀ ($\frac{\text{g agua}}{100 \text{ g emulsión}} \text{hr}^{-1}$) | | | | | |
|------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Temp. (°C) | Conc. de protefina (% P/P) | Fracción en volumen de aceite | | | | | | | |
| | | 0,30 | 0,40 | 0,50 | 0,58 | | | | |
| 37 | 0,5 | --- | 37 [±] 1 | --- | 58 [±] 6 | --- | | | |
| | 1 | --- | 29 [±] 0,2 | 23 [±] 0,8 | 19 [±] 0,2 | 7 [±] 1 | 6,6 [±] 0,7 | | |
| | 1 | 24 [±] 0,3 | 19,2 [±] 0,2 | 18 [±] 2 | 14 [±] 1 | 7 [±] 0,2 | 4,4 [±] 0,1 | 2,3 [±] 0,2 | 1,3 [±] 0,2 |
| 45 | 1 | --- | 30 [±] 0,2 | 26 [±] 0,1 | 25 [±] 2 | 70 [±] 22 | 20 [±] 1 | 5 [±] 2 | |
| 60 | 0,5 | --- | 38 [±] 0,5 | --- | --- | 169 [±] 50 | --- | --- | |
| | 1 | --- | 35 [±] 0,3 | 28 [±] 0,4 | 29 [±] 0,9 | --- | 74 [±] 4 | 21 [±] 1 | 4,3 [±] 0,5 |
| | 2 | 31 [±] 1 | 27 [±] 0,5 | 22 [±] 1 | 16 [±] 0,7 | 6,6 [±] 0,5 | 7,2 [±] 0,1 | 3,2 [±] 0,6 | 1,7 [±] 0,1 |

Los estimadores de las desviaciones estandar $\hat{\sigma}_{II}$ y $\hat{\sigma}_{R_0}$ que se incluyen en dicha Tabla fueron calculados aplicando las siguientes expresiones:

$$\hat{\sigma}_{II} = \frac{\hat{\sigma}_Q}{q_0} \quad (35)$$

y $\hat{\sigma}_{R_0}$ usando la ecuación (33).

En general se observa que tanto el II como R_0 disminuyen al aumentar la fracción en volumen de aceite o la concentración de proteína. Sin embargo existe una diferencia entre ambos índices. Un incremento en la fracción en volumen de aceite (\emptyset) de 0,3 a 0,58 produce una disminución similar en el II a 1 y 2% de proteína. En el caso de R_0 , por el contrario el efecto de incrementar \emptyset de 0,3 a 0,58 fue altamente dependiente de la concentración de proteína. A una concentración de proteína de 2% R_0 disminuye levemente cuando la concentración de aceite de la emulsión se incrementa de $\emptyset = 0,3$ a $\emptyset = 0,58$. A 1% un incremento similar en la concentración de aceite produce una disminución muy marcada en los valores de R_0 . Titus y col. (1968) demostraron que un aumento de la concentración del agente emulsificante, produce un incremento en la estabilidad de crema de leche o en emulsiones aceite de soja/agua. Acton y Saffle (1970,1971) hallaron que la tasa de estabilidad de las emulsiones aceite en agua estabilizadas por caseinato de sodio, gelatina y proteinato de soja,

se incrementaba, al aumentar la concentración de proteína de la fase acuosa (0,5-2,5%) o el porcentaje en volumen de aceite (20-50%). Además, ambos factores mostraron estar interrelacionados, en forma significativa.

Para cuantificar el efecto combinado de la concentración de aceite y proteína de la emulsión en el II y R_o se aplicaron modelos de regresión lineal simple y múltiple.

En la Tabla 17 se muestran los modelos de regresión lineal simple y múltiple entre $\ln II$ y las diferentes variables independientes.

Los coeficientes de determinación (R^2) del modelo de regresión lineal simple entre $\ln II$ a 37-60°C y la variable independiente $\emptyset.C$ (término de interacción que tiene en cuenta que \emptyset y C están interrelacionados) fueron altamente significativos ($P < 0,01$). Los valores de R^2 indican que 86,2% y 90,5% de las variaciones de $\ln II$ pueden ser explicadas por esta variable ($\emptyset.C$) a 37 y 60°C respectivamente. Al incluir a \emptyset como segunda variable independiente, en un modelo de regresión múltiple, los valores de R^2 se incrementaron a 0,913 y 0,948 a 37° y 60°C respectivamente. Los valores negativos de los coeficientes de regresión de las variables independientes \emptyset y $\emptyset.C$, indican que la inestabilidad de las emulsiones disminuye al incrementar la concentración de aceite y/o proteína. Además teniendo en cuenta que los valores de los t de Student de los coeficientes de regresión

Tabla 17

Modelos de regresión para predecir el efecto combinado de la concentración de aceite y protefna de soja en el índice de inestabilidad

| Modelo de regresión para ln II | Temperatura °C | Variable Independiente | R ² | Coefficiente de regresión | t-Student | β |
|--------------------------------|----------------|------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|--------|
| Lineal simple | 37 | Constante | | 3,663 | | |
| | | ∅.C | 0,862 ^a | -0,878 | 6,12 ^b | --- |
| Lineal múltiple | 37 | Constante | | 3,947 | | |
| | | ∅.C | 0,913 ^a | -0,765 | 5,44 ^a | -0,809 |
| | | ∅ | | -0,776 | 1,72 ^c | -0,256 |
| Lineal simple | 60 | Constante | | 3,883 | | |
| | | ∅.C | 0,905 ^a | -0,856 | 7,56 ^b | --- |
| Lineal múltiple | 60 | Constante | | 4,10 | | |
| | | ∅.C | 0,948 ^a | -0,755 | 7,29 ^b | -0,843 |
| | | ∅ | | -0,655 | 2,01 ^d | -0,232 |

a: P < 0,01 ; b: P < 0,001 ; c: P < 0,2 ; d: P < 0,1

parciales fueron altamente significativos, tanto \emptyset como $\emptyset.C$ afectan el Índice de Inestabilidad de la emulsión. El valor de los coeficientes de regresión estandarizados (β) que indican el peso relativo de las variables incluidas, sugiere que el término de interacción ($\emptyset.C$) contribuye más a determinar el II de la emulsión que la fracción en volumen de aceite (\emptyset).

En la Tabla 18 se muestran los modelos de regresión hallados para predecir el efecto combinado de la concentración de aceite y proteína sobre la velocidad inicial de desestabilización a 37 ó 60°C. A ambas temperaturas el modelo más adecuado fue aquel que incluyó a $\ln R_0$ como variable dependiente y al término $\emptyset.C$ como variable independiente. Los valores de R^2 fueron altamente significativos ($P < 0,01$) e indican que 91,2% y 86,2% de las variaciones en el $\ln R_0$ pueden ser explicadas por el término de interacción ($\emptyset.C$).

Cuando se incluyó a \emptyset o C como segunda variable independiente en un modelo de regresión múltiple no se observó incremento alguno en los valores de R^2 .

En IV.1.2.2 se demostró que la cantidad de aceite y agua absorbidos por una proteína determinan la estabilidad de las emulsiones formuladas con la misma.

De acuerdo al modelo propuesto (Fig. 18), el espesor de la doble capa que estabiliza las gotas de aceite, depende de la capacidad de absorción de agua y aceite de la proteína

Tabla 18

Modelos de regresión para predecir el efecto combinado de la concentración de aceite y la protefina de soja en el ln.de la velocidad inicial de desestabilización

| Temperatura °C | Variable independiente | R ² | Coefficiente de regresión | t-Student |
|-------------------|------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| 37 | Constante | 0,912 ^a | 4,353 | 7,88 ^a |
| | Ø.C | | -3,656 | |
| 60 | Constante | 0,826 ^b | 5,398 | 5,34 ^b |
| | Ø.C | | -4,496 | |

a: P < 0,001

b: P < 0,01

y de la concentración de la misma. En el caso de emulsiones formuladas con la misma proteína, pero con concentraciones variables de la misma y de aceite, la extensión del concepto de capacidad de absorción de agua sería la cantidad de agua absorbida por la proteína presente respecto al total de agua de la emulsión.

Esta magnitud depende de la capacidad de absorción de agua de la proteína y de la composición de la emulsión de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \% \text{ de agua absorbida} &= \frac{\text{ml de agua absorbidos por la proteína presente}}{\text{ml agua/100 ml emulsión}} = \\ &= \frac{(C \cdot \text{ml agua/100 ml emulsión}) \text{ CAA}}{\text{ml agua/100 ml emulsión}} = C \cdot \text{CAA} \quad (36) \end{aligned}$$

donde: C : concentración de proteína de la fase continua % (P/P)
CAA: capacidad de absorción de agua de la proteína (ml agua/g proteína)

Análogamente, la cantidad de aceite absorbida por la proteína presente respecto al aceite total de la emulsión resulta:

$$\begin{aligned} \% \text{ de aceite absorbido} &= \frac{\text{ml de aceite absorbidos por la proteína presente}}{\text{ml aceite/100 ml emulsión}} = \\ &= \frac{(C \cdot \text{ml agua/100 ml emulsión}) \text{ CAAC}}{\text{ml aceite/100 ml emulsión}} \quad (37) \end{aligned}$$

///

donde: CAAC = capacidad de absorción de aceite de la proteína
(ml de aceite/g proteína).

En la Tabla 19 se muestran el % de agua y aceite absorbidos por la proteína presente en cada emulsión.

Se propusieron distintos modelos de regresión para describir la dependencia del II y de R_0 a 37 y 60°C con el % de agua y aceite absorbidos por la proteína presente.

En la Tabla 20 se muestran los modelos de regresión lineal hallados para el II a 37 y 60°C. A ambas temperaturas el modelo más adecuado fue un modelo de regresión lineal múltiple que incluyó al %AA y la relación entre el %AA y el %ACA (%AA/%ACA) como variables independientes.

Los coeficientes de determinación (R^2) fueron altamente significativos ($P < 0,01$) y sus valores indican que el 92 y 93% de las variaciones del índice de inestabilidad pueden ser explicadas por ambas variables a 37 y 60°C respectivamente.

Los coeficientes de regresión estandarizados (β), indican que el %AA y el %AA/%ACA contribuyen en igual medida a determinar el índice de inestabilidad.

Los coeficientes de regresión parciales, presentan valores aproximadamente iguales, a ambas temperaturas. Esto permite afirmar que las variaciones en la temperatura de almacenamiento de las emulsiones tiene un efecto muy moderado en el proceso total de desestabilización de las mismas (al menos en

Tabla 19

Porcentajes de agua y aceite absorbidos por la protefina presente en cada emulsión

| Concentración de protefina (% P/P) | Fracción en volumen de aceite | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|------|------|------|
| | 0,30 | 0,40 | 0,50 | 0,58 |
| | % AA | %AA | %AA | %AA |
| | %ACA | %ACA | %ACA | %ACA |
| 0,5 | 9,95 | 9,95 | 9,95 | 9,95 |
| | ----- | 1,42 | ---- | ---- |
| 1 | 19,9 | 19,9 | 19,9 | 19,9 |
| | ----- | 2,85 | 1,9 | 1,38 |
| 2 | 39,8 | 39,8 | 39,8 | 39,9 |
| | 8,87 | 5,7 | 3,8 | 2,76 |

Tabla 20

Modelos de regresión para predecir el índice de inestabilidad en función del % de agua y aceites absorbidos por la proteína

| Temperatura °C | Variable Independiente | R ² | Coefficiente de Regresión | t-Student | β |
|-------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|--------|
| 37 | Constante | | 46,80 | | |
| | %AA | 0,92 ^a | -0,435 | 6,128 ^a | -0,472 |
| | $\frac{\%AA}{\%ACA}$ | | -1,22 | 5,082 ^a | -0,616 |
| 60 | Constante | | 51,36 | | |
| | %AA | 0,93 ^a | -0,406 | 6,291 ^a | -0,722 |
| | $\frac{\%AA}{\%ACA}$ | | -1,22 | 5,613 ^a | -0,645 |

a: P < 0,01

el rango de temperaturas estudiado).

La Tabla 21, muestra que para la velocidad inicial de desestabilización, el modelo más adecuado fue también el modelo de regresión lineal múltiple que incluyó a %AA y %AA/%AcA como variables independientes. Sin embargo, en este caso los valores de los coeficientes de determinación (R^2) 0,72 a 37°C y 0,77 a 60°C, indican que para la velocidad inicial de desestabilización existen otros factores que contribuyen a determinar su valor. Entre ellos podrían mencionarse, la polidispersibilidad de la emulsión y el incompleto recubrimiento de los glóbulos de grasa con el film proteico, situación ésta que se hace evidente en los primeros momentos del almacenamiento (que es cuando se evalúa R_0).

Los coeficientes de regresión estandarizados (β) indican que las variaciones en el %AA afectan mucho más a R_0 , que las correspondientes variaciones en %AA/%AcA. Además, en este caso, la temperatura de almacenamiento, tiene un efecto notable. En efecto los coeficientes de regresión a 60°C, son tres veces mayores que a 37°C.

La ecuación de correlación múltiple hallada para el II:

$$II = A + B(\%AA) + D\left(\frac{\%AA}{\%AcA}\right) \quad (38)$$

///

Tabla 21

Modelos de regresión para predecir la velocidad inicial de desestabilización en función del % de agua y aceite absorbidos por la protefina

| Temperatura °C | Variable Independiente | R ² | Coefficiente de Regresión | t-Student | β |
|-------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|--------|
| 37 | Constante | | 66,86 | | |
| | %AA | 0,72 ^a | -1,16 | 3,137 ^a | -0,748 |
| | $\frac{\%AA}{\%ACA}$ | | -2,09 | 1,669 ^a | -0,398 |
| 60 | Constante | | 195,31 | | |
| | %AA | 0,77 ^a | -3,54 | 3,054 ^a | -0,745 |
| | $\frac{\%AA}{\%ACA}$ | | -6.18 | 1,600 ^b | -0,385 |

a: P < 0,05 ; b: P < 0,2

puede expresarse en función de la composición de la emulsión y las propiedades físico-químicas de la proteína usando las ecuaciones (36) y (37):

$$II = A + B(C.CAA) + D \left(\frac{CAA}{CAAc} \right) \frac{\emptyset}{(1 - \emptyset)} \quad (39)$$

donde \emptyset : fracción en volumen de aceite

A, B y D : coeficientes de regresión de la correlación múltiple

Pero de acuerdo a (17) CAA/CAAc es el IAAAc, entonces resulta:

$$II = A + B(C.CAA) + D \text{ IAAAc} \frac{\emptyset}{(1 - \emptyset)} \quad (40)$$

Con el fin de determinar si la ecuación (40) podría aplicarse para predecir el II de emulsiones formuladas con cualquier proteína alimenticia, la ecuación (40) se usó para predecir el II de las emulsiones formuladas con las proteínas incluidas en la Tabla 9 y se lo comparó con el determinado experimentalmente. Pese a que este último fue determinado a 45°C (Tabla 9), la comparación es válida porque los coeficientes de regresión (A, B, D) varían muy poco con la temperatura. No obstante, considerando que 45°C es una temperatura intermedia entre 37 y 60°C,

los coeficientes de regresión de la ecuación (40), se calcularon como promedio de los valores a 37 y 60°C. Además considerando que en dicho caso todas las emulsiones se formularon con una concentración de proteína de 1%(P/P) y fracción en volumen de aceite de 0,50, la ecuación (40) resulta:

$$II = 49,08 - 0,421 \quad CAA - 1,22 \cdot IAAAc \quad (41)$$

En la Tabla 22 se muestra el II experimental y el predicho usando la ecuación (41) para todas las emulsiones formuladas con las proteínas incluídas en la Tabla 9. Por aplicación de un modelo de regresión lineal simple entre ambos valores se obtuvo una muy buena correlación ($R = 0,917$, $P < 0,001$).

Este resultado permite concluir que la ecuación (41), puede usarse para predecir el II de emulsiones formuladas con proteínas alimenticias de diferente origen y composición variable.

En la Fig. 26 se muestran las líneas de isoines-
tabilidad (igual II) obtenidas a partir de la ecuación (38).

Dichas rectas indican que existen diferentes combinaciones de las dos variables independientes (%AA, %AA/%AAc) que dan emulsiones con el mismo II. Sin embargo, si una emulsión presenta un dado grado de inestabilidad los valores del % de agua absorbido por la proteína quedan acotados dentro de un intervalo

Tabla 22

Valores del índice de inestabilidad experimental y predicho usando la ecuación (40) para emulsiones^a formuladas con diferentes proteínas alimenticias. a: C = 1% (P/P), $\phi = 0,5$

| | II Experimental | II Predicho |
|---------------------------------|-----------------|-------------|
| Concentrado proteína de suero | 50,4 | 48,7 |
| Proteínas cárnicas | 44,0 | 48,1 |
| Albúmina bovina | 48,0 | 48,4 |
| Concentrado proteína de zapallo | 44,3 | 47,1 |
| Aislado proteína de poroto | 43,4 | 45,4 |
| Caseinato de sodio | 45,8 | 45,7 |
| Purina 710 | 46,0 | 45,6 |
| Aislado proteína de soja | 35,6 | 42,9 |
| Purina 660 | 39,5 | 41,3 |
| Purina 500E | 36,0 | 40,4 |
| Purina 630 | 43,9 | 40,6 |
| Purina 760 | 32,0 | 38,0 |
| Proteinmax 90HG | 31,8 | 33,9 |
| Proteinmax 90NB | 27,9 | 26,0 |

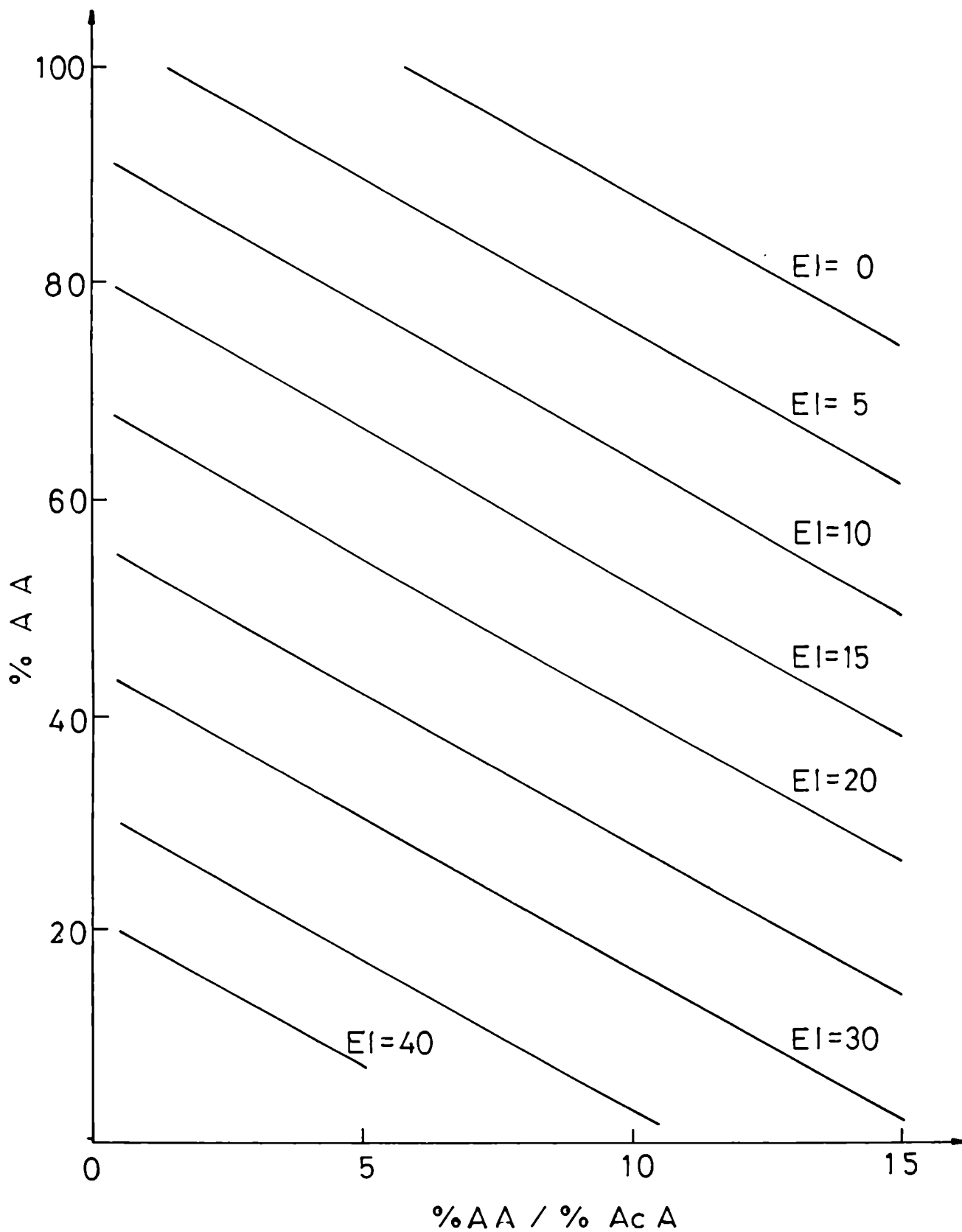


Figura 26: Líneas de iso-inestabilidad

determinado. Así si una emulsión presenta un II de 5, el %AA está comprendido entre 100 y 61.

Debido a que %AA = C.CAA y

$$\frac{\%AA}{\%AAc} = IAAc \frac{\emptyset}{1 - \emptyset}$$

se puede predecir el grado de inestabilidad de la emulsión a partir de la composición de la emulsión (C y \emptyset) y el tipo de proteína usada, utilizando el gráfico de la Fig. 26.

IV.3.2. Efecto de la temperatura sobre el índice de inestabilidad y la velocidad inicial de desestabilización

En la Tabla 16 se puede observar que el índice de inestabilidad se incrementa al aumentar la temperatura de 37 a 60°C. Esto se verifica para todos los valores de \emptyset y C considerados. En el caso de la velocidad inicial de desestabilización, aumenta al elevar la temperatura de 37 a 45°C. De 45 a 60°C se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de R_0 o que disminuye levemente (según cuál sea el valor de \emptyset de la emulsión). Este último comportamiento aparentemente anómalo puede explicarse de la siguiente forma: experimentalmente se observó que al cabo de 24 horas de almacenamiento y a todas las temperaturas las muestras habían gelificado parcial-

mente. La velocidad con que ocurre este proceso depende de la temperatura, concentración de proteína y aceite.

Este factor adicional contribuye a aumentar la estabilidad de las emulsiones por formación de una estructura tridimensional que actúa como soporte de los glóbulos de aceite. Dicho factor se hace evidente sobre la velocidad inicial de desestabilización solo a 60°C que es una temperatura suficientemente alta como para que en la primera hora de almacenamiento ocurra una gelificación parcial. La gelificación a temperaturas menores (37 y 45°C) ocurre en tiempos más largos. Esto da como resultado que R_0 a 60°C sea igual o menor que a 45°C. Al cabo de 24 horas de almacenamiento, momento en el cual se evalúa el II, el tiempo es suficiente para que las emulsiones almacenadas a 37 y 45°C, también gelifiquen. El factor adicional de estabilidad, entonces está presente a todas las temperaturas. Por lo tanto el II aumenta cuando se eleva la temperatura de 37 a 60°C.

Con el fin de estimar la energía de activación del proceso total de desestabilización se propuso una relación tipo Arrhenius entre el II y la temperatura:

$$II = Ae^{-E_a/RT} \quad (42)$$

donde:

E_a = Energía de activación

T = temperatura absoluta en K°

A = constante

R = constante universal de los gases = $1,98 \frac{\text{cal}}{\text{mol K}^\circ}$

En la Fig. 27 se muestran las rectas obtenidas al graficar el $\ln II$ en función de la inversa de la temperatura absoluta, para emulsiones con una concentración de proteína de 1% (P/P) y diferentes fracciones en volumen de aceite. En todas los casos se observa que se cumple la relación de Arrhenius.

Los valores de energía de activación estimados por regresión lineal se muestran en la Tabla 23.

Los valores que oscilan entre 2 y 4 Kcal/mol

Tabla 23

Valores de Energía de activación (E_a)

| fracción en volumen de aceite | E_a (Kcal/mol) |
|----------------------------------|------------------|
| 0,40 | 3 |
| 0,50 | 2 |
| 0,58 | 4 |

indican que las variaciones de temperatura de almacenamiento en el rango 37-60°C tienen poca influencia en el grado de desesta-

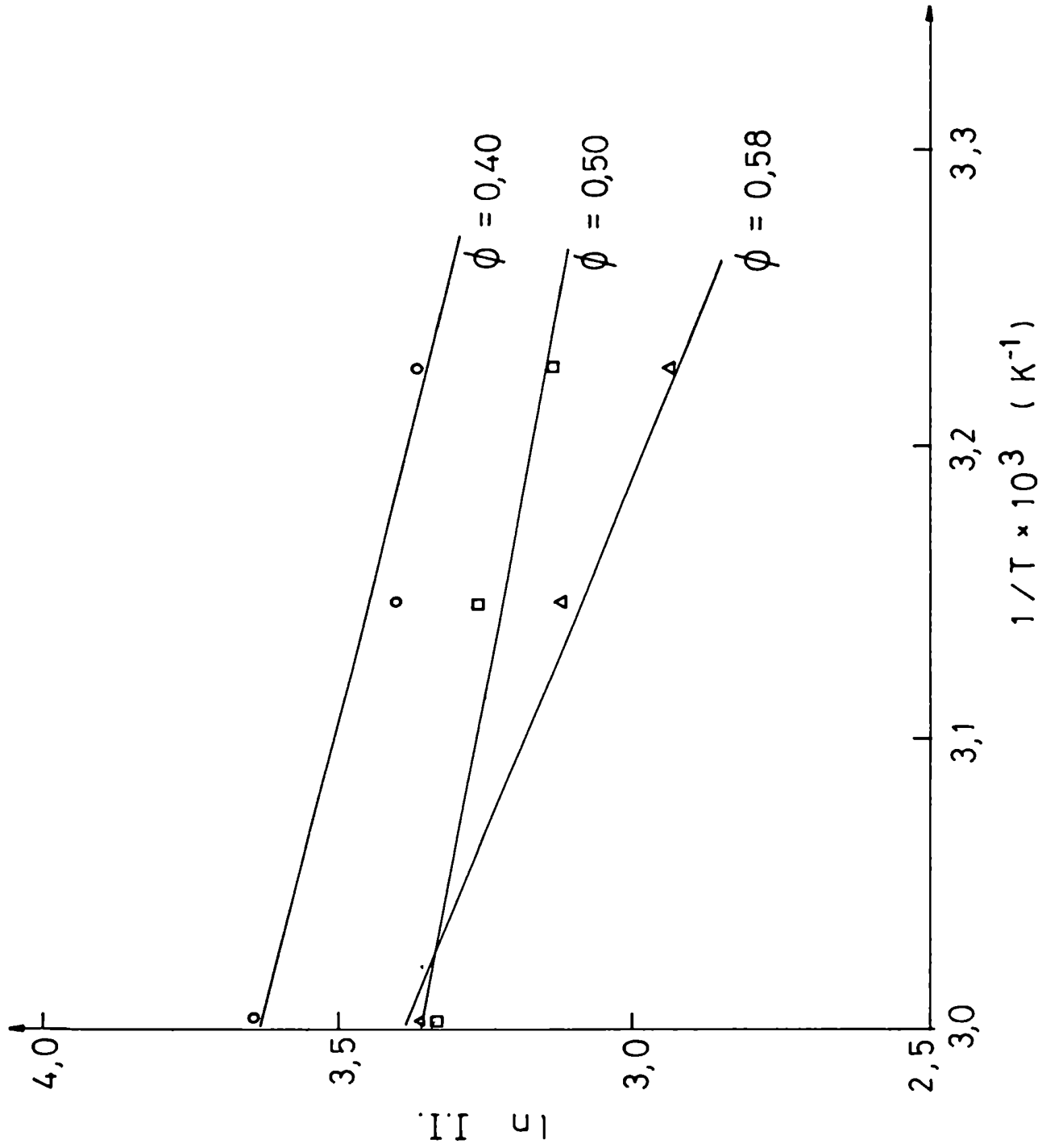


Figura 27: Relación de Arrhenius para el Índice de Inestabilidad (II) de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB ($C = 1\%$ (P/P))

bilización de las emulsiones. Este valor es inferior al informado por Karel (1973), quien considerando que dicha Energía de activación representaba la barrera energética que debían superar los glóbulos de aceite para coalescer (y que representa el trabajo necesario para que se produzca la ruptura del film de proteína) encontró un valor que oscilaba entre 4 y 8 Kcal/mol.

La expresión cinética de orden dos que describe la velocidad de desestabilización de las emulsiones aquí estudiadas, indicaría que la floculación sería la etapa determinante de la velocidad global de desestabilización. El hecho de que la barrera energética para la floculación sea menor que para la coalescencia concuerda con los bajos valores de energía de activación aquí encontrados.

IV.4. Efecto de la concentración de aceite y proteína en los parámetros reológicos de emulsiones formuladas con proteínas de soja

IV.4.1. Descripción matemática de las curvas de flujo

En la sección anterior hemos visto que la desestabilización de las emulsiones era función de la concentración de aceite y proteína de la emulsión.

Teniendo en cuenta que las propiedades reológi-

cas, pueden proporcionar información respecto a la estructura de las emulsiones y por lo tanto están vinculadas a la estabilidad de las mismas (Sherman, 1963; Halm y Ericksen, 1980); se procedió a determinar las curvas de flujo de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (P90NB). La composición de las emulsiones cuyas curvas de flujo fueron determinadas, se detalla en la Tabla 24. Todas las emulsiones fueron, además estabilizadas por agregado de 0,4% (P/P) de Carboximetil Celulosa (CMC) en la fase continua.

Las curvas de flujo de las emulsiones se muestran en las Figs. 28 a 30. En las mismas se aprecia que todas presentaron comportamiento pseudoplástico y umbral de fluencia (τ_0).

Las emulsiones en general presentan este comportamiento (Becher, 1965; Dickinson y Stainsby, 1982; Sherman, 1983). En particular para emulsiones aceite/agua formuladas con proteínas, Halm y Ericksen (1980) encontraron que las emulsiones aceite/agua preparadas con un concentrado de proteína de papa y un aislado de proteína de soja (Purina 500E) presentaban comportamiento pseudoplástico. Ramanatham y col. (1978), hallaron lo mismo para emulsiones aceite/agua formuladas con proteína de nuez.

En ningún caso se observó un comportamiento tixotrópico al estudiar el efecto del tiempo en condiciones de velocidad de deformación constante. Los siguientes modelos fueron

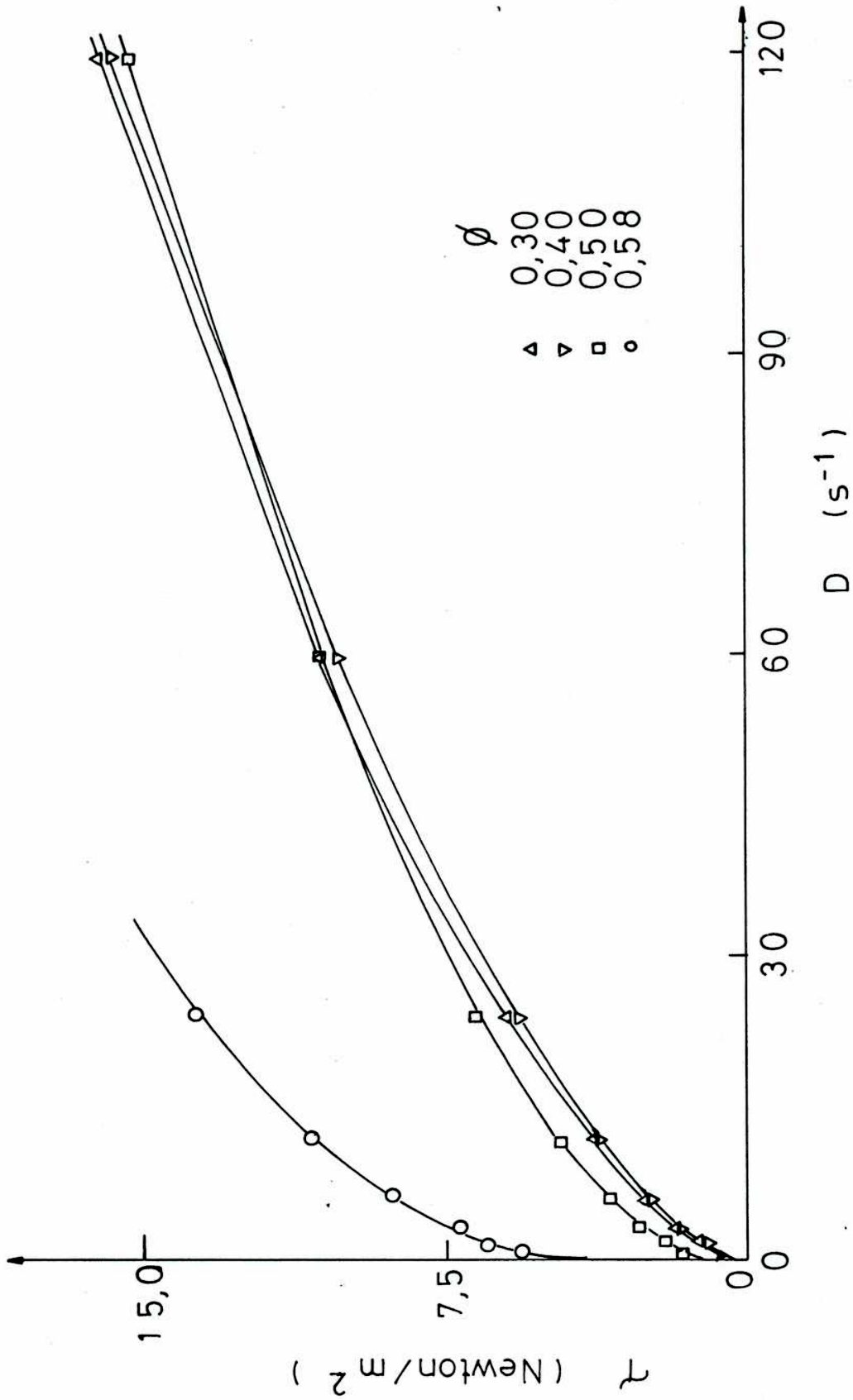


Figura 28: Curvas de flujo de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 0,5 (P/P))

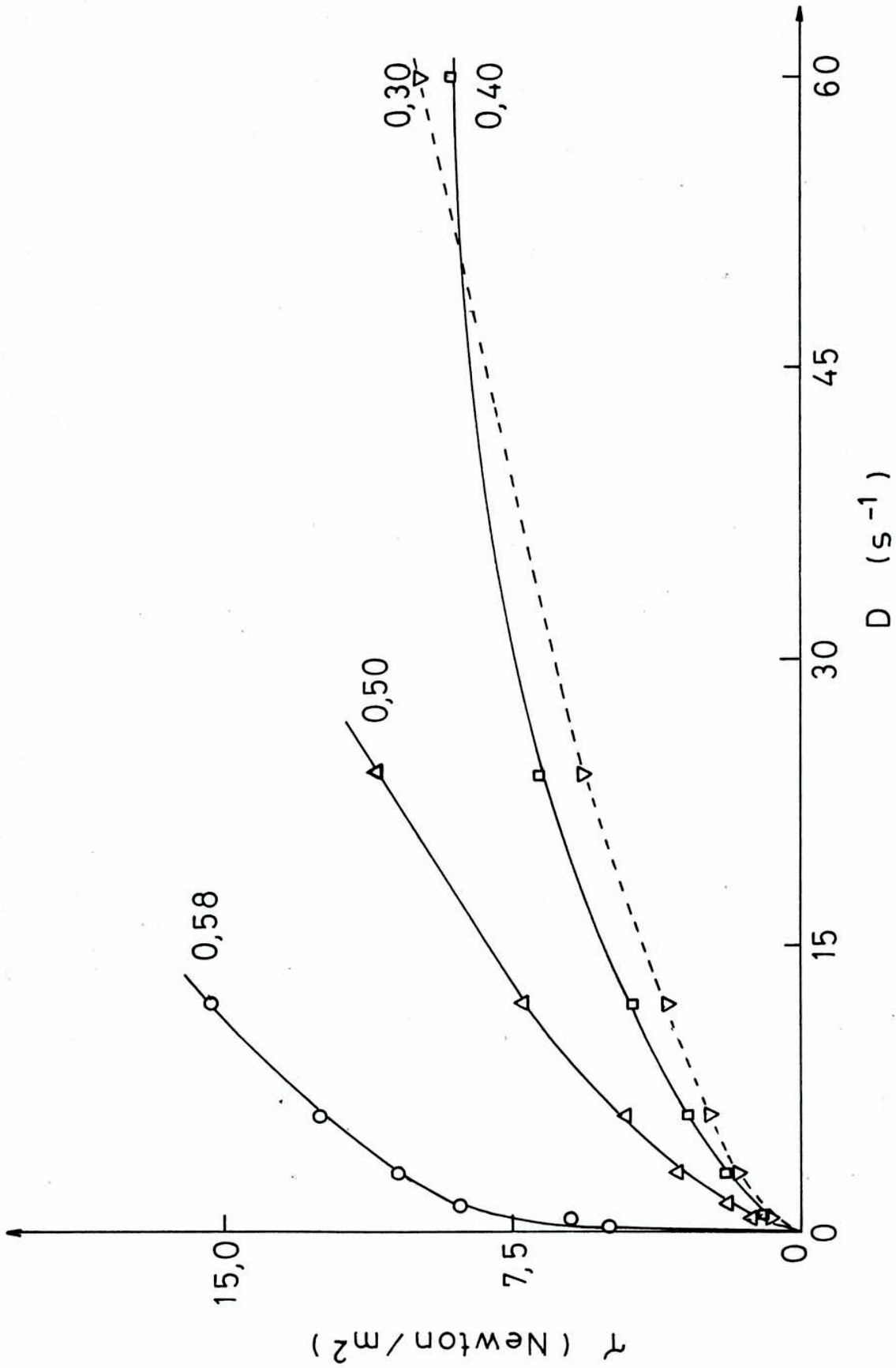


Figura 29: Curvas de flujo de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 1% (P/P))

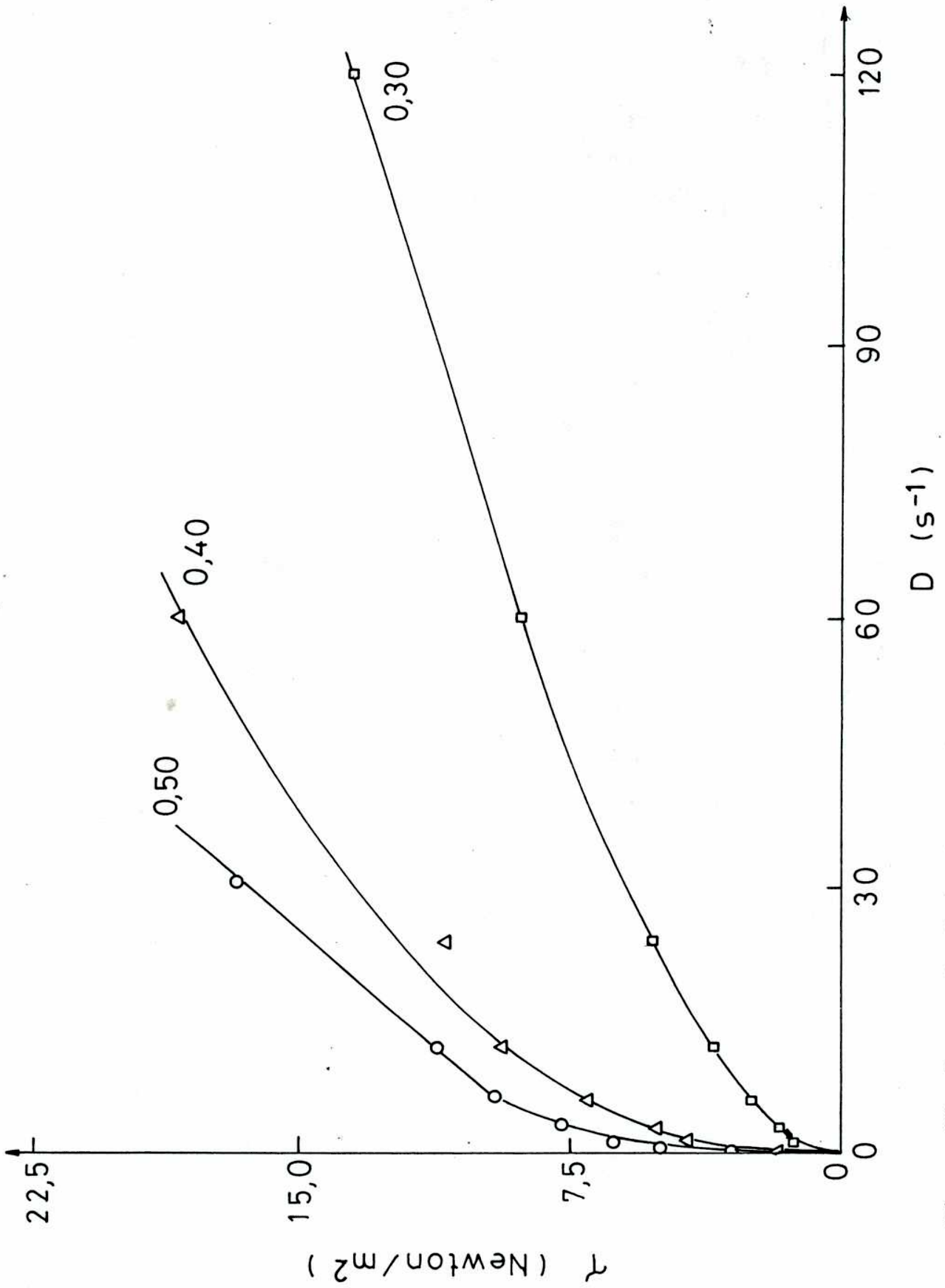


Figura 30: Curvas de flujo de emulsiones formuladas con Proteinmax 90NB (C = 2% (P/P))

usados para describir las curvas de flujo de las emulsiones:

I) Modelo de Herschel y Bulkley (ec. (13))

$$\tau = \tau_0 + K D^n$$

donde: τ = esfuerzo de corte (N/m^2)

τ_0 = umbral de fluencia (N/m^2)

D = velocidad de deformación (s^{-1})

n = índice de comportamiento de flujo (adimensional)

K = índice de consistencia ($\frac{N s^n}{m^2}$)

Por linealización de dicha ecuación se obtiene la siguiente expresión:

$$\log(\tau - \tau_0) = \log K + n \log D \quad (43)$$

a partir de la cual por aplicación de un programa de regresión lineal se pueden evaluar los parámetros K y n .

II) Modelo de Casson (ec. (14))

$$\tau^{\frac{1}{2}} = K_0 + K_1 D^{\frac{1}{2}}$$

donde K_1 y K_0 son constantes, y K_0^2 es igual al umbral de

fluencia del modelo de Casson (τ_{OC}) (Charm, 1963; Hermansson, 1975b).

Si se aplica un programa de regresión lineal entre $\tau^{\frac{1}{2}}$ y $D^{\frac{1}{2}}$, de la ordenada al origen y la pendiente se pueden obtener los parámetros K_1 y K_0 respectivamente.

IV.4.2. Efecto de la concentración de proteína y de aceite sobre los parámetros reológicos (τ_0 , K , n , η_{app})

El umbral de fluencia fue determinado experimentalmente en la forma indicada en III.3.2. También se obtuvo a partir del modelo de Casson como K_0^2 . El ajuste de la ecuación de Casson a los datos experimentales fue muy bueno con coeficientes de correlación R comprendidos entre 0,999 a 0,983 ($p < 0,01$).

En la Tabla 25 se muestran los valores del umbral de fluencia determinado experimentalmente, y a partir del modelo de Casson (τ_{OC}); en la misma se aprecia que los valores del umbral de fluencia predichos por el modelo de Casson son mayores que los determinados experimentalmente. Resultados similares han sido hallados por Vitali y Rao (1984) y Bianchi y col. (1985).

La precisión lograda en la medición del umbral de fluencia permite afirmar que todos los valores de τ_0 que figuran en la Tabla 25 fueron significativamente diferentes. En la

Tabla 25

Magnitud del umbral de fluencia predicho por el modelo de Casson y determinado experimentalmente

| Concentración de proteína (% P/P) | Umbral de fluencia (N/m ²) | | | |
|-----------------------------------|--|---------------------|---------------------|-------------------|
| | 0,5 | 1 | 2 | |
| Fración en volumen de aceite (Ø) | Experimental | Casson Experimental | Casson Experimental | Casson |
| 0,30 | 0,28 ^a | 0,74 | 0,37 ^a | 0,60 |
| 0,40 | 0,32 ^a | 0,64 | 0,47 ^a | 0,52 ^a |
| 0,50 | 1,02 ^a | 1,50 | 0,75 ^b | 0,65 |
| 0,58 | 4,10 ^b | 4,74 | 5,59 ^b | 1,59 ^b |
| | | | 2,05 ^b | 3,02 |
| | | | 6,62 | 3,08 |
| | | | 14,7 ^b | |

a: $\Delta\tau_0 = \pm 0,02 \text{ N/m}^2$; b: $\Delta\tau_0 = \pm 0,2 \text{ N/m}^2$;

Los mismos están determinados por la precisión que asegura el viscosímetro, y que es 1% del valor del τ a máxima escala.

misma puede apreciarse que si se mantiene constante la concentración de proteína los valores del umbral de fluencia sufren un incremento muy marcado al aumentar la fracción en volumen de aceite (\emptyset). La magnitud del aumento es función del porcentaje de proteína. Así a 0,5 y 1% de proteína el umbral de fluencia aumenta aproximadamente 12 veces cuando \emptyset es llevada de 0,3 a 0,58. A una concentración de proteína de 2% (P/P) un incremento similar en \emptyset provoca un aumento en τ_0 de 28 veces. Además se aprecia que los mayores cambios en el umbral de fluencia se producen para \emptyset entre 0,5-0,58. Al aumentar la concentración de proteína los valores del umbral de fluencia se incrementan, sin embargo este efecto fue menor que el provocado por un aumento de la concentración de aceite (\emptyset).

El índice de comportamiento de flujo (n) y el coeficiente de consistencia (K) fueron obtenidos a partir de la expresión linealizada del modelo de Herschel y Bulkley (ecuación (43)) aplicando un programa de regresión lineal entre $\log (\tau - \tau_0)$ y $\log D$. El umbral de fluencia utilizado fue el determinado experimentalmente pues se verificó que con este se obtenía un ajuste mejor a los datos experimentales que con el predicho por el modelo de Casson (τ_{0c}).

En la Tabla 26 se muestran los valores del índice de consistencia (K), índice de comportamiento de flujo (n), los coeficientes de correlación (R), los errores en K ($\pm \Delta K$) y

Tabla 26

Parámetros del modelo de Herschel-Bulkley para emulsiones formuladas con diferentes concentraciones de proteína de soja y aceite

| Fracción en volumen de aceite (\emptyset) | Concentración de proteína de soja (% P/P) | Índice de consistencia (K) $N s^n/m^2$ | Índice de comportamiento de flujo (n) | R ^a | Viscosidad aparente (η_{app} (12 s ⁻¹)) (poise) |
|---|---|--|---------------------------------------|----------------|---|
| 0,3 | 0,5 | 0,79 [±] 0,03 | 0,63 [±] 0,05 | 0,998 | 3,25 [±] 0,02 |
| | 1 | 0,62 [±] 0,01 | 0,66 [±] 0,07 | 0,999 | 2,86 [±] 0,02 |
| | 2 | 0,62 [±] 0,01 | 0,63 [±] 0,01 | 0,999 | 2,85 [±] 0,02 |
| 0,4 | 0,5 | 0,59 [±] 0,03 | 0,68 [±] 0,03 | 0,999 | 3,02 [±] 0,02 |
| | 1 | 0,69 [±] 0,02 | 0,70 [±] 0,06 | 0,996 | 3,62 [±] 0,02 |
| | 2 | 2,42 [±] 0,02 | 0,46 [±] 0,02 | 0,998 | 7,59 [±] 0,15 |
| 0,5 | 0,5 | 0,74 [±] 0,07 | 0,61 [±] 0,02 | 0,948 | 4,08 [±] 0,15 |
| | 1 | 0,93 [±] 0,03 | 0,77 [±] 0,08 | 0,995 | 6,02 [±] 0,15 |
| | 2 | 3,66 [±] 0,04 | 0,43 [±] 0,03 | 0,998 | 10,47 [±] 0,15 |
| 0,58 | 0,5 | 2,07 [±] 0,04 | 0,48 [±] 0,05 | 0,996 | 9,08 [±] 0,15 |
| | 1 | 3,05 [±] 0,08 | 0,46 [±] 0,05 | 0,998 | 12,79 [±] 0,15 |
| | 2 | ----- | ----- | ----- | ----- |

a: (P < 0,01)

en n ($\pm \Delta n$). Dichos errores fueron calculados de la siguiente manera:

- El error absoluto en n ($\pm \Delta n$) fue calculado a partir de la desviación estandar de la pendiente (S_n) obtenida a partir del programa de regresión lineal y el parámetro "t" de Student para un nivel de confianza de 95% ($t_{95\%}$) como:

$$\Delta n = \pm S_n \ "t"_{95\%} \quad (44)$$

- El error en K ($\pm \Delta K$) se calculó de la siguiente manera:

El error absoluto de cualquier ordenada y' de una correlación lineal (x,y) puede ser estimado por medio de la siguiente expresión (Steel y Torrie, 1960):

$$\Delta y' = \pm t_{95\%} S_b \left(\frac{1}{N} (x - \bar{x})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (45)$$

Donde S_b = desviación estandar de la pendiente

N = número de puntos (pares (x,y'))

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^N x \right) / N$$

Para el punto $(y,0)$ (ordenada al origen) resulta

///

$$\Delta y' = \pm t_{95\%} S_b \bar{X} \left(\frac{1}{N}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (46)$$

En nuestro caso la desviación estandar de la pendiente S_b es igual a S_n , $\Delta y' = \Delta \log K$ y $\bar{X} = \frac{N}{\sum_{i=1}^N} \log D / N$. Con lo cual la expresión (46) se transforma en

$$\Delta \log K = \pm t_{95\%} S_n \frac{\sum_{i=1}^N \log D}{N^{3/2}} \quad (47)$$

Luego el error $\pm \Delta K$ fue calculado como

$$\Delta K = \pm (\Delta \log K) K \cdot 2,303 \quad (48)$$

En todos los casos se aprecia que el ajuste del modelo de Herschel-Bulkley a los datos experimentales fue muy bueno con coeficientes de correlación (R) comprendidos entre 0,999 a 0,995 ($P < 0,01$).

El efecto de la concentración de proteína sobre el índice de consistencia depende de la fracción en volumen de aceite (\emptyset). Así a $\emptyset = 0,3$ no hay diferencias significativas cuando la concentración de proteína se incrementa desde 0,5 a 2% (P/P). Para $\emptyset = 0,4, 0,5$ y $0,58$, un incremento similar en la concentración de proteína produce un aumento notable en los valores de K especialmente entre 1 y 2% (P/P).

Al mantener constante la concentración de pro-

tefina un incremento en la fracción en volumen de aceite, produce un aumento en el índice de consistencia, en especial al aumentar ϕ desde 0,50 a 0,58. Este efecto depende de la concentración de proteína siendo más pronunciado a 2%.

Todas las emulsiones muestran valores de n menores de uno, lo que indica que tienen comportamiento pseudoplástico. Como en el caso de τ_0 y K , el índice de comportamiento de flujo cambia abruptamente, cuando la fracción en volumen de aceite se aproxima a 0,58 y/o la concentración de proteína a 2%. En estos casos n disminuye en forma notable (la emulsión se vuelve más pseudoplástica).

Teniendo en cuenta que las emulsiones presentaron comportamiento pseudoplástico, la viscosidad es función de la velocidad de deformación y se denomina viscosidad aparente (η_{app}).

La viscosidad aparente (12 s^{-1}) de las emulsiones fue calculada como:

$$\eta_{app} = \frac{\tau}{D} = \frac{\tau_0}{D} + K D^{n-1} \quad (49)$$

En la Tabla 26 se incluyen los valores de la viscosidad aparente a 12 s^{-1} y los errores absolutos correspondientes ($\pm \Delta\eta_{app}$) de las diferentes emulsiones. Dichos errores están determinados por la precisión que asegura el viscosímetro

y que es el 1% del valor máximo de viscosidad que puede medirse. Este valor máximo depende de la geometría del cono, y de la velocidad a la cual se evalúa la viscosidad. Así a 12 s^{-1} para el cono 52 el valor máximo es 15,53 poise y para el 41, 1,92 poise. Si se calcula el 1% de dichos valores resulta $\Delta\eta = 0,15$ poise y $\Delta\eta = 0,02$ poise respectivamente.

En la Tabla 26 se puede ver que la η_{app} presenta un comportamiento similar a los demás parámetros reológicos. Es decir que un aumento en el porcentaje de aceite y/o proteína, provoca un aumento en la η_{app} y que este incremento alcanza su mayor magnitud cuando la fracción en volumen de aceite se acerca a $\phi = 0,58$.

Los resultados mostrados indican que se producen cambios muy significativos en el comportamiento de flujo de las emulsiones cuando la fracción en volumen de aceite se aproxima a $\phi = 0,58$ (cerca del punto de inversión de la emulsión) y/o cuando la concentración de proteína es de 2%. Bajo estas circunstancias, τ_0 , K y η_{app} aumentan bruscamente y n disminuye significativamente.

Sherman (1959) trabajando con emulsiones estabilizadas por detergentes iónicos, halló resultados similares a los nuestros encontrando que cerca del punto de inversión τ_0 , K y η_{app} aumentaban enormemente. Halm y Ericksen (1980) trabajando con emulsiones aceite/agua formuladas con un concentrado de

proteína de papa y un aislado de proteína de soja (Purina 500E) encontraron que la η_{app} aumenta al incrementarse el porcentaje de aceite de la emulsión aumentando bruscamente al acercarse al punto de inversión de la emulsión y que la η_{app} aumenta exponencialmente con la concentración de proteína.

Cerca del punto de inversión los glóbulos de aceite rodeados por la película de proteína se encuentran muy próximos entre si produciéndose fuertes interacciones entre los mismos. Además en emulsiones muy concentradas, los glóbulos de aceite están separados por películas muy delgadas de fase continua (Sherman, 1970), cuya viscosidad es muy superior a la viscosidad en el seno de la fase continua (η_0) (Sherman, 1970). Esto explicaría los valores anormalmente altos de K , τ_0 y η_{app} en las proximidades del punto de inversión.

Con el fin de poder explicar los cambios notables que se producen en los parámetros reológicos de las emulsiones para concentraciones de proteína comprendidas entre 1 y 2% (P/P) se determinaron las curvas de flujo de las dispersiones proteicas. Las mismas no presentaron umbral de fluencia y se muestran en la Figura 31. Por aplicación de un programa de regresión lineal a la expresión de la ley de la potencia linealizada ($\log \tau = \log K + n \log D$) se obtuvieron los valores de K y n de las dispersiones proteicas.

En la Tabla 27 se muestran dichos valores, así

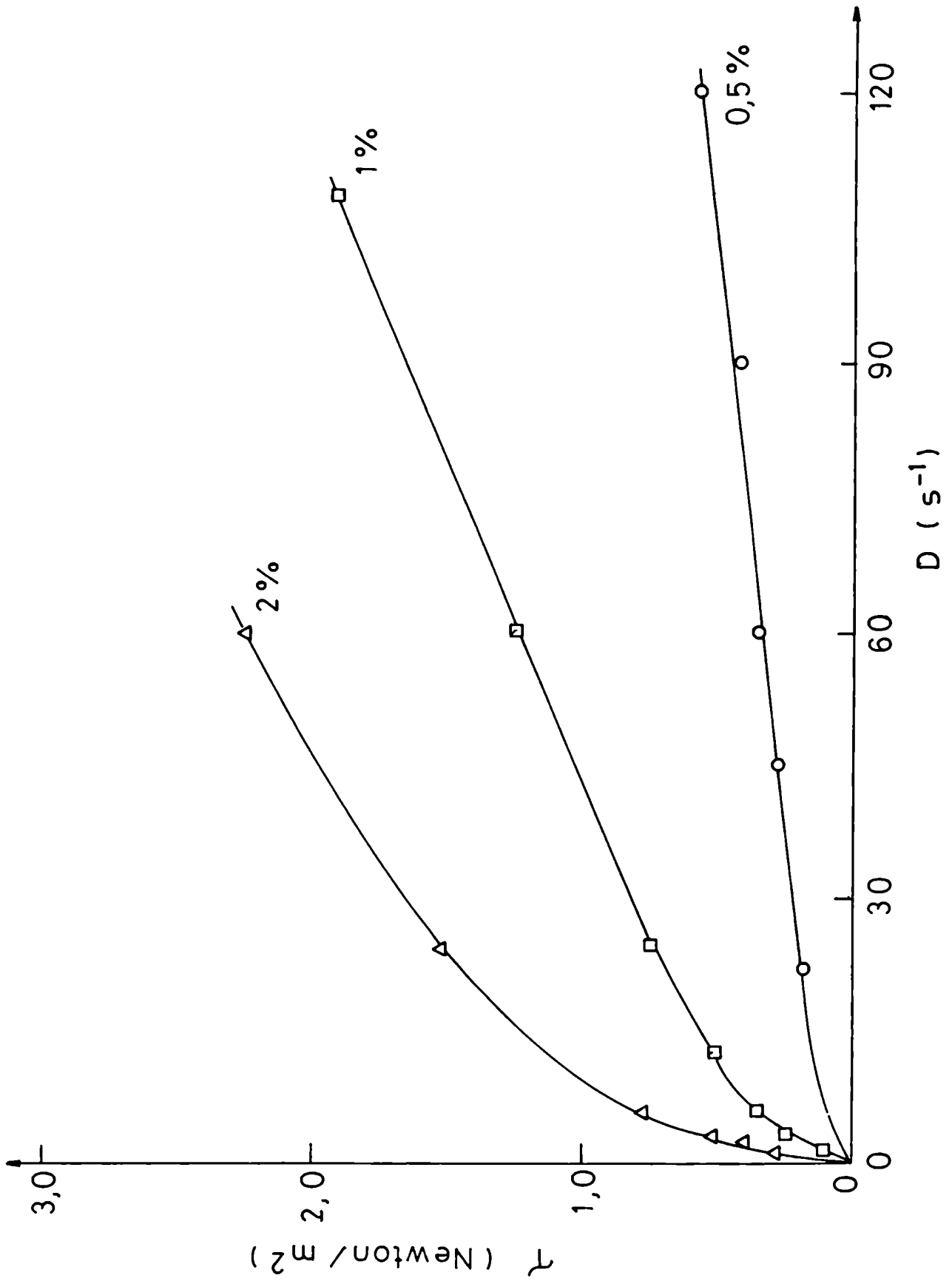


Figura 31: Curvas de flujo de las dispersiones 0,5, 1 y 2% (P/P) de Proteinmax 90NB

Tabla 27

Parámetros de la ley de la potencia ($\tau = K D^n$) para las dispersiones de protefina de soja

| Concentración de protefina de soja (% P/P) | Indice de consistencia (K) ($N s^n/m^2$) | Indice de comportamiento de flujo (n) | R ^a |
|--|--|---------------------------------------|----------------|
| 0,5 | 0,024 [±] 0,001 | 0,65 [±] 0,05 | 0,997 |
| 1 | 0,102 [±] 0,001 | 0,57 [±] 0,01 | 0,999 |
| 2 | 0,22 ± 0,01 | 0,53 [±] 0,06 | 0,964 |

a: P < 0,01

como sus correspondientes errores. Estos últimos se determinaron utilizando un tratamiento análogo al indicado anteriormente para las emulsiones.

El índice de consistencia se incrementa a medida que aumenta la concentración de proteína, sin embargo en mucho menor medida que para la emulsión. Además se puede afirmar que no existen diferencias significativas en el índice de comportamiento de flujo para las diferentes dispersiones. Por lo tanto la magnitud de los cambios que se producen en los parámetros reológicos de las emulsiones, en el rango de concentraciones comprendido entre 1 y 2% (P/P), no puede ser atribuido simplemente a la modificación de los parámetros reológicos de la fase continua en dicho rango. La influencia de la concentración del agente emulsificante en las propiedades de flujo de las emulsiones es complejo y la magnitud de su efecto depende de la fracción en volumen de aceite (ϕ).

Sherman (1959) encontró que incrementos similares en la concentración del agente emulsificante producen un aumento mucho mayor en el índice de consistencia umbral de fluencia y viscosidad en emulsiones concentradas que en diluidas.

Shimada y col. (1982) trabajando con emulsiones aceite/agua estabilizadas por proteínas de pescado modificadas químicamente y gelatina hallaron también que el aumento de la concentración de proteína en emulsiones concentradas ($\phi = 0,85$)

produce un incremento mucho mayor en K y τ_0 y disminución en n que en las más diluidas.

La obtención de una ecuación que permita predecir el efecto combinado de la concentración de proteína y la fracción en volumen de aceite, sobre los parámetros de flujo, es importante pues va a permitir determinar cuál es la formulación más adecuada para obtener una emulsión que presente ciertas propiedades de acuerdo al uso de la misma. Así por ejemplo, un aderezo y una mayonesa deben poseer un alto umbral de fluencia pero la última debe poseer una viscosidad o índice de consistencia mayor.

Con este objeto se plantearon modelos de regresión múltiple para predecir el efecto combinado de la concentración de proteína y fracción en volumen de aceite de la emulsión sobre los parámetros reológicos (τ_0 , K y η_{app} a 12 s^{-1}).

Se encontró que el modelo más adecuado era el siguiente:

$$\ln P = a + b\phi + (\phi.C) \quad (50)$$

Donde: a , b , c son los coeficientes de regresión de la correlación

P : τ_0 , K o η_{app} según el caso

ϕ : fracción en volumen de aceite

C : concentración de proteína (%(P/P))

///

Tabla 28

Modelos de regresión para predecir el efecto de la concentración de protefina de soja y aceite en los parámetros de flujo

| Variable dependiente. | Variable independiente | R ² | Coefficiente de regresión | t-Student | β |
|---|------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|-------|
| ln τ ₀ | Constante | | -1,886 | | |
| | ∅ | 0,862 ^a | 7,910 | 5,097 ^d | 0,687 |
| | ∅.C | | 1,594 | 3,030 ^b | 0,409 |
| ln K | Constante | | -2,010 | | |
| | ∅ | 0,748 ^a | 3,530 | 2,902 ^b | 0,528 |
| | ∅.C | | 1,551 | 3,193 ^b | 0,581 |
| ln η _{app} (12 s ⁻¹) | Constante | | -0,466 | | |
| | ∅ | 0,849 ^a | 4,394 | 4,398 ^a | 0,823 |
| | ∅.C | | 0,538 | 1,104 ^e | 0,206 |

∅: fracción en volumen de aceite ; C: concentración de protefina (% P/P)

a: P < 0,01 ; b: P < 0,02 ; c: P < 0,10 ; d: P < 0,001 ; e: P < 0,3

La inclusión del término de interacción ($\emptyset.C$) como variable independiente se debe a que como ya se mencionó el efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de flujo es función de la fracción en volumen de aceite (\emptyset).

En la Tabla 28 se muestran los valores de los coeficientes de regresión (a, b, c) coeficientes de determinación (R^2), t-Student y coeficientes de regresión normalizados (β) de las correlaciones múltiples mencionadas para los distintos parámetros reológicos.

El coeficiente de determinación (R^2) entre $\ln K$, $\ln \tau_0$, $\ln \eta_{app}$ y las variables independientes \emptyset y $\emptyset.C$ fue altamente significativo ($P < 0,01$). El 86,2% de las variaciones en el umbral de fluencia pueden ser explicadas por las dos variables independientes \emptyset y $\emptyset.C$. Los valores de t-Student de los coeficientes de regresión parciales son altamente significativos (para \emptyset $P < 0,001$, y para $\emptyset.C$ $p < 0,02$) indicando que ambas variables afectan el τ_0 . Sin embargo los coeficientes de regresión estandarizados (β) que permiten determinar la importancia relativa de las variables incluidas, indican que \emptyset fue levemente más importante que $\emptyset.C$ en su efecto sobre el umbral de fluencia.

Los valores de R^2 correspondientes a los modelos de regresión múltiple para $\ln K$ y $\ln \eta_{app}$ fueron similares indicando que 74,6 y 74,8 de la variación de las mismas respectivamente puede ser explicada por \emptyset y $\emptyset.C$. Los valores de

t-Student de los coeficientes de regresión parciales fueron altamente significativos indicando que tanto ϕ como $\phi.C$ son importantes en determinar las variaciones de K y η_{app} .

Para K el valor de los coeficientes de regresión estandarizados (β) indica que ϕ y $\phi.C$ tienen el mismo peso, en tanto que para la predicción de la viscosidad aparente ϕ , tiene un efecto mayor que $\phi.C$ (comparar el valor de $\beta = 0,725$ para ϕ , frente a $\beta = 0,340$ para $\phi.C$).

VI.4.3. Conclusiones

Las ecuaciones de correlación múltiple halladas, para predecir el efecto de la fracción en volumen de aceite y la concentración de proteína sobre los parámetros de flujo confirman las conclusiones ya mencionadas en base al análisis de la Tabla 26.

- 1) El efecto causado por la concentración de proteína es menor que el producido por la fracción en volumen de aceite. Esto se hace evidente en la ecuación de correlación que no incluye a C como variable independiente sino a ϕ y el término de interacción $\phi.C$.
- 2) El incremento de la fracción en volumen de aceite de la emulsión, provoca un cambio importante en los parámetros reológicos.

cos especialmente al acercarse al punto de inversión de la emulsión.

- 3) El efecto causado por la concentración de proteína depende de la fracción en volumen de aceite de la emulsión. Esto está contemplado en la inclusión del término $\phi.C$ en la ecuación de correlación. Un aumento similar en la concentración de proteína produce un incremento mayor en τ_0 , K y η_{app} en las emulsiones concentradas que en las diluídas.

V. CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Se encontró que la capacidad de absorción de agua y aceite de la proteína, son propiedades fisicoquímicas adecuadas para evaluar las características hidrofílicas y lipofílicas de la misma, que permiten predecir el comportamiento de la proteína en la interfase aceite/agua, pudiendo concluir que:
 - a) La capacidad de emulsificación de la proteína depende de la existencia de un balance adecuado entre las características hidrofílicas y lipofílicas de la proteína que se puede describir a través del índice de absorción de agua y aceite (IAAAc), es decir de la relación entre la capacidad de absorción de agua y la capacidad de absorción de aceite. Un incremento en el carácter hidrofílico o lipofílico de la proteína "per se" no produce modificación en la capacidad y eficiencia de emulsificación.
 - b) La estabilidad de las emulsiones no depende del balance entre las características hidrofílicas y lipofílicas de la proteína sino del valor absoluto de la capacidad de absorción de agua y aceite. La viscosidad de la fase continua (η_0) también es un factor importante del cual depende la estabilidad de las emulsiones.

2) El estudio de la cinética de desestabilización de emulsiones formuladas con diferentes proteínas alimenticias permitió obtener una ecuación general para describir la pérdida de estabilidad de las mismas en función del tiempo. Se hallaron distintos criterios cuantitativos (Q , B , K , R_0) para caracterizar la estabilidad de las emulsiones.

La expresión cinética hallada de orden dos, indica que la floculación podría ser la etapa determinante del proceso total de desestabilización de dichas emulsiones.

3) Se halló que un incremento en la concentración de aceite y/o proteína produce un aumento en la estabilidad de la emulsión. Las ecuaciones de regresión halladas para predecir el efecto combinado de la concentración de aceite y proteína sobre la estabilidad de la emulsión, indican que ambas variables están altamente relacionadas.

4) El estudio reológico de las emulsiones demostró que todas presentaban comportamiento pseudoplástico y umbral de fluencia. Los modelos de regresión múltiple hallados para predecir el efecto combinado de la concentración de aceite y proteína sobre los parámetros de flujo (τ_0 , K y η_{app}) permitieron concluir que:

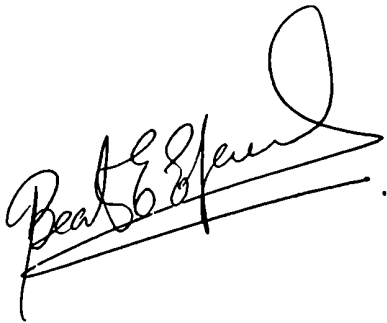
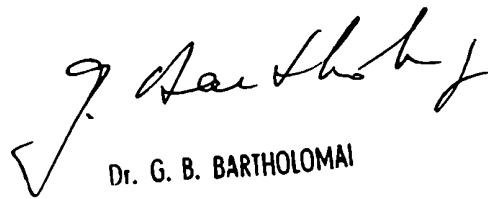
- a) El efecto producido por la concentración de proteína depende de la fracción en volumen de aceite.
 - b) Se producen cambios muy grandes en los parámetros de flujo cuando la fracción en volumen de aceite de la emulsión se acerca al punto de inversión de la emulsión; bajo estas condiciones τ_0 , K y η_{app} aumentan enormemente.
- 5) Se encontró una ecuación general que permite predecir la estabilidad de las emulsiones en función de la capacidad de absorción de agua y aceite de la proteína usada para su formulación y de la composición de la emulsión (es decir ϕ y C).

En síntesis podemos decir que:

- Los resultados obtenidos nos aportan un mayor conocimiento de la relación entre las propiedades moleculares de las proteínas y su función como agentes emulsificantes. Además proporcionan información respecto a los mecanismos de desestabilización y comportamiento reológico de las emulsiones alimenticias.

- Desde el punto de vista tecnológico nos proporcionan información aplicable en el control de calidad, diseño de equipos y aplicaciones industriales en la fabricación de emulsiones.

- Indican que la capacidad de absorción de agua y aceite de una proteína son propiedades fisicoquímicas que determinan su aptitud como agente emulsificante; siendo esto de especial relevancia desde el punto de vista tecnológico ya que permite determinar el tipo de procesamiento al que debe someterse la proteína para tener las características de emulsificación deseadas. Estos procesos pueden incluir la modificación de la funcionalidad a través de la desnaturalización, modificaciones químicas y/o enzimáticas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. B. Bartholomai', written over three horizontal lines.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. B. Bartholomai', written above the printed name.

Dr. G. B. BARTHOLOMAI

VI. BIBLIOGRAFIA

- Acton, J.C. and Saffle, R.L. 1970. Stability of oil-in-water emulsions. 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat proteins. J. Food Sci. 35: 852.
- Acton, J.C. and Saffle, R.L. 1971. Stability of oil-in-water emulsions. 2. Effects of oil phase volume, stability test, viscosity, type of oil and protein additive. J. Food Sci. 36: 1118.
- Acton, J.C. and Saffle, R.L. 1972. Emulsifying capacity of muscle protein. Phase volumes at emulsion collapse. J. Food Sci. 37: 904.
- Ambwani, D.S. and Fort, T. 1979. Pendant drop technique for measuring liquid boundary tensions. In "Surface and Colloid Science". R.J. Good and R.R. Stramberg (ed.) Vol. 11, p. 93 Plenum Press, N.Y.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis. Assoc. Official Anal. Chem. Washington. DC.
- Aoki, H., Taneyama, O., and Inami, M. 1980. Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins. J. Food Sci. 45: 534.

- Aoki, H., Taneyama, O., Orimo, N. and Kitagawa, I. 1981. Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. J. Food Sci. 46: 1192.
- Aoki, H., Shirase, Y., Kato, J. and Watanabe, Y. 1984. Emulsion stabilizing properties of soy protein isolates mixed with sodium caseinates. J. Food Sci. 49: 212.
- Bauman, H. 1966. Apparatur nach Bauman zur bestimmung der flussigkeit soufnahme von pulvrigen substanzen. Fette, Seifen, Anstrichm, 68: 741.
- Becher, P. 1965. "Emulsion: Theory and practice" 2nd ed. Reinhold Publishing Corp., N.Y.
- Bianchi, M.A., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1985. Rheological behavior of comminuted meat proteins containing soy protein isolates. J. Texture Studies 16: 193.
- Carpenter, J.A. and Saffle, R.L. 1964. A simple method of estimating the emulsifying capacity of various sausage meats. J. Food Sci. 29: 774.
- Casson, N. 1959. Rheology of dispersed systems (C.C. Mill, Ed.) Pergamon Press. London.
- Charm, S.E. 1963. The direct determination of shear stress-shear rate behavior en presence of a yield stress.

J. Food Sci. 28: 107.

Circle, S.J., Meyer, E.W. and Whitney, R.W. 1964. Rheology of soy protein dispersions. Effect of heat and other factors on gelación. Cereal Chem. 41: 157.

Cox, C.P. 1952. Changes with temperature in the viscosity of whole milk. J. Dairy Res. 19: 72.

Crenwelge, D.D., Diel, C.W., Tybor, P.T. and Landmann, W.A., 1974. A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrates. J. Food Sci. 39: 175.

Dickinson, E. and Stainsby, G. 1982. In "Colloids in Foods". Chaps. 4 y 7. Ed. by Applied Science Publishers L.T.D. England.

Ehninger, J.N. and Pratt, D.W. 1974. "Some factors influencing gelation and stability of soy protein dispersion. J. Food Sci. 39: 892.

Fernández-Martín, F. 1972. Influence of temperature and composition on some physical properties of milk and milk concentrates. II. Viscosity. J. Dairy Res. 39: 75.

Figoni, P.I. and Shoemaker, Ch. F. 1981. Review paper: Characterization of structure breakdown of foods from their flow properties. J. Texture Studies 12: 287.

- Fisher, L.R., Mitchell, E.E. and Parker, N.S. 1985. Interfacial tensions of commercial vegetable oils with water. J. Food Sci. 50: 1202.
- Fleming, S.E. Sosulki, F.W., Kilara, A. and Humbart, E.S. 1974. Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates. J. Food Sci. 39: 188.
- Flint, F.O. and Johnson, R.F.P. 1981. A study of film formation by soy protein isolate. J. Food Sci. 46: 1351.
- Franzen, K. and Kinsella, J.E. 1976a. Functional properties of succinyated and acetylated soy proteins. J. Agric. Food Chem. 24: 788.
- Gladwell, N., Grimson, M.J., Rahalkar, R.R. and Richmond, P. 1975a. Rheological behavior of soya oil-water emulsions: Dependence upon oil concentration. J. Food Sci. 50: 440.
- Gladwell, N., Grimson, M.J., Rahalkar, R.R. and Richmond, P. 1975b. Creep-recovery behavior of oil in water emulsions: Influence of disperse phase concentration. J. Food Sci. 50: 1477.
- Gopal, E.S.R. 1968. Emulsion Science. Ed. by Sherman, P.

Academic Press, London, Chap. 1.

- Griffin, W.C. 1949. Classification of surface active agents by "HLB". J. Soc. Cosmetics 1: 311.
- Groninger, H.S.J.R. 1973. Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar protein. J. Agr. Food Chem. 21: 978.
- Hahn, A.V. and Vold, R.D. 1975. The kinetics and mechanisms of ultracentrifugal demulsification. J. Colloid Interface Sci. 51: 133.
- Halm, F. and Ericksen, S. 1980. Emulsifying properties of undenatured potato protein concentrate. Food Technol. 15: 71.
- Hayes, J.F. and Müller, L.L. 1961. Factors affecting the viscosity of solutions of acid-precipitated caseins. Aust. J. Dairy Technol. 16: 265.
- Hegarty, G.R. Bratzler, L.J. and Pearson, G.R. 1963. Studies on de emulsifying properties of some intracellular beef muscle proteins. J. Food Sci. 28: 663.
- Hennoek, M., Rahalkar, R.R., and Richmond, P. 1984. Effect of

xanthan gum upon the rheology and stability of oil in water emulsions. J. Food Sci. 49: 1271.

Hermansson, A.M. 1972. Functional properties for foods. Swelling Lebensm.-Wiss.Technol. 5: 24.

Hermansson, A.M. 1975a. Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effects on texture of meat product. J. Food Sci. 40: 611.

Hermansson, A.M. 1975b. Functional properties of proteins for foods. Flow properties. J. Texture Studies 5: 425.

Hermansson, A.M. 1979. Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. J. Am. Oil Chemists' Soc. 56: 272.

Hutton, C.W. and Campbell, A.M. 1977. Functional properties of a soy concentrate and soy isolate in single systems and in a food system: Emulsion properties thickening function and fat absorption. J. Food Sci. 42: 457.

Inkelaar, P.A., Fortuin, J. 1969. Determining the emulsifying and emulsion stabilizing of protein meat additives. Food Technol. (Chicago) 23: 103.

- Ivey, F.J., Webb, N.B. and Jones, V.A. 1970. The effect of disperse phase droplet size and interfacial thickness on the emulsifying capacity and estability of meat emulsions. Food Technol. (Chicago) 24: 91.
- Kamat, V.B., Graham, G.E. and Davis, M.A.F. 1978. Vegetable protein: Lipid interactions. Cereal Chem. 55: 295.
- Karel, M. 1973. Protein interaction in biosystems. J. Food Sci. 40: 896.
- Kato, A. and Nakai, S. 1980. Hidrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochem. Biophys. Acta 624: 13.
- Kato, A., Tsutsui, N., Kobayashi, K.K. and Nakai, S. 1981. Effects of partial denaturation on surface properties of ovoalbumin and lysozyme. Agric. Biol. Chem. 45: 2755.
- Kato, A., Fujeshige, T., Matsumdomi, N. and Kobayashi, K. 1985. Determination of emulsifying properties of some protein by conductivity measurements. J. Food Sci. 50: 56.
- Keshavarz, E. and Nakai, S. 1979. The relationhsip between hidrophobicity and interfacial tension of proteins. Biochim. Biophys. Acta 756: 269.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in foods:

- a survey. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 7: 219.
- Kinsella, J.E. 1979. Functional properties of soy proteins. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56: 242.
- Kinsella, J.E., Damodaran, S., and German, B. 1985. In "New protein foods" (Altschul, A.M., and Wilcke, H.L. eds.) vol 5, chap. 5, p. 149. Academic Press, Inc.
- Kuntz, D.A., Nelson, A.I., Steinberg, M.P. and Wei, L.S. 1978. Control of chalkiness in soy milk. J. Food Sci. 43: 1279.
- Li-Chan, E., Nakai, S. and Wood, D.F. 1984. Hidrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. J. Food Sci. 49: 345.
- Li-Chan, E., Nakai, S. and Wood, D.F. 1985. Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. J. Food Sci. 50: 1034.
- Lin, M.J., Humbert, E.S., and Sosuiski, F.W. 1974. Certain functional properties of sunflower meat products. J. Food Sci. 39: 368.
- López de Ogara, M.C. Bercovich, F., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1986. Denaturation of soybean proteins related to

functionality and performance in a meat system. J. Food Technol. 21: 279.

López de Ogara, M.C., Pilosof, A.M.R., and Bartholomai, G.B.
1987. Effect of solutes on the hydration characteristics of soy protein isolate. Int. J. Food Sci. Technol. 22: 153.

Mc Watters, K.H. and Cherry, J.P. 1975. Functional properties of peanut paste as affected by moist heat treatment of fullfat peanuts. J. Food Sci. 40: 1205.

Mc Watters, K.H. and Cherry, J.P. 1981. Emulsification: Vegetable proteins. A.C.S. Symp. Ser. 147: 217.

Mc Watters, K.H. and Holmes, M.R. 1979a. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. J. Food Sci. 44: 770.

Mc Watters, K.H. and Holmes, M.R. 1979b. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut flours. J. Food Sci. 44: 774.

Marshall, A.M., Dutson, T.R., Carpenter, Z.L. and Smith, G.C.
1975. "A simple method for emulsion end-point-determinations"
J. Food Sci. 40: 896.

Mattil, K.F. 1971. The functional requirements of proteins for

- foods. J. Am. Oil. Chem. Soc. 48: 477.
- Mizrahi, S. and Berk, Z. 1972. Flow behavior of concentrated orange juice: Mathematical treatment. J. Texture Studies 3: 69.
- Nakai, S., Ho, L., Helbig, N., Kato, A. and Tung, M.A. 1980. Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. Can Inst. Food Sci. Technol. J. 13: 23.
- Padday, J.F. 1969. Surface tension. Part II. The measurements of surface tension. In Surface and Colloid Science. E. Matejevic (Ed.) Vol. 1, p. 101. John Wiley. N.Y.
- Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of protein: Evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26: 716.
- Pearson, A.M., Spooner, M.E., Hegarty, G.R. and Bratzler, L.J. 1965. "The emulsifying capacity and stability of sodium proteinate, potassium caseinate and nonfat dry milk. Food Technol. 19: 1841.
- Petrowsky, G.E. 1976. Emulsion stability and its relation to foods. Advances in Food Research. Academic Press. N.Y. 22: 310.
- Phillips, M.C. 1981. Protein conformation at liquid interfaces

- its role in stabilizing emulsions and foams. Food Technol. 35: 50.
- Pilosof, A.M.R., Bartholomai, G.B. and J. Chirife. 1982. Kinetics of nitrogen solubility loss in heated flour and protein isolates from bean, *phaseolus vulgaris*. J. Food Sci. 47: 4.
- Pilosof, A.M.R., Boquet, R. and Bartholomai, G.B. 1985. Kinetics of water uptake by food powders. J. Food Sci. 50: 278.
- Pilosof, A.M.R., López de Ogara, M.C. and Bartholomai, G.B. 1986. Effect of slurry preparation methods on the rheological and gelling behavior of soy protein. J. Texture Studies 17: 346.
- Prentice, J.H. 1972. Rheology and texture of dairy products. J. Texture Studies 3: 415.
- Quaglia, G.B., Alessandrini, A. and Riccardi, A. 1981. In proprietà funzionali delle proteine. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy.
- Rakosky, J. 1970. Soy products for meat industry. J. Agric. Food Chem. 18: 1005.
- Ralston, M.L. and Jennrich, I. 1978. Duda derivative free algoritmo for non lineal least squares. Technometrics 20(1).
- Ramanathan, G., Ran, L.H. and Urs, L.N. 1978. Emulsification

- properties of groundnut protein. J. Food Sci. 43: 1270.
- Rha, Ch. 1978. Rheology of fluids foods. Food Technol. 32: 77.
- Rham, O., Kruseman, J. and Hidalgo, J. 1978. Nongelling soy protein hydrolysate for use in concentrated fluid complex foods. J. Food Sci. 43: 642.
- Romo, C.R. 1980. The extraction characterization together with nutritional and technological properties of protein contained in chilean bean and rapeseed meal. Ph D. Thesis. National College of Food Technology. Weyhridge. England
- Saffle, R.L. 1968. "Meat Emulsions". Advances in Food Research 16: 105.
- Schuster, G. 1981. Manufacture and stabilization of food emulsions. Lecture presented at the INSKO Training Course, Helsinki, Finland.
- Shemer, M., Creinin, H.L., Mc Donald, R. and Irwin, W.F. 1978. Functional properties of soy protein isolated. Cereal Chem. 55: 383.
- Sherman, P. 1959. The influence of emulsifying agent concentration

- on emulsion viscosity. Kolloid-Z 165: 156.
- Sherman, P. 1963. Changes in the rheological properties of emulsions on aging and their dependence on the kinetics of globule coagulation. J. Phys. Chem. 67: 2531.
- Sherman, P. 1968. (Ed.) "Emulsion Science". Academic Press. N.Y.
- Sherman, P. 1970. Industrial Rheology. Chap. 3. Academic Press. Inc. London.
- Sherman, P. 1983. Encyclopedia of emulsion technology. Ed. by Paul Becher, Marcel Dekker, Inc. New York. Vol. 1. Chap 7 (Rheological properties of emulsions) p. 405.
- Shimada, A., Yazawa, E. and Arai, S. 1982. Preparation of proteinaceous surfactants by enzymatic modification and evaluation of their functional properties in a concentrated emulsion system. Agric. Biol. Chem. 46: 173.
- Smith, A.K. and Circle, S.J. 1972. "Soybeans: Chemistry and Technology" Chaps. 9 and 10. Avi Publishing Co. Inc. Westport, Conn.
- Smith, L.M. and Dairiki, T.J. 1975. Stability of milk fat emulsion. Preparation of model oil-in-water emulsions and evaluation of their stability. J. Dairy Sci. 58: 1249.

- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1960. Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York. USA.
- Stone, M. and Campbell, A.M. 1980. Emulsification in systems containing soy protein isolates, salt and starch. J. Food Sci. 45: 1713.
- Swift, C.E. Lockett, C. and Fryar, A.J. 1961. Comminuted meat emulsions. The capacity of meats for emulsifying fat. Food Technol. 15: 468.
- Swift, C.E. and Sulzbacher. 1963. Comminuted meat emulsions: Factors affecting meat proteins as emulsions stabilizers. Food Technol. 17: 224.
- Tadros, T.F. and Vincent, B. 1983. Encyclopedia of emulsion Technology. Ed. by Paul Becher, Marcel Dekker, Inc. New York Vol. 1. p. 129.
- Tiu, C. and Boger, D.V. 1974. Complete rheological characterization of time dependent food products. J. Texture Studies 5: 329.
- Titus, T.C., Wiancko, N.N., Barbour, H.F. and Mickle, J.B. 1968. Emulsifier efficiency in model systems of milk fat or soybean oil and water. Food Technol. 22: 1449.
- Tornberg, E. and Hermansson, A.M. 1977, "Functional

characterization of proteins stabilized emulsions: Effect of processing" J. Food Sci. 42: 468.

Tornberg, E. 1979. The adsorption behavior of proteins at an interface as related to their emulsifying properties. Am. Chem. Soc. Simp. Series 92: 6.

Torgensen, H. and Toledo, R.T. 1977. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. J. Food Sci. 42: 1615.

Tsai, R., Cassens, R.G. and Briskey, E.J. 1972. The emulsifying properties of purified muscle proteins. J. Food Sci. 37: 286.

Tung, M.A., Watson, E.L. and Richards, J.F. 1971. Rheology of egg albumen. Trans. Am. Soc. Agric. Engrs. 14: 17.

Tybor, P.T., Dill, C.W. and Laudmann, W.A. 1973. Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray dried blood protein concentrates. J. Food Sci. 35: 501.

Urbanski, G.E., Wei, L.S., Nelson, A.I. and Steinberg, M.P. 1983. Flow properties of soy bean constituents

controlled by ratio of total to imbedded water. J. Food Sci. 48: 691.

Van den Tempel, M. 1953. Stability of oil-in-water emulsions. 1. The electrical double layer at the oil-water interface. Recueil 72: 419.

Van Eerd, J.P. 1971. Meat emulsion stability. Influence of hydrophilic lipophilic balance, salt concentration and blending with surfactants. J. Food Sci. 36: 1121.

Vigo, M.S., Bertoni, M.H. y Cattaneo, P. 1973. Estudios sobre semillas de cucurbitáceas Argentinas. Anales Asociación Química Argentina 61: 241.

Vitali, A.A. and Rao, M.A. 1984. Flow properties of low-pulp concentrated orange juice. Effect of temperature and concentration. J. Food Sci. 49: 882.

Volkert, M.A. and Klein, B.P. 1979. Protein dispersibility and emulsion characteristics of four soy products. J. Food Sci. 44: 93.

Voutsinas, L.P., Cheung, E. and Nakai, S. 1983. Relationship of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. J. Food Sci. 48: 26.

- Wallingford, L. and Labuza, T.P. 1983. Evaluation of the water binding properties of food hydrocolloids by physical/chemical methods and in a low fat meat emulsion. J. Food Sci. 48: 1.
- Walstra, P. 1983. Encyclopedia of emulsion Technology. Ed. by Paul Becher, Marcel Dekker, Inc. New York. Vol 1 Chap.2 (Formation of emulsions).
- Wang, J.C. and Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf proteins. J. Food Sci. 41: 286.
- Watanabe, M., Fujii, N. and Arai, S. 1982. Characterization of foam-and emulsion-stabilizing functions of enzymatically modified proteins with surfactancy. Agr. Biol. Chem. 46: 1581.
- Webb, N.B., Ivey, F.J., Jones, V.A. and Monroe, J.R. 1970. The measurement of emulsifying capacity by electrical resistance. J. Food Sci. 35: 501.
- Wolf, W.J. 1972. "Soybeans: Chemistry and Technology" Chap. 4. AVI Publishing Co., Inc. Westport Conn.
- Yatsumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Toda, J., Wada, J. and Ishii, K. 1972a. Whipping and emulsifying properties

of soybean products. Agric. Biol. Chem. 36: 719.

Zakaria, F., Mc Feeters, R.F. 1978. Improvement of the emulsification of soy protein by limited pepsin hydrolysis.

Lebens-Wiss.u.-Technol. 11: 42.