

Tesis Doctoral

Impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre proteína del lactosuero e hidroxipropilmetilcelulosa en las propiedades físico-químicas de las mezclas

Jara, Federico Luis

2011

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:

Jara, Federico Luis. (2011). Impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre proteína del lactosuero e hidroxipropilmetilcelulosa en las propiedades físico-químicas de las mezclas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Jara, Federico Luis. "Impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre proteína del lactosuero e hidroxipropilmetilcelulosa en las propiedades físico-químicas de las mezclas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

***IMPACTO DE LA INCOMPATIBILIDAD/COMPATIBILIDAD
TERMODINAMICA ENTRE PROTEINAS DEL LACTOSUERO E
HIDROXIPROPILMETILCELULOSA EN LAS PROPIEDADES
FISICO-QUIMICAS DE LAS MEZCLAS***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Industrial

Lic. Federico Luis Jara

Director de tesis: Dra. Ana Maria Renata Pilosof

Director asistente: Dr. Oscar Edgardo Pérez

Consejero de estudios: Dra. Ana Maria Renata Pilosof

Buenos Aires, 2011

Impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre proteínas del lactosuero e hidroxipropilmetilcelulosa en las propiedades físico-químicas de las mezclas

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre las proteínas del lactosuero y diferentes hidroxipropilmetilcelulosas, sobre las transiciones térmicas de las mezclas deshidratadas de dichos biopolímeros, la formación de los geles mixtos, las propiedades de las películas interfaciales mixtas, y el fraccionamiento de las proteínas lactoséricas.

En todas las experiencias se caracterizó, previamente, el comportamiento de los componentes solos. Los resultados demostraron que los sistemas ternarios WPC/HPMC/agua se comportan como una emulsión agua-en-agua, donde la micro-estructura de la misma está determinada por la relación de volúmenes entre las fases segregadas.

En el caso de las transiciones térmicas se observó que las mezclas compatibles (sin separación de fases) presentaron una única temperatura de transición vítrea (T_g) que se ajustó con modelos previamente descritos en literatura. Por el contrario, las mezclas acuosas que presentan una separación total (incompatibilidad) o parcial de las fases (compatibilidad limitada), la T_g quedó determinada por la morfología y el grado de segregación de las fases.

Así mismo, se encontró que dicha micro-estructura define tanto el comportamiento reológico (carácter sólido, G' ; viscoelasticidad relativa, $\tan \delta$) como las características macroestructurales (dureza) de los geles mixtos los cuales están determinados por el componente (WPC o HPMC) que constituye la fase continua. Sin embargo, la temperatura de gelificación (T_{gel}), al igual que la temperatura de transición vítrea (T_g), quedó determinada por la morfología y el grado de separación de fases.

Por otra parte, las mezclas de proteínas del lactosuero (β -lactoglobulina) e hidroxipropilmetilcelulosas (E50LV) en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica y concentraciones que permiten la saturación de la interfase por ambos biopolímeros, presentaron un comportamiento competitivo en la interfase aire-agua, modulado por el pH. Debido a su mayor carácter tensioactivo y buenas propiedades formadoras de películas, la HPMC dominó tanto la presión superficial como las propiedades reológicas de las películas interfaciales.

Finalmente, se demostró la capacidad de los "sistemas acuosos de dos fases" (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) constituidos por WPC/HPMC, para fraccionar las proteínas lactoséricas de bajo PM (α -lactalbúmina y β -lactoglobulina).

En términos generales, este trabajo aporta al conocimiento del entendimiento de las interacciones entre proteínas y polisacáridos y su posible aplicación tanto en el campo científico como en el tecnológico.

Palabras clave: proteínas del suero lácteo, hidroxipropilmetilcelulosas, incompatibilidad/compatibilidad termodinámica, transiciones térmicas, geles, interfases.

Impact of the thermodynamic incompatibility/compatibility between whey proteins and hydroxypropylmethylcellulose on the physico-chemical properties of the mixtures

Abstract

The aim of this work was to study the impact of the thermodynamic incompatibility/compatibility between whey proteins and different hydroxypropylmethylcelluloses on the thermal transitions of their dry-blends, the formation of mixed gels, the properties of interfacial mixed films, and whey protein fractionation.

In all the experiments the behavior of the single components was previously characterized. The results showed that the ternary systems WPC/HPMC/water behave like a water-in-water emulsion, where their micro-structure is determined by the volume ratio between the segregated phases.

In the case of thermal transitions it was observed that compatible mixtures (without phase separation) showed a single glass transition temperature (T_g) that was fitted with models previously described in literature. On the contrary, in full (incompatibility) or partial (limited compatibility) phase separated aqueous mixtures, the T_g was determined by morphology and the extent of phase segregation.

Moreover, it was found that the micro-structure defines both the rheological behavior (solid character, G' ; relative viscoelasticity, $\tan \delta$) and macrostructural characteristics (hardness) of mixed gels are determined by the component (WPC or HPMC) which constitutes the continuous phase. However, the gelation temperature (T_{gel}), as well as the glass transition temperature (T_g) were determined by morphology and the degree of phase separation.

Furthermore, mixtures of whey proteins (β -lactoglobulin) and hydroxypropylmethylcellulose (E50LV) in conditions of limited thermodynamic compatibility and concentrations that allow saturation of the interface for both biopolymers, showed a competitive behavior at the air-water, which was modulated by pH. Because of their greater surfactant character and good film forming properties, the HPMC dominated both surface pressure and the rheology of interfacial films.

Finally, it was demonstrated the ability of WPC/HPMC aqueous two-phase systems (ATPS) to fractionate low molecular weight (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) whey proteins.

In general, this work contributes to the knowledge of understanding the interactions between proteins and polysaccharides, and their possible applications in the field of science and technology.

Keywords: whey protein, hydroxypropylmethylcellulose, thermodynamic incompatibility/compatibility, thermal transitions, gels, interfaces.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Pilosof su inmensa ayuda y dirección en todo el trabajo de investigación. Por su presencia constante, por ser una gran guía durante todo el trabajo de investigación y el proceso de escritura, por sus importantes aportes, comentarios y sugerencias. Y sobre todo por demostrarme su confianza, dandome una oportunidad laboral, teniéndome una enorme paciencia, y por haberme ayudado y escuchado en muchos momentos personales en los que necesite un buen consejo.

Al Dr. Oscar Pérez por orientarme en muchísimas cuestiones profesionales, por la ayuda en el trabajo experimental y en la escritura de la tesis.

A Mariana, por ser mi compañera en todo momento, por su amor y su infinita paciencia. Por tantas vivencias juntos.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por su amor y paciencia, y por haberme acompañado en la vida. Por representar un ejemplo de buenas personas. A mi madre y mis hermanas por su gran cariño. A mis tíos y primas que me han apoyado siempre y con quienes comparto momentos amenos.

A mis compañeras de laboratorio, Karina, Nerina, Edith y Carolina por la colaboración de cada una de ellas en la realización de este trabajo. A Julia y Victor, por su amistad y su ayuda incondicional.

A mis grandes amigos Juan y Fede por las charlas, risas y recuerdos vividos.

A todos las personas del plantel no docente de Industrias, por su ayuda y su buena onda.

Al Dr. Juan Miguel Rodríguez Patino, por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios sobre interfases en su laboratorio de la Universidad de Sevilla, y por la orientación brindada para realizarlos.

Al Dr. Cecilio Carrera Sánchez por su gran ayuda en el uso de los equipos y en la realización de mi trabajo experimental en mi estancia en Sevilla, y por ser un tío de buen corazón.

A todo el grupo de gente de Sevilla, Victor, Charly, Paco Carrillo, Juan Carlos, el Padi, que me hicieron sentir como uno más del grupo desde el primer día. Y a Charo por su simpatía andaluza.

A todos los docentes del Departamento de Industrias que han participado en mi formación académica durante el doctorado y a través de la docencia que realizo.

Al CONICET, por haberme otorgado las becas para la realización de este trabajo y a la Universidad de Buenos Aires y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, quienes han otorgado el financiamiento necesario para el trabajo de investigación. Al Programa CYTED por haber financiado mi estancia en la Universidad de Sevilla.

A todos, ¡¡muchas gracias!!

A Mariana y mi familia.

ÍNDICE

OBJETIVOS

Objetivo general.....	1
Objetivos específicos	1

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Lactosuero: elaboración, composición y aplicaciones.....	3
1.2. Proteínas del lactosuero	5
1.2.1. Propiedades fisicoquímicas y funcionales	8
1.2.2. β -lactoglobulina (β -lg)	11
1.2.3. α -lactalbúmina (α -lac).....	14
1.2.4. Seroalbúmina bovina (BSA, Bovine Serum Albumin).....	16
1.3. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).....	18
1.4. Interacciones proteína-polisacárido.....	23
1.4.1. Coacervación compleja.....	26
1.4.2. Incompatibilidad termodinámica.....	27
1.5. Impacto de las interacciones proteína-polisacárido en transiciones térmicas, geles e interfases.....	29
1.5.1. Transiciones térmicas	30
1.5.2. Gelificación.....	35
1.5.3. Comportamiento interfacial de biopolímeros.....	43
1.5.3.1. Cinética de adsorción en la interfase.....	45
1.5.3.2. Propiedades reológicas de las películas interfaciales.....	50
1.5.3.3. Propiedades interfaciales de mezclas de proteínas y polisacáridos.....	52
1.6. Referencias	56

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA SEPARACIÓN DE FASES EN LAS TRANSICIONES TÉRMICAS DE SISTEMAS MIXTOS DESHIDRATADOS

2.1. Introducción.....	68
2.2. Objetivo	69
2.3. Materiales y Métodos.....	70
2.3.1. Materiales.....	70
2.3.2. Preparación de soluciones madres y mezclas acuosas	70
2.3.3. Preparación de las mezclas deshidratadas	72
2.3.4. Cinética de la separación de fases de las mezclas acuosas.....	72
2.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry)	73
2.3.6. Microscopia laser de barrido confocal (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy)	74

2.3.7. Análisis estadísticos	75
2.4 Resultados y discusión	76
2.4.1 Separación de fases en mezclas acuosas y temperatura de transición vidrea (T _g) de los sistemas deshidratados	76
2.4.1.1. T _g de cada biopolímero deshidratado	76
2.4.1.2. T _g de mezclas deshidratadas obtenidas a partir de mezclas acuosas sin separación de fases	77
2.4.1.3. T _g de mezclas deshidratadas derivadas de mezclas acuosas con separación de fases: efecto del grado de separación de fases	82
2.4.2. Relación entre la T _g de las mezclas deshidratadas y la micro-morfología de la separación de fases en el sistema acuoso	91
2.5. Conclusiones	97
2.6. Referencias	99

CAPÍTULO III. EFECTO DE LA SEPARACIÓN DE FASES EN LAS PROPIEDADES DE GELES MIXTOS

3.1. Introducción	102
3.2. Objetivo	103
3.3. Materiales y Métodos	103
3.3.1. Materiales	103
3.3.2. Preparación de soluciones madres	104
3.3.3. Preparación de las soluciones binarias	105
3.3.4. Determinación del diagrama de fases	105
3.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry)	106
3.3.6. Dinámica de gelificación	107
3.3.7. Microscopia laser de barrido confocal (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy)	108
3.3.8. Propiedades de textura de los geles	109
3.3.9. Análisis estadísticos	112
3.4. Resultados y discusión	112
3.4.1 Diagrama de fases del sistema ternario WPC/E50LV/agua	112
3.4.2. Separación de fases de las mezclas seleccionadas para los estudios de gelificación	114
3.4.3. Dinámica de gelificación de los componentes individuales: WPC y E50LV	117
3.4.4. Dinámica de gelificación de los sistemas mixtos WPC/E50LV	122
3.4.4.1. Temperaturas de gelificación (T _{gel})	122
3.4.4.2. Evolución temporal de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') durante el calentamiento y el enfriamiento	126
3.4.5. Macro-estructura y propiedades texturales de los geles mixtos WPC/E50LV	131
3.5. Conclusiones	135
3.6. Referencias	136

CAPÍTULO IV. COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE MEZCLAS DE β -LACTOGLOBULINA E HIDROXIPROPILMETICELULOSA. EFECTO DEL pH

4.1. Introducción.....	139
4.2. Objetivo	141
4.3. Materiales y Métodos.....	141
4.3.1. Materiales.....	141
4.3.2. Preparación de soluciones madres	143
4.3.3. Preparación de los sistemas mixtos	143
4.3.4. Determinación de las propiedades interfaciales.....	144
4.3.4.1. Determinación de la tensión superficial	144
4.3.4.2. Determinación de las propiedades reológicas de las películas interfaciales.....	151
4.3.5. Análisis estadísticos	153
4.4. Resultados y discusión	153
4.4.1. Isotermas de adsorción (π vs concentración) para β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3.....	153
4.4.2. Dinámica de formación de las películas mixtas de β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3.....	159
4.4.3. Características viscoelásticas de las películas mixtas de β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3	162
4.5. Conclusiones.....	166
4.6. Referencias	167

CAPÍTULO V. FRACCIONAMIENTO DE α -LACTALBÚMINA Y β -LACTOGLOBULINA PROMOVIDO POR LA INCOMPATIBILIDAD TERMODINÁMICA ENTRE WPC Y HPMC

5.1. Introducción.....	170
5.2. Objetivo	171
5.3. Materiales y Métodos.....	172
5.3.1. Materiales.....	172
5.3.2. Preparación de soluciones madres	172
5.3.3. Preparación de los sistemas acuosos de dos fases (ATPS)	173
5.3.4. Determinación del contenido de proteína y polisacárido en cada fase	174
5.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	175
5.3.6. Cuantificación de cada tipo de proteína mediante análisis de imagen de los geles SDS-PAGE	176
5.3.7. Determinación del coeficiente de partición y de la recuperación proteica para β -lg y α -lac en las fases separadas	177
5.3.8. Análisis estadísticos	178
5.4. Resultados y discusión	178
5.4.1. Segregación de sistemas mixtos WPC/HPMC	178
5.4.2. Fraccionamiento de α -lac, β -lg y BSA en las fases separadas.....	179
5.4.3. Particionamiento de α -lac y β -lg.....	185
5.5. Conclusiones.....	188

5.6. Referencias190

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones Generales.....193

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el impacto de la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica entre las proteínas del lactosuero y diferentes hidroxipropilmetilcelulosas, sobre distintas propiedades físico-químicas de las mezclas.

Objetivos específicos

Caracterizar la incompatibilidad/compatibilidad termodinámica a nivel molecular entre las proteínas lácteas e hidroxipropilmetilcelulosas en solución, determinando su impacto en:

- ✚ Las transiciones térmicas de las mezclas deshidratadas.***

- ✚ La formación de los geles mixtos.***

- ✚ El comportamiento interfacial de las mezclas.***

- ✚ El fraccionamiento de las proteínas lactoséricas.***

Las proteínas del suero lácteo en forma de concentrados o aislados, provienen principalmente de un subproducto de la elaboración de quesos (el suero lácteo) que durante muchos años fue considerado como un desecho. Sin embargo estas proteínas son ingredientes alimenticios muy importantes desde el punto de vista tecnológico debido a las propiedades funcionales que presentan, y desde el punto de vista nutricional, por su alto valor biológico. Las principales proteínas lactoséricas son β -lactoglobulina (β -lg), α -lactalbúmina (α -lac) y seroalbúmina bovina (BSA). Éstas representan alrededor del 70% del total de las proteínas del suero y son las responsables de la capacidad de hidratación, gelificación, emulsificación y espumado de los aislados y concentrados proteicos.

La elección de las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC) se basó en la amplia aplicación de las mismas en la industria alimenticia, debido a las notables propiedades que poseen: son espesantes eficientes, presentan actividad superficial, tienen la habilidad de formar películas interfaciales y la capacidad de formar geles termorreversibles. Al mezclar las proteínas del lactosuero con la HPMC pueden obtenerse comportamientos sinérgicos, generándose sistemas mixtos con propiedades funcionales mejoradas respecto a las proteínas individuales.

En las páginas siguientes se explicarán las características físico-químicas y las propiedades funcionales de las proteínas y los polisacáridos utilizados en este trabajo para contar con ellas como herramientas para el análisis de los resultados obtenidos.

Además, se realizará una descripción del comportamiento de fases característico de los sistemas mixtos de proteína y polisacárido.

Finalmente, se expondrán una serie de conceptos teóricos acerca de, las transiciones térmicas de un material, el proceso de gelificación, así como también del comportamiento de biopolímeros en las interfases aire-agua.

Capítulo I

Introducción general

1.1. Lactosuero: elaboración, composición y aplicaciones.

Aunque se desconoce el verdadero origen del queso, su existencia se remonta a tiempos muy antiguos. Paralelamente, el aprovechamiento (aunque parcial) del suero tendría la misma antigüedad. Se sabe que 500 años a.C., los griegos ya prescribían el suero como bebida terapéutica. Históricamente fue utilizado por médicos de gran renombre como Hipócrates, Galeno, Avicena, etc, que recomendaban toma regular de suero por sus efectos depurativos y desintoxicantes del organismo y también fue utilizado como brebaje contra quemaduras y diversas enfermedades. Incluso en el Siglo XVIII, se abrieron sanatorios especializados en las “curas de suero de queso”.

El suero de queso es un residuo líquido rico en proteínas (6 g de proteína/litro de suero) que tanto en la Argentina, como en el resto del mundo, todavía no se aprovecha en forma eficiente. Debido a que es un contaminante ambiental, es de gran interés transformar este residuo en un producto de alto valor agregado.

La producción mundial de suero líquido se estima en 160 millones de toneladas por año, con un aumento anual de 1-2% (2008). Esto sería equivalente a 7 millones de toneladas de suero en polvo, pero dado que la producción mundial de este suero en polvo es de 4,3 millones de toneladas, las cifras indican que resta un 38 % de suero que se encuentra disponible para su aprovechamiento o que forma parte de los vertidos industriales (Guimarães y col., 2010).

Dado que el suero líquido proviene mayoritariamente de la elaboración de quesos, éste adquiere gran importancia en países como el nuestro, con una arraigada tradición quesera y niveles de producción significativos.

En este marco, resulta interesante conocer, al menos de modo orientativo, el orden del volumen total de sueros de lechería, la producción potencial de suero en polvo y su comparación con las estadísticas oficiales de elaboración real del producto en Argentina.

En 2008 se procesaron en Argentina con destino a quesos en el orden de 4200 millones de litros de leche, los que habrían generado unos 3800 millones de litros de suero (se generan 91 litros suero por cada 100 litros de leche cruda). Si todo este volumen de suero se secara en plantas industriales, y utilizando una conversión de 22 litros de suero líquido por cada kilo de suero en polvo, el país podría producir alrededor de 170000 toneladas de suero en polvo (Schaller, 2009)

En términos teóricos, si se compara esta producción potencial con la elaboración efectiva de suero en polvo se podrá tener una noción aproximada del porcentaje de utilización.

En 2008 se elaboró entre 32 y 36 mil toneladas de suero en polvo y otros productos similares. A grandes rasgos, esto significa que en el país se seca entre el 20 y el 25 % del potencial de suero disponible. Como dato de referencia puede consignarse que, por ejemplo, usando datos oficiales de 1991, una estimación similar arroja un aprovechamiento inferior al 3 % (Schaller, 2009).

Estas cifras, aunque aproximadas, permiten extraer dos conclusiones: por un lado, que se ha avanzado mucho en la búsqueda de nuevas alternativas de aprovechamiento de los sueros y en consecuencia en el cuidado del medio ambiente; pero a la vez llama la atención sobre el enorme compromiso que representa seguir explorando y explotando este recurso proteico con gran potencial de desarrollo de cara a la demanda del futuro cercano.

Las estadísticas oficiales muestran un crecimiento explosivo en la producción de suero en polvo en el último tiempo. En efecto, la producción nacional se duplicó entre 2004 y 2007, y habría alcanzado un nuevo récord en 2008 (Schaller, 2009)

En otro orden, se estima que en Argentina existen aproximadamente doce importantes plantas procesadoras de sueros de lechería, la mayor parte localizadas en la zona pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA (Arla Food Ingredients SA, un joint venture al 50 % de la danesa Arla con la argentina Sancor), con una planta en la localidad cordobesa de Porteña; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras son: Mastellone Hnos., Milkaut, García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur.

Las compañías líderes utilizan tecnología de punta y cumplen los más exigentes estándares internacionales, accediendo incluso a certificaciones BPM e ISO.

El gran crecimiento de la producción nacional vino de la mano de un fuerte impulso de las colocaciones externas. Entre 1999 y 2008 las exportaciones se multiplicaron por once, hasta alcanzar según se estima, un récord del orden de las 36000 toneladas y U\$S 86 millones en 2008. El 84 % del volumen colocado corresponde al lactosuero y el resto a otros componentes naturales de la leche. El precio promedio para 2008 fue de unos 1600 U\$S/tonelada para el suero en polvo

y aproximadamente 6500 U\$S/tonelada para los distintos concentrados de proteína (Schaller, 2009). Ambos grupos de productos a más de 30 países. Brasil, Indonesia, China, Chile y Singapur dan cuenta del 71 % del volumen.

En resumen, queda claro que el proceso de valorización de los sueros de lechería se encuentra en pleno auge y que, a pesar de la crisis de los mercados mundiales, la senda de permanente innovación en tecnología de procesos y productos seguirá siendo transitada por aquellas industrias líderes que además de buscar la mejora de la eficiencia y una mayor rentabilidad, generan divisas genuinas a través de la exportación de productos de alto valor agregado, a la vez que dan cumplimiento a las normativas ambientales.

Durante muchos años, la forma más común de desechar el suero ha sido sencillamente verterlo en los cursos de agua, lo que es muy perjudicial desde el punto de vista ambiental. De hecho, se puede estimar que una fábrica de queso que procesa 280000 litros de leche cruda por día, por ejemplo, produce alrededor de 250000 litros de suero líquido y puede contaminar tanta agua como una ciudad de 50000 habitantes (FAO, 1997). Una práctica menos perjudicial ha sido y es de uso muy frecuente, el suministro de suero a los terneros o cerdos como complemento de su alimentación.

1.2. Proteínas del lactosuero.

En la Tabla 1.1 se presenta la composición proteica de la leche bovina observándose que las caseínas son las proteínas más abundantes (80 % del total). Las caseínas de la leche tienen pesos moleculares que oscilan entre 25.000 y 40.000 Da; las más importantes son la α , β y κ , que representan, respectivamente, el 50, 30 y 15 % del total de las caseínas. En la leche, estas proteínas se asocian entre sí para formar partículas denominadas micelas, que se encuentran estabilizadas gracias a la presencia de la κ -caseína (Grasselli y col., 1997)

El tipo de suero y su composición (Tabla 1.2) dependen del método utilizado durante la remoción de la caseína: (i) “suero de queso”, es un co-producto obtenido durante la elaboración del queso, proceso en la cual se agregan enzimas coagulantes a la leche, que catalizan la ruptura de un enlace peptídico de la

κ -caseína: la unión entre el aminoácido fenilalanina en la posición 105 y la metionina en la 106.

Tabla 1.1 Composición proteica de la leche de vaca.

PROTEÍNA	LECHE DE VACA (g/100 ml)
Caseína	2,8
α -lactalbúmina	0,12
β -lactoglobulina	0,3
Inmunoglobulinas	0,05
Lactoferrina	0,02
Lactoperoxidasa	0,003
Totales	3,4

Fuente: Grasselli y col. (1997)

Este clivaje de la κ -caseína provoca la desestabilización de las micelas y por lo tanto la precipitación de casi todas las caseínas, las que posteriormente se van a transformar en queso; (ii) “suero ácido”, obtenido después de la acidificación directa o indirecta de la leche para la preparación de caseína ácida y queso cottage.

La mayoría del suero producido mundialmente es el suero de queso o también llamado “suero dulce”. Se calcula que aproximadamente el 94 % del suero producido en Estados Unidos es suero dulce y el restante 6 % es suero ácido (Anónimo, 2002).

En nuestro país el suero de queso se utiliza para preparar ricota, precipitando las proteínas por calentamiento en medio ácido. En este procedimiento se aprovechan solamente las propiedades nutricionales de las proteínas, ya que el procedimiento las desnaturaliza, es decir que las proteínas se despliegan, pierden su estructura y por lo tanto también muchas de sus propiedades funcionales (Grasselli y col., 1997).

Las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son amplísimas. La más usual es la deshidratación, por spray, para obtener suero en polvo o concentrados de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés, “whey protein concentrate”). En el primer caso el suero es deshidratado directamente, mientras que en el segundo el suero es previamente enriquecido en proteína, eliminando sales y lactosa mediante tecnologías de membrana.

No hay dudas de que este proceso de continua valorización del suero líquido ha sido posible gracias a la evolución permanente de la aplicación de las tecnologías de membrana en la industria láctea. El gran avance de esta rama de la ingeniería se produjo a comienzos de la década del setenta cuando se desarrolló la tecnología de ultrafiltración.

Tabla 1.2. Composición proteica del suero de queso y suero ácido.

	COMPOSICIÓN PROMEDIO (g/l)	
	SUERO DE QUESO	SUERO ÁCIDO
β -lactoglobulina	3,5	3,5
α -lactalbúmina	1,3	1,3
Sero albúmina	0,1	0,1
Inmunoglobulinas	0,4	0,4
Lipoproteínas	0,2	–
Proteosa-peptona	0,2	0,2
Caseinoglicomacropéptido	1	–
Proteína de suero total	6,7	5,8

Fuente: Oakenfull y col (1997).

La ultrafiltración se caracteriza por poseer un espectro de corte que va de 3.000 a 100.000 kDa. El corte más común para sistemas de lechería es 10.000 kDa. Éste es el tamaño de poro tradicional para separar las proteínas del suero de la lactosa, para producir WPC desde 35 a 85 % de pureza. Durante el proceso de ultrafiltración las proteínas del suero no se desnaturalizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas.

El paso más reciente en esta notable evolución fue la nanofiltración, que comenzó a aplicarse en el mercado industrial en la década del noventa y que desde entonces ha tenido un gran auge.

Entre los productos proteicos del suero, además de los concentrados con distintas proporciones de proteína, también se encuentran los aislados de proteínas (WPI por sus siglas en inglés, “whey protein isolates”) y proteínas aisladas como la α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas. Todos estos productos se obtienen por diafiltración o cromatografía de intercambio iónico.

Los productos derivados del suero de queso son considerados como productos GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas del inglés “generally recognized as safe”) por el Departamento de Administración de Alimentos de Estados Unidos (USFDA), y presentan un amplio rango de aplicaciones debido a su variada funcionalidad.

1.2.1. Propiedades físicoquímicas y funcionales.

Las funciones típicas de las proteínas en los alimentos incluyen la gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavour.

Las propiedades funcionales están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas de las proteínas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta y distribución de las cargas y relación hidrofobicidad/hidrofiliidad (Damodaran, 1996). Particularmente están definidas por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, las uniones inter e intramoleculares, principalmente uniones disulfuro, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales y la naturaleza y la extensión de las interacciones con otros componentes.

Kinsella (1976; 1982) definió a las propiedades funcionales como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo”.

El entendimiento de las propiedades físicas, químicas y funcionales de las proteínas y los cambios que sufren estas proteínas durante el procesamiento es esencial para comprender el comportamiento de las proteínas en los alimentos (Damodaran, 1997).

Para explicar el complejo comportamiento funcional de las proteínas lácteas se presenta un esquema (Figura 1.1) que muestra los diferentes factores que afectan a estas propiedades.

Las proteínas nativas (Figura 1.1, parte superior) reflejan un número de propiedades funcionales en solución acuosa (Figura 1.1, parte central) las cuales son modificadas durante el procesado de los alimentos. En esta secuencia, las

propiedades funcionales son el resultado de propiedades intrínsecas de las proteínas nativas y de un número de factores extrínsecos.

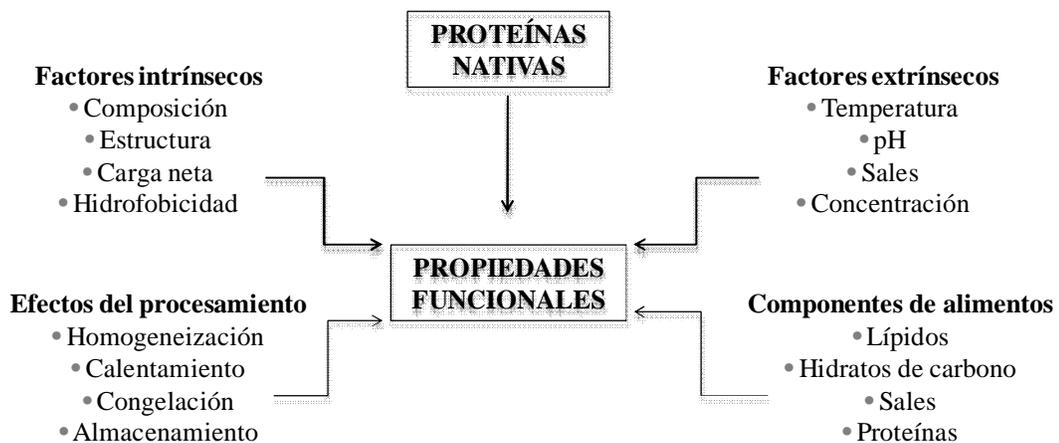


Figura 1.1. Esquema de los factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (adaptado de de Wit (1998)).

El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para predecir y controlar las propiedades funcionales. Dichas propiedades definen el comportamiento de las proteínas del suero en los alimentos y reflejan la manera en la cual las mismas interactúan con otros componentes, tales como lípidos, azúcares, sales, proteínas de otro origen y polisacáridos, como se indica en la Figura 1.1. Estas interacciones son gobernadas por los efectos del procesado y de las condiciones de almacenamiento. Así, casi todas las aplicaciones requieren atributos funcionales específicos para obtener el comportamiento deseado, el cual usualmente es alcanzado por prueba y error.

Las proteínas del suero son muy usadas como ingredientes en alimentos debido a sus propiedades funcionales únicas: emulsificación, gelificación, espumado, capacidad de retención de agua, entre otras. Pero además, la demanda actual no tiene que ver sólo con ingredientes funcionales, sino también saludables.

Numerosas investigaciones sugieren que las proteínas del suero son capaces de brindar diferentes beneficios nutricionales, biológicos y fisiológicos. Algunos de estos incluyen actividad antioxidante, mejora de la inmunidad de inmunodeprimidos, actividad anticancerígena, efectos antitumorales, efectos

sobre la movilidad gastrointestinal, actividad bacteriostática, etc (Brody, 2000; Demetriades y col., 1998; El-Salam y col., 1996; Thomä-Worringer y col., 2006) En la Tabla 1.3 se muestran algunas de las aplicaciones de las proteínas del suero en la industria de alimentos (Cayot y Lorient, 1996; Damodaran, 1997).

Tabla 1.3. Funcionalidad y aplicación de las proteínas del suero en alimentos.

FUNCIÓN	MECANISMO	ALIMENTO
Solubilidad	Hidrofilicidad	Bebidas
Gelificación	Retención e inmovilización de agua, formación de red	Carnes, geles, tortas, quesos, productos panificados
Cohesión–adhesión	Uniones hidrofóbicas, iónicas y puente hidrógeno	Carnes, salsas, pastas, productos panificados
Emulsificación	Adsorción y formación de películas en la interfase	Salsas, sopas, tortas, aderezos
Espumado	Adsorción interfacial y formación de películas	Coberturas para tortas, helados, postres, tortas
Liga de grasa y flavour	Retención, uniones hidrofóbicas	Roscas rellenas de mermeladas, panificados bajos en grasa

Además, el elevado valor biológico de las proteínas del suero (Tabla 1.4) es una de las razones por las que los concentrados de suero se emplean también en formulaciones alimentarias infantiles.

Tabla 1.4. Tabla comparativa del valor biológico entre las proteínas del suero y otras proteínas alimentarias.

PROTEÍNA	VALOR BIOLÓGICO
Proteína de suero	100
Proteína de huevo	97
Proteína de leche	88
Proteína de soja	71
Caseína	70

1.2.2. β -lactoglobulina (β -lg).

Como se mostró en la Tabla 1.2, la β -lactoglobulina (β -lg) es la proteína más abundante del suero lácteo (50-65 % de la proteína total de suero; 7-12 % del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de alrededor de 18,4 kDa.

La leche de todos los rumiantes tiene β -lg, mientras que la de casi todos los no rumiantes no la tiene. La β -lg tiene numerosas funciones biológicas entre ellas una alta eficiencia en la unión del retinol (provitamina A) (Sawyer y col., 1998). Es una fuente rica en cisteína, un aminoácido esencial que estimula la síntesis de glutatión que es un tripéptido anticarcinogénico que protege contra tumores intestinales. Además, la estructura globular de la β -lg la hace muy estable contra las enzimas proteolíticas y los ácidos presentes en el estómago (de Wit, 1998). Debido a su predominancia en la leche bovina, también domina las propiedades de las proteínas del suero.

Existen diferentes variantes genéticas de la β -lg, entre ellas las más abundantes son la variante A y la B (Eigel y col., 1984). Estas variantes difieren en la sustitución de una glicina en la variante B por un ácido aspártico en la variante A (Kilara y Vaghela, 2004). Ambas estructuras están estabilizadas por dos uniones disulfuro (entre Cys 160-Cys 66 y Cys 119-Cys 106) y también contienen un grupo sulfidriilo libre (Cys 121). A pesar de diferencias menores en la composición de aminoácidos entre las diferentes variantes genéticas, todas poseen un alto contenido de aminoácidos esenciales (Phillips y col., 1994a).

En la Figura 1.2 se muestra la estructura primaria de una de las variantes genéticas de la β -lg, la variante A.

La β -lg ha sido estudiada mediante dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja para determinar su estructura secundaria y se ha reportado que contiene 10-15 % de estructura α -hélice, 43 % de hojas- β -plegadas y 47 % de estructura desordenada (Timasheff y col., 1966). Verheul y col.(1999) describen al monómero de β -lg como una estructura esférica de 4 nm de diámetro.

La estructura nativa de una proteína resulta de un balance de varias fuerzas, atractivas y repulsivas, que ocurren entre diferentes partes de la cadena polipeptídica y entre la cadena polipeptídica y las moléculas del solvente

(Relkin, 1996). La conformación tridimensional de la β -lg nativa se muestra en la Figura 1.3 (Kuwata y col., 1999).

1	Leu	Ile	Val	Thr	Gln	Thr	Met	Lys	Gly	Leu	11	Asp	Ile	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Thr	Thr	Trp
21	Ser	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	31	Leu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Arg
41	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	51	Glu	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Gln	Lys
61	Asp	Glu	Asn	Asp	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Lys	71	Ile	Ile	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala
81	Val	Phe	Lys	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	91	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Lys
101	Lys	Thr	Leu	Leu	Phe	Cys	Met	Glu	Asn	Ser	111	Ala	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	Val	Cys	Gln
121	Cys	Leu	Val	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Asp	131	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu
141	Lys	Ala	Leu	Pro	Met	His	Ile	Arg	Leu	Ser	151	Phe	Asn	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys
161	His	Ile	OH																		

Figura 1.2. Estructura primaria de la β -lg bovina A. Se indica la ubicación de las sustituciones en las distintas variantes genéticas (Kilara y Vaghela, 2004).

La presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre le imparte a la molécula de la β -lg una estructura espacial rígida. El punto isoeléctrico (pI) de la β -lg se encuentra entre 4,6 y 5,2 según la variante genética (Barnett y Bull, 1960; Bromley y col., 2005; Das y Kinsella, 1989; Harnsilawat y col., 2006; Haug y col., 2009; Townsend y col., 1964). Por debajo de pH 3 y por encima de pH 7, la β -lg existe como monómero.

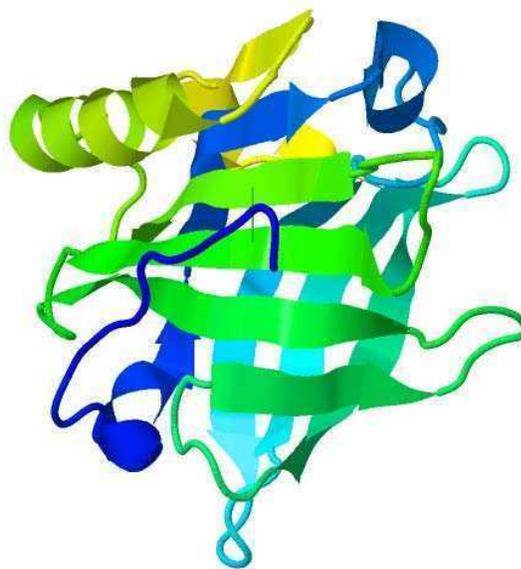


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina bovina (Kuwata y col., 1999).

Entre pH 3,1 y 5,1 a bajas temperaturas y altas concentraciones de proteína, la β -lg se asocia hasta en forma octamérica. Esta asociación ocurre por medio de los grupos carboxilos; de esta manera, la variante A tiene más posibilidad de formar octámeros que la variante B por la presencia de un ácido aspártico más, en el lugar que la variante B tiene glicina. A otros valores de pH, incluyendo el pH natural de la leche (pH 6,5), la β -lg se presenta generalmente en forma dimérica (Kilara y Vaghela, 2004). Esta asociación entre monómeros de β -lg se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp 130 y Glu 134 con los residuos de lisina en la molécula vecina.

La disociación del dímero en monómeros de β -lg a pH mayor a 7 coincide con un aumento de actividad en el grupo tiol. Por lo tanto, los reactivos que estabilizan la conformación nativa o asociada en dímeros de β -lg podrían reducir la actividad del grupo tiol libre al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas.

Aunque la β -lg presenta una importante cantidad de residuos hidrofóbicos, es una proteína muy soluble en agua ya que la mayoría de los residuos no polares están ocultos en el interior de la molécula y la mayoría de los grupos polares están expuestos en la superficie (Mangino, 1984). Además, relacionado con esta alta solubilidad en agua, la β -lg es muy activa superficialmente, lo que le proporciona buenas propiedades espumantes y emulsificantes. Sin embargo, las propiedades superficiales dependen mucho del estado de desnaturalización que presenta la proteína; por lo tanto, estas propiedades se verán modificados por las condiciones del medio como el pH, fuerza iónica, etc (Cayot y Lorient, 1996). La capacidad de ligar agua depende también del estado estructural de la molécula, la β -lg es capaz de ligar agua y estabilizar productos luego de la cocción como por ejemplo, emulsiones cárnicas, salsas, etc. cuando el pH es cercano a la neutralidad. La ausencia de sinéresis en productos hidratados es un criterio muy importante de calidad en la aceptabilidad de un producto por lo tanto esta característica de la β -lg es de suma importancia.

La capacidad gelificante de la β -lg la ubica entre las proteínas más estudiadas. La gelificación de esta proteína puede lograrse principalmente por calentamiento, y en menor medida por la adición de sales o la modificación del pH (Clark y col., 2001; Kilara y Vaghela, 2004).

1.2.3. α -lactalbúmina (α -lac).

La α -lactalbúmina bovina es cuantitativamente la segunda proteína más importante del suero de la leche (Tabla 1.2), representando aproximadamente un 20% p/p del total. Esta proteína se sintetiza completamente en la glándula mamaria y es allí donde actúa como coenzima en la biosíntesis de la lactosa, una importante fuente de energía para el recién nacido (de Wit, 1998). Se han identificado tres variantes genéticas: A, B y C (Fox, 2008).

Se trata de una metaloproteína con capacidad para ligar calcio. Está formada por 123 aminoácidos y un peso molecular de 14,2 kDa. La Figura 1.4 muestra la estructura primaria α -lac (Brew y col., 1970), mientras que su estructura terciaria puede observarse en la Figura 1.5 (Chrysinia y col., 2000). Esta última puede dividirse en dos lóbulos con distinta naturaleza electrostática: un lóbulo ácido, rico en láminas β plegadas que contiene el rulo de unión al calcio (residuos 35-88) con un pI de 3,7 (incluyendo 10 residuos Asp), y un lóbulo básico, rico en estructuras α -hélice (residuos 1-34 y 89-123) con un pI de 9,6 (incluyendo 9 residuos Lys) (Chrysinia y col., 2000; Vanhooren y col., 2002).

1	N'	Glu	Gln	Leu	Thr	Lys	Cys	Glu	Val	Phe	Arg	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu			
16	Lys	Gly	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Trp	Val	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Thr	
35	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Gln	Ala	Ile	Val	Gln	Asn	Asn	Asp	Ser	Thr	Glu	Tyr	Gly	
55	Leu	Phe	Gln	Ile	Asn	Asn	Lys	Ile	Trp	Cys	Lys	Asp	Asp	Gln	Asn	Pro	His	Ser	
74	Ser	Asn	Ile	Cys	Asn	Ile	Ser	Cys	Asp	Lys	Phe	Leu	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	
92	Asp	Ile	Met	Cys	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Lys	Val	Gly	Ile	Asn	Tyr	Trp	Leu	
110	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Cys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Gln	Trp	Leu	Cys	Glu	Lys	Leu	-C'

Figura 1.4. Estructura primaria de la α -lactalbúmina (adaptada de Brew, 1970)

Esta estructura globular se encuentra estabilizada por cuatro puentes disulfuro en el rango de pH 5,4-9,0 (Evans, 1982) y no contiene grupos tiol libres (Brew y Grobler, 1992). Debido a esto se la ha considerado la proteína del lactosuero más termoestable (Ferreira y col., 2001). Sin embargo, uno de los puentes disulfuro es más sensible a la ruptura que los otros tres (Kuwajima y col., 1990).

Esta proteína existe en un número de conformaciones dependientes del ambiente, incluyendo la forma holo (nativa, unida al calcio), la cual es la forma mayoritaria bajo condiciones fisiológicas (Alexandrescu y col., 1993).

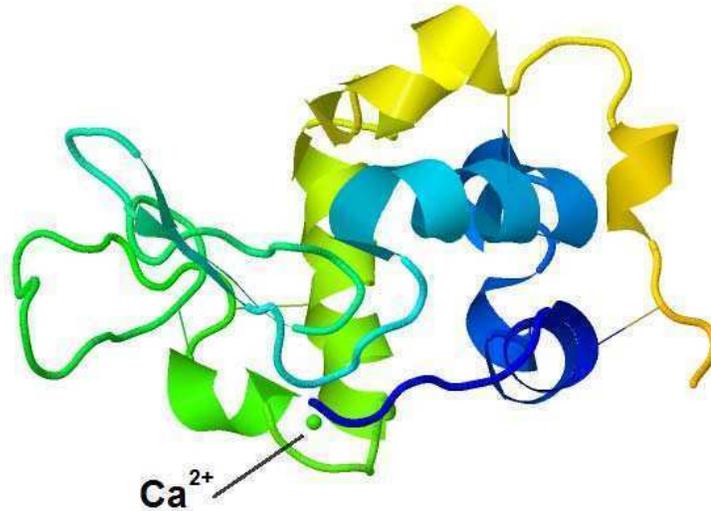


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la proteína α -lactalbúmina mostrando el sitio de unión al calcio (esquemático como una esfera verde) (Chrysina y col., 2000).

Un incremento de pH por encima de 9,0 o una disminución por debajo de 4,0 resulta en la disociación de los iones de Ca^{2+} de la molécula de proteína lo que desestabiliza la conformación molecular y, por lo tanto, lleva a la desnaturalización (Boye y col., 1997).

Se ha demostrado que cuando la α -lac es calentada en solución, la misma puede repetidamente sufrir las mismas transiciones térmicas (Paulsson y col., 1985; Relkin, 1996; Relkin y col., 1993; Ruegg y col., 1977). Esta transición es a menor temperatura (66 °C) que de la β -lg (73 °C) (Ruegg y col., 1977). Sin embargo, cuando la α -lac tiene menos de 1 mol de calcio (u otro catión divalente) por mol de proteína, la temperatura de transición térmica de esta apo- α -lac disminuye aproximadamente 35 °C (Relkin, 1996).

Se ha observado que la α -lac no forma agregados consigo misma sino que mayormente lo hace con la β -lg (Schokker y col., 2000). También otros autores han informado que puede ocurrir agregación de la α -lac a pH 3 pero sin que exista formación de geles (Boye y col., 2000).

1.2.4. Seroalbúmina bovina (BSA, Bovine Serum Albumin).

Otra proteína del suero presente en un 5-6 %, es la seroalbúmina bovina (BSA). Esta proteína no es sintetizada en la glándula mamaria pero aparece en la leche mediante liberación pasiva desde el torrente sanguíneo. La seroalbúmina es la proteína más abundante en el sistema circulatorio de los vertebrados (concentración plasmática promedio, 5g/100ml), y contribuye con el 80% a la presión osmótica coloidal en sangre, siendo su principal función biológica el transporte de moléculas no polares en los fluidos biológicos (Carter y Ho, 1994). Contiene 582 aminoácidos y su peso molecular es de 66,2 kDa (Figura 1.6) (Huang y col., 2004). En su estructura secundaria predominan las regiones α -hélice (67%) y el resto son regiones flexibles o extendidas sin la presencia de hojas- β -plegadas.

```

1 mkwvtfisl llfssaysrg vfrdthkse iahrkdige ehfkgvlia fsqylqqcpf
61 dehvklvnel tefaktcvad eshagceksl htifgdeick vasiretygd madccekqep
121 ernecfshk ddsdpdlpkk pdnticdef kadekkfwgk ylyeiarrhp yfyapellyy
181 ankyngvfqe ccqaedkgac llpkietmre kvltssarqr lrcasiqkfg eralkawsva
241 rlsqkfpkae fvevtklvtd ltkvhkecch gdllcaddr adlakyicdn qdtisskike
301 ccdkplleks hciaevekda ipenlplta dfaedkdvck nyqeakdafl gsflveysrr
361 hpeyavsvil rlakeyeatl eeccakddph acystvfdkl khlvdepqnl ikqncdqfek
421 lgeygfqnal ivrytrkvpq vstptlivevs rslgkvgrc ctkpesermp ctedylsil
481 nrlcvlhekt pvsekvtkcc teslvnrpc fsaltpdety vpkafdekif tfnadictlp
541 dtekqikkqt alvellkhkp kateeqiktv menfvafvdk ccaaddkeac favegpkivv
601 stqtala

```

Figure 1.6. Estructura primaria de la seroalbúmina bovina (BSA) (adaptado de Huang y col., 2004).

Como puede observarse en la Figura 1.7a, la conformación tridimensional consta de tres dominios homólogos (I, II y III), en cada uno de los cuales a su vez se pueden identificar dos subdominios (A y B). Estos subdominios están divididos en nueve rulos mediante 17 puentes disulfuro, los cuales se encuentran casi exclusivamente entre los segmentos de α -hélice en las siguientes posiciones: (1) 77-86; (2) 99-115; (3) 114-125; (4) 147-192; (5) 191-200; (6) 223-269; (7) 268-276; (8) 288-302; (9) 301-312; (10) 339-384; (11) 383-392; (12) 415-461; (13) 460-

471; (14) 484-500; (15) 499-510; (16) 537-582; (17) 581-590 (Figura 1.7b) (Huang y col., 2004).

Debido a su tamaño y a sus altos niveles estructurales, la BSA es capaz de unir ácidos grasos libres y otros lípidos, así como también compuestos del flavour (Kinsella y Phillips, 1989), propiedad que es dañada severamente luego de la desnaturalización. Se ha reportado la temperatura de desnaturalización de la BSA mediante DSC en 62 °C, con un onset de cambio conformacional en 58,1 °C (Poole y col., 1987).

Dentro de sus propiedades funcionales, se ha observado que mejora el espumado y la estabilidad de las espumas cuando interactúa con proteínas básicas como la lisozima debido a las interacciones que forman entre sí en la interfase (Poole y col., 1984).

Cuando la BSA es calentada forma agregados solubles mediante interacciones no covalentes y puentes disulfuro, luego la gelificación a pH 6,5 ocurre de manera similar a la observada para la β -lg (de Wit, 1998).

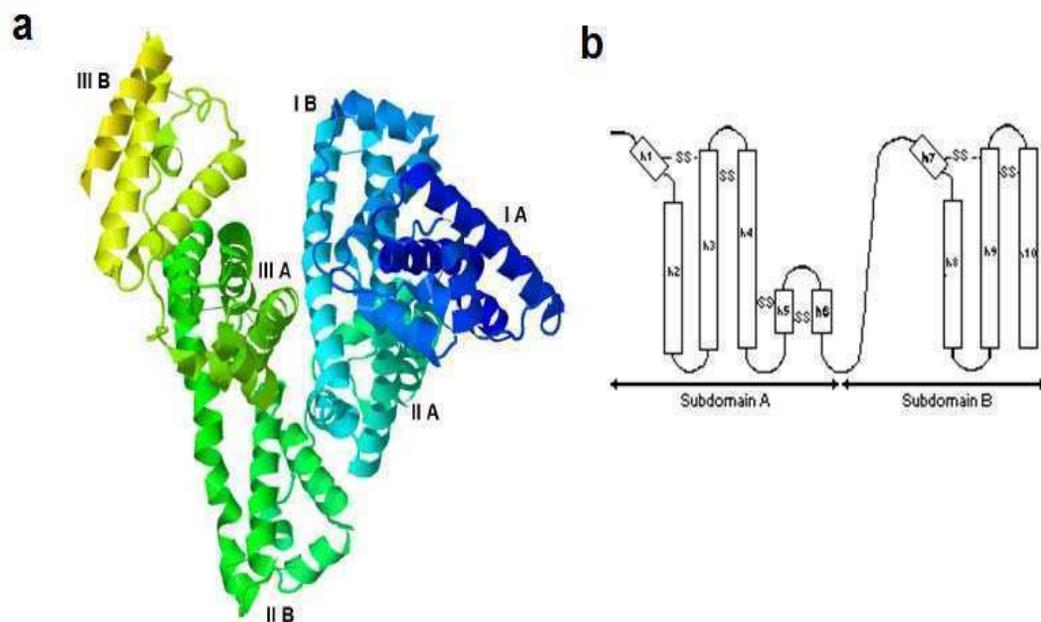


Figura 1.7. (a) Molécula de BSA compuesta de tres dominios homólogos (I, II, III), donde cada uno de ellos contiene dos subdominios (A y B) que comparten motivos estructurales comunes; (b) localización de los puentes disulfuro (Huang y col., 2004).

1.3. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un derivado de la celulosa que forma parte de una familia que incluye otros polisacáridos, como por ejemplo la metilcelulosa (MC), o la metilhidroxietilcelulosa (MHEC).

La celulosa es la sustancia orgánica más abundante en la naturaleza, se ha estimado que anualmente las plantas sintetizan aproximadamente 10^{11} toneladas (Bovey y Winslow, 1981). Por lo tanto no sorprende que la humanidad haya hecho uso de la celulosa desde tiempos inmemoriales con distintos fines, para obtener papel, en la minería, en la construcción e industrias relacionadas y últimamente como una fuente de bioenergía. Estas aplicaciones conciernen a la celulosa en su estado natural o modificada física o químicamente.

La celulosa es el principal componente de las paredes celulares de plantas y algas verdes. Este polímero se presenta en la madera en un 40 – 50%, 80% en fibras de lino y 90% en las fibras de algodón (Marchessault y Sundararajan, 1983). La purificación comercial de la celulosa se realiza a partir de las fibras de algodón y de la pulpa de madera, en el primer caso por el alto contenido en este polisacárido y en el segundo por la accesibilidad de este recurso. En su estado natural la celulosa es difícil de purificar ya que es insoluble en los solventes comerciales. Así, el aislamiento de la celulosa en su forma pura incluye tratamiento alcalino para la remoción de ceras, proteínas y ligninas. Las pulpas destinadas a la obtención de éteres de celulosa sufren pasos de extracción alcalina adicionales que se hacen para remover polisacáridos de bajo peso molecular llamados hemicelulosas y aumentar la fracción de la celulosa pura o alfa (Coffey y col., 1995).

Desde el punto de vista químico, la celulosa es un poliacetal β -1,4 de 4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucosa (celobiosa) ya que la unidad básica consiste de dos unidades de glucosa unidas por unión β -1,4 (Coffey y col., 1995). La configuración β -1,4 da como resultado una estructura lineal y rígida para el polímero (Figura 1.8). La relativa abundancia de grupos hidroxilo y la tendencia a formar puentes hidrógeno tanto intra como intercatenarios es la causa de la formación de agregados lineales los cuales contribuyen a la rigidez de las paredes celulares y a la relativa insolubilidad de la celulosa en los solventes comunes, particularmente el agua.

El tamaño molecular puede ser apropiadamente descrito en términos del grado de polimerización (DP), el cual representa el valor promedio del número de unidades monoméricas. En estado sólido la celulosa posee zonas cristalinas distribuidas entre zonas menos ordenadas, amorfas, que constituyen regiones donde los grupos hidroxilo están más expuestos para participar en una reacción. La reactividad de la celulosa dependerá de su origen y de las condiciones de aislamiento y purificación.

Distintas técnicas demostraron que las moléculas de celulosa se presentan unidas por puentes hidrógeno y fuerzas electrostáticas en microfibrillas, las cuales en ciertas áreas tienen las cadenas en capas apiladas. Estas son las áreas organizadas en forma regular que constituyen regiones cristalinas discretas conocidas como cristalitas (Coffey y col., 1995).

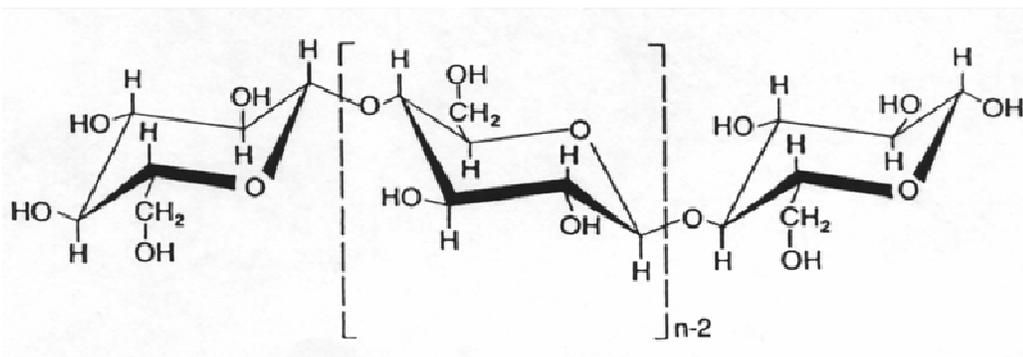


Figura 1.8. Estructura química del polímero lineal de celulosa (Coffey col., 1995).

Desde el punto de vista de sus propiedades físicoquímicas, La celulosa es un material higroscópico, insoluble, pero capaz de absorber agua, ácidos diluidos y muchos solventes. Las reacciones químicas en las que participa la celulosa están determinadas por su naturaleza polimórfica. Las regiones amorfas, menos ordenadas, son los puntos donde todas las reacciones químicas se inician. Por su parte, poca o ninguna participación incumbe a las regiones cristalinas más ordenadas (Rorrer y Hawley, 1993). Las soluciones alcalinas concentradas penetran la celulosa por absorción y por subsecuente atracción capilar entran en las regiones cristalinas provocando la disrupción de las mismas. Este proceso denominado mercerización, es usado para activar a la celulosa en la producción de éteres de celulosa.

Es posible mejorar las propiedades de la celulosa a través de modificaciones que pueden ser físicas o químicas. Una de las modificaciones físicas más comunes

consiste en hacer pasar una pasta de celulosa a través de tamices de pequeños orificios bajo condiciones de gran esfuerzo de corte y altas presiones diferenciales (Coffey y col., 1995). Así se obtienen las celulosas microfibriladas las cuales tienen mayor capacidad de retención de agua y son menos propensas a la precipitación. Por modificaciones físicas también se obtiene la celulosa microcristalina que es producida tratando a la celulosa natural con ácido clorhídrico para disolver las regiones amorfas del polisacárido, persistiendo solamente las regiones cristalinas. Estas celulosas generan soluciones donde la viscosidad no varía con el pH o la temperatura (Brownsey y Redout, 1985). Por otra parte, el peso molecular de estos polímeros se manifiesta en la viscosidad de sus soluciones, así a medida que el peso molecular disminuye, la viscosidad disminuye. Para estos derivados de celulosa la propiedad más importante es entonces la viscosidad (Coffey y col., 1995).

Si bien existen numerosos derivados obtenidos por modificaciones químicas de la celulosa natural, sólo unos pocos éteres de celulosa han encontrado aplicación en la industria alimentaria. Los derivados más comúnmente usados son la carboximetilcelulosa, metilcelulosa, e hidroxipropilmetilcelulosa. Estos dos últimos son empleados debido a la capacidad de formar geles termorreversibles y por sus propiedades interfaciales (Kobayashi y col., 1999; Sarkar y Walker, 1995)

Aunque la variedad de éteres de celulosa es amplia, todos ellos son obtenidos esencialmente de la misma manera (Kondo, 1993). El proceso de producción puede ser dividido en tres etapas:

1. Obtención del álcali de celulosa. Para ello, se trata a la pulpa de celulosa con soluciones concentradas de hidróxido de sodio (35-60%, p/v). Esta mezcla se deja reposar durante un tiempo y a una temperatura y presión determinadas para asegurar la reacción completa. La viscosidad del producto final se controla con el tiempo de reposo.
2. Alquilación o hidroxialquilación. La alquilación se da cuando el producto buscado es metilcelulosa. El álcali de celulosa reacciona con cloruro de metilo para generar la metilcelulosa y cloruro de sodio. En cambio durante la hidroxialquilación, el álcali de celulosa reacciona con óxido de propileno generando hidroxipropilcelulosa. Para obtener la hidroxipropilmetilcelulosa, se somete a la hidroxipropilcelulosa a alquilación.

3. La purificación final del producto. Debido a que los derivados de celulosa gelifican durante el calentamiento y los subproductos generados durante las etapas anteriores tienden a precipitar, el lavado de la pasta conteniendo los derivados en agua a altas temperaturas constituye un medio eficiente para lograr la separación buscada.

Además de los sustituyentes presentes en el esqueleto carbonado de celulosa y la viscosidad de sus soluciones (normalmente medidas a concentraciones de 1 o 2% p/v), estos productos son descritos por el grado de sustitución (DS) y la sustitución molar (MS).

Cada unidad de anhidroglucosa en la molécula de celulosa tiene tres grupos hidroxilo disponibles para la derivatización. De esta manera, si los tres grupos fueran sustituidos el producto tendría un DS igual a 3. Si un número promedio de dos sobre tres hidroxilos totales hubieran reaccionado, entonces el DS sería 2 y así sucesivamente. El término DS se reserva para aquellos sustituyentes que bloquean los grupos hidroxilo reactivos. Los sustituyentes que permiten el crecimiento posterior de la cadena son caracterizados por la sustitución molar (MS). La derivatización de los grupos hidroxilo reactivos con óxido de propileno genera a su vez sitios hidroxilo disponibles para posteriores reacciones. De esta manera la reacción continúa con la extensión de la cadena. La proporción de MS/DS da la longitud promedio de las cadenas de los sustituyentes laterales.

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) presenta en su cadena grupos metilo e hidroxipropilos (Figura 1.9). La utilidad de estos éteres no iónicos de celulosa se basa fundamentalmente en cuatro atributos: son espesantes eficientes, presentan actividad superficial, tienen la habilidad de formar películas interfaciales y la capacidad de formar geles termorreversibles.

La HPMC tiende a concentrarse en interfases tanto aire-agua como aceite-agua. La propiedad de comportarse como surfactante es el resultado de la sustitución heterogénea en el polímero, es decir que hay zonas del polímero ricas en grupos hidrofílicos y otras ricas en grupos hidrofóbicos. La concentración de este polisacárido en la interfase de soluciones diluidas puede ser varias veces superior. Esta propiedad puede entonces conducir a la estabilización de espumas y emulsiones y tener efectos positivos en la estructura de cortezas panarias, leudado de masas de panadería, etc.

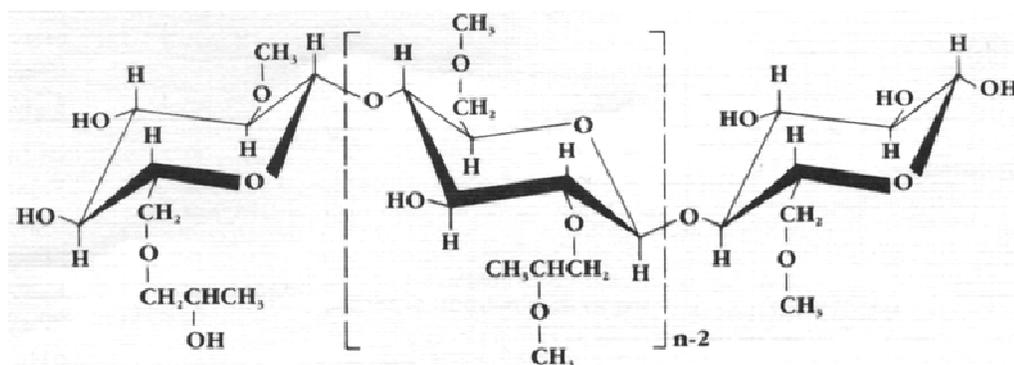


Figura 1.9. Estructura química de hidroxipropilmetilcelulosa (Coffey y col., 1995).

Si bien la HPMC se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, es preciso destacar que la industria de pinturas, la cosmética y la farmacéutica también hacen uso de este polímero en grandes cantidades. También, la industria farmacéutica utiliza en gran escala la HPMC para la producción de matrices de liberación controlada de drogas (Escudero González y col., 2008).

Centrándonos específicamente en la industria alimentaria, la hidroxipropilmetilcelulosa se emplea en una amplia gama de productos. Aquellos basados en proteínas frecuentemente necesitan estabilizantes para prolongar su vida útil durante el almacenamiento a temperatura ambiente o en refrigeración, donde estos polisacáridos pueden ser agregados para lograr este objetivo (Coffey y col., 1995).

Actualmente existe una fuerte tendencia en la industria hacia la producción de alimentos reducidos en calorías, esto resulta en una nueva aplicación de HPMC ya que este polisacárido imparte buenas características de textura (Mälkki y col., 1993). En particular las HPMC que son interfacialmente activas ofrecen la posibilidad de imitar la textura de los lípidos en estos productos. La rápida migración de la HPMC a las interfases contribuye a una rápida estabilización de las emulsiones. Pueden proveer además estabilidad contra la coalescencia de las gotas durante el almacenamiento. En el caso de productos batidos, es necesario mantener la integridad estructural de las celdas de aire. El polímero es capaz de acumularse en la interfase aire-agua sufriendo gelificación por su alta concentración en la interfase y como consecuencia se estabiliza el sistema (Coffey y col., 1995).

También se ha empleado HPMC en la formulación de productos panificados sin harina de trigo para celíacos (Kobylański y col., 2004). En productos fritos, estos polisacáridos se usan como rebozador ya que tienen la capacidad de impedir la pérdida de humedad durante la cocción por formar un gel alrededor del alimento y simultáneamente bloquean la absorción de aceite.

En alimentos fluidos como salsas, sopas y jarabes, las HPMC son agregadas como espesantes y ligantes de agua para reducir la sinéresis. También puede ser empleada en productos congelados bajos en calorías ya que contribuye al control del crecimiento de los cristales y a modificar la reología del producto, contribuyendo a la retención de aire y permitiendo emular texturas similares a la generada por lípidos en postres congelados.

1.4. Interacciones proteína-polisacárido.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos juegan un rol muy importante en la estructura y la estabilidad de muchos alimentos procesados.

Las propiedades funcionales de las proteínas, tales como solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, propiedades gelificantes, espumantes y emulsificantes se ven afectadas por su interacción con polisacáridos.

Las interacciones entre estos biopolímeros involucran diferentes tipos de fuerzas intermoleculares que se describen en la Tabla 1.5.

La importancia relativa de estas interacciones en un sistema particular depende las características de los biopolímeros involucrados (peso molecular, densidad de carga en función del pH, flexibilidad, hidrofobicidad), las características de la solución (pH, fuerza iónica) y las condiciones ambientales (temperatura, cizalla) (McClements, 2006).

Conociendo y manejando estos parámetros es posible controlar las interacciones proteína-polisacárido y por lo tanto crear atributos funcionales diferentes en un sistema alimentario.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos se pueden dividir en dos grupos: interacciones atractivas y repulsivas entre diferentes macromoléculas y pueden estar dadas por los diferentes tipos de fuerzas definidas en la Tabla 1.5. Estos dos tipos de interacciones entre biopolímeros son las responsables de la formación de complejos y de la inmiscibilidad de biopolímeros, respectivamente.

Tabla 1.5. Tipos de fuerzas intermoleculares que contribuyen a las interacciones entre biopolímeros.

Covalentes: unión muy fuerte formada entre grupos reactivos específicos de diferentes macromoléculas. Por ejemplo, uniones por puente disulfuro.

Electrostáticas: interacción que puede ser repulsiva o atractiva según las cargas eléctricas sean de signo igual u opuesto, respectivamente. La fuerza de estas interacciones disminuye con el aumento de la fuerza iónica.

Volúmenes de exclusión: es una interacción repulsiva dada por el gran volumen ocupado por algunos biopolímeros en solución, produciendo un importante efecto sobre la exclusión estérica, es decir hay una reducción en el volumen disponible a ser ocupado por una molécula de biopolímero.

Uniones hidrógeno: interacción atractiva moderadamente fuerte entre átomos de hidrógeno y otros átomos mucho más electronegativos. Las uniones puente hidrógeno son menos importantes cuando aumenta la temperatura.

Hidrofóbicas: interacción atractiva moderadamente fuerte de origen entrópico entre grupos no polares. Las uniones hidrofóbicas aumentan su fuerza con el aumento de la temperatura.

Puentes iónicos: tipo específico de interacción que involucra la unión de cationes polivalentes (especialmente Ca^{+2}) con dos grupos aniónicos diferentes.

Van der Waals: interacción atractiva débil de origen electromagnético entre grupos con dipolos inducidos o permanentes.

Fuente: Dickinson (1998); McClements (2006).

Al mezclar una solución de proteína con una de polisacárido se puede observar alguno de los comportamientos que se representan en la Figura 1.10.

La interacción de los dos biopolímeros puede ser segregativa (los biopolímeros se excluyen unos a otros y entonces se definen como incompatibles) o asociativa (los biopolímeros se atraen unos a otros) (de Kruif y Tuinier, 2001; McClements, 2006; Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 2003) En soluciones diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado y la proteína y el polisacárido son cosolubles: sistema (b).

En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los distintos biopolímeros (estos poseen carga neta opuesta) las atracciones electrostáticas pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase. En este caso estamos en presencia del efecto de solubilidad por complejamiento: sistema (c) (McClements, 2006). También puede ocurrir que los complejos que se forman resulten no solubles. Estos, denominados “coacervados”, precipitan y por lo tanto, se generan dos fases separadas: una fase “coacervada” que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja

concentración de ambos biopolímeros (Schmitt y col., 1998). Este fenómeno se llama “coacervación compleja” (Doublier y col., 2000), y es un fenómeno de complejamiento: sistema (d).

Por último, en condiciones donde predominan las fuerzas de repulsión entre los biopolímeros (por ejemplo, si ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases (emulsión agua en agua) en el cual ambos componentes macromoleculares están concentrados en diferentes fases. Esto se debe a la incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos en medio líquido (Grinberg y Tolstoguzov, 1997); estamos entonces en presencia de un fenómeno de segregación: sistema (a).

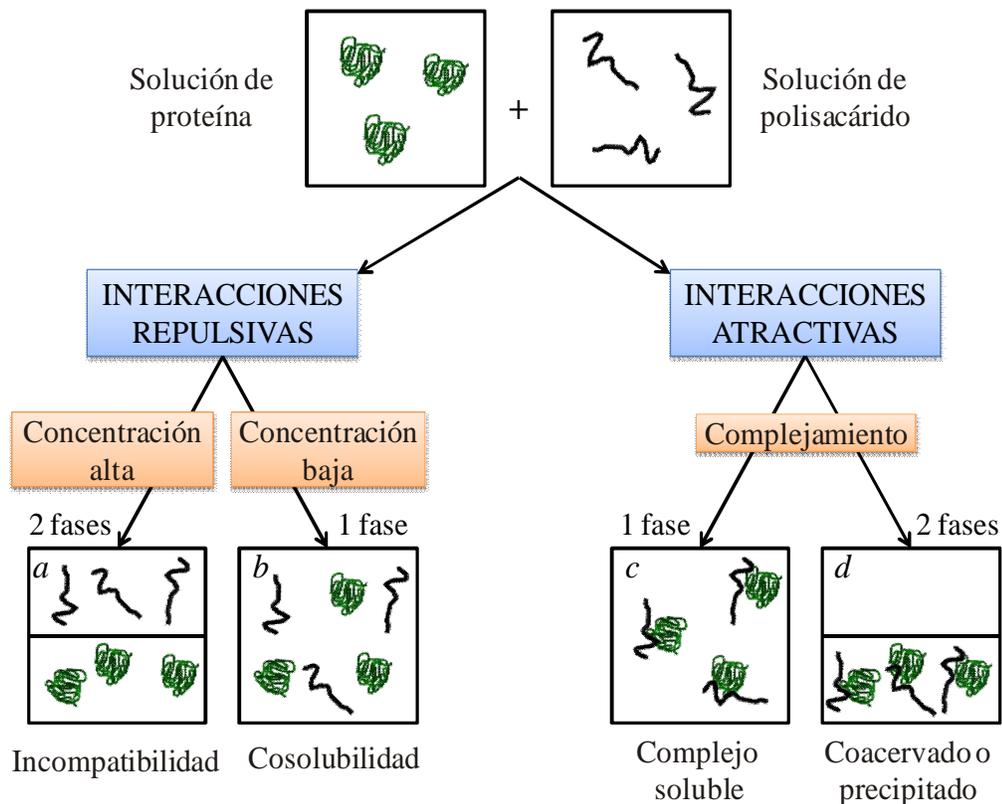


Figura 1.10. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos al mezclar soluciones de una proteína y un polisacárido. Adaptado de de Kruif y Tuinier (2001), y McClements (2006).

La diferencia entre los sistemas líquidos de dos fases (a) y (d) reside en que en los distintos sistemas los biopolímeros están concentrados juntos en una fase inferior (d) o en diferentes fases (a) (McClements, 2006). Entonces, las soluciones

acuosas de mezclas de biopolímeros son susceptibles a la separación de fases por dos de los siguientes mecanismos: i) coacervación compleja o ii) incompatibilidad termodinámica.

Todos los sistemas descritos de soluciones mixtas (estados estables o de fases separadas) difieren en estructura y propiedades, por lo tanto también variarán las propiedades funcionales de los sistemas de los que formen parte (Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 1990; Tolstoguzov, 1991; Tolstoguzov y col., 1985)

1.4.1. Coacervación compleja.

Como lo definió originalmente Bungenberg de Jong (1949), la coacervación compleja es una separación espontánea de un sistema en dos fases líquidas. La fase más concentrada en biopolímeros es el coacervado y la otra fase es la solución en equilibrio. La separación de fase asociativa de dos polímeros en agua ocurre si existe una fuerte atracción electrostática. La coacervación compleja es causada por la interacción de dos biopolímeros con cargas opuestas (de Kruif y col., 2004) y se origina a pH por debajo del pI de la proteína y especialmente a bajas fuerzas iónicas. En estas condiciones, se dan interacciones atractivas entre los grupos positivamente cargados de las proteínas ($\text{pH} < \text{pI}$), y polisacáridos aniónicos (de Kruif y col., 2004). La formación de estos complejos es usualmente reversible, dependiendo de la condiciones del medio.

También pueden darse atracciones de naturaleza más débil, entre polisacáridos aniónicos y proteínas con carga neta igual a cero ($\text{pH} \approx \text{pI}$) o cargadas negativamente ($\text{pH} > \text{pI}$) (Dickinson, 1993).

Durante la formación de los complejos electrostáticos, la carga neta de los polisacáridos aniónicos va disminuyendo a medida que estos se complejan a los grupos polares de las proteínas. Esta disminución de carga neta reduce la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo. Luego, los complejos no solubles (coacervados) dispersos se agregan y precipitan (Baeza, 2003). Por lo tanto, el mecanismo por el cual ocurre la coacervación compleja en sistemas mixtos de proteína y polisacárido podría ser un proceso de nucleación y crecimiento (Turgeon y col., 2007).

Los principales usos de los complejos son como reemplazantes de grasa, debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Además, se utilizan complejos

texturizados en forma de fibra para la obtención de análogos de carne bajos en grasa, y en la producción de films comestibles, que poseen ventajas respecto de films formados con un solo biopolímero (Baeza, 2003). Finalmente, existe una creciente tendencia en la aplicación de la coacervación compleja para la microencapsulación de compuestos, tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica. Por lo tanto, aparecen numerosos artículos en literatura focalizados en la caracterización de estos complejos como encapsulantes (de Kruif y col., 2004)

1.4.2. Incompatibilidad termodinámica.

En el fenómeno de incompatibilidad termodinámica, existe una separación espontánea en dos fases también pero en este caso, una es predominantemente rica en proteína y la otra rica en polisacárido (Tolstoguzov, 1991).

Generalmente, esta separación ocurre cuando la concentración total de los componentes macromoleculares excede el 4 % (Tolstoguzov, 1986). Incluso a concentraciones totales del 1 %, se han observado fenómenos segregativos en algunas soluciones mixtas de polisacáridos y proteínas (Doublier y col., 2000).

La presencia de una interacción repulsiva desfavorable (endotérmica) entre segmentos químicamente diferentes de polímeros en solución conduce a una alta probabilidad de exclusión mutua de cada componente polimérico.

La incompatibilidad de los biopolímeros depende de la intensidad de las interacciones entre ellos, entre las moléculas de cada uno consigo mismas y con el solvente (diferencias en la hidrofiliidad de los biopolímeros) y se origina bajo ciertas condiciones las cuales inhiben la formación de complejos entre biopolímeros. A una concentración total de biopolímero moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del biopolímero, del pH y la fuerza iónica (Alves y col., 1999). La incompatibilidad se favorece a alta fuerza iónica y/o a valores de pH mayores que el pI de la proteína.

Además la incompatibilidad puede aumentar por el efecto de otros factores: i) el aumento del peso molecular y la rigidez estructural de los biopolímeros; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y al tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas; iii) el aumento de la concentración de sales y de la temperatura (Tolstoguzov, 1997b).

La estructura química de los polisacáridos es el factor que más afecta la incompatibilidad y la separación de fases en sistemas de proteínas y polisacáridos. La incompatibilidad disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato. Además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados (Grinberg y Tolstoguzov, 1997). La incompatibilidad termodinámica también varía por la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y moléculas de sacarosa, los cuales presentan en general un efecto negativo y positivo, respectivamente, con respecto a la compatibilidad entre los biopolímeros (Semenova, 1996).

El comportamiento de incompatibilidad se representa en la Figura 1.11, donde se muestra el diagrama de fases, el cual se define para un sistema binario en particular (Grinberg y Tolstoguzov, 1972; Grinberg y Tolstoguzov, 1997; Polyakov y col., 1997; Tolstoguzov, 1997b; Tolstoguzov, 2001; Tolstoguzov y col., 1985). La denominada curva binodal marca el límite de cosolubilidad de los biopolímeros. Cuando la composición del sistema, respecto a los dos biopolímeros, se encuentra por debajo de la curva binodal, el sistema permanece como una fase simple homogénea (sistema b de la Figura 1.10). En cambio, cuando la composición de un sistema se encuentra por encima de la curva binodal, es inestable y se separa en dos fases líquidas, una rica en proteína y la otra en polisacárido (sistema a de la Figura 1.10) (Dickinson y McClements, 1995; Tolstoguzov, 1997b; Tolstoguzov, 2003);

En la Figura 1.11 al mezclar soluciones A y B en una proporción de volumen BC/AC, se obtiene una mezcla de composición C. Este sistema mixto C se separa en dos fases D y E. Los puntos D y E son los puntos binodales. En general, las ramas binodales están bastante cerca de los ejes, si bien no coinciden con los ejes de concentración de los biopolímeros. Esto significa que los biopolímeros tienen limitada cosolubilidad en el solvente y que cada biopolímero se concentra en fases diferentes. Las composiciones de D y E se pueden obtener por centrifugación y análisis posterior del contenido de polisacárido y proteína.

Se han reportado una gran cantidad de diagramas de fases para sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos (Grinberg y Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 1997b). En general, estos diagramas resultan asimétricos debido a un fenómeno de exclusión mutua entre las macromoléculas de proteína y polisacárido

(Tolstoguzov, 1997b). El grado de asimetría de los diagramas de fase refleja una mayor hidrofiliicidad y un volumen efectivo superior de los polisacáridos (especialmente para los lineales) comparado con las moléculas compactas de proteínas globulares. De acuerdo a esto, una fase menos concentrada rica en polisacárido se encuentra en equilibrio con una fase más concentrada rica en proteína. En muchos casos, la concentración de proteína se ve aumentada de modo que esta gelifica.

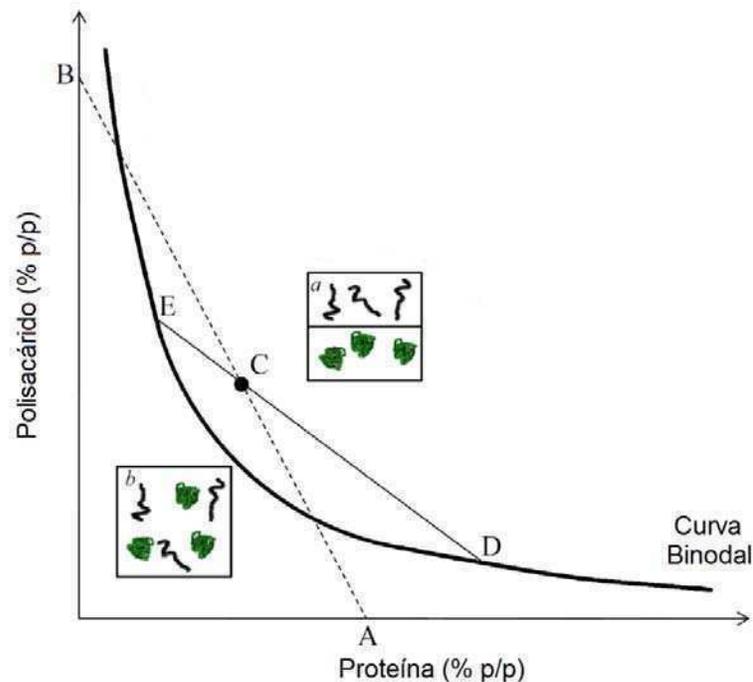


Figura 1.11. Representación esquemática de un diagrama de fases típico para una mezcla incompatible de proteína y polisacárido, mostrando la posición de la curva binodal. Se incluye el comportamiento (descrito en la Figura 1.10) de los sistemas por debajo y por encima de la curva binodal.

1.5. Impacto de las interacciones proteína-polisacárido en transiciones térmicas, geles e interfases.

En este trabajo se estudiaron las interacciones entre las proteínas del lactosuero y distintas hidroxipropilmetilcelulosas. Por lo tanto, en primer lugar se evaluó el comportamiento de dichos biopolímeros solos, y luego sus mezclas, para determinar el impacto de dichas interacciones en las transiciones térmicas, la

gelificación y las propiedades de las interfases aire-agua de los sistemas mixtos. Por ello, a continuación se describirán conceptos teóricos acerca de: las transiciones térmicas de un material, el proceso de gelificación, así como también de las interfases aire-agua.

1.5.1. Transiciones térmicas.

En la Figura 1.12 se esquematizan algunas de las transiciones de fase en los materiales alimentarios.

La movilidad de las partículas y su ordenamiento son características distintivas de cada estado de agregación de la materia. En estado gaseoso las moléculas se mueven libremente y no poseen regiones de distribución ordenada. En estado líquido, las moléculas se deslizan libremente entre sí y poseen pequeñas regiones ordenadas. En el estado sólido, a diferencia de los fluidos, la movilidad de las partículas es mínima (vibraciones alrededor de posiciones fijas) y se pueden dividir según posean regiones ordenadas o no, en cristalinos y amorfos, respectivamente.

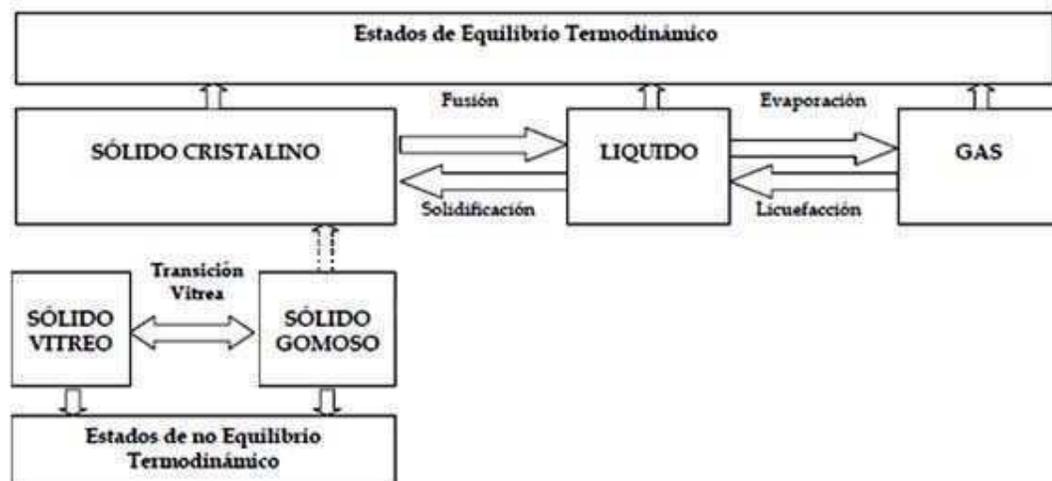


Figura 1.12. Transiciones de fase más frecuentes de los alimentos.

Los sólidos cristalinos, como el hielo o el NaCl tienen rigidez y orden de largo alcance; sus partículas ocupan posiciones específicas formando celdas unitarias (unidades básicas) que se repiten a lo largo de toda la red tridimensional. Existen 7 tipos de celdas unitarias: cúbica simple, tetragonal, ortorrómbica, romboédrica, monoclinica, triclínica y hexagonal (Dean, 1995).

En la estructura cristalina (Figura 1.13a) la disposición de átomos, moléculas o iones es tal que las fuerzas netas de atracción de las partículas es máxima. Este tipo de estructuras son termodinámicamente estables. En cambio, los sólidos amorfos (como por ejemplo un caramelo o un alimento deshidratado), carecen de una disposición tridimensional regular de sus partículas (Figura 1.13b).

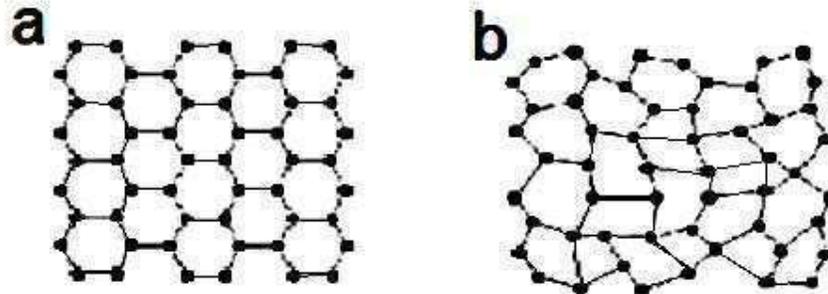


Figura 1.13. Disposición de las partículas en un sólido cristalino (a) y en uno amorfo (b).

Los sistemas amorfos son de no equilibrio termodinámico o equilibrio metaestable; no fluyen naturalmente (a diferencia de los líquidos) debido a su alta viscosidad, pero pueden evolucionar con el tiempo hacia un estado de equilibrio. Cuanto mayor sea la viscosidad (barrera), más difícil le resultará al sistema pasar de un estado metaestable (amorfo) a uno estable (cristalino) (Figura 1.14).

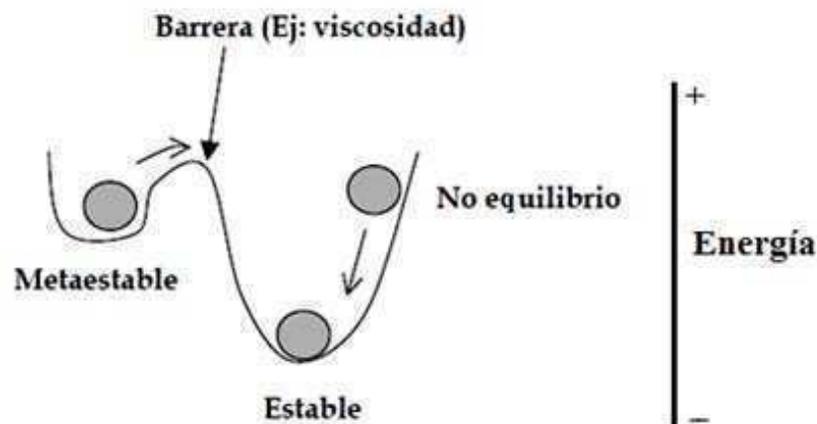


Figura 1.14. Diagrama esquemático de los tipos de equilibrio.

Los sólidos amorfos pueden dividirse a su vez en vítreos y sobreenfriado: en el estado vítreo el sólido amorfo posee una viscosidad extremadamente alta (orden de 10^{12} Pa.s), lo cual minimiza la movilidad molecular. Por ello, a pesar de ser un

estado metaestable que puede evolucionar con el tiempo, la difusión molecular es tan baja (del orden de 1 mm/100 años), que se considera despreciable. Por el contrario, un sólido amorfo gomoso posee una viscosidad mucho menor que el vítreo y por lo tanto, mayor movilidad molecular. Con el tiempo puede cristalizar. El estado amorfo puede definirse como una fase (Dean, 1995).

Una fase constituye un sistema que presenta una cierta uniformidad en su composición y en sus propiedades físicas. Por lo tanto, una transición de fase se define como el cambio brusco de las propiedades macroscópicas de un sistema, por efecto de la variación de algún parámetro de control externo (temperatura y/o presión) y tiene como consecuencia cambios en la movilidad molecular, lo cual está relacionado con variaciones en las propiedades físicas (térmicas, eléctricas, mecánicas y difusionales), en las cinéticas de reacciones químicas y enzimáticas, y en los fenómenos de transporte (Dean, 1995).

Centrándonos en las transiciones, estas se clasifican según la continuidad de las derivadas del potencial de Gibbs (G) Así, existen tres tipos de transiciones de fase (Mathot, 1994):

- i. Transiciones de primer orden. La primera derivada de G es discontinua. Son transiciones en las que el sistema absorbe o desprende una cierta cantidad de calor (calor latente) y en que hay coexistencia de fases. Durante este proceso, la temperatura del sistema permanece constante pese a la transmisión de calor (ejemplos, transiciones entre los estados sólido, líquido y gaseoso; fusión, ebullición, solidificación)
- ii. Transiciones de segundo orden. Son transiciones que no tienen un calor latente asociado. En las transiciones de segundo orden la segunda derivada de G es discontinua. (ejemplos, transición vítrea).
- iii. Transiciones de fase de orden superior. En este caso, la primera derivada de G es continua. No tienen asociado un calor latente. Este tipo de transiciones no están estudiadas en materiales como los alimentos (ejemplos, transición ferromagnética-paramagnética o la condensación de Bose-Einstein).

La transición vítrea es un tipo de transición de segundo orden que se da entre un estado líquido (el material fluye) y otro estado aparentemente sólido: es un estado de no-equilibrio termodinámico, en el cual el material puede ser considerado

como un líquido sobreenfriado (que fluye a velocidades extremadamente lentas), con movimientos en sus segmentos prácticamente congelados. Todos los polímeros termoplásticos presentan una transición vítrea, ya sean estos amorfos o semicristalinos. Los polímeros amorfos al calentarse presentan solamente una transición, la vítrea (Höhne y col., 1996). Los polímeros semicristalinos presentan dos, la vítrea, y la fusión de los cristales (Rey y col., 1993).

La temperatura a la cual ocurre esta transición de segundo orden, se denomina temperatura de transición vítrea (T_g). Existen diferentes métodos experimentales para determinar la T_g , pero debido al carácter termodinámico de esta pseudotransición, cada método provee de un valor de T_g diferente, es por ello que en los artículos científicos se provee siempre del método por el cual se determinó su valor. Una de las técnicas más utilizadas para la determinación de la T_g es la calorimetría diferencial barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry), debido a la mínima cantidad de polímero requerido, lo confiable de sus mediciones y la gran cantidad de información que brinda. La DSC permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. Existen dos tipos de métodos para obtener datos en DSC (Maglic y col., 1984):

- i. DSC de potencia compensada En esta técnica, la muestra y el material de referencia se calientan mediante calentadores separados aunque sus temperaturas se mantienen iguales mientras las temperaturas se aumentan (o disminuyen) linealmente.
- ii. DSC de flujo de calor. En este caso, se mide la diferencia de cantidad de calor de la muestra y de la referencia cuando la temperatura de la muestra se aumenta (o disminuye) linealmente.

El DSC mide el flujo de calor (Φ) en función del tiempo (t) o la temperatura (T), en la muestra a estudiar y en un material inerte de referencia de forma independiente. La función $\Phi(t:T)$ presenta la forma de una curva, y se la suele denominar termograma (Ramos-Sánchez y col., 1991). En la Figura 1.15 se muestra un esquema del termograma de un sólido amorfo vítreo susceptible de cristalizar (por ejemplo, lactosa).

Las transiciones vítreas se presentan cuando se aumenta la temperatura de un sólido amorfo. Estas transiciones aparecen como una alteración en la línea base de la señal registrada. Esto es debido a que la muestra experimenta un cambio en la capacidad calorífica sin que tenga lugar un cambio de fase formal (Dean, 1995; Skoog y col., 1998).

A medida que la temperatura aumenta, el sólido amorfo se hará menos viscoso. En algún momento las moléculas pueden obtener suficiente libertad de movimiento para disponerse por sí mismas en una forma cristalina. Esto es conocido como temperatura de cristalización (T_c). Esta transición de sólido amorfo a sólido cristalino es un proceso exotérmico y da lugar a un pico en la curva DSC. A medida que la temperatura aumenta, la muestra alcanza eventualmente su temperatura de fusión (T_m).

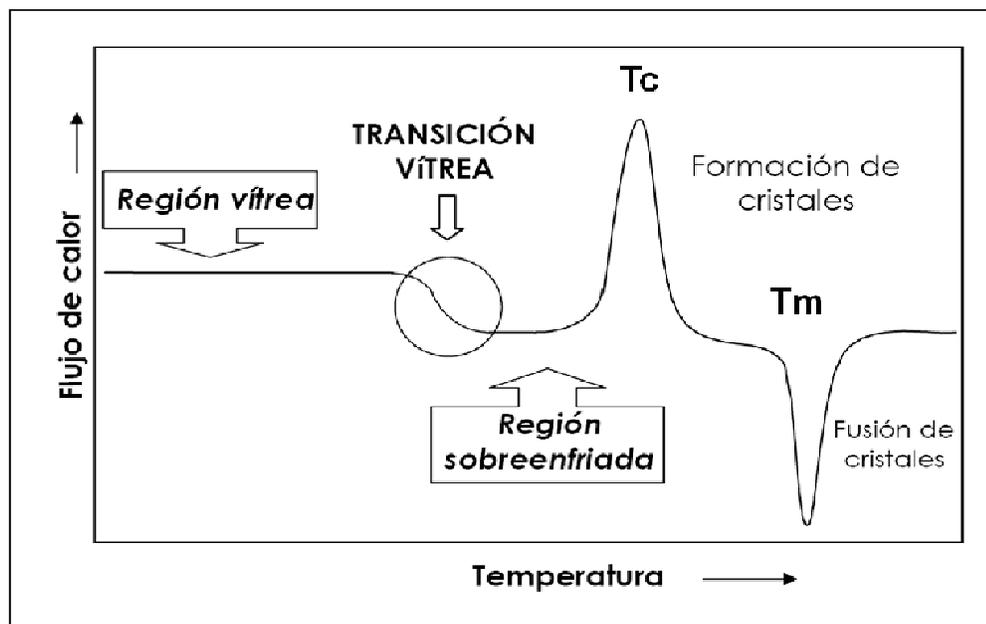


Figura 1.15. Esquema de la curva de flujo de calor en función de la temperatura (termograma) para un sólido amorfo. T_c : temperatura de cristalización; T_m : temperatura de fusión.

El proceso de fusión resulta evidenciado por un pico endotérmico en la curva DSC. La capacidad para determinar temperaturas de transición y entalpías hace de las curvas DSC una herramienta valiosa para producir diagramas de fase para diversos sistemas químicos (Dean, 1995).

1.5.2. Gelificación.

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas que puede ser inducida por tratamiento térmico es la gelificación. Las características típicas de muchos alimentos están determinadas por la propiedad de gelificar de las proteínas durante el calentamiento. Por ejemplo, la textura, propiedades organolépticas, rendimiento y calidad de productos como embutidos cocidos, quesos, yogurt, tofu, huevo duro, postres de gelatina, están vinculadas a la formación de un gel proteico (Pilosof, 2000).

Sin embargo, la gelificación proteica también puede ser promovida por cambios en el pH, presencia de sales (por ejemplo adición de iones Ca^{+2} en micelas de caseína), hidrólisis enzimática moderada, altas presiones, etc.

La gelificación puede ser definida como un fenómeno de agregación ordenada en el cual fuerzas atractivas y repulsivas están balanceadas de modo de obtener una matriz o red proteica capaz de retener una gran cantidad de agua (Hermansson, 1979).

La gelificación térmica involucra el calentamiento a distintas temperaturas y distintos tiempos de dispersiones proteicas de concentración apropiada. Las condiciones de temperatura y tiempo a utilizar son propias de cada proteína y estarán determinadas en función de la temperatura de desnaturalización de la misma en las condiciones del ensayo. La gelificación puede ocurrir durante el calentamiento (proteínas de soja, clara de huevo, proteínas de lactosuero) o luego del enfriamiento (gelatina, lisozima) dependiendo de la proteína y condiciones de gelificación.

La concentración de proteína es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de los geles. La mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican, a esta concentración se la denomina “concentración crítica”. El tipo y las propiedades de los geles se ven afectados por el pH, tipo y concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos (Pilosof, 2000).

La Figura 1.16 muestra un esquema del proceso de gelificación por calor para proteínas globulares.

Se pueden caracterizar varias etapas (Foegeding y Hamann, 1992):

1. La proteína se desnaturaliza por acción del calor.
2. Las moléculas proteicas desnaturalizadas interaccionan entre sí generando agregados.
3. Luego de un cierto tiempo se llega al “punto gel” donde la interacción entre agregados es suficientemente importante como para generar una matriz primaria que exhibe propiedades de sólido viscoelástico. Estas propiedades pueden ir cambiando con el tiempo y con el enfriamiento hasta formar la matriz de equilibrio o sea la estructura final del gel.

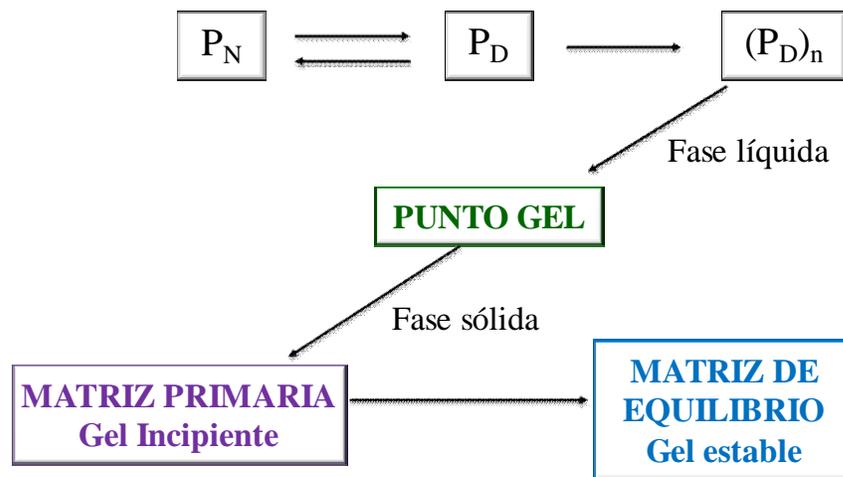


Figura 1.16. Esquema del proceso de gelificación, involucrando la desnaturalización y la agregación proteicas.

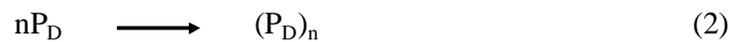
Existen básicamente dos teorías para describir la gelificación: la teoría de Flory-Stockmayer (1953; 1974) y la teoría de la percolación atribuida a De Gennes (1979). Según el modelo de Flory–Stockmayer, la gelificación es un evento súbito que ocurre cuando es alcanzado un cierto grado de entrecruzamiento entre el polímero, valor crítico llamado punto gel, en el cual la viscosidad diverge a infinito. En la teoría de la percolación se asume que los monómeros forman agregados pequeños y que en un cierto punto se llega al punto gel en el cual los agregados se entrecruzan.

El proceso mostrado en la Figura 1.16 puede ser visto desde el punto de vista reológico como el pasaje de una solución (sol) que va aumentando su viscosidad

mientras se forman los agregados proteicos, a la formación de un sólido viscoelástico (gel) (Baeza, 2003).

La desnaturalización de las proteínas del suero se puede describir como un proceso de dos etapas: i) un desplegamiento de la molécula de proteína, el cual puede ser reversible o irreversible, y ii) una agregación irreversible (de Wit y Klarenbeek, 1984; Mulvihill y Donovan, 1987).

El mecanismo aceptado clásicamente para describir la desnaturalización y agregación de proteínas globulares es el siguiente (Morr y Ha, 1993):



Donde P_N es la proteína nativa, P_D es la proteína desnaturalizada y n es un número pequeño de subunidades o monómeros de proteína.

Las reacciones iniciales (1) de este proceso implican un debilitamiento y ruptura de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo de alterar la conformación nativa de la proteína.

La segunda etapa (2) (si el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína son suficientes) es una polimerización de moléculas de proteína disociadas y desplegadas para producir una estructura tridimensional (gel) mediante la formación de enlaces intermoleculares de tipo disulfuro, hidrofóbicos o electrostáticos (Mangino, 1992; Morr y Ha, 1993) .

Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína principalmente desnaturalizada, $(P_D)_n$, el mismo puede ser alcanzado por una de las siguientes vías de reacción:



Dependiendo de las condiciones en las que se produce la gelificación, ocurrirá una u otra reacción; por lo tanto el tipo de uniones que formen los agregados, así

como también su tamaño y forma, serán diferentes dando lugar a distintos tipos de geles.

La reacción (3) se da en condiciones que favorecen las interacciones proteína-proteína en solución. Estas condiciones pueden ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales, o a bajas temperaturas de calentamiento (Verheul y col., 1999). Este tipo de reacción puede dar lugar a la formación de agregados de proteína previamente a la desnaturalización (Baeza, 2003; Stading y Hermansson, 1990) y luego se dará la desnaturalización de los agregados formados.

La reacción (4) se da por calentamiento en condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína que a la agregación de la misma (pH por encima del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles, presencia de ciertos iones, presencia de agentes disociantes como la urea o detergentes, altas temperaturas de calentamiento). En estas condiciones, durante el calentamiento se exponen los grupos tiol internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. El calentamiento además favorece las interacciones hidrofóbicas ya que también se activan grupos hidrófobos antes ocultos en el interior de la molécula proteica. La formación de la red tridimensional final implica también enlaces puente hidrógeno que se favorecen durante el enfriamiento.

Desde el punto de vista microestructural los geles se pueden clasificar en geles formados por una red de filamentos finos y geles agregados o particulados (Pilosof, 2000). El hecho de que se forme uno u otro tipo de gel se relaciona con que las condiciones mencionadas anteriormente den lugar a la reacción (4) y (3), respectivamente. Así, los geles de filamentos finos están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño de tal forma que estos geles son transparentes. Mientras que los geles agregados se forman a partir de una agregación desordenada, son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua. Las diferencias en las interacciones moleculares y en el equilibrio de las fuerzas atractivas y repulsivas dependientes de las condiciones del medio mencionadas anteriormente se reflejan en la apariencia macroscópica de los geles de proteínas globulares. En la Figura 1.17 se muestra un esquema de los dos tipos de geles mencionados anteriormente.

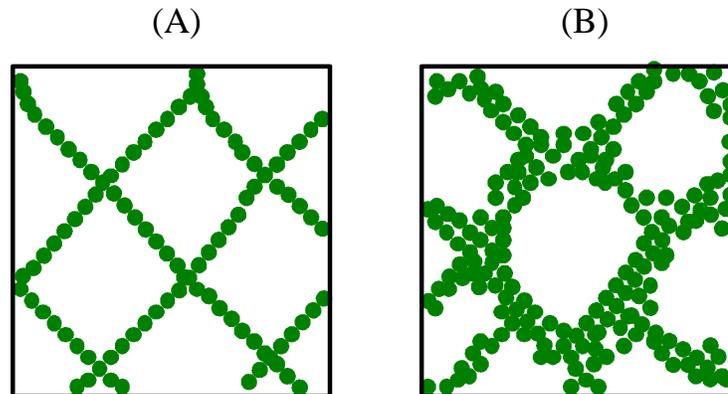


Figura 1.17. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos, (B) geles agregados o particulados (adaptado de Pilosof, 2000).

Todo lo mencionado hasta aquí respecto al proceso de gelificación se aplica a la interacción proteína-proteína.

Sin embargo, los geles de proteínas pueden formarse también en presencia de otros biopolímeros como polisacáridos, sean estos gelificantes o no gelificantes, y por lo tanto se verán afectadas por las interacciones proteína-polisacárido descritas en la sección 1.4 de esta introducción (Figura 1.10). Por lo tanto, los geles mixtos proteína-polisacárido presentan propiedades viscoelásticas diferentes a las de uno solo de los componentes (Doublier y col., 1992).

En mezclas de proteínas y polisacáridos, ambos gelificantes, en condiciones de incompatibilidad termodinámica, se pueden originar dos tipos de geles, rellenos o mixtos. Los geles rellenos se obtienen cuando uno de los componentes puede formar una red continua en todo el sistema y el otro componente polimérico sirve como relleno del gel. Estos geles pueden ser de una fase (el relleno está en un estado molecular disperso) o en dos fases (la fase dispersa consiste en partículas líquidas o gel). Geles mixtos se obtienen cuando las dos macromoléculas forman redes continuas separadamente y debe ser tratado como un caso específico de redes poliméricas homogéneas e interpenetradas (Tolstoguzov, 1997a). Sin embargo, aunque no se produzca una separación macroscópica de fases, la existencia de interacciones repulsivas entre proteína y polisacárido puede producir importantes efectos en la cinética de gelificación de uno o ambos componentes, así como en la microestructura y reología del gel resultante (Dickinson, 1993).

Se ha estudiado el comportamiento de geles mixtos de proteínas del lactosuero y polisacáridos formados en condiciones de incompatibilidad termodinámica.

La presencia de polisacáridos en estos sistemas se refleja en las siguientes formas: i) disminución de la concentración mínima de proteína para gelificar, ii) disminución en la temperatura o tiempo de gelificación, iii) variación en la textura, microestructura, apariencia y retención de agua de los geles. (Beaulieu y col., 2001; Fernandes, 1994; Ndi y col., 1996; Syrbe y col., 1995; Walkenstrom y col., 1998; Zasytkin y col., 1996).

En general, en condiciones de incompatibilidad termodinámica, la concentración crítica para gelificar de los componentes gelificantes disminuye en las mezclas (Baeza y col., 2002; Capron y col., 1999) dado que el fenómeno de incompatibilidad termodinámica aumenta la concentración efectiva de ambos biopolímeros en fases coexistentes. Esto facilita la interacción proteína-proteína y durante el calentamiento permite la agregación con la consecuente formación de una red tridimensional (Baeza y col., 2003). Baeza y col. (2001) mostraron que la adición de pequeñas cantidades (0.5 %) de polisacáridos no gelificantes a una solución de β -lactoglobulina (β -lg) al 6 %, concentración en la cual la proteína no gelifica, promueven la gelificación de la misma a temperaturas cercanas y por encima de la de desnaturalización de la proteína a pH neutro (80-88 °C). Sin embargo cada polisacárido utilizado, goma xántica, λ -carragenano y alginato de propilenglicol (PGA), impactó en forma diferente en el tiempo de gelificación, en las propiedades viscoelásticas de los geles, textura y apariencia.

La gelificación de la β -lg a pH 7, se produce típicamente por la formación de enlaces covalentes del tipo disulfuro, lo que lleva a la formación de agregados lineales que luego se unen por medio de uniones covalentes y no covalentes (hidrofóbicas) (Baeza y col., 2003). La presencia de los polisacáridos favorece las interacciones proteína-proteína, y provoca un aumento en las uniones no covalentes entre sus moléculas, lo que lleva a la formación de agregados de mayor tamaño. Martinez y col. (2010) reportaron que el diámetro hidrodinámico promedio de los agregados formados por calentamiento hasta 85°C de soluciones de β -lg es de entre 23 nm y 750 nm a concentraciones entre 3 y 9 % p/v. Cuando se mezcló propilenglicol (PGA) con la β -lg, y se calentó la mezcla hasta 85°C, se formaron agregados de proteína con un diámetro hidrodinámico promedio de

entre 5.600 a 22.000 nm. Por lo tanto, el PGA influencia la asociación de β -lg durante la gelificación.

Las mezclas de concentrados de proteínas del lactosuero (WPC) con hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC) a pH 7 son sistemas termodinámicamente incompatibles a temperatura ambiente, por lo cual tienden a separarse fácilmente en dos fases. La Figura 1.18 corresponde al diagrama de fases obtenido por Pérez y col., (2006b) para el sistema WPC/E4M (HPMC) a 25°C y pH 6,5.

Al ocurrir la separación de fases, se obtiene una fase superior rica en E4M y otra inferior rica en WPC.

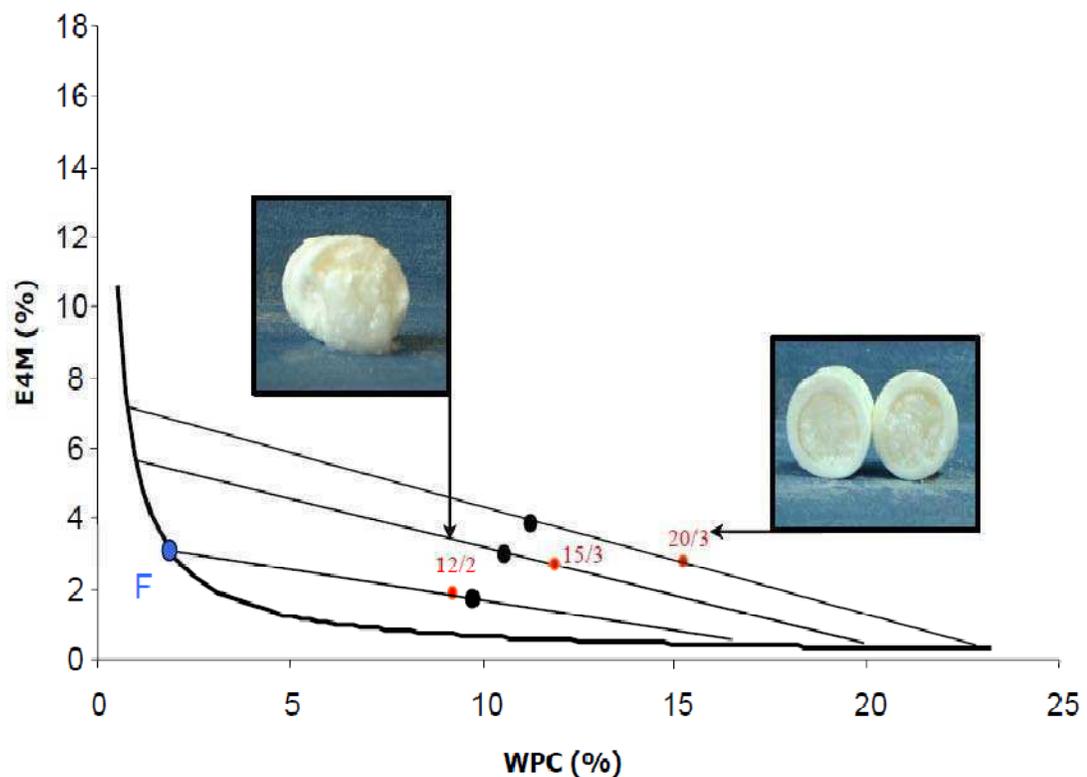


Figura 1.18. Diagrama de fases para el sistema mixto WPC/HPMC. Inserto, se muestran las distintas macro-estructuras para los geles obtenidos por calentamiento de sistemas mixtos señalados con las flechas. Adaptado Pérez y col. (2006b)

Al ser sometidas estas mezclas a calentamiento tienen lugar una serie de complejos fenómenos, algunos de los cuales pueden ocurrir simultáneamente: a) deshidratación de las moléculas de HPMC y consiguiente exposición de grupos hidrofóbicos susceptibles de agregarse entre sí; b) agregación/gelificación de HPMC; c) agregación/desnaturalización de WPC; d) separación de fases. Pérez y

col. (2006b) estudiaron la dinámica de gelificación térmica así como la macroestructura de estas mezclas mostrando que existen dos fenómenos competitivos: la separación de fases y la gelificación. Debido a la competencia entre velocidad de gelificación y de separación de fases, se logra obtener geles con una macro-estructura muy interesante, de tipo core-shell, a concentraciones de proteína mayores o iguales al 12% y concentración variable de E4M (1-4%) (Figura 1.18). Este tipo de estructura puede encontrar aplicación como sistema de microencapsulamiento o de liberación controlada, en los cuales algún componente activo se particiona entre las fases separadas y puede concentrarse en la fase HPMC, o bien para desarrollar nuevas estructuras y alimentos.

Como se mostró anteriormente, cada polisacárido por sus características propias, presenta distinta incompatibilidad con la proteína generando diferentes agregados proteicos y estructuras en los geles. Así mismo para un dado polisacárido al aumentar su concentración en relación a la proteína, se induce una mayor agregación de la proteína obteniéndose geles cada vez más particulados (Baeza y col., 2001). Por lo tanto, la selección del polisacárido y de su concentración permite obtener geles de proteínas del lactosuero de características específicas.

El proceso de gelificación se caracteriza fundamentalmente por la determinación del punto gel, es decir el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requerimientos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del rango de la respuesta lineal, debe proveer magnitudes físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica (Pilosof, 2000).

Estos requerimientos eliminan a los métodos transientes como las mediciones de "creep" o de relajación del esfuerzo, quedando solamente los métodos reológicos dinámicos en los cuales se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria como la única alternativa de seguimiento de la gelificación (Pilosof, 2000); dichos métodos son los utilizados en el presente trabajo.

1.5.3. Comportamiento interfacial de biopolímeros.

Los tensioactivos (o surfactantes) son sustancias con actividad superficial debido a que sus moléculas son anfifílicas (tienen una parte polar y otra no polar). Para minimizar la energía libre, las moléculas de tensioactivo tienden a orientarse en la interfase aceite-agua o aire-agua, de forma que los grupos hidrofílicos estén localizados en la fase acuosa y la parte hidrófoba (lipófila) en la fase oleosa o gaseosa, respectivamente (McClements, 2005; Rodríguez Patino y col., 1990).

En la industria alimentaria los surfactantes son utilizados para estabilizar, principalmente espumas y emulsiones. Existen dos clases de moléculas tensioactivas (Wilde, 2000):

- i. Surfactantes o tensioactivos de bajo peso molecular: detergentes, fosfolípidos y lípidos. Son solubles en agua o aceite, y normalmente forman una película compacta con baja tensión interfacial.
- ii. Biopolímeros: macromoléculas anfifílicas, las más usadas son las proteínas, aunque también incluye algunos polisacáridos. Estos polímeros forman una película viscoelástica irreversible.

Ambos grupos de sustancias tensioactivas otorgan funciones específicas en el procesado y las propiedades del producto final. El empleo óptimo de ellas depende del conocimiento que se tenga de sus propiedades fisicoquímicas interfaciales (actividad interfacial, cantidad adsorbida, estructura, espesor, topografía, estabilidad, movilidad lateral, interacciones entre las moléculas adsorbidas, capacidad de cambiar la conformación, propiedades reológicas interfaciales, etc.). También es importante conocer la cinética de formación de la película y otras propiedades fisicoquímicas en las interfases fluidas.

Para definir el concepto de tensión superficial o interfacial, podemos imaginar una molécula situada en el interior de un líquido, suficientemente alejada de la superficie libre del mismo como para que su esfera de acción molecular se encuentre completamente en el interior del líquido. Todas las moléculas de líquido contenidas en dicha esfera ejercerán fuerzas de atracción sobre ésta y, como consecuencia de la homogeneidad isótropa del líquido, la distribución de fuerzas también será isótropa y su resultante nula. Supongamos ahora, que una molécula está situada muy cerca de la superficie libre del líquido, más cerca que la esfera

de acción molecular; en estas condiciones, habrá más moléculas atrayéndola hacia el interior del líquido que hacia fuera del mismo. La distribución anisótropa de fuerzas de atracción intermoleculares sobre estas moléculas próximas a la superficie libre resulta en una fuerza neta sobre las mismas, dirigida hacia el interior del líquido y que será tanto más intensa, como más cercana a la superficie libre se encuentre la molécula en cuestión (Maldonado Valderrama, 2006) (Figura 1.19).

Esta fuerza atractiva neta que dirige las moléculas hacia el seno de la fase en que se encuentra, provoca una reducción del área interfacial. Esta fuerza se denomina tensión interfacial o superficial, la unidad en el SI es $\text{J/m}^2 = \text{N/m}$.

La termodinámica clásica define la tensión superficial (σ) como el trabajo (W) que es necesario realizar para incrementar en una unidad el área interfacial (A) (Dickinson y Stainsby, 1982; McClements, 1999). Este trabajo representa la variación de energía libre que sufre el sistema como consecuencia de un aumento de la superficie según: $W = \sigma \Delta A$.

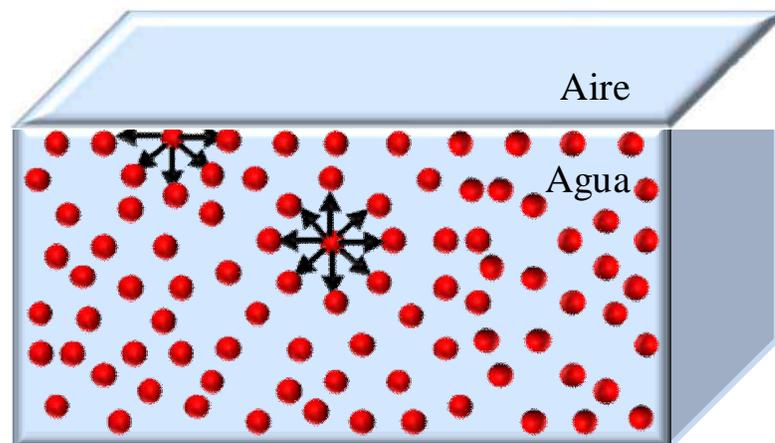


Figura 1.19. Interacciones entre las moléculas de un líquido.

El valor de la tensión superficial da idea de lo difícil que puede resultar la fabricación de una espuma o una emulsión y cuán estable será ésta. Cuanto mayor sea la tensión superficial, mayor trabajo tendrá que aportar al sistema para aumentar el área interfacial. La adición de tensioactivos reduce la tensión interfacial del sistema, por lo que facilita en gran medida la formación de la espuma o emulsión (Bos y Van Vliet, 2001).

1.5.3.1. Cinética de adsorción en la interfase.

La cinética de adsorción de un biopolímero (proteína o polisacárido) en la interfase aire-agua (o aceite-agua) se refiere a cambios de la presión superficial con el tiempo.

La presión superficial se define como $\pi = \sigma - \sigma_0$, donde σ_0 es la tensión superficial del agua, y σ es el valor de la tensión superficial en presencia de la proteína y/o el polisacárido.

Las principales etapas de la cinética de adsorción son las siguientes (Graham y Phillips, 1979; MacRitchie, 1978; MacRitchie, 1990; Tornberg, 1978b), (Figura 1.20): (i) difusión de la macromolécula desde el seno de la fase acuosa hacia la interfase aire-agua; (ii) adsorción (penetración) y desplegamiento interfacial; y (iii) agregación (reordenamiento) en la interfase aire-agua, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial.

La cinética de adsorción de la proteína está inicialmente controlada por la difusión, pero a tiempos mayores, la penetración y el reordenamiento de la macromolécula en la película interfacial serán los que controlen el proceso.

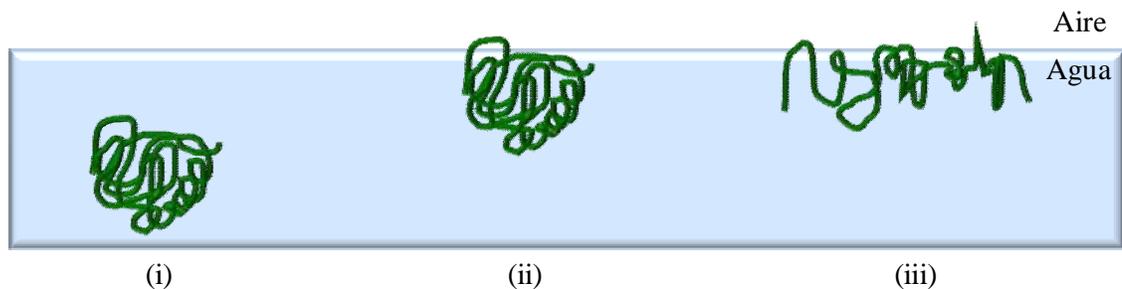


Figura 1.20. Procesos de adsorción: (i) difusión de la macromolécula hacia la interfase; (ii) penetración de la macromolécula en la interfase; (iii) reordenamiento de la macromolécula en la interfase.

Toda sustancia tensioactiva tiende a acumularse en la interfase formando películas monomoleculares que se denominan monocapas.

Los tensioactivos de bajo peso molecular forman monocapas con un alto grado de empaquetamiento en la interfase, lo que los hace muy efectivos en reducir la tensión interfacial (Figura 1.21i).

Los biopolímeros flexibles, tales como las caseínas, se ubican en la interfase en una forma expandida, con segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos incluidos en la fase aire y agua respectivamente (Figura 1.21ii).

Las sustancias tensioactivas de alto peso molecular (macromoléculas), tales como las proteínas o polisacáridos tensioactivos, pueden cambiar considerablemente su conformación en la interfase inmediatamente después de la adsorción (Bos y Van Vliet, 2001; Pérez y col., 2006a). Tales cambios conformacionales pueden ser vistos como una desnaturalización interfacial en el caso de las proteínas en la que sus residuos hidrofóbicos se orientan hacia la fase aire o aceite, y los hidrofílicos hacia la acuosa (Dalglish, 1996) (Figura 1.21iii). En el caso de los polisacáridos, una vez que la macromolécula llega a la interfase es capaz de manifestar cambios conformacionales o arreglos estructurales de acuerdo a la naturaleza de su estructura molecular (Pérez y col., 2006a).

Además, ambos biopolímeros también pueden cambiar su conformación, luego de la adsorción, en respuesta a las condiciones del medio como pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa (Damodaran, 1996; McClements, 1999). La velocidad a la que la conformación de una macromolécula cambia en la interfase depende de su estructura molecular: las moléculas más flexibles pueden alterar rápidamente su conformación, mientras que las moléculas más rígidas cambian más lentamente (Dickinson, 1992).

Como se dijo anteriormente, es muy importante conocer la velocidad a la que ocurre el proceso de adsorción en la interfase. La velocidad de adsorción depende de las características moleculares de la sustancia tensioactiva (tamaño, conformación e interacciones), la naturaleza de la fase continua y de las condiciones del proceso, tales como temperatura, método de formación de la dispersión, etc. Dicha velocidad debe ser suficientemente rápida como para que las moléculas puedan adsorberse sobre la interfase de burbujas o gotas creadas durante la formación de la espuma o emulsión.

En resumen, las características más importantes que debe reunir una sustancia tensioactiva son: (i) la capacidad para reducir la tensión interfacial y la tasa de reducción, (ii) el grado de adsorción en la interfase, (iii) su capacidad de desorción, (iv) la posibilidad de cambiar su conformación durante y después de la adsorción, (v) el espesor de la monocapa adsorbida y su resistencia, y (vi) las

interacciones entre las moléculas adsorbidas (Bos y Van Vliet, 2001; Dickinson y McClements, 1995; Kim y Kinsella, 1985; Walstra, 1996)

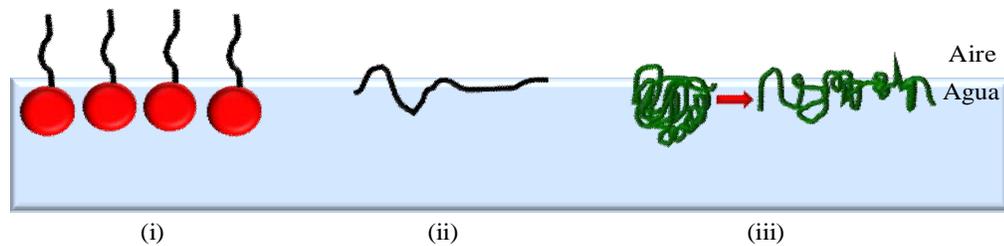


Figura 1.21. Conformación de moléculas tensioactivas en interfases aire-agua: (i): tensioactivos de bajo peso molecular, (ii): biopolímeros flexibles y (iii): macromoléculas.

Adaptado de Bos y Van Vliet (2001).

La adsorción de una macromolécula es el resultado neto de varias interacciones entre sí mismas y con los componentes del sistema, que incluye la interfase (gas, líquida o sólida), las moléculas del disolvente (agua) y cualquier otro soluto. El origen de estas interacciones incluye a las fuerzas de London, de van der Waals (fuerzas de dispersión, orientación e inducción), fuerzas ácido-base de Lewis (incluyendo las uniones puente hidrógeno), las fuerzas electrostáticas, los efectos estéricos, tales como el efecto hidrofóbico y las restricciones de empaquetamiento interno (estéricas y exclusión de volumen) (McClements, 2005). Es decir, todas las interacciones intermoleculares (macromolecula-macromolecula; macromolecula-interfase; disolvente-disolvente; disolvente-interfase) son de importancia para la adsorción de la proteína (Haynes y Norde, 1994; Norde y Lyklema, 1991).

La evidencia experimental y los modelados teóricos indican que sólo una fracción de los segmentos de una macromolécula de polímero adsorbida está en contacto directo con la interfase.

Como se muestra en la Figura 1.22, la configuración de una macromolécula adsorbida en la interfase aire-agua se puede dividir en tres diferentes tipos (Dickinson, 1992):

- (i) Fila (train): se refiere a los segmentos de la macromolécula que están en contacto directo con la interfase.
- (ii) Lazo (loop): hace referencia a los segmentos de la macromolécula que están suspendidos en el seno de la fase.

(iii) Cola (tail): refiere a los segmentos terminales de la macromolécula. Frecuentemente estos segmentos están inmersos en la fase acuosa, debido a que suelen ser grupos cargados según el pH del medio.

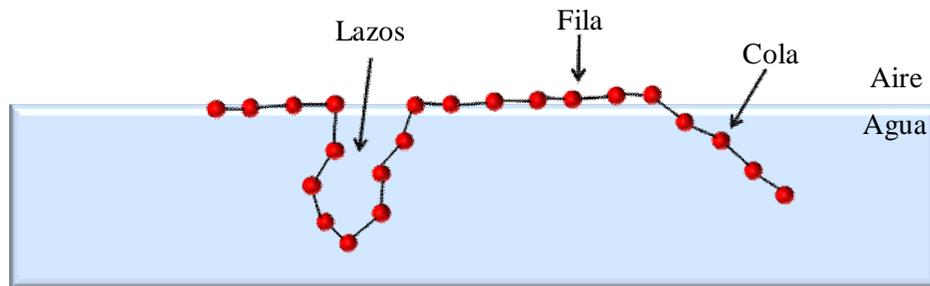


Figura 1.22. Representación esquemática de las diferentes conformaciones de una macromolécula en la interfase aire-agua. Adaptado de Dickinson (1992).

El hecho de que las macromoléculas adquieran una u otra conformación en la interfase depende de la flexibilidad de la cadena y de su afinidad con el medio (Kim, 1985).

Una diferencia importante entre la adsorción de una macromolécula y de un surfactante de bajo peso molecular, es que el primero sólo tiene entre 30-40 % del área superficial disponible ocupada por segmentos en fila, en comparación con cerca de un 100 % para la monocapa de surfactante de bajo peso molecular (Figura 1.21i).

En un sistema acuoso no agitado, inicialmente, la macromolécula se hidrata difundiendo rápidamente a la interfase y el proceso de adsorción está controlado por la difusión, dependiendo la velocidad de difusión del tamaño y la forma molecular y de la posibilidad de que la macromolécula se adsorba al colisionar con la interfase (dependiente de la hidrofobicidad y del impedimento electrostático) (Tornberg, 1978b).

La superficie de la película se encuentra en continua formación, y para cubrir el área máxima, las moléculas que arriban a la interfase se despliegan parcialmente. El grado de desplegamiento durante la adsorción depende de numerosos factores: la estabilidad conformacional y la flexibilidad de la macromolécula, la concentración de la solución, el tipo de interfase, etc. (Dickinson, 1992; Wilde y Clark, 1996).

El reordenamiento de las moléculas adsorbidas en la superficie puede ser retardado por varios eventos: presencia de una barrera de adsorción, lentos reordenamientos moleculares, formación de complejos, transiciones de fase en la superficie y formación o destrucción de una estructura tridimensional (Lucassen-Reynders, 1993).

Cuando la concentración de la macromolécula adsorbida aumenta, se genera una barrera electrostática sobre el lado acuoso de la superficie debido a la orientación preferencial de los grupos cargados hacia la fase acuosa polar. Entonces, las macromoléculas requieren una energía cinética adecuada para superar dicha barrera electrostática (que involucra fuerzas repulsivas, impedimentos estéricos y osmóticos) y también para comprimir las moléculas adsorbidas en la interfase. En esta etapa del proceso, la velocidad está determinada por la capacidad de las macromoléculas para penetrar en la interfase y reacomodarse, creando espacio en la película preexistente. Una vez adsorbidas en la interfase, las macromoléculas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre (Phillips y col., 1994b). Con el aumento de la cantidad de macromoléculas adsorbidas, el reordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y la película cambia de estado expandido a comprimido (Kinsella y Phillips, 1989). En conclusión, se puede decir que las macromoléculas (proteínas o polisacáridos) tienen gran potencial como sustancias tensioactivas.

Las proteínas, a diferencia de los tensioactivos de bajo peso molecular como mono o diglicéridos o fosfolípidos, poseen flexibilidad molecular y capacidad de alterar su conformación para reorientarse y asociarse en la interfase (Phillips y col., 1994b). Además de reducir la tensión interfacial, pueden formar una película continua sobre la interfase por medio de complejas interacciones intermoleculares, confiriéndole una estructura deseable a la interfase. El desarrollo de esta película interfacial, con elevada resistencia mecánica, puede no ser factible en el caso de tensioactivos de bajo peso molecular debido a que las interacciones intermoleculares son más débiles (Rodríguez Patino y col., 2002).

Por lo general los polisacáridos debido a su carácter altamente hidrofílico no son activos en las interfases. Un grupo de polisacáridos con actividad interfacial son los ésteres del ácido algínico, alginato de propilenglicol (PGA) que son producidos con una gama de viscosidades y grados de esterificación. Al aumentar el grado de esterificación se reduce el carácter hidrofílico de la molécula lo cual le imparte

propiedades interfaciales (Baeza y col., 2004b). Como ya se mencionó, la HPMC es un derivado de la celulosa que tiene sustituyentes metilos e hidroxipropilos en la estructura principal de anhidroglucosa, los cuales le confieren la capacidad para reducir la tensión superficial (surfactante) (Pérez y col., 2006a).

Por último, cabe destacar que existen diferentes factores (intrínsecos y extrínsecos) que afectan las propiedades interfaciales tanto de las proteínas como de los polisacáridos, por lo tanto, se deben tener en cuenta al momento de elegir un biopolímero como agente tensioactivo. Entre los factores intrínsecos se encuentran: la composición de aminoácidos, la relación de aminoácidos no polares y polares, la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, la presencia de uniones disulfuro y grupos tioles libres y el tamaño, forma y flexibilidad molecular. Entre los extrínsecos se pueden nombrar: el pH y la fuerza iónica del medio, la concentración de proteína, el tiempo y la temperatura a la que se expone la proteína en la interfase y la aplicación de energía mecánica (Baeza, 2003).

1.5.3.2. Propiedades reológicas de las películas interfaciales.

El conocimiento de la reología interfacial de las películas es importante en relación a la estabilización de espumas y emulsiones (Halling, 1981; Neurath y Bull, 1938). Las propiedades viscoelásticas de la interfase han sido correlacionadas con la funcionalidad de espumas y emulsiones (Halling, 1981; Kim y Kinsella, 1985; Nakai y Li-Chan, 1993; Phillips, 1981). Rodríguez-Patino y col.(2002) afirman que la estructura de la película, que es una consecuencia de la existencia de interacciones entre las moléculas que la componen, determina las propiedades reológicas de la misma. Es decir, que las características reológicas superficiales son muy sensibles a la existencia de esas interacciones entre las moléculas presentes en la interfase y entre las moléculas de la interfase y las de la subfase (Murray, 2002; Rodríguez Niño, 1996).

Las propiedades reológicas que se pueden determinar en una película son diferentes dependiendo de la deformación a que se ha sometido. Debe especificarse qué clase de tensión fue aplicada en las mediciones (Lucassen-Reynders, 1993): (i) de cizalla, se somete a la película a esfuerzos que

originan cambios en su forma; o (ii) dilatacionales, se somete a la película a compresiones y expansiones que modifican su área.

En el primer caso, se refleja la atracción neta entre las macromoléculas en la película interfacial, y entre estas y las capas de líquido adyacentes. Es la fuerza requerida para desplazar y mover las macromoléculas de un punto a otro (Martínez, 2007). Esta viscosidad superficial o resistencia a los esfuerzos de corte o de cizalla de la superficie de la película refleja la resistencia mecánica de la misma y es un parámetro importante relacionado con la estabilidad de espumas y emulsiones.

Las propiedades reológicas que se obtienen a partir del segundo tipo de deformación poseen gran relevancia en los fenómenos de emulsificación y espumado, de acuerdo con la rápida expansión de la superficie durante dichas operaciones (Murray, 2002; Rodríguez Patino y col., 2002). En las experiencias de reología interfacial dilatacional, se aplica una deformación sinusoidal del área que ocupa la película y se mide la variación sinusoidal resultante en la tensión superficial. La deformación aplicada está caracterizada por una amplitud máxima y una frecuencia de oscilación. La respuesta sinusoidal de la presión superficial derivada presenta la misma frecuencia que la deformación aplicada, pero estará o no en fase con ésta dependiendo de las características viscoelásticas de la película.

La elasticidad y la viscosidad de dilatación se pueden combinar en un único parámetro, el módulo viscoelástico superficial de la película (E) que vincula la variación de la presión superficial con los cambios del área superficial (A) ($E = -d\pi/d(\ln A)$) (Kim y Kinsella, 1985).

Finalmente, numerosas metodologías se han desarrollado para estudiar las propiedades interfaciales.

La tensión superficial se puede determinar por el método del volumen de las gotas (estalagmómetro de Traube), por caracterización de la forma y del tamaño de la gota (método de Sessile) y por distintos métodos dinámicos como el anillo de Du Noüy-Padday (Padday, 1974), método de la gota pendiente (Tornberg, 1978a), tensiolaminómetro de la placa de Wilhelmy (German y col., 1985; Graham y Phillips, 1979). En los últimos años se desarrollaron metodologías más modernas como las balanzas para películas tipo Langmuir donde se pueden estudiar procesos de relajación y dilatación por aplicación de ciclos de compresión y

expansión, por medio de mediciones dinámicas de presión superficial y área interfacial (Rodríguez Niño y col., 1999). También se puede determinar la tensión superficial sometiendo a oscilaciones con determinada frecuencia a gotas ubicadas en el interior de un capilar o midiendo la amplitud y frecuencia de ondas generadas en un capilar lleno de líquido (McClements, 1999).

Las propiedades de flujo de las películas superficiales (umbral de fluencia, viscosidades, comportamiento no-newtoniano) se pueden determinar mediante un viscosímetro de tracción viscosa de un canal (Mannheimer y Schechter, 1970), viscosímetros de anillo (Blank, 1969; Blank y Britten, 1970), péndulo rotatorio (Miller y col., 1998), o cilindros de sobreflujo (Prins, 1999).

Es posible realizar estudios morfológicos con microscopía del ángulo de Brewster (Rodríguez Niño y col., 1999), microscopía electrónica de películas líquidas suspendidas en aire con análisis de imágenes (Clark y col., 1994; Miller y col., 1998) y microscopía de fuerza atómica (AFM) por medio de la cual se observan las redes interfaciales (Gunning y col., 1996). Las interacciones coloidales que involucran biopolímeros adsorbidos en la interfase ocurren en general a distancias de nanómetros y son una combinación de fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y de interacciones entrópicas y estéricas. La técnica de medición de fuerzas superficiales permite la determinación de las magnitudes de las fuerzas moleculares entre dos películas superficiales, resultando una técnica útil para determinar bases fundamentales de la funcionalidad y el comportamiento de proteínas (Leckband y Israelachvili, 1993; Tsarkova y col., 2004).

1.5.3.3. Propiedades interfaciales de mezclas de proteínas y polisacáridos.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos en interfases son de gran importancia para la formación y la estabilidad de espumas y emulsiones, así como para el diseño de películas interfaciales con propiedades específicas.

En los últimos años se ha abordado el estudio de las propiedades interfaciales aire-agua de proteínas del suero lácteo y otras proteínas en presencia de polisacáridos con y sin actividad interfacial (Baeza y col., 2004a; 2005; 2006; Pérez y col., 2008; 2007) y su relación con la estabilidad de las espumas en condiciones donde pueden existir fenómenos de volúmenes de exclusión en el seno de la fase (pH 7, concentración de proteína 2% máximo, concentración de

polisacárido 0,5% máximo). Los estudios interfaciales realizados permitieron determinar la existencia de fenómenos competitivos o cooperativos entre los biopolímeros a nivel de las películas interfaciales y mostraron que aún los polisacáridos sin actividad interfacial tienen efecto a nivel de la interfase proteica, contribuyendo a la estabilización de espumas más allá de su carácter espesante. Como se menciono anteriormente, un grupo de polisacáridos con actividad interfacial son los ésteres del ácido algínico, alginato de propilenglicol (PGA) que son producidos con una gama de viscosidades y grados de esterificación. Su capacidad para reducir la tensión superficial, así como para aumentar la viscosidad los convierte en agentes estabilizadores y espumantes. También ya se ha mencionado que la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) tiene posee características surfactantes (sección 1.3).

Debido al carácter tensioactivo, estos polisacáridos pueden competir con las proteínas por las interfases. Se han estudiado las propiedades dinámicas y de equilibrio de las siguientes varias mezclas proteína/polisacárido (β -Ig/PGA; caseinomacropéptido (GMP)/PGA; WPC/ HPMC con el objetivo de comprender cómo las características de cada componente y su capacidad formadora de película impacta en las propiedades de las películas mixtas (Baeza y col., 2004a; 2005; 2006; Ganzevles y col., 2006; Pérez y col., 2008; 2007)

La evolución de la presión superficial (π) así como de las propiedades reológicas de la película interfacial de los componentes solos y de las mezclas se estudiaron en un tensiómetro de gota a 20°C y a pH 7. Dichos estudios se realizaron en concentraciones de proteína y polisacárido en el seno de la fase que permiten la saturación de la interfase (concentración de proteína y polisacárido 1-2 %). Este pH no promueve el complejamiento electrostático entre proteínas y polisacáridos y los sistemas presentan una incompatibilidad limitada (no hay separación macroscópica de fases predominando el fenómeno de volúmenes de exclusión). La presión superficial con el tiempo para mezclas de HPMC con WPC, mostró una conducta competitiva, dominado por HPMC a causa de su actividad superficial excepcionalmente alta. La componente elástica del módulo dilatacional (E_d) de las películas mixtas en tiempos cortos de adsorción fue dominado por el componente que se adsorbe más rápidamente (HPMC). En tiempos largos de adsorción, E_d fue dominado por el componente con el mayor E_d (WPC) (Pérez y col., 2008; 2007). La presión superficial con el tiempo para mezclas de un polisacárido con poca

actividad superficial como el PGA con proteínas como β -lg o GMP, fue dominado por β -lg, pero mostró un valor intermedio a los componentes cuando la proteína fue GMP, aunque el GMP es mucho más activo superficialmente que β -lg. Esta última también determinó las propiedades elásticas de la película mixta porque formó películas con mejores propiedades de superficie que PGA. En la mezcla de GMP/PGA, donde ambos componentes tuvieron un E_d semejante, se observó que la viscoelasticidad relativa de la película mixta ($\tan \delta$) fue más baja que la de los componentes solos indicando un efecto antagónico (Baeza y col., 2004a; 2005; 2006; 2007).

Por lo tanto, durante la adsorción competitiva entre polisacáridos y proteínas del lactosuero en concentraciones altas en el seno de la fase, la presión superficial es dominada por el componente que exhibe mayor actividad superficial si este componente también forma películas con un módulo de elasticidad alto. La reología de la película superficial estaría dominada principalmente por el componente que puede formar las películas más viscoelásticas, pero interacciones antagónicas en la superficie pueden alterar esta conducta. El mismo comportamiento se ha observado durante la adsorción competitiva en la interfase agua/aceite (Camino, 2010).

Los polisacáridos sin actividad interfacial como la goma xántica o el λ -carragenano tienen una enorme influencia en la interfase aún sin penetrar en la misma, debido a un posible complejamiento sobre la proteína en la monocapa y a fenómenos de limitada incompatibilidad tanto en el seno de la solución como en la interfase. La mezcla β -lg/goma xántica presentó un efecto sinérgico en la presión superficial (Baeza y col., 2004a; 2005)

El efecto de los polisacáridos en las propiedades interfaciales de una proteína es complejo por lo cual no se puede predecir en forma simple el comportamiento de mezclas de proteínas y polisacáridos debido a la coexistencia de diferentes fenómenos (Pilosof y col., 2009).

Dichos fenómenos se describen a continuación, y se muestran esquemáticamente en la Figura 1.23,

- i) Incompatibilidad entre biopolímeros tanto a nivel de la subfase como de la interfase que promueven una segregación de ambos biopolímeros y un aumento de la concentración efectiva.

- ii) Fenómenos competitivos o cooperativos que predominan de acuerdo a la concentración de cada componente en la subfase.
- iii) Interacciones específicas de complejamiento a través de ciertas regiones de la molécula del polisacárido y de la proteína que ocurren aún cuando las condiciones de pH no favorezcan la ocurrencia de atracciones electrostáticas netas (pH por encima del isoelectrico).

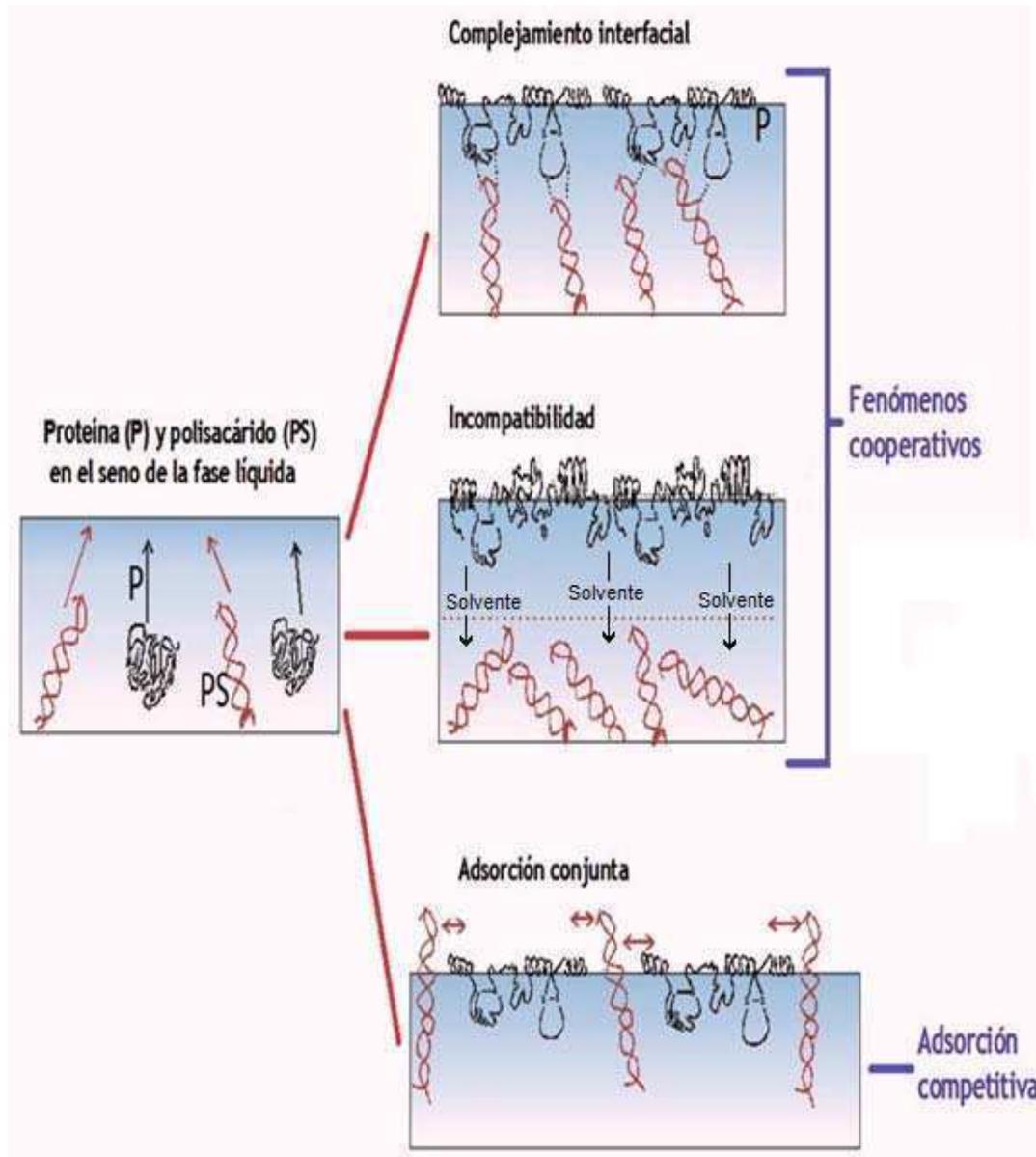


Figura 1.23. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de interacción entre proteínas y polisacáridos en la interfase aire-agua. Adaptado de Pilosof y col. (2009).

1.6. Referencias.

- Alexandrescu A. T., Evans P., Pitkeathly M., Baum J., and Dobson C. M. (1993). Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of α -lactalbumin: a two dimensional NMR study. *Biochemistry*, 32, 1707-1718.
- Alves M. M., Antonov Y. A., and Gonçalves M. P. (1999). The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 13, 157-166.
- Anónimo (2002). Reference manual for US whey products. *US Dairy Export Council*. Arlington, VA, USA.
- Baeza R. (2003). Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. Ph.D. (pp. 253). Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Baeza R. I., Carp D. J., Pérez O. E., and Pilosof A. M. R. (2002). κ -carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35, 741-747.
- Baeza R. I., Carrera Sánchez C., Pilosof A. M. R., and Rodríguez Patino J. M. (2004a). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 18, 959-966.
- Baeza R. I., Carrera Sánchez C., Pilosof A. M. R., and Rodríguez Patino J. M. (2004b). Interfacial and foaming properties of propylenglycol alginates. Effect of degree of esterification and molecular weight. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36, 139-145.
- Baeza R. I., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2005). Interactions between β -lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. *Food Colloids. Interactions, microstructure and processing*. Ed: E Dickinson, (pp. 301-316). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Baeza R. I., Gugliotta L. M., and Pilosof A. M. R. (2001). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin in the presence of non gelling polysaccharides studied by dynamic light scattering. *Proceedings of EMPROMER 2001*, 3, 1513-1518.
- Baeza R. I., Gugliotta L. M., and Pilosof A. M. R. (2003). Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 81-93.
- Baeza R. I., Pilosof A. M. R., Carrera Sánchez C., and Rodríguez Patino J. M. (2006). Adsorption and rheological properties of biopolymers at the air-water interface. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 52(7), 2627-2638.
- Barnett L. B., and Bull H. B. (1960). Electrophoresis of ribonuclease and of β -lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 89(2), 167-172.
- Beaulieu M., Turgeon S. L., and Doublier J. L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/ low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11, 961-967.

- Blank M. (1969). Intermolecular interactions in newly spread serum albumin monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 29, 205-209.
- Blank M., and Britten J. S. (1970). Determination of yield stress in surface films of lung extract. *Journal of Colloid and Interface Science*, 32, 62-66.
- Bos A. M., and Van Vliet T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471.
- Bovey F. A., and Winslow E. H. (1981). *Macromolecules. An Introduction to Polymer Science*. Eds: F. A. Bovey and E. H. Winslow. Academic Press, New York, NY, USA.
- Boye I., Alli I., and Ismail A. A. (1997). Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy on the study of thermal and structural stability of α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1116-1125.
- Boye J. I., Kalab M., Alli I., and Ma Y. C. (2000). Microstructural properties of heat-set whey protein gels: Effect of pH. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 33, 165-172.
- Brew K., Castellino F. J., Vanaman T. C., and Hill R. L. (1970). The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 4570.
- Brew K., and Grobler J. A. (1992). α -lactalbumin. *Advanced dairy chemistry. Proteins*. Ed: P. F. Fox, (pp. 191-229). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, UK.
- Brody E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropptide. *British Journal of Nutrition*, 84(1), S39-S46.
- Bromley E. H. C., Krebs M. R. H., and Donald A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in β -lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13-27.
- Brownsey G. J., and Redout M. J. (1985). Rheological characterization of microcrystalline cellulose dispersions: Avicel RC 591. *Journal of Food Technology*, 20, 237.
- Bungenberg de Jong H. G. (1949). Reversible Systems. *Colloids Science*. Ed: H. R. Kruyt, (pp. 232-258). Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Camino N. (2010). Comportamiento de hidroxipropilmetilcelulosas y sus mezclas con β -lactoglobulina en solución, interfases y emulsiones. Ph.D. (pp. 274). Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Capron I., Nicolai T., and Durand D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 13, 1-5.
- Carter D. C., and Ho J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153-203.
- Cayot P., and Lorient D. (1996). Structure-function relationship of whey proteins. *Food Proteins and their applications*. Eds: S. Damodaran and A. Paraf, (pp. 225-256). Marcel Dekker, New York, NY, USA.

- Clark A. H., Kavanagh G. M., and Ross-Murphy S. B. (2001). Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, 383-400.
- Clark D. C., Mackie A. R., Wilde P. J., and Wilson D. R. (1994). Differences in the structure and dynamics of the adsorbed layers in protein-stabilized model foams and emulsions. *Faraday Discussions*, 98, 253-262.
- Coffey D. G., Bell D. A., and Henderson A. (1995). Cellulose and Cellulose Derivatives. *Food Polysaccharides and Their Applications* Ed: A. M. Stephen, (pp. 123-153). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Chrysin E. D., Brew K., and Acharya K. R. (2000). Crystal structures of apo- and holo-bovine alpha-lactalbumin at 2.2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 37021-37029.
- Dalgleish D. G. (1996). Food emulsions. *Emulsions and emulsion stability*. Ed: J. Sjöblom, (pp. 287-321). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Damodaran S. (1996). Functional properties. *Food proteins. Properties and characterization*. Eds: S. Nakai and H. W. Modler, (pp. 167-234). VCH, New York, NY, USA.
- Damodaran S. (1997). Food protein: an overview. *Food proteins and their applications*. Eds: S. Damodaran and A. Paraf, (pp. 1-24). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Das K. P., and Kinsella J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10(1), 77-102.
- De Gennes P. G. (1979). Scaling concepts in polymer physics. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- de Kruif C. G., and Tuinier R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 555-563.
- de Kruif C. G., Weinbreck F., and de Vries R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340-349.
- de Wit J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- de Wit J. N., and Klarenbeek G. (1984). Effects of heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701-2710.
- Dean J. A. (1995). The Analytical Chemistry Handbook. McGraw Hill, New York, NY, USA.
- Demetriades K., Bryant C. M., and McClements D. J. (1998). Optimizing the functional properties of whey proteins to enhance nutritional benefits. *Research Developments in Nutrition*, 2, 131-153.
- Dickinson E. (1992). An introduction to food colloids. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dickinson E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties*. Eds: E. Dickinson and P. Walstra, (pp. 77-93). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

- Dickinson E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trend in Food Science and Technology*, 9, 347-354.
- Dickinson E., and McClements D. J. (1995). Protein-polysaccharide interactions. *Advances in food colloids*. Eds: E. Dickinson and D. J. McClements, (pp. 81-101). Chapman & Hall, London, UK.
- Dickinson E., and Stainsby G. (1982). Colloids in food applied sciene. Chapman & Hall, London, UK.
- Doublier J. L., Garnier C., Renard D., and Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 202-214.
- Doublier J. L., Launay B., and Cuvelier G. (1992). Viscoelastic properties of food gels. *Viscoelastic Properties of Foods*. Eds: A. Rao and J. F. Steffe, (pp. 371-434). Elsevier Science, Barking, UK. .
- Eigel W., Butler J., Ernstrom C., Farrel H., Harwalker V., Jenness R., and Whitney R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631.
- El-Salam M. H. A., El-Shibiny S., and Buchheim W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6(4), 327-341.
- Escudero González J. J., Ferrero Rodríguez M. C., and Jiménez-Castellanos Ballesteros R. (2008). Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and inert polymers: Effect of HPMC of different viscosity grades. *International Journal of Pharmaceutics*, 35(11-12), 61-73.
- Evans E. W. (1982). Uses of milk proteins in formulated foods. Developments in Food Proteins. Ed: B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science Publishers, Londres, UK.
- FAO (1997). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 1997. Parte III: La agroindustria y el desarrollo económico.
www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s00.htm
- Fernandes P. (1994). Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 8, 277-285.
- Ferreira I. M. P., Mendes E., and Ferreira M. A. (2001). HPLC/UV analysis of protein in dairy products using a hydrophobic interaction chromatographic column. *Analytical Science*, 17(4), 499-501.
- Flory P. J. (1953). Principles of polymer chemistry. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Flory P. J. (1974). Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 57, 7-18.
- Foegeding E. A., and Hamann D. D. (1992). Physicochemical aspects of muscle tissue behaviour. *Physical Chemistry of Foods*. Eds: H. G. Schwartzberg and R. W. Hartel, (pp. 423-441). Marcel Dekker, New York, NY, USA.

Fox P. F. (2008). Milk: an overview *Milk Proteins. From Expression to Food*. Eds: A. Thompson, M. Boland and H. Singh, (pp. 1-54). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, UK.

Ganzevles R. A., Znoviadou K., vanVliet T., CohenStuart M. A., and deJongh H. H. J. (2006). Modulating Surface Rheology by Electrostatic Protein/ Polysaccharide Interactions. *Langmuir*, 22(24), 10089-10096.

German J. B., O'Neill T. E., and Kinsella J. E. (1985). Film forming and foaming behaviour of food proteins. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 62, 1358-1366.

Graham D. E., and Phillips M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403-414.

Grasselli M., Navarro del Cañizo A. A., Fernández Lahore H. M., Miranda M. V., Camperi S. A., and Cascone O. (1997). ¿Qué hacer con el suero de leche? *Ciencia Hoy*, 8(43), 12-17.

Grinberg V. Y., and Tolstoguzov V. B. (1972). Thermodynamic compatibility of gelatin and some D-glucans in aqueous media. *Carbohydrate Research*, 25, 313-320.

Grinberg V. Y., and Tolstoguzov V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11, 145-158.

Guimarães P. M. R., Teixeira J. A., and Domingues L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28 375-384.

Gunning A. P., Wilde P. J., Clark D. C., Morris V. J., Parker M. L., and Gunning P. A. (1996). Atomic force microscopy of interfacial protein films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 183, 600-602.

Halling P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 155-203.

Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., and McClements D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.

Haug I. J., Skar H. M., Vegarud G. E., Langsrud T., and Draget K. I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2287-2293.

Haynes C. A., and Norde W. (1994). Globular proteins at solid/ liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(6), 517-566.

Hermansson A. M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal American Oil Chemistry Society*, 56, 272-279.

Höhne G., Hemminger W., and Flammersheim H. F. (1996). Differential Scanning Calorimetry, An Introduction for Practitioners. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

- Huang B. X., Dass C., and Kim H. Y. (2004). Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1237-1247.
- Kilara A., and Vaghela M. N. (2004). Whey proteins. *Proteins in food processing*. Ed: R. Y. Yada, (pp. 72-99). Woodhead Publishing Limited & CRC Press, Cambridge, UK.
- Kim S. H. (1985). Structure, surface properties and foam stability of native, reduced and succinylated soy 11S globulins. Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Kim S. H., and Kinsella J. E. (1985). Surface activity of food proteins: relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 50, 1526-1530.
- Kinsella J. E. (1976). Functional properties of food proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.
- Kinsella J. E. (1982). Relationship between structure and functional properties of food proteins. *Food proteins*. Eds: P. F. Fox and J. J. Condon, (pp. 51). Applied Science Publishers, New York, NY, USA.
- Kinsella J. E., and Phillips L. G. (1989). Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behavior. *Food proteins*. Eds: J. E. Kinsella and W. G. Soucie, (pp. 52-77). AOCS, Champaign, IL, USA.
- Kobayashi K., Huang C., and Lodge T. P. (1999). Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules*, 32, 7070-7077.
- Kobylański J. R., Pérez O. E., and Pilosof A. M. R. (2004). Thermal transitions of gluten free doughs as affected by water, egg white and hydroxypropylmethylcellulose. *Thermochimica Acta*, 411, 81-89.
- Kondo T. (1993). Preparation of 6-O-alkyl celluloses. *Carbohydrate Research*, 238, 231.
- Kuwajima K., Ikeguchi M., Sugawara T., Hiroka Y., and Sugai S. (1990). Kinetics of disulfide bond reduction in α -lactalbumin by dithiotreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys6-Cys120 disulfide bond. *Biochemistry*, 29, 8240-8249.
- Kuwata K., Hoshino M., Forge V., Era S., Batt C. A., and Goto Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine beta-lactoglobulin A. *Protein Science*, 8, 2541-2545.
- Leckband D., and Israelachvili J. (1993). Molecular basis of protein function as determined by direct force measurements. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(6), 450-459.
- Lucassen-Reynders E. H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12, 1-12.
- MacRitchie F. (1978). Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, 32, 283-326.
- MacRitchie F. (1990). Chemistry at interfaces. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Maglic K. D., Cezairliyan A., and Peletsky V. E. (1984). Compendium of Thermophysical Property Measurement Methods (vol. 1). Plenum Press, New York, NY, USA.

- Maldonado Valderrama J. (2006). Caracterización interfacial de proteínas y tensioactivos: aplicación a dispersiones alimentarias. Ph.D. (pp. 296). Grupo de física de fluidos y biocoloides, Universidad de Granada. Granada, España.
- Mälkki Y., Heiniö R. L., and Autio K. (1993). Influence of oat gum, guar gum and carboxymethyl cellulose on the perception of sweetness and flavour. *Food Hydrocolloids*, 6(6), 525-532.
- Mangino M. E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2711.
- Mangino M. E. (1992). Gelation of whey protein concentrates. *Food Technology*, 46, 114-119.
- Mannheimer R. J., and Schechter R. S. (1970). An improved apparatus and analysis for surface rheological measurements. *Journal of Colloids and Interface Science*, 32, 195-211.
- Marchessault R. H., and Sundararajan P. R. (1983). Cellulose. *The Polysaccharides (vol. 2)*. Ed: G. O. Aspinall, (pp. 11). Academic Press, New York, NY, USA.
- Martínez K. D. (2007). Impacto de la hidrólisis enzimática de las proteínas de soja en sus propiedades interfaciales, de espumado y en la interacción con polisacáridos. Ph.D. (pp. 243). Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Martinez M. J., Fariás M. E., and Pilosof A. M. R. (2010). The dynamics of gelation of casein glycomacropptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. *International Dairy Journal*, in press.
- Mathot V. B. F. (1994). *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers*. Hanser Publishers, Munich, Alemania.
- McClements D. J. (1999). Interfacial properties and their characterization. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Ed: D. J. McClements, (pp. 127-160). CRC Press, Florida, FL, USA.
- McClements D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- McClements D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621-625.
- Miller R., Krägel J., Wüstneck R., Wilde P. J., Li J. B., Fainerman V. B., Loglio G., and Neumann A. W. (1998). Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/ water and oil/ water interfaces. *Nahrung*, 42(3-4), 225-228.
- Morr C., and Ha Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
- Mulvihill D. M., and Donovan M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.

- Murray B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 426-431.
- Nakai S., and Li-Chan E. (1993). Recent advances in structure and function of food proteins, QSAR approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 477-499.
- Ndi E., Swanson B., Barbosa-Canovas G., and Luedecke L. (1996). Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/ sodium polypectate gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 86-92.
- Neurath H., and Bull H. B. (1938). The surface activity of proteins. *Chemical Reviews*, 23, 391-435.
- Norde W., and Lyklema J. (1991). Why proteins prefer interfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2, 183-202.
- Oakenfull D., Pearce J., and Burley R. W. (1997). Protein Gelation. *Food Proteins and Their Applications* Eds: S. Damodaran and A. Paraf, (pp. 111-142). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Padday J. F. (1974). Sessile drop profiles: A comparison with Searle's equation for drop height. *Journal of Colloid and Interface Science*, 48(1), 170-171.
- Paulsson M., Hegg P. O., and Castberg H. B. (1985). Thermal stability of whey proteins studied by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 95(2), 435-440.
- Pérez A. A., Carrara C. R., Sánchez C. C., Santiago L. G., and Rodríguez Patino J. M. (2008). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/ polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, In Press, Accepted Manuscript.
- Pérez O. E., Carrera Sanchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2006a). Thermodynamic and Dynamic Characterization of Hydroxypropylmethylcellulose adsorved films at the air water interfase. *Biomacromolecules*, 7, 388-393.
- Pérez O. E., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 794-803.
- Pérez O. E., Wargon V., and Pilosof A. M. R. (2006b). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/ hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 966-974.
- Phillips L. G., Whitehead D. M., and Kinsella J. E. (1994a). Chapter 4: Structural and chemical properties of β -lactoglobulin. *Structure-function properties of food proteins*. Ed: S. L. Taylor, (pp. 75-106). Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Phillips L. G., Whitehead D. M., and Kinsella J. E. (1994b). Protein Films. *Structure-function properties of food proteins*. Eds: L. G. Phillips, D. M. Whitehead and J. E. Kinsella, (pp. 111-130). Academic press, San Diego, CA, USA.
- Phillips P. M. (1981). Protein Conformation at Liquid Interfaces and Its Role in Stabilizing Emulsions and Foams. *Food Technology*, 35, 50-58.

- Pilosof A. M. R. (2000). Gelificación. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Eds: A. M. R. Pilosof and G. B. Bartholomai, (pp. 75-95). Eudeba, Buenos Aires, Argentina.
- Pilosof A. M. R., Pérez O. E., Martínez K. D., Martínez M. J., Camino N. A., and Jara F. L. (2009). Valorización de proteínas del lactosuero por interacción con polisacáridos. *Funcionalidad de Componentes Lácteos*. Eds: J. Fontecha, I. Recio and A. M. R. Pilosof, (pp. 377-399). CEE Limencop S.L, Alicante, España.
- Polyakov V. I., Grinberg V. Y., and Tolstoguzov V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins. *Food Hydrocolloids*, 11, 171-180.
- Poole S., West S. I., and Fry J. C. (1987). Effects of basic proteins on the denaturation and heat gelation of acidic proteins. *Food Hydrocolloids*, 1, 301-316.
- Poole S., West S. I., and Walters C. L. (1984). Protein-Protein Interactions: Their Importance in Foaming of Heterogeneous Protein Systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 701-711.
- Prins A. (1999). Stagnant surface behaviour and its effect on foam and film stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 149, 467-473.
- Ramos-Sánchez M. C., Rodríguez-Torres A., Leal-Ojeda A., Martín-Gil F. J., and Martín-Gil J. (1991). Thermolytical techniques to characterize fungal polysaccharides and bacterial lipopolysaccharides. *Biotechnology Progress*, 7, 526-533.
- Relkin P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 565-601.
- Relkin P., Launay B., and Eynard L. (1993). Effect of sodium and calcium addition on thermal denaturation of apo α -lactalbumin: A differential scanning calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, 76, 36-47.
- Rey F., Chamorro O., Martín-Gil F. J., and Martín-Gil J. (1993). Characterization of fatty acid methyl esters by thermal analysis. *The Journal of Thermal Analysis*, 40, 463-473.
- Rodríguez Niño M. R. (1996). Estudio de películas de lípidos y proteínas sobre la interfase aire-medio acuoso. Ph.D. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Rodríguez Niño M. R., Carrera Sánchez C., and Rodríguez Patino J. M. (1999). Interfacial characteristics of β -casein spread films at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 161-173.
- Rodríguez Patino J. M., de la Fuente Fera J., and Gómez Herrera C. (1990). Monocapas de emulsionantes alimentarios. *Grasas y Aceites*, 41, 179-189.
- Rodríguez Patino J. M., Rodríguez Niño M. R., and Carrera Sánchez C. (2002). Propiedades funcionales de lípidos y proteínas de interés para la formulación de dispersiones alimentarias. *Proteínas y Polisacáridos como ingredientes funcionales*. Eds: M. C. Añón and A. M. R. Pilosof, (pp. 11-28). Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata, Argentina.

- Rorrer G. L., and Hawley M. C. (1993). Vapor-phase HF solvolysis of cellulose modification of the reversion oligosaccharide distribution by in situ methanolysis. *Carbohydrate Polymers*, 22(1), 9.
- Ruegg M., Moor V., and Blanc B. (1977). A calorimetric study of thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *Journal of Dairy Research*, 44, 500-520.
- Sarkar N., and Walker L. C. (1995). Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 27, 177-185.
- Sawyer L., Brownlow S., Polikarpov I., and Wu S.-Y. (1998). β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, 8, 65-72.
- Schaller A. (2009). "Sueros de lechería. Cadenas Alimentarias".
http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_44/cadenas/Lacteos_sueros_lecheria.html.
- Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., and Hardy J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schokker E. P., Singh H., and Creamer L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 10, 843-853.
- Semenova M. G. (1996). Factors determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. *Macromolecular Interactions in Food Technology*. Eds: N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer and J. Pearce, (pp. 37-49). American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Skoog D. A., Holler F. J., and Nieman T. (1998). Principles of Instrumental Analysis (5th edition), (pp 905-908). Saunders College Publishing, Philadelphia, PA, USA.
- Smithers G. W. (2008). Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.
- Stading M., and Hermansson A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin structures. *Food Hydrocolloids*, 4(2), 121-135.
- Syrbe A., Fernandes P. B., Dannenberg F., Bauer W., and Klostermeyer H. (1995). Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its applications. *Food Colloids and Macromolecules*. Eds: E. Dickinson and D. Lorient, (pp. 328-339). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Thomä-Worringer C., Sørensen J., and López Fandiño R. (2006). Health effects and technological features of caseinomaclopeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Timasheff S. N., Townend R., and Mescanti L. (1966). The optical rotatory dispersions of the β -lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 1863-1870.
- Tolstoguzov V. (1997a). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, 11, 159-170.
- Tolstoguzov V. B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. *Functional properties of food macromolecules*. Eds: J. R. Mitchell and D. A. Ledward, (pp. 385-411). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.

- Tolstoguzov V. B. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. *Gums and stabilisers for the food industry*. Eds: G. O. Phillips, P. A. Williams and D. J. Wedlock, (pp. 157-175). IRL Press, Oxford, UK.
- Tolstoguzov V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.
- Tolstoguzov V. B. (1997b). Protein-polysaccharide interactions. *Food proteins and their applications*. Eds: S. Damodaran and A. Paraf, (pp. 171-198). Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Tolstoguzov V. B. (2001). Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food and beverages. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2), 89-174.
- Tolstoguzov V. B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Tolstoguzov V. B., Grinberg V., and Gulov A. (1985). Some physicochemical approaches to the problem of protein texturisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 151-159.
- Tornberg E. (1978a). The application of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 64, 391-402.
- Tornberg E. (1978b). The interfacial behaviour of three food proteins studied by the drop volume technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 762-776.
- Townend R., Herskovits T. T., Swaisgood H. E., and Timasheff S. N. (1964). The solution properties of β -lactoglobulin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(12), 4196-4201.
- Tsarkova L. A., Protsenko P. V., and Klein J. (2004). Interactions between Langmuir-Blodgett polymer monolayers studied with the surface force apparatus. *Colloid Journal*, 66(1), 84-94.
- Turgeon S. L., Schmitt C., and Sanchez C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 166-178.
- Vanhooren A., Vanhee K., Noyelle K., Majer Z., Joniau M., and Hassens I. (2002). Structural basis for difference in heat capacity increments for Ca^{2+} binding to two α -lactalbumins. *Biophysical Journal*, 82, 407-417.
- Verheul M., Pedersen J. S., Roefs S. P. F. M., and de Kruif K. G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Bipolymers*, 49, 11-20.
- Walkenstrom P., Panighetti N., Windhab E., and Hermansson A. M. (1998). Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids*, 12, 469-479.
- Walstra P. (1996). Dispersed systems: basic considerations. *Food Chemistry*. Ed: O. R. Fenema, (pp. 95-155). Marcel Dekker, New York, NY, USA.

Wilde P. J. (2000). Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 176-181.

Wilde P. J., and Clark D. C. (1996). Foam formation and stability. *Methods of testing protein functionality*. Ed: G. M. Hall, (pp. 110-152). Blakie Academic & Professional, London, UK.

Zasykin D. V., Dumay E., and Cheftel J. C. (1996). Pressure and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/ xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, 10, 203-211.

Capítulo II

Efecto de la separación de fases en las transiciones térmicas de sistemas mixtos deshidratados

2.1. Introducción.

Las proteínas y polisacáridos son los biopolímeros típicos presentes en los alimentos y productos farmacéuticos (Roos y Karel, 1991). El secado es el método más común para la estabilización de dichos productos. Por lo tanto, estos biopolímeros se presentan con frecuencia en un estado amorfo vítreo (estado de no-equilibrio termodinámico). Así, con el tiempo y los cambios de temperatura y humedad podrán sufrir alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas.

Mezclas amorfas vítreas de proteína y polisacárido pueden producirse a partir de soluciones acuosas de estos biopolímeros por secado spray o por liofilización. Generalmente, estas soluciones mixtas no son termodinámicamente estables, si el pH es mayor al punto isoeléctrico (pI) de la proteína; por lo tanto, luego de la preparación, suelen separarse en dos fases debido a un fenómeno de incompatibilidad termodinámica.

Esta segregación previa al secado puede influir en las propiedades de la mezcla deshidratada. Dicho fenómeno de segregación es el resultado de barreras entálpicas y entrópicas causadas por el tamaño y la incompatibilidad química de los diferentes biopolímeros (Icoz y col., 2005). Por encima del pI de la proteína la incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos se da generalmente a causa de la repulsión electrostática y la diferencia de afinidad hacia el agua de cada uno de los biopolímeros. Entonces, en estas condiciones, cuando se alcanza una concentración crítica de biopolímeros se produce la separación de fases a nivel macroscópico.

Por otra parte, las propiedades de las fases separadas quedan determinadas por su composición, por la morfología de los micro-dominios biopoliméricos dentro de dichas fases segregadas, y por el efecto de la energía libre de superficie de la interfase.

Existen varias técnicas para caracterizar la microestructura de las fases separadas, incluidas algunas técnicas de microscopía. Tromp y col. (2001) demostraron que la microscopía láser de barrido confocal (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy) es una técnica muy potente para caracterizar la morfología de las fases separadas de mezclas biopoliméricas.

La transición vítrea es una característica de los materiales en estado amorfo y/o gomoso, que controla su procesabilidad, propiedades y estabilidad.

Como se mencionó en la sección “Introducción”, la transición vítrea es una pseudotransición termodinámica propia de los materiales amorfos vítreos. Así, la temperatura de transición vítrea (T_g) se puede entender de forma bastante simple como la temperatura en la que el material deja de ser vítreo, pasando al estado amorfo gomoso.

Desde un punto de vista más estricto, la T_g no tiene un valor único, sino que ocurre en un rango de temperaturas que está determinado por la heterogeneidad del sistema (Bosma y col., 1988; Ferry, 1980). Dicha heterogeneidad, en una mezcla deshidratada, está determinada principalmente por las propiedades físicas de los polímeros que la componen, así como las interacciones entre ellos dadas en la mezcla acuosa, es decir, el comportamiento de la separación de fases.

El estudio de mezclas donde los biopolímeros resultan inmiscibles han revelado con frecuencia, la existencia de dos T_g s: una correspondiente a cada biopolímero (Kalichevsky y Blandshard, 1992; Zimeri y Kokini, 2003). En contraste, en mezclas donde los polímeros son perfectamente compatibles aparece una única T_g cuyo valor se encuentra entre los correspondientes a las T_g s de los componentes individuales (Hale y Blair, 1997; Hartikainen y col., 2004; Icoz y col., 2005).

Por lo tanto, la comprensión de la relación entre la separación de fases de una mezcla acuosa proteína/polisacárido y las propiedades térmicas de la mezcla deshidratada, tiene una gran importancia para el desarrollo de alimentos y biomateriales con propiedades funcionales específicas.

2.2. Objetivo.

Relacionar el tipo de morfología y grado de separación de fases en mezclas acuosas de proteína/polisacárido incompatibles, con las propiedades térmicas de la mezcla correspondiente deshidratada. Como modelo se utilizó una mezcla de un concentrado de proteínas de lactosuero e hidroxipropilmetilcelulosa.

2.3. Materiales y Métodos.

2.3.1. Materiales.

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se utilizó una hidroxipropilmetilcelulosa comercial denominada Methocel[®] E4M, gentilmente donada por Colorcon-Argentina, representantes argentinos de Dow Chemical Company. Esta HPMC de calidad alimentaria fue usada sin purificación posterior. Según el proveedor, este derivado celulósico tiene un 25 % de grupos metilo, un 10 % de grupos hidroxipropilo, siendo el relación metilo/hidroxipropilo, 2,8%; su peso molecular es de 90 kDa; contenido de humedad, 1,6%. La viscosidad de una solución acuosa de este polímero al 2% p/v y a 20°C es de 5000 mPa.s.

Concentrado de proteínas del suero lácteo (WPC). Se utilizó un concentrado de uso comercial denominado, WPC80. Este producto en polvo fue provisto por Milka Frank-Santa Fe, Argentina. De acuerdo con lo reportado por Pérez y col. (2006), su composición (% p/p) fue la siguiente: 78,9% de proteínas totales, determinado por el método de Kjeldhal (Nx6,25) AOAC (1995), lactosa 5%, grasa 6%, cenizas 4,3% y 5,6% de humedad.

Otros reactivos químicos. Se utilizaron en grado analítico.

2.3.2. Preparación de soluciones madres y mezclas acuosas.

Se prepararon soluciones madres de WPC80 y E4M al 40% y 4% p/p, respectivamente. Ambas soluciones fueron preparadas en agua destilada. Cada polvo se pesó en una balanza analítica (VXI, Modelo 60/220, PCE Grupo Ibérica S. L., Tobarra, España). En el caso del WPC, el polvo fue dispersado en agua destilada a temperatura ambiente (25°C), con agitación durante 4 hs (agitador magnético modelo C-MAG HS7, IKA[®], Wilmington, NC, USA) para permitir la completa disolución del polvo. Después de la preparación, esta solución se almacenó en heladera (4°C).

La solución de HPMC se preparó dispersando el polvo en agua destilada a 85 °C, con agitación manual para permitir la disolución completa del polvo.

Luego, se enfrió la solución a temperatura ambiente (25 °C) mediante baño en agua, y se agregó la masa de agua perdida por evaporación. Por último, esta solución se almacenó en heladera a 4 °C por 24 hs para permitir que el polisacárido alcance el máximo grado de hidratación.

Antes de los experimentos, ambas soluciones madres fueron llevadas a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un baño termostático (modelo MASSON II, Vicking SRL, Buenos Aires, Argentina).

En base al diagrama de fases para el sistema mixto WPC80/E4M (Pérez y col., 2006) (Figura 2.1) se seleccionaron diferentes mezclas (condiciones de mezclado ver sección 3.3.3 Capítulo III), exhibiendo separación o no de las fases: WPC 12%/HPMC 2% y WPC 20%/HPMC 3% (por encima de la curva binodal) y WPC 6%/HPMC 1% (por debajo de la curva binodal). Estos sistemas se prepararon mezclando proporciones adecuadas de las soluciones madres de WPC y HPMC, para obtener las concentraciones finales antes mencionadas. El pH de las mezclas fue de 6 (medidor pH, modelo A920, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA), el cual fue posteriormente ajustado solamente en la mezcla WPC 12%/HPMC 2%, a valores de pH 5 y 3 con una solución de HCl 0,1 M.

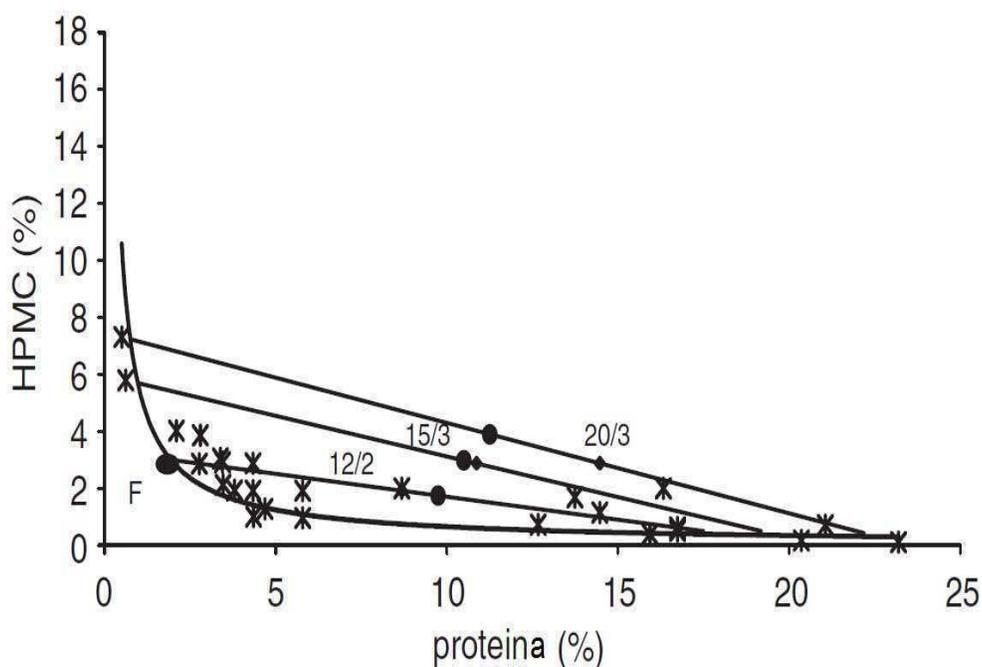


Figura 2.1. Diagrama de fases para el sistema mixto WPC80/E4M (a 25°C y pH 7).

Adaptado de Pérez y col. (2006).

2.3.3. Preparación de las mezclas deshidratadas.

Los sistemas mixtos deshidratados en estado amorfo se obtuvieron por un proceso de liofilización de 48 hs a temperatura y presión de operación de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100 mmHg , respectivamente (liofilizador modelo Stokes 24 PV, American Lyophilizer Inc.). Luego, las muestras se colocaron en una estufa de vacío a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 días en presencia de CaCl_2 para eliminar cualquier residuo de agua.

Soluciones de los componentes puros (WPC y E4M) a la concentración correspondiente, también se sometieron al mismo proceso para determinar la T_g de cada biopolímero deshidratado.

Para obtener las mezclas deshidratadas con diferentes grados de separación de fases, cada mezcla bifásica fue congelada con nitrógeno líquido para arrestar el fenómeno de segregación en forma inmediata, antes del proceso de liofilización. Para las mezclas WPC 12 %/HPMC 2% y WPC 20 %/HPMC 3% la separación de fases fue detenida a tres tiempos diferentes: (i) inmediatamente después de la mezcla de los biopolímeros, (ii) 30 minutos después de la mezcla, y (iii) después de la centrifugación (ver condiciones en sección 3.3.4 Capítulo III),, es decir, cuando se alcanzó la separación total de las dos fases.

2.3.4. Cinética de la separación de fases de las mezclas acuosas.

En mezclas acuosas de WPC 20%/HPMC 3% a pH 6,5 y WPC 12 %/HPMC 2% a pH 5 y 6, se determinó la cinética de separación de fases a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), colocando 10 ml del sistema mixto en un tubo graduado y midiendo el aumento del volumen de la fase inferior (rica en WPC) en función del tiempo.

Finalmente, se registró el máximo volumen alcanzado por la fase inferior (V_{max}), y se determinó el grado de separación de fases como la relación $(V_{\text{FI}}/ V_{\text{max}}) \cdot 100$, donde V_{FI} es el volumen de la fase inferior a un determinado tiempo de separación de fases.

2.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry).

Para el análisis térmico se utilizó un calorímetro diferencial de barrido modelo DSC 822 de METTLER-Toledo equipado con el software de análisis STARe versión 6.1.

El instrumento se calibró con indio y zinc. Cada muestra se calentó a una velocidad de 10 °C/min, desde una temperatura inicial de 5 °C hasta una temperatura final de 220 °C.

Luego, se enfrió la muestra con la misma velocidad llevándola hasta la temperatura inicial, para comenzar con un segundo barrido de calentamiento. Este procedimiento tiene como objeto eliminar diferencias entre las muestras debidas al tratamiento para obtener los materiales deshidratados, es decir, eliminar su “historia térmica”.

La temperatura de transición vítrea se registró como el punto medio de las discontinuidades en la curva de flujo de calor (Φ) en función de la temperatura (T). La temperatura de “onset” y “enset” corresponden a las temperaturas donde comienza y finaliza, respectivamente, dicha discontinuidad en el flujo de calor (Figura 2.2).

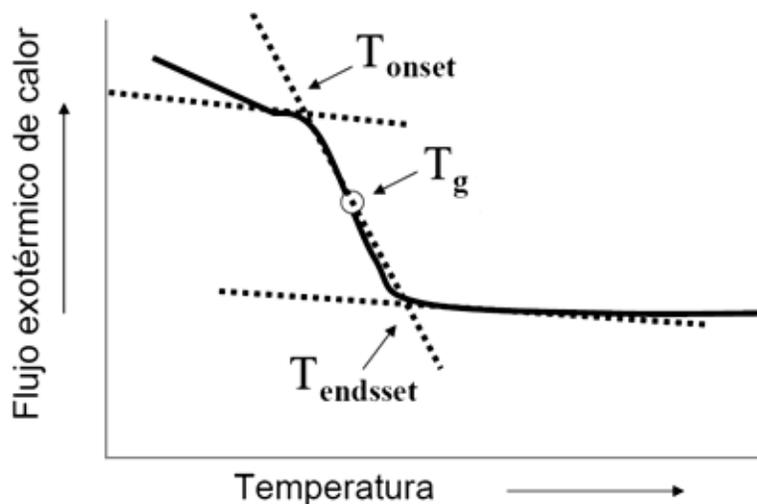


Figura 2.2. Esquema del flujo de calor en función de la temperatura obtenido en un barrido de DSC. Se visualiza como se determinan las temperaturas de “onset”, “enset” y de transición vítrea, en el pasaje de la muestra del estado “vítrea” al “gomoso”.

Los experimentos se realizaron al menos por duplicado en cápsulas de aluminio con una capacidad de 40 μl (Mettler-Toledo), las cuales se cargaron con una masa de 10 a 15 mg de muestra seca.

El procedimiento de carga de las cápsulas se realizó con una electro-banza modelo AG245 de Mettler-Toledo (precisión, $\pm 0,01$ mg). Como referencia térmica se utilizó una cápsula vacía.

2.3.6. Microscopía láser de barrido confocal (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy).

La técnica de microscopía confocal (CSLM) es una potente técnica que proporciona información extremadamente valiosa sobre la microestructura de los materiales alimenticios (Blonk y Aalst, 1993; Brooker, 1995; Smart y col., 1995; Vodovotz y col., 1996). Las imágenes proporcionadas por esta técnica resultan mucho más clarificadoras que las obtenidas por microscopía óptica convencional. Sin embargo, la mayor ventaja de esta técnica es que no es invasiva y permite la generación de imágenes tridimensionales de la estructura de los materiales.

La técnica consiste en centrar uno o varios haces de luz láser (de diferentes longitudes de onda) en un punto particular del sistema analizado, excitando uno o más componentes de la muestra, mientras que los detectores miden la intensidad de la luz emitida por dichos componentes. De esta manera, se van generando imágenes bidimensionales al realizar mediciones en diferentes puntos de un plano x-y, y luego se combinan las mediciones de cada punto (barrido horizontal). Esto puede realizarse de dos maneras, o bien moviendo la muestra y manteniendo el láser estacionario, o bien moviendo dicho láser y manteniendo la muestra estacionaria (método más utilizado). Luego, las imágenes tridimensionales se obtienen combinando distintas imágenes bidimensionales x-y, obtenidas al centrar el haz láser a diferentes profundidades en la muestra (Figura 2.3).

Para la observación de la microestructura de sistemas con varios componentes puede aprovecharse la fluorescencia intrínseca de determinados materiales, o bien usar marcadores fluorescentes que se unen selectivamente a

componentes específicos (por ejemplo, proteínas, lípidos, o polisacáridos) (Haugland, 1992).

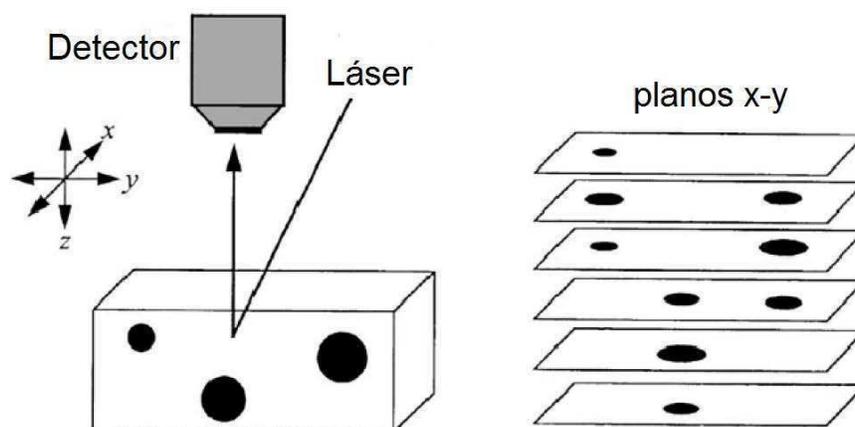


Figura 2.3. Esquema de la técnica de microscopía confocal (CSLM), adaptado de Haugland (1992). Un haz de láser escanea la muestra dentro de plano x-y particular. Mediante la combinación de sucesivos planos x-y, es posible crear una imagen tridimensional.

En este trabajo, mediante esta técnica de microscopía, se obtuvieron imágenes de las fases separadas en mezclas acuosas de WPC/HPMC, con un equipo de microscopía confocal modelo Olympus FV300 CLSM (microscopio vertical modelo Olympus BX61; fuente Ar/HeNe de luz láser de fotón). Se utilizaron los objetivos Olympus UplanFI 10X/0.3NA/medio seco y UplanFI 10X/0.5NA/medio seco.

Previamente al análisis microscópico, la proteína en la muestra se marcó en forma no-covalente con una solución al 10% del fluoróforo rodamina B (longitud de onda excitación y de emisión, 560 y 625 nm, respectivamente). Las imágenes digitales se almacenaron en archivos con formato múlti.tif, a resoluciones de 1024x1024 y 512x512 píxeles.

2.3.7. Análisis estadístico.

Los datos de temperatura de transición vítrea obtenidos para los distintos replicados se promediaron e informaron como una media y un desvío estándar. Para la determinación de estos parámetros estadísticos se utilizó el software Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA).

2.4 Resultados y discusión.

2.4.1 Separación de fases en mezclas acuosas y temperatura de transición vítrea (T_g) de los sistemas deshidratados.

2.4.1.1. T_g de cada biopolímero deshidratado.

Las curvas DSC (termogramas) para cada biopolímero individual deshidratado se muestran en la Figura 2.4 a-b.

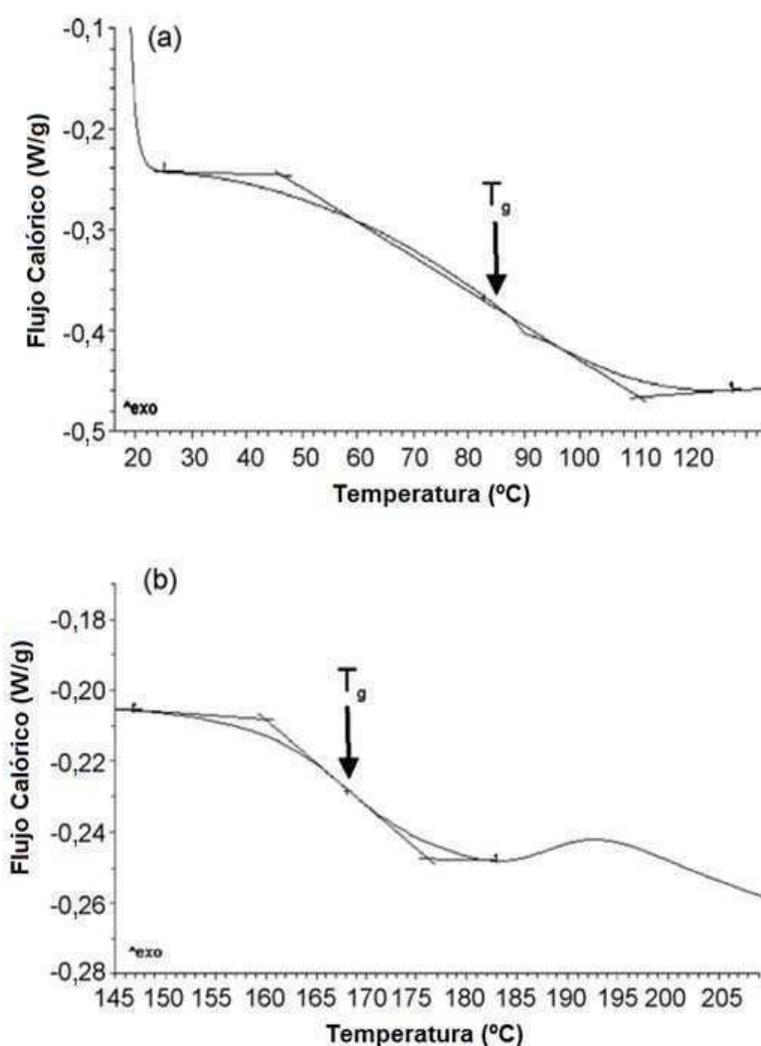


Figura 2.4. Termogramas obtenidos por DSC de los biopolímeros individuales, WPC (a) y HPMC (b). Las flechas indican la T_g . (^exo indica el sentido exotérmico del flujo calórico).

Puede verse el cambio endotérmico en el flujo calórico que ocurre a la T_g, lo que indica el paso del estado amorfo vítreo al estado gomoso del material.

Las T_gs determinadas por el análisis térmico figuran en el Tabla 2.1. El valor de T_g para la E4M deshidratada fue de aproximadamente 168 °C, el cual está en el orden de valores (162 a 168 °C) previamente reportados en literatura para esta HPMC en estado anhidro (Cilurzo y col., 2002; McPhillips y col., 1999).

Con respecto al WPC deshidratado, presentó un valor aproximado de T_g de 85°C (Tabla 2.1). Burin y col. (2000) determinaron valores de T_g entre 80 y 85 °C para polvos deshidratados de lactosuero. Jouppila y Roos (1994) y Karmas y col. (1992), reportaron valores de T_g para leche descremada y sistemas formulados en base a lactosa, respectivamente, que están dentro del mismo orden mencionado. La similitud entre los valores de T_g para el suero lácteo y los sistemas formulados con lactosa sugiere que es este disacárido el que rige la transición vítrea de los sistemas lacto séricos, o bien que la lactosa y las proteínas lactoséricas pueden existir en diferentes fases, siendo detectable por DSC la fase rica en lactosa (Jouppila y Roos, 1994).

Tabla 2.1. Valores de T_g experimentales determinados para el WPC y HPMC.

Biopolímero	T _{g_e} (°C)
HPMC (anhidro)	167,7 ± 0,7
WPC (anhidro)	84,8 ± 1,5

T_{g_e}: valor experimental de temperatura de transición vítrea.

2.4.1.2. T_g de mezclas deshidratadas obtenidas a partir de mezclas acuosas sin separación de fases.

La Figura 2.5 a-b muestra las curvas de DSC correspondientes a las mezclas deshidratadas, WPC 6%/HPMC1% a pH 6 y WPC 12%/HPMC 2% a pH 3, respectivamente. En ambos casos se obtuvo una sola T_g. Esto era de esperar ya que ninguna de estas mezclas acuosas mostró una separación de fases macroscópica (Figura 2.6 a-b).

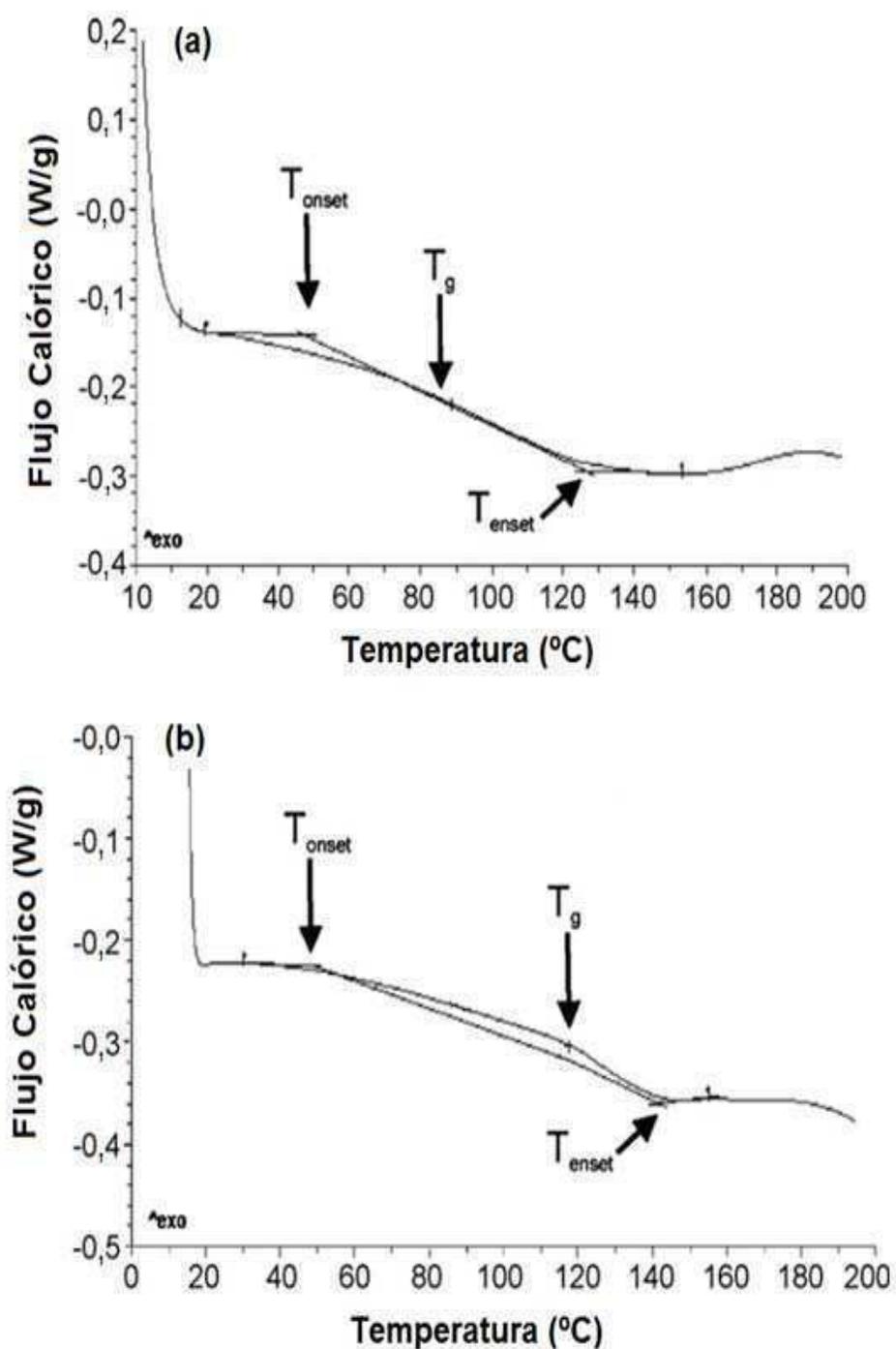


Figura 2.5. Curvas de DSC para mezclas deshidratadas obtenidas por liofilización de mezclas sin separación de fases. (a) WPC 6%/HPMC 1% a pH 6; (b) WPC 12%/HPMC 2% a pH 3.

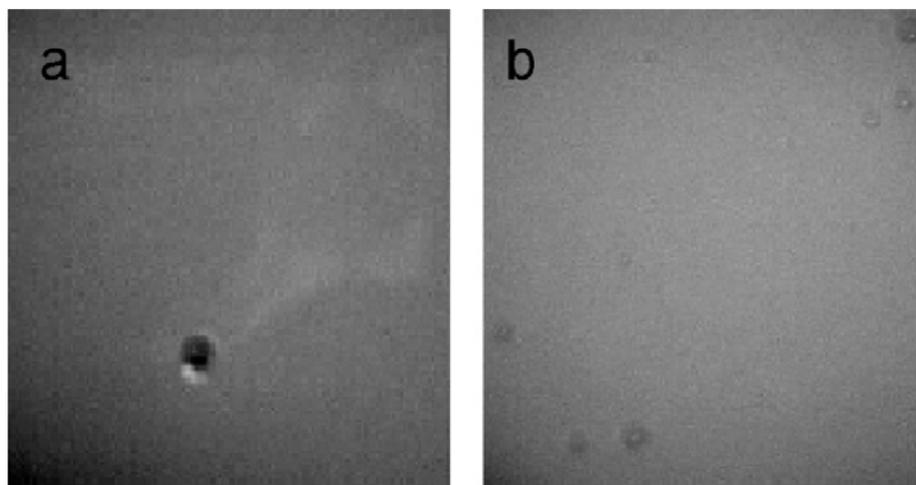


Figura 2.6. Visualización de mezclas WPC/HPMC sin separación de fases, obtenidas inmediatamente después del proceso de mezclado. (a) WPC 6 %/HPMC 1% a pH 6; (b) WPC 12%/HPMC 2% a pH 3 (aumento: ojo desnudo).

Varios modelos matemáticos han sido desarrollados para relacionar la dependencia de la T_g de una mezcla polimérica termodinámicamente compatible, con su composición. Una de las ecuaciones más utilizadas es la desarrollada por Couchman y Karasz (C-K):

$$T_g = \frac{W_1 T_{g1} + (\Delta C_{p2} / \Delta C_{p1}) W_2 T_{g2}}{W_1 + (\Delta C_{p2} / \Delta C_{p1}) W_2} \quad (1)$$

donde T_g es la temperatura de transición vítrea de la mezcla, T_{g1} y T_{g2} son las temperaturas de transición vítrea de los polímeros individuales, W_1 y W_2 son las fracciones en peso de cada uno de los polímeros, y finalmente, ΔC_{p1} y ΔC_{p2} corresponden a los cambios en la capacidad calorífica que ocurren durante la transición vítrea de cada polímero (Couchman y Karasz, 1978).

Los valores ΔC_p para cada polímero individual, así como también las T_g s experimentales y predichas mediante la ecuación C-K para las mezclas deshidratadas provenientes de soluciones acuosas binarias compatibles, se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Temperatura de transición vítrea determinada para los biopolímeros individuales anhidros y sus mezclas deshidratadas obtenidas a partir de sistemas acuosos binarios sin separación de fases.

Muestra	T _{g_e} (°C)	ΔC _p (J/g °K)	T _{g_{c-k}} (°C)
HPMC (anhidro)	167,7 ± 0,7	0,25 ± 0,01	
WPC (anhidro)	84,8 ± 1,5	1,02 ± 0,02	
WPC/HPMC 6/1 pH 6 (anhidro)	82,4 ± 1,5		87,5
WPC/HPMC 12/2 pH 3 (anhidro)	117,3 ± 1,2		87,5

T_{g_e}: valor experimental de temperatura de transición vítrea.

T_{g_{c-k}}: temperatura de transición vítrea predicho mediante la ecuación Couchman y Karasz (1).

Puede observarse que los valores de T_g para las mezclas deshidratadas WPC 6%/HPMC 1% a pH 6, y WPC 12%/HPMC 2% a pH 3, fueron de 82,4 y 117,3 °C, respectivamente. Por otra parte, también puede observarse que el valor de T_g estimado con la ecuación de Couchman Karasz fue 87.5 °C, para ambos sistemas. Por lo tanto la mezcla deshidratada WPC 6%/HPMC 1% de pH 6, muestra que el valor de T_g experimental y el estimado se encuentran en el mismo orden (82,4 y 87,5 °C), lo cual era de esperarse dado que este sistema anhidro deriva de una mezcla acuosa homogénea.

En el caso de la mezcla deshidratada WPC 12 %/HPMC 2% a pH 3 puede observarse que existe una gran desviación entre el valor experimental y el predicho de T_g (117,3 y 87,5 °C, respectivamente). Sin embargo, en un sistema bipolimérico deshidratado, la amplitud de la región del termograma donde ocurre la transición vítrea, definida como la diferencia entre las temperaturas de onset y endset (comienzo y fin de la alteración de la línea de base del flujo calórico, respectivamente), resulta proporcional a la compatibilidad de los polímeros en solución.

Song y col. (1996), con base empírica, sugirieron la siguiente relación aproximada para la amplitud de la transición vitrea:

$$\Delta T_{g_p} \approx \frac{W_1 \Delta T_{g_1} + W_2 \Delta T_{g_2}}{\Delta T_{g_2}} \quad (2)$$

donde W_1 y W_2 son las fracciones en peso de los polímeros 1 y 2, respectivamente, mientras que ΔT_{g1} y ΔT_{g2} corresponden a las amplitudes de la región de transición vítrea de dichos polímeros 1 y 2. Estos mismos autores también propusieron una cuantificación de la desviación (δT_g) entre la amplitud de transición vítrea obtenida experimentalmente, y la estimada con la ecuación 2. La relación es la siguiente:

$$\delta T_g = \Delta T_{g_e} - \Delta T_{g_p} \quad (3)$$

donde ΔT_{g_e} corresponde al valor de amplitud de transición vítrea experimental, y ΔT_{g_p} es el valor estimado mediante la ecuación (2). Un par de polímeros compatibles tiene un valor de δT_g cercano a cero, mientras que una compatibilidad parcial da como resultado valores de δT_g que van de 10 a 40 °C aproximadamente (Song y col., 1996).

La Tabla 2.3 muestra valores de la desviación δT_g calculados para las mezclas secas WPC 6%/HPMC 1% y WPC 12 %/HPMC 2% a pH 6 y 3, respectivamente. Según estos valores, puede verse claramente que en la primera de dichas mezclas los biopolímeros resultan compatibles, mientras que en la segunda existe una compatibilidad parcial entre ellos.

Tabla 2.3. Desviación (δT_g) para mezclas deshidratadas derivadas de soluciones binarias sin separación de fases macroscópica.

Muestra	ΔT_{g_e} (°C)	ΔT_{g_p} (°C)	δT_g (°C)
WPC/HPMC 6/1 pH 6 (anhidro)	75	74	1
WPC/HPMC 12/2 pH 3 (anhidro)	93	74	19

ΔT_{g_e} : es la diferencia entre los valores experimentales de las temperaturas de onset y endset registrados por DSC durante la transición vítrea.

δT_g , ΔT_{g_p} : son los parámetros de miscibilidad calculados utilizando las ecuaciones desarrolladas por Song y col. (1996).

Se sabe que mezclas de poliepiclorhidrina con polimetacrilato de metilo no son compatibles, aunque una manipulación en la separación de las fases puede dar

lugar a una estructura temporalmente homogénea resultado de un bloqueo cinético (Shultz y Young, 1980).

Por otra parte, mezclas parcialmente compatibles de polimetacrilato de metilo y poliestireno contienen dominios submicronicos heterogéneos, resultando las propiedades del material, por ejemplo la temperatura transición vítrea, sensibles a dicha separación de fases microscópica (Woo y Fan, 1999).

Por lo tanto, la compatibilidad parcial de la mezcla deshidratada WPC 12 %/HPMC 2% de pH 3 podría resultar de una separación de fases microscópica, dando lugar a un sistema pseudo-homogéneo, resultando en una única fase aparente la cual muestra una sola Tg, pero que se desvia del valor teórico estimado por la ecuación (2).

2.4.1.3. Tg de mezclas deshidratadas derivadas de mezclas acuosas con separación de fases: efecto del grado de separación de fases.

La separación de fases de la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% de pH 6 se arrestó a tres tiempos diferentes:

- i) Inmediatamente después del mezclado de los biopolímeros.
- ii) 30 minutos después de dicho proceso de mezcla.
- iii) Luego de un proceso de centrifugación, para lograr la separación completa de las dos fases.

Las curvas de DSC obtenidas para muestras deshidratadas en los casos i), ii) y iii) se muestran en la Figura 2.7a-c, mientras que los correspondientes valores de Tg obtenidos del análisis térmico se agrupan en la Tabla 2.4.

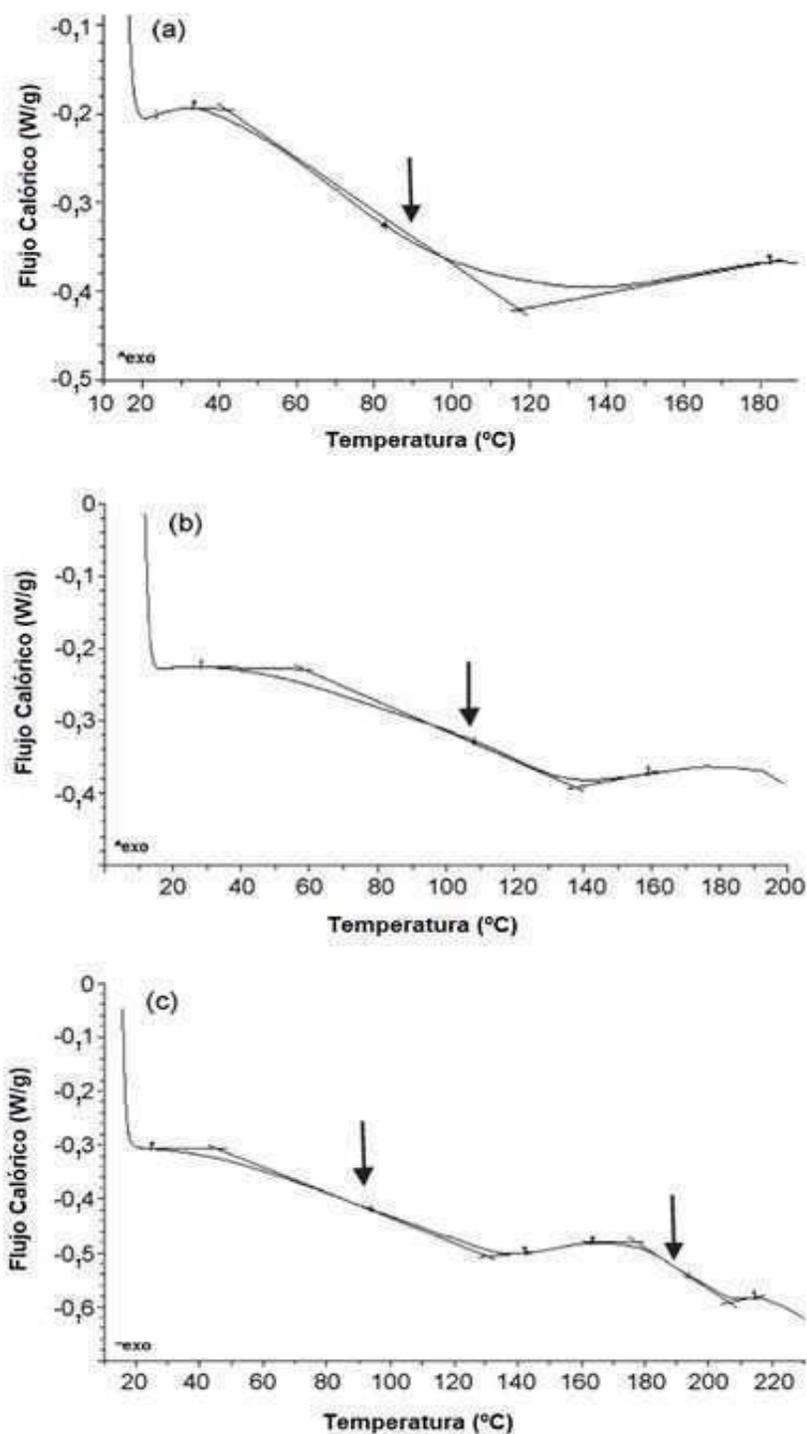


Figura 2.7. Termogramas obtenidos por DSC para la mezcla deshidratada WPC 12 %/E4M 2% a pH 6, cuando la separación de fases del correspondiente sistema binario acuoso fue arrestada, (i) inmediatamente después del mezclado de los biopolímeros (a), (ii) 30 minutos después de dicho proceso de mezcla (b), y (iii) luego de la centrifugación (separación completa de las fases) (c). Las flechas indican la Tg. (^exo indica el sentido exotérmico del flujo calórico).

Tabla 2.4. Valores de Tg para mezclas deshidratadas WPC 12%/HPMC 2% de pH 6 obtenidas a partir de soluciones binarias con distintos grados de separación de fases.

Muestra	tiempo (min)	Tg (°C)	Tg _{C-K} (°C)	V _{FI} /V _{max} (%)
	0	91,4 ± 1,8		0
WPC/HPMC12/2 pH 6 (anhidro)	30	113,6 ± 0,9	87,5	44
	Centrifugado	94,7 ± 2,3 193,2 ± 1,0		100

Tg_{C-K}: valor de Tg estimado con la ecuación Couchman-Karasz (1)

V_{FI}/V_{max} (%): es una medida del grado de separación de fases del sistema acuoso bipolimérico.

Esta solución binaria acuosa (WPC 12%/HPMC 2%; pH 6) presentó una separación de fases macroscópica (ojo desnudo) inmediatamente después del proceso de mezcla, como puede observarse en la Figura 2.8. Sin embargo, cuando esta fue deshidratada exhibió un único valor de Tg de 91,4 °C, levemente desviado del valor estimado para este sistema mixto mediante la ecuación de Couchman y Karasz (87,5 °C).

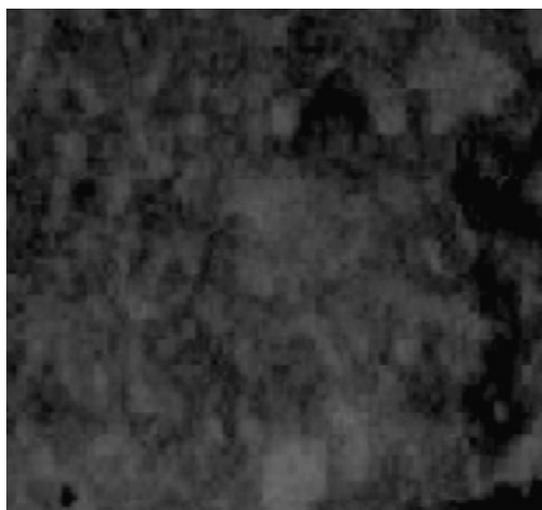


Figura 2.8. Visualización de la mezcla WPC 12%/HPMC2% a pH 6. Puede observarse la separación de fases inmediatamente luego del proceso de mezclado (aumento: ojo desnudo).

Ahora bien, cuando la separación de fases de la mezcla acuosa se detuvo 30 minutos después del proceso de mezcla de los biopolímeros, el sistema mixto deshidratado presentó también una sola Tg de 113,6 °C. Por otra parte, como era esperable se observaron dos valores de Tg, 94,7 °C y 193,2 °C, cuando la mezcla deshidratada provenía de una solución binaria completamente separada en dos fases. Sin embargo, estos valores resultaron superiores a los correspondientes valores de Tg de los biopolímeros deshidratados puros (Tabla 2.1).

En la Figura 2.1 se mostró el diagrama de fases para el sistema mixto WPC/HPMC (Pérez y col., 2006). Según este, la fase rica en proteína del sistema acuoso bifásico WPC 12%/HPMC 2% contiene un 0,62 % de HPMC. Por lo tanto, el aumento en el valor de Tg de esta fase deshidratada (94,7 °C) con respecto al valor del WPC puro anhidro (84,8 °C), puede explicarse por esta cantidad remanente de HPMC.

En cuanto a la fase rica en HPMC en la mezcla deshidratada, uno podría plantear la ocurrencia de un fraccionamiento molar de la HPMC durante la separación de fases debido a su alto grado de polidispersidad. Suele ocurrir que los polímeros derivados de la celulosa no presentan un único peso molecular sino un rango o peso molecular promedio (es decir son polidispersos con respecto a su masa molar). Además, cabe destacar que todos los éteres celulósicos de la línea METHOCEL[®] presentan un rango altamente heterogéneo en la naturaleza y longitud de su cadena carbonada, debido a que durante el proceso de manufactura de los mismos se produce una distribución estocástica de la sustitución y secuencia de los isómeros (Keary, 2001).

Por lo tanto, esta característica de polidispersidad de la HPMC daría lugar a un fraccionamiento molar durante la separación de fases, resultando en una distribución asimétrica de las distintas fracciones molares del polisacárido en las dos fases coexistentes. Este fenómeno ya ha sido observado en mezclas de maltodextrina y agarosa por Loret y col. (2005), quienes demostraron que la separación de fases conllevó a un fraccionamiento molar de la maltodextrina debido al alto grado de polidispersidad de este biopolímero. Entonces, teniendo en cuenta este fraccionamiento molar diferencial de la HPMC, es lógico pensar que las distintas fracciones de este biopolímero no tengan el mismo grado de compatibilidad con el WPC. Así, las fracciones de

mayor peso molecular se concentrarían en la fase rica en HPMC de la mezcla deshidratada, llevando el valor de su T_g (193,2 °C) por encima de valor de E4M puro anhidro (167,7 °C). Siguiendo con esta línea de razonamiento, el remanente de HPMC presente en la fase rica en proteínas, correspondería a las fracciones de menor peso molecular de dicho biopolímero.

La Figura 2.10 muestra la cinética de separación de fases de la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% a pH 6 y 5. Puede observarse que para ambas mezclas la separación ocurrió rápidamente, siendo la velocidad de separación mayor a pH 5.

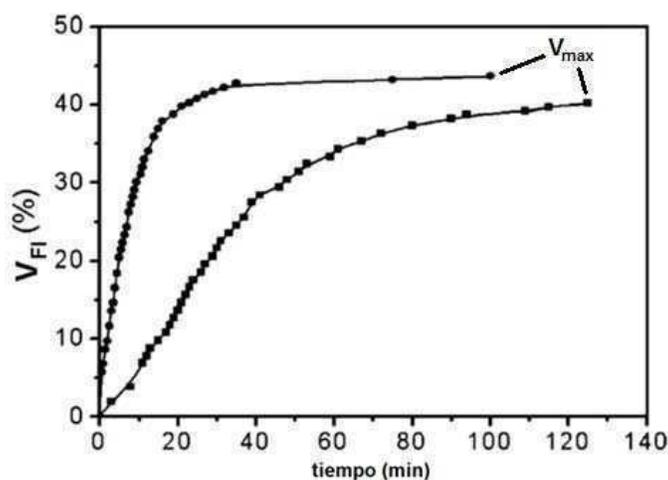


Figura 2.10. Cinética de separación de fases para la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% a pH 5 (●) y 6 (■). V_{max} : máximo volumen alcanzado por la fase inferior cuando se completó la separación de fases.

Una medida del grado de separación de fases es la relación $(V_{Fi}/V_{max}) \cdot 100$, donde V_{max} es el máximo volumen alcanzado por la fase inferior y V_{Fi} es el volumen de la fase inferior a un determinado tiempo. Treinta minutos después del proceso de mezclado, dicha proporción fue del 44% para el sistema binario a pH 6. Sin embargo, la mezcla de pH 5 presentó un valor casi dos veces mayor (82%) (Tablas 2.4 y 2.5, respectivamente).

La Figura 2.11a-c muestra los termogramas correspondientes a muestras secas derivadas del sistema binario acuoso WPC 12%/HPMC 2% de pH 5, con distintos grados de separación de fases (inmediatamente después del mezclado de los biopolímeros; 30 minutos después de dicho proceso de

mezcla; separación completa en dos fases, lograda por centrifugación). Los valores obtenidos de Tg se agrupan en la Tabla 2.5.

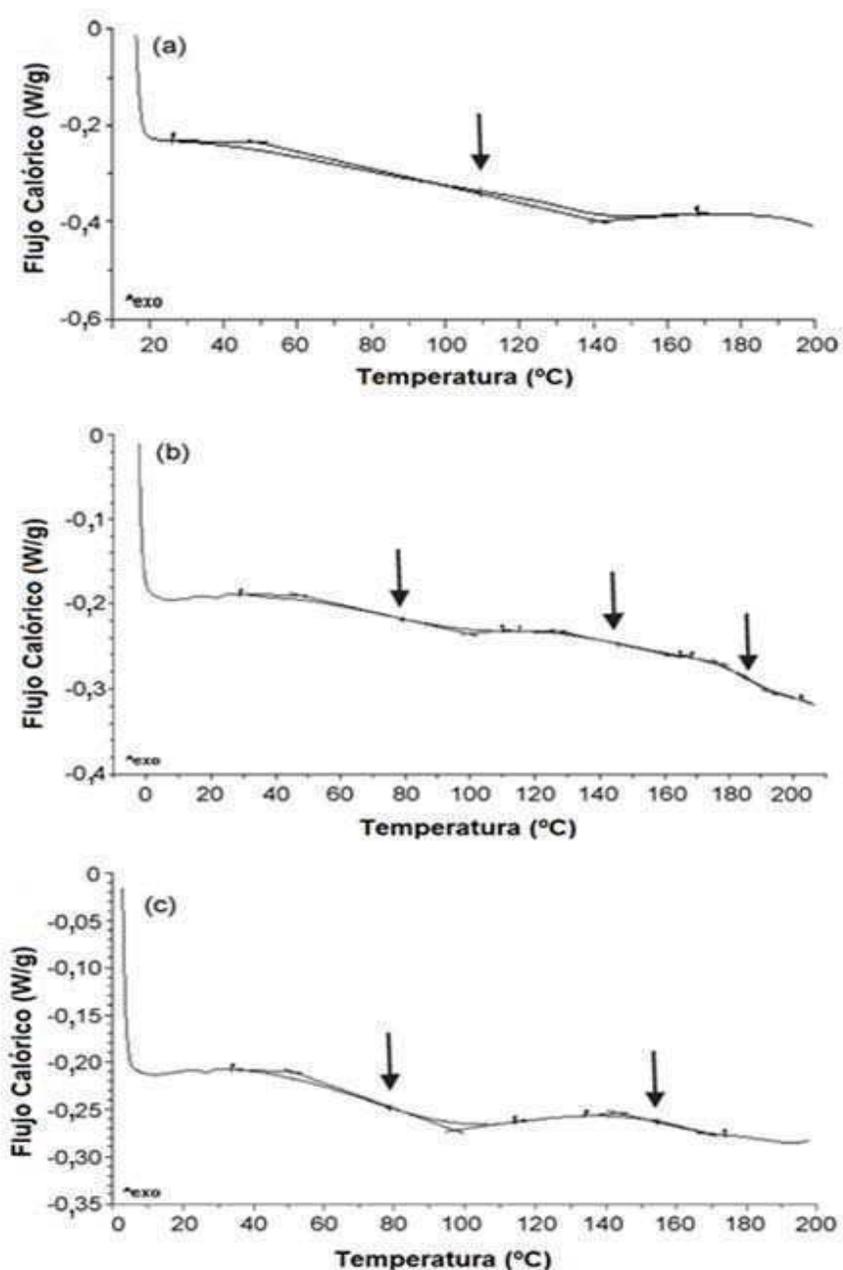


Figura 2.11. Termogramas obtenidos por DSC para la mezcla deshidratada WPC 12 %/HPMC 2% a pH 5, cuando la separación de fases del correspondiente sistema binario acuoso fue arrestada, (i) inmediatamente después del mezclado de los biopolímeros (a), (ii) 30 minutos después de dicho proceso de mezcla (b), y (iii) luego de la centrifugación (separación completa de las fases) (c). Las flechas indican la Tg. (^exo indica el sentido exotérmico del flujo calórico).

Tabla 2.5. Valores de Tg para mezclas deshidratadas WPC 12%/HPMC 2% de pH 5 obtenidas a partir de soluciones binarias con distintos grados de separación de fases.

Muestra	tiempo (min)	Tg (°C)	Tg _{C-K} (°C)	V _{F1} /V _{max} (%)
	0	107,0 ± 0,7		0
WPC/HPMC 12/2 pH 5 (anhidro)	30	82,0 ± 0,2	87,5	82
		142,3 ± 0,3		
		187,4 ± 2,2		
Centrifugado		79,0 ± 1,7		100
		153,3 ± 2,2		

Tg_{C-K}: valor de Tg estimado con la ecuación Couchman-Karasz (1).

V_{F1}/V_{max} (%): es una medida del grado de separación de fases del sistema acuoso bpolimérico.

Al igual que a pH 6 la mezcla de WPC/HPMC 12/2 a pH 5 presentó una separación de fases inmediata después del mezclado (Figura 2.12). Sin embargo, la correspondiente mezcla deshidratada presentó una sola Tg de 107 °C (Figura 2.11a, Tabla 2.5).



Figura 2.12. Visualización de la mezcla WPC 12%/HPMC 2% a pH 5. Puede observarse la separación de fases inmediatamente luego del proceso de mezclado. (aumento: ojo desnudo).

Luego de 30 minutos de haber mezclado los biopolímeros, la segregación de las fases era casi completa dado que el grado de separación de fases alcanzó el 82% (Tabla 2.5). En este caso, la mezcla deshidratada exhibió tres valores de Tg, 82, 142,3 y 187,4 °C (Figura 2.11b, Tabla 2.5). Como puede observarse, el primer valor resulta ligeramente inferior al valor de Tg del WPC anhidro (84,8 °C), el último es superior a la Tg de E4M anhidro (167,7 °C), mientras que el segundo valor resulta intermedio a los valores de Tg de los componentes individuales secos. Por último y como era de esperar, la mezcla deshidratada correspondiente al sistema acuoso bifásico (centrifugado) presentó dos valores de Tg, 79 y 153,3 °C (Figura 2.11c, Tabla 2.5), aunque estos resultaron ser inferiores a los valores de Tg de los biopolímeros individuales anhidros (84,8 y 167,7°C, para WPC y E4M, respectivamente).

Con respecto a la mezcla acuosa WPC 20 %/HPMC 3% a pH 6, el proceso de separación de fases también fue arrestado: inmediatamente después del proceso de mezclado, 30 minutos después de la mezcla, y después de la centrifugación (separación completa en dos fases). La Tabla 2.6 agrupa los valores de Tg obtenidos para las correspondientes mezclas deshidratadas, mientras que las curvas de DSC se muestran en la Figura 2.13a-c.

Tabla 2.6. Valores de Tg para mezclas deshidratadas WPC 20%/HPMC 3% de pH 6 obtenidas a partir de soluciones binarias con distintos grados de separación de fases.

Muestra	tiempo (min)	Tg (°C)	Tg _{C-K} (°C)	V _{FI} /V _{max} (%)
	0	149,5 ± 2,0		0
WPC/HPMC 20/3 pH 6 (anhidro)	30	160,0 ± 0,5	88	7
	Centrifugado	80,1 ± 2,3 152,0 ± 2,1		100

Tg_{C-K}: valor de tg estimado con la ecuación Couchman-Karasz (1).

V_{FI}/V_{max} (%): es una medida del grado de separación de fase del sistema acuoso bipolarimérico.

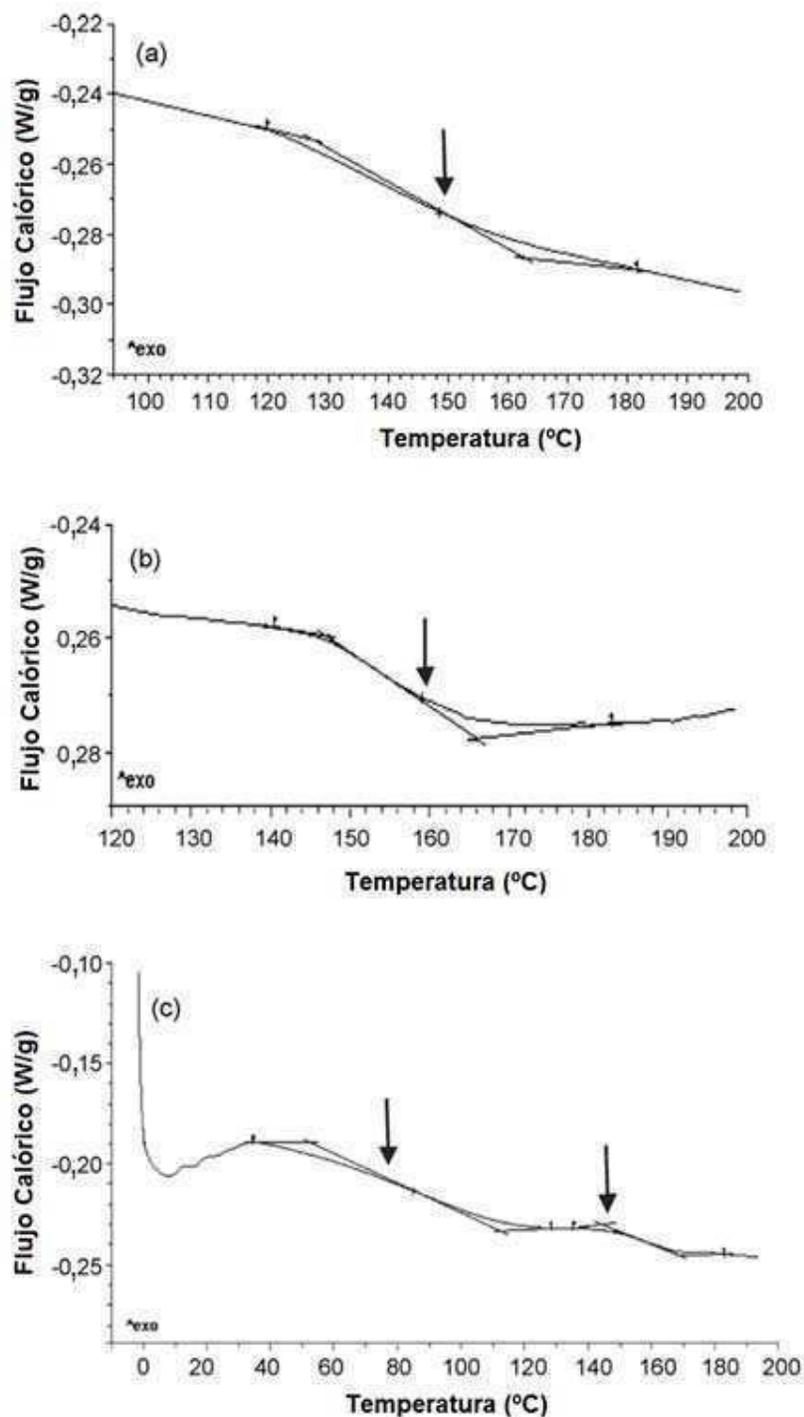


Figura 2.13. Termogramas obtenidos por DSC para la mezcla deshidratada WPC 20 %/HPMC 3% a pH 6, cuando la separación de fases del correspondiente sistema binario acuoso fue arrestada, (i) inmediatamente después del mezclado de los biopolímeros (a), (ii) 30 minutos después de dicho proceso de mezcla (b), y (iii) luego de la centrifugación (separación completa de las fases) (c). Las flechas indican la T_g . (^exo indica el sentido exotérmico del flujo calórico).

En este caso también se observó una separación de fases macroscópica inmediata luego de la mezcla de los componentes (no se muestran los datos). Con respecto a los resultados calorimétricos, tanto inmediatamente después del mezclado de los componentes poliméricos, como 30 minutos después de dicho proceso, la mezcla deshidratada presentó un único valor de Tg, 149,5 y 160 °C, respectivamente (Figura 2.13a-b, Tabla 2.6). Ambos valores resultan ampliamente desviados con respecto al valor estimado por medio de la ecuación Couchman-Karasz (88 °C). Por otra parte, puede derivarse de los valores de la relación V_{FI}/V_{max} (%) (Tabla 2.6), que la separación de fases resulta extremadamente lenta en este sistema. De hecho, luego de 30 minutos esta mezcla solo presentó un grado de separación de fases de un 7%, el cual resulta muy bajo comparado con el 44% o el 82% de separación obtenidos para las mezclas WPC 12%/HPMC 2% de pH 6 o 5, respectivamente. Este comportamiento se debería a la alta viscosidad del sistema con 3 % de HPMC. Finalmente, como era esperable, la mezcla deshidratada proveniente del sistema acuoso bifásico (centrifugado) presentó dos valores de Tg, 80,1 y 152 °C (Figura 2.13c, Tabla 2.6), los cuales nuevamente resultan inferiores a las Tg correspondientes a los biopolímeros anhidros (84,8 °C para WPC; 167,7 °C para E4M).

2.4.2. Relación entre la Tg de las mezclas deshidratadas y la micro-morfología de la separación de fases en el sistema acuoso.

La separación en dos fases de mezclas biopoliméricas acuosas puede proceder principalmente por dos vías o mecanismos, la “descomposición espinodal” (SD, spinodal decomposition) o la “nucleación y crecimiento” (NG, nucleation and growth) (Maughey y col., 2001). Según cuál sea el mecanismo, la morfología que presenten las fases separadas será distinta: el mecanismo SD da lugar a una micro-morfología donde las fases aparecen interconectadas en una red tridimensional (Turgeon y col., 2003), mientras que, la NG se caracteriza por generar un fase continua que contiene a la fase dispersa, generalmente, en forma de gotas esféricas (Maughey y col., 2001).

La morfología de las fases separadas de los sistemas mixtos acuosos WPC 12%/HPMC 2% de pH 6 y 5, puede observarse en las Figuras 2.14 y

2.15, respectivamente. En ambos casos puede verse que estos sistemas se separaron vía un mecanismo SD.

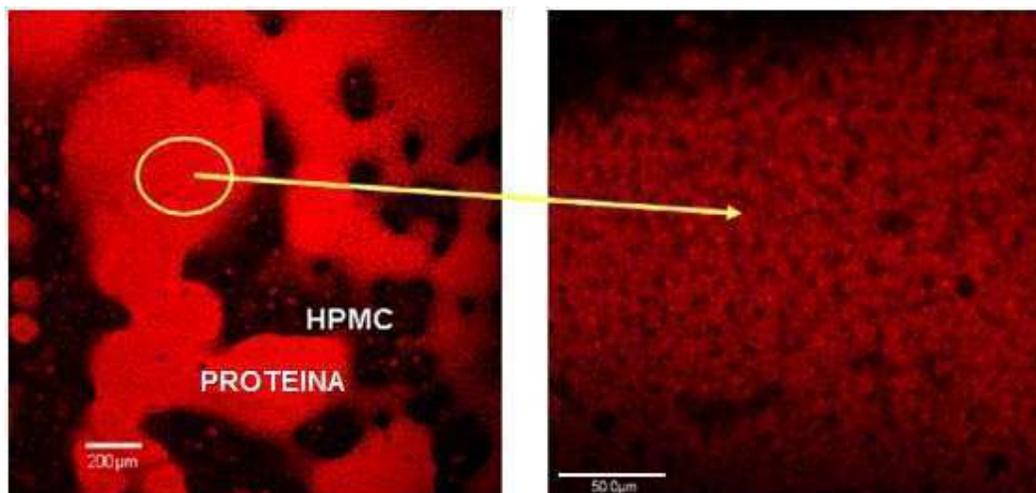


Figura 2.14. Imagen obtenida por microscopia confocal (CSLM) de la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% a pH 6; rojo: proteína, negro: HPMC; (barras de referencia: 200 μm y 50 μm).

Contrariamente, las fases separadas de la mezcla acuosa WPC 20%/HPMC 3% de pH 6 presentaron una morfología característica derivada de un segregación via NG, donde puede observarse gotas de la fase rica en HPMC dispersas en la fase continua, rica en WPC (Figura 2.16)

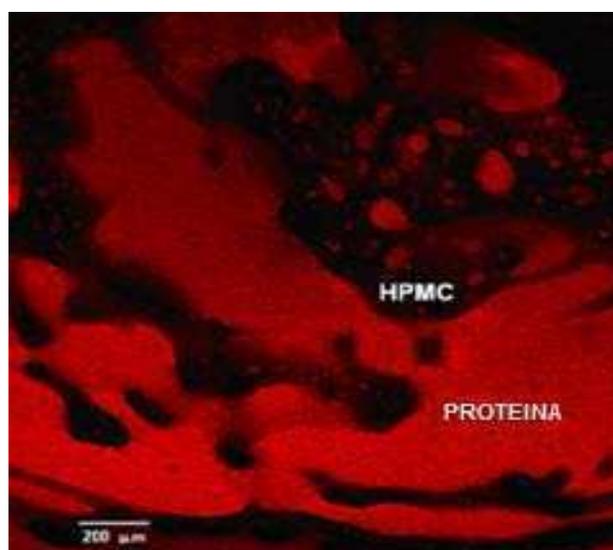


Figura 2.15. Imagen obtenida por microscopia confocal (CSLM) de la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% a pH 5; rojo: proteína, negro: HPMC; (barra de referencia: 200 μm).

Los resultados expuestos en las dos secciones anteriores muestran que las mezclas acuosas de pH 6, compuestas por un 20 o 12 % de WPC y un 3 o 2 % de HPMC, respectivamente, presentaron una separación de fases macroscópica inmediatamente después del mezclado de los componentes. Sin embargo sus correspondientes sistemas mixtos deshidratados presentaron una única T_g , cuando era de esperarse al menos dos transiciones vítreas, correspondientes a cada una de las fases separadas.

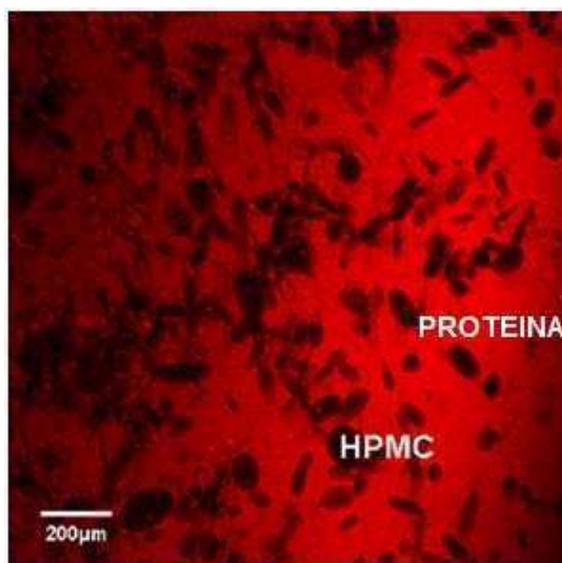


Figura 2.16. Imagen confocal (CSLM) de la mezcla acuosa WPC 20%/HPMC 3% a pH 6; rojo: proteína, negro: HPMC; (barra de referencia: 200 μm).

Por otra parte, el sistema deshidratado derivado de la mezcla acuosa WPC 12 %/HPMC 2% de pH 5 con un grado avanzado de separación de fases (30 minutos después del mezclado), presentó tres valores de T_g , de los cuales ninguno coincidió con los valores de T_g obtenidos para los polímeros individuales en estado anhidro.

Una posible hipótesis para explicar estos resultados es que se detecte primariamente, en el sistema deshidratado (hasta un cierto grado de separación de fases), una T_g correspondiente a la interfase agua-agua que se establece entre la fase rica en proteínas y la rica en polisacárido, durante el proceso de segregación de la mezcla acuosa (cabe aclarar que en el Capítulo IV del presente trabajo se describen en detalle, las propiedades de la

interfases aire-agua formadas por películas mixtas de β -lactoglobulina, proteína mayoritaria del WPC, y HPMC)

Dicha interfase constituye en sí, una tercera fase independiente de las otras dos, constituyendo una película homogénea producto de la adsorción conjunta de HPMC y WPC. De hecho al producirse la separación de fases se genera una emulsión agua-agua, siendo la tensión interfacial sumamente baja (Pérez y col., 2007). Como muestra la Figura 2.14, la morfología de la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% de pH 6 está formada por estructuras bicontinuas donde ambas fases aparecen totalmente interconectadas por una gran interfase. Más aún, cuando se incrementó el aumento del objetivo óptico, pudo observarse una segunda morfología bicontinua dentro de la anterior, constituida por pequeños dominios de HPMC (negro) atrapados dentro de una red de agregados proteicos (Figura 2.14). Esto confirma visualmente la existencia de una enorme interfase. Por lo tanto, la técnica de DSC solo permitiría detectar una sola Tg en el sistema deshidratado, correspondiente a la interfase de la mezcla acuosa. Esto se debe a la compleja microestructura que se forma durante la separación de fases de dicha solución binaria, la cual estaría constituida en su mayoría por esta interfase agua-agua, siendo esta la que domina las características de la totalidad del sistema.

Sin embargo, la detección de una única Tg no excluye la existencia de otras transiciones vítreas asociadas a las fases en formación durante el proceso de formación, las cuales podrían detectarse con una técnica más sensible (por ejemplo, la espectroscopia mecánica). Sin embargo, los resultados presentados en esta sección señalan sin duda que, en soluciones binarias proteína/polisacárido existe formación de una gran interfase durante el proceso de separación, la cual determina las propiedades de dichas mezclas cuando han sido deshidratadas.

En cuanto a la mezcla acuosa WPC 12%/HPMC 2% de pH 5, al comienzo de la separación de fases también se forman estructuras bicontinuas con ambas fases totalmente interconectadas mediante una gran interfase (Figura 2.15). Sin embargo, como se mencionó anteriormente su proceso de segregación avanza más rápidamente que a pH 6 (Figura 2.10; Tablas 2.4 y 2.5). Así, el estudio por DSC de la correspondiente mezcla deshidratada permitió detectar una única Tg al inicio de la segregación, debido a la gran magnitud de dicha interfase. A

medida que el proceso de separación de fases avanza, se forman tres fases independientes: dos de estas enriquecidas en cada uno de los componentes (proteína o polisacárido), y una tercera constituida por la interfase propiamente dicha. Por lo tanto, en la mezcla deshidratada con la separación detenida 30 minutos luego de la mezcla de los biopolímeros puros, se detectan tres valores de T_g , correspondientes a las tres fases mencionadas (Tabla 2.5). Posteriormente, tanto la fase rica en WPC como la rica en HPMC van aumentando a expensas de la continua reducción de la interfase. Finalmente, cuando la separación de fases ha terminado (mezclas acuosas centrifugadas), la correspondiente mezcla deshidratada presenta dos valores de T_g (Tabla 2.5) atribuidos a las fases ricas en WPC o HPMC, siendo en este caso insignificante el dominio de la interfase sobre las características del sistema, debido a su pequeño volumen en relación a los otros dos dominios.

Con respecto al sistema mixto deshidratado WPC 20 %/HPMC 3% de pH 6 este presentó una única T_g , incluso cuando la muestra anhidra derivaba de una mezcla acuosa con la separación de fases arrestada luego de 30 minutos del proceso de mezclado. Esto se debe a que a dicho tiempo la mezcla acuosa presenta un escaso grado de separación de fases de apenas 7% (Tabla 2.6). Por lo tanto, puede considerarse que la mezcla deshidratada de este sistema está casi completamente constituida por una gran interfase, y sólo se detecta la T_g de este dominio. Al final del proceso de separación, la mezcla deshidratada de este sistema acuoso presentó dos valores de T_g , cercanos a 80 y 150 °C, los cuales se atribuyeron a las fases ricas en WPC y HPMC, respectivamente. Con respecto a la T_g de la fase rica en WPC, este valor está en el orden del que presentó el WPC anhidro puro (84,8 °C). En cuanto a la fase rica en HPMC, Pérez y col. (2006) demostraron que este dominio segregado a partir del sistema acuoso WPC 20 %/HPMC 3% de pH 6, contiene aproximadamente 0,81% de WPC. Este remanente de proteína podría explicar porque la T_g de esta fase rica en polisacárido, resulta menor que la correspondiente a la HPMC deshidratada (167,7 °C).

Finalmente, la interfase de una solución binaria acuosa de WPC y HPMC puede describirse como una mezcla miscible, de proporciones desconocidas, constituida por HPMC y WPC adsorbidas en forma conjunta en la película interfacial agua-agua. Existen estudios previos sobre la dinámica de adsorción

a la interfase aire-agua en sistemas mixtos acuosos WPC/HPMC, en los cuales se ha demostrado que hay una adsorción competitiva entre la HPMC y el WPC, siendo el polisacárido más tensioactivo (esto se discutirá en detalle en el Capítulo VI). Más aún, la HPMC domina las propiedades interfaciales (por ejemplo, las reológicas) cuando los tiempos de adsorción son largos (Pérez y col., 2007). A partir de estos resultados, podría pensarse que existe un cambio temporal en la estructura y composición de la interfase agua-agua establecida entre las fases ricas en WPC y HPMC. También podría extrapolarse que el comportamiento de dicha película interfacial agua-agua, está determinado fundamentalmente por el polisacárido dado que este presenta mayor actividad superficial. Por lo tanto, el único valor de T_g detectado en los sistemas deshidratados provenientes de mezclas acuosas WPC/HPMC con evidente separación de fases, podría ser atribuido a la interfase considerándola a esta como un sistema WPC/HPMC miscible. Así, la T_g atribuible a esta interfase aparece ubicada entre los valores de T_g correspondientes a los componentes individuales anhidros, y cambia con el avance de la separación de fases, hacia el valor de T_g de la HPMC debido a los cambios en la composición de la interfase con el tiempo (Pérez y col., 2007) (Tablas 2.4, 2.5 y 2.6).

La Figura 2.17 muestra una representación gráfica resumiendo el esquema propuesto para explicar la relación existente entre la morfología producto del mecanismo de separación de fases del mixto acuoso WPC/HPMC, y los valores de las transiciones vítreas detectadas en la correspondiente mezcla deshidratada.

En este esquema se propone, i) atribuir el único valor de T_g observado en mezclas deshidratadas derivadas de soluciones binarias acuosas con grados avanzados separación de fases (hasta un 50%), a la interfase formada por HPMC y WPC, la cual dominaría la movilidad de todo el sistema ya que actuaría como una red vinculante entre las fases ricas en proteína y en polisacárido; ii) Con un proceso de separación de fases más avanzado (grado mayor al 50%), pueden encontrarse tres valores de T_g en las mezclas deshidratadas, los cuales se atribuyeron a la interfase, y a las dos fases segregadas en la correspondiente solución binaria acuosa. La magnitud de estos valores se relaciona con las características de la película interfacial, las cuales varían en el tiempo (Pérez y col., 2007), dado que dependen de las

diferentes morfologías y de la composición que van adoptando las dos fases segregadas coexistentes; iii) por último, cuando la separación de fases finaliza, el volumen de la interfase resulta despreciable con respecto al de las fases segregadas, y por lo tanto ya no tiene significancia sobre las características de la mezcla deshidratada. Así, los dos valores de Tg observados corresponden a las fases separadas.

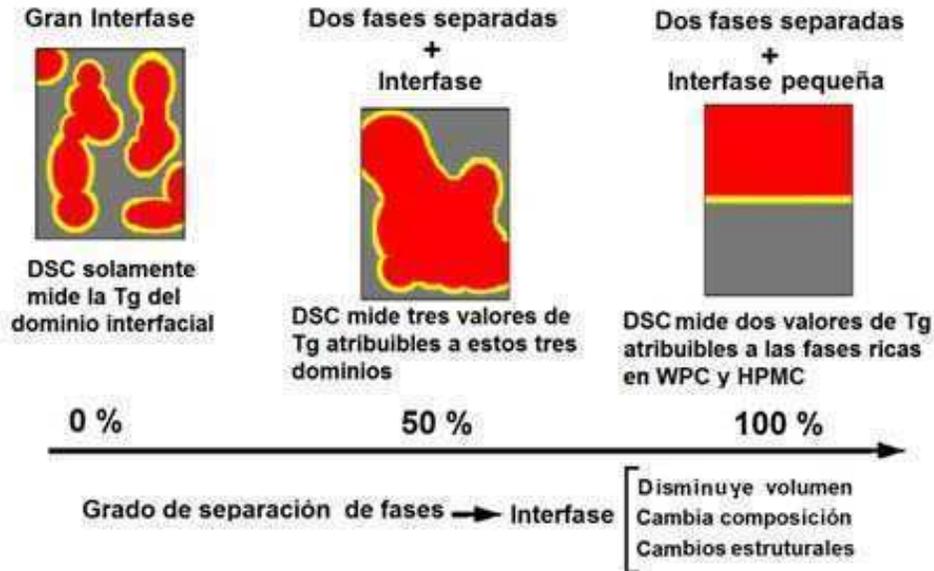


Figura 2.17. Representación esquemática de la relación entre el grado de separación de fases del sistema binario WPC/HPMC y la Tg medida en la correspondiente mezcla deshidratada.

2.5. Conclusiones.

Por medio de una combinación de las técnicas de análisis térmico (DSC) y microscopía (CSLM), se pudo establecer que existe una dependencia de la temperatura de transición vítrea de mezclas deshidratadas de WPC y HPMC, con el comportamiento de la separación de fases que ocurre en la correspondiente solución binaria acuosa.

Para la mezcla acuosa sin separación de fases, WPC 6%/HPMC 1% de pH 6, la temperatura de transición vítrea pudo ser ajustada con los modelos tradicionalmente utilizados para estimar valores de Tg en mezclas binarias de polímeros sintéticos. En cuanto al sistema WPC

12%/HPMC 2% de pH 3, a pesar de no haber mostrado una separación de fases macroscópica, su termograma presentó una gran amplitud en la región donde ocurre la transición vítrea, evidenciando una limitada compatibilidad entre los polímeros en solución. Igualmente, la temperatura de transición vítrea pudo ser ajustada con un modelo que contempla este fenómeno (Song y col. 1996).

En el caso de mezclas acuosas que presentan una separación total o parcial de las fases, la temperatura transición vítrea depende de la morfología y el grado de separación de fases en la segregación (Figura 2.17).

Por último, los avances realizados en esta parte del trabajo sobre el conocimiento del comportamiento de los sistemas binarios de proteína y polisacárido, pueden ser utilizados como una herramienta para controlar la Tg de mezclas biopoliméricas y su estabilidad.

2.6. Referencias.

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official methods of analysis (16th edition). AOAC Press, Arlington, TX, USA.
- Blonk J. C. G., and Aalst H. (1993). Confocal scanning light microscopy in food research. *Food Research International*, 26(4), 297-311.
- Bosma M., Brinke G. T., and Ellis T. S. (1988). Polymer-polymer miscibility and enthalpy relaxations. *Macromolecules*, 21, 1645-1470.
- Brooker B. E. (1995). Imaging food systems by confocal laser scanning microscopy. *New Physicochemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*. (pp. 53-68). Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Burin L., Jouppila K., Roos Y., Kansikas J., and Buera M. P. (2000). Color Formation in Dehydrated Modified Whey Powder Systems As Affected by Compression and Tg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5363-5268.
- Cilurzo F., Minghetti P., Casiraghi A., and Montanari L. (2002). Characterization of nifedipine solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 313-317.
- Couchman P., and Karasz F. (1978). A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures. *Macromolecules*, 11, 117-119.
- Ferry J. D. (1980). Viscoelastic Properties of Polymers. 3rd Edition. J. Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Hale A., and Blair H. E. (1997). Polymer Blends and Block Copolymers (2nd Ed.). (pp. 745-786). Ed: E. A. Turi. Academic Press, San Diego, CA, USA. .
- Hartikainen J., Lehtonen O., Harmia T., Lindner M., Valkama S., Ruokolainen J., and Friedrich K. (2004). Structure and morphology of polyamide 66 and oligomeric phenolic resin blends: Molecular modeling and experimental investigations. *Chemistry of Materials*, 16(16), 3032-3039.
- Haugland R. P. (1992). Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (5th edition). (pp. 451). Ed: K. D. Larison. Molecular Probes, Eugene, OR, USA.
- Icoz D. Z., Moraru C. I., and Kokini J. L. (2005). Polymer-polymer interactions in dextran systems using thermal analysis. *Carbohydrate Polymers*, 62, 120-129.
- Jouppila K., and Roos Y. (1994). Glass transitions and crystallization in milk powders. *Journal of Dairy Science*, 77, 2907-2915.
- Kalichevsky M. T., and Blandshard J. M. V. (1992). A study of the effect of water on the glass transition of 1:1 mixtures of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydrate Polymers*, 19, 271-278.
- Karmas R., Buera M. P., and Karel M. (1992). Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 873-879.

- Keary C. M. (2001). Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. *Carbohydrate Polymers*, 45, 293-303.
- Loret C., Schumm S., Pudney P. D. A., Frith W. J., and Fryer P. (2005). Phase separation and molecular weight fractionation behaviour of maltodextrina/ agarosa mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19, 557-565.
- Maugey J., Van Nuland T., and Navard P. (2001). Small angle light scattering investigation of polymerisation induced phase separation mechanisms. *Polymer*, 42, 4353-4366.
- McPhillips H., Craig D., Royall P., and Hill V. (1999). Characterisation of the glass transition of HPMC using modulated temperature differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 180, 83-90.
- Pérez O. E., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 794-803.
- Pérez O. E., Wargon V., and Pilosof A. M. R. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/ hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 966-974.
- Roos Y. H., and Karel M. (1991). Applying state diagrams in food processing and product development. *Food Technology*, 45(12), 66-71.
- Shultz A. R., and Young A. L. (1980). DSC on Freeze-Dried Poly(methyl methacrylate)-Polystyrene Blends. *Macromolecules*, 13, 663-668.
- Smart M. G., Fulcher R. G., and Pechak D. G. (1995). Recent developments in the microstructural characterization of foods. *Characterization of Foods: Emerging Techniques*. Ed: A. G. Goankar, (pp. 223-275). Elsevier Science, New York, NY, USA.
- Song M., Hammiche A., Pollock H. M., Hourston D. J., and Reading M. (1996). Modulated differential scanning calorimetry: 4. Miscibility and glass transition behaviour in poly(methyl methacrylate) and poly(epichlorohydrin) blends. *Polymer*, 37(25), 5661-5665.
- Tromp R. H., van de Velde F., van Riel J., and Paques M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34, 931-938.
- Turgeon S. L., Beaulieu M., Schmitt C., and Sanchez C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 401-414.
- Vodovotz Y., Vittadini E., Coupland J., McClements D. J., and Chinachoti P. (1996). Bridging the Gap: Use of confocal microscopy in food research. *Food Technology*, 50, 74-82.
- Woo E. M., and Fan H. J. (1999). Phase structure and miscibility in blend of poly(4-methyl styrene) with poly(cyclohexyl methacrylate). *Polymer*, 40, 3803-3808.

Zimeri J. E., and Kokini J. L. (2003). Phase transitions of inulin-waxy maize starch systems in limited moisture environments. *Carbohydrate Polymers*, 51, 183-190.

Capítulo III

Efecto de la separación de fases en las propiedades de geles mixtos

3.1. Introducción.

Las proteínas y polisacáridos aparecen frecuentemente en forma conjunta en una amplia gama de alimentos impartiendo una gran cantidad de características deseables en los mismos. Estos biopolímeros contribuyen a la estructura, a la textura y a la estabilidad de los alimentos debido a su capacidad gelificante, espesante y a su actividad interfacial (Simonet y col., 2000). Sin embargo, las propiedades particulares de estos sistemas mixtos dependerán no sólo de las propiedades de las proteínas y los polisacáridos que los componen, sino también de la naturaleza y magnitud de las interacciones entre estos dos biopolímeros (Ercelebi y Ibanoglu, 2007).

Respecto a estas interacciones, el término "compatibilidad" implica miscibilidad de los diferentes biopolímeros a nivel molecular. Por el contrario, los términos "incompatibilidad" o "compatibilidad limitada" denotan la existencia de una limitada co-solubilidad entre los biopolímeros, los cuales suelen ser miscibles en una solución binaria diluida, o bien cuando se hallan formando un complejo soluble (Tolstoguzov, 2007). Cabe destacar que, la incompatibilidad entre macromoléculas, es más bien la regla que la excepción. Incluso, soluciones suficientemente concentradas de biopolímeros que difieren ligeramente en composición y estructura química, generalmente son inmiscibles.

Desde el punto de vista termodinámico, en el caso de soluciones de moléculas pequeñas el término entálpico del proceso de segregación de fases, es normalmente compensado por la entropía derivada del proceso de mezclado (Fitzsimons y col., 2008). Para soluciones biopoliméricas de igual concentración, sin embargo, existen muchas menos moléculas libres para moverse independientemente, lo que da lugar a una entropía de mezclado mucho menos significativa. En estas condiciones, las soluciones mixtas proteína/polisacárido a un pH mayor al pI de la proteína, suelen separarse espontáneamente en dos fases cada una de ellas enriquecida en un polímero y depletada del otro (Antonov y col., 1979; Tolstoguzov, 1997).

La incompatibilidad termodinámica brinda beneficios interesantes, como ser la reducción de la concentración crítica para gelificar (Baeza y Pilosof, 2001; Tolstoguzov, 1995). Más aún, permite la formación de estructuras inmiscibles (es decir, dominios termodinámicamente incompatibles) atrapados en una

matriz gelificada. Estas novedosas estructuras resultan de gran interés dadas sus diversas aplicaciones: para la modificación y/o el diseño de nuevas texturas, para el encapsulamiento de aromas y sabores (Norton y Frith, 2001), como espesantes o sustitutos de grasas, como “carriers” de nutrientes, sabores, esencias, y finalmente como matrices de liberación controlada tanto para productos alimenticios como drogas (Lorén y Hermansson, 2003).

Pérez y col. (2006) estudiaron la influencia de una hidroxipropilmetilcelulosa de alto peso molecular y alta viscosidad (E4M), sobre las propiedades gelificantes de un concentrado de proteínas de suero WPC, en condiciones de incompatibilidad termodinámica (pH 7 y 25 °C). Estos autores encontraron una serie de geles mixtos que presentaban una interesante morfología con un núcleo constituido por HPMC gelificada, rodeado de una cubierta de gel correspondiente a la fase enriquecida en WPC (estructura core-shell). Además, estos geles resultaron ser mucho más elásticos que un gel de WPC de igual concentración.

3.2. Objetivo.

Teniendo en cuenta las conclusiones a las cuales arribaron Pérez y col. (2006), se propone en la presente sección de este trabajo, caracterizar el comportamiento del fenómeno de separación de fases en mezclas de WPC y E50LV (una HPMC de baja viscosidad), para determinar el impacto de dicha segregación en la dinámica de gelificación y en las propiedades de los geles mixtos.

3.3. Materiales y Métodos.

3.3.1. Materiales.

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se utilizó una hidroxipropilmetilcelulosa comercial denominada Methocel[®] E50LV, gentilmente donada por Colorcon-Argentina, representantes argentinos de Dow Chemical Company. Esta HPMC de calidad alimentaria fue usada sin purificación posterior. Según el proveedor, este derivado celulósico tiene un 29,1 % de grupos metilo, un 9,2

% de grupos hidroxipropilo, siendo el relación metilo/hidroxipropilo, 3,2%; su peso molecular es de 18 kDa; contenido de humedad, 1,6%. La viscosidad de una solución acuosa de este polímero al 2% p/v y a 20°C es de 41 mPa.s.

Concentrado de proteínas del suero lácteo (WPC). Se utilizó un concentrado de uso comercial denominado, WPC80. Este producto en polvo fue provisto por Milka Frank-Santa Fe, Argentina. Según Pérez y col (2006), su composición fue la siguiente: 78,9% de proteínas totales, determinado por el método de Kjeldhal (Nx6,25) AOAC (1995), lactosa 5%, grasa 6%, cenizas 4,3% y 5,6% de humedad.

Otros reactivos químicos. Se utilizaron de grado analítico.

3.3.2. Preparación de soluciones madres.

Se prepararon soluciones madres de WPC80 y E50LV al 40% y 10% p/p, respectivamente, disolviendo el correspondiente polvo en agua destilada. Cada polvo se pesó en una balanza analítica (VXI, Modelo 60/220, PCE Grupo Ibérica S. L., Tobarra, España). En el caso del WPC, el polvo fue dispersado en agua destilada a temperatura ambiente (25°C), con agitación durante 4 hs (agitador magnético modelo C-MAG HS7, IKA®, Wilmington, NC, USA) para permitir la completa disolución del polvo. Después de la preparación, esta solución se almacenó en heladera 4°C.

En cuanto a la HPMC, la solución se preparó dispersando el polvo en el agua destilada a 85 °C, con agitación manual para permitir la disolución completa del polvo. Luego, se enfrió la solución a temperatura ambiente (25 °C) mediante baño en agua, y se agregó la masa de agua perdida por evaporación. Por último, esta solución se almacenó en heladera a 4 °C por 24 hs para que el polisacárido alcance el máximo grado de hidratación.

Antes de los experimentos, ambas soluciones madres fueron llevadas a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un baño termostático (modelo MASSON II, Vicking SRL, Argentina).

3.3.3. Preparación de las soluciones binarias.

Las soluciones binarias de WPC y HPMC se prepararon pesando cuidadosamente cantidades iguales de cada solución madre, en proporciones que permitiesen obtener mezclas con concentraciones de WPC en el rango 6-20 % p/p y de E50LV el orden de 0,25-4 % p/p. Estos sistemas se mezclaron con un agitador magnético durante 4 hs para permitir una distribución homogénea de los componentes. El pH de las mezclas fue de 6,5 (pH-metro, modelo A920, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA).

3.3.4. Determinación del diagrama de fases.

El diagrama fases se estableció a pH 6,5 y 25 °C, determinando la transición de una a dos fases en las soluciones binarias de WPC y E50LV. Para acelerar el proceso y garantizar la completa separación de fases, 10 ml de cada mezcla fueron centrifugados en tubos plásticos graduados de 15 ml en una centrífuga modelo 5810 R de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) con una fuerza equivalente a 13,000 g y a temperatura ambiente (25 °C), hasta completar la separación de fases. Luego, se determinaron visualmente los volúmenes de las fases inferior (V_L) y superior (V_U). La concentración de proteínas en la fase inferior (rica en este biopolímero) se determinó por el método Kjeldahl, tal cual se describe en AOAC (1995). Brevemente, las muestras fueron digeridas utilizando un baño térmico seco (modelo 1009 Digestor, Tecator AB, Höganäs, Suecia) y su contenido de nitrógeno total se determinó utilizando una equipo de destilación automático (modelo Kjeltex Auto 1030 Analizador, Tecator AB, Höganäs, Suecia). La concentración de proteínas se calculó utilizando un factor de 6,25.

El contenido de proteína de la fase superior (X_U) se determinó por diferencia entre el total de proteínas en la muestra (también determinado por el método de Kjeldahl) y el determinado en la fase inferior (X_L).

La concentración de polisacárido tanto en la en la fase inferior (Y_L), como en la fase superior (Y_S), se calculó según la siguiente ecuación (Pérez y col., 2006),

$$Y_{L,U} = [- (\alpha Y_0 + Y_0) / (\alpha X_0 + X_0)] \alpha X_{L,U} + (\alpha Y_0 + Y_0) \quad (1)$$

la cual representa el segmento que pasa por las coordenadas de la concentración inicial de cada mezcla (X_0 , Y_0), y por las coordenadas que definen la composiciones de la fases superior (X_U , Y_U) e inferior (X_L , Y_L). El parámetro α constituye la relación de volúmenes entre las fases, V_L/V_U . El procedimiento completo se realizó al menos por triplicado, informándose los valores de media y desviación estándar para todas las variables. El diagrama de fases se construyó ajustando los valores de composición de la mezcla inicial y de las fases separadas, para cada sistema mixto, utilizando el software OriginPro v8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

3.3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry).

La calorimetría diferencial de barrido se utilizó para determinar el cambio endotérmico asociado a la deshidratación de las cadenas de la HPMC (Pérez y col., 2006). El análisis térmico se realizó en un calorímetro diferencial de barrido modelo DSC 822 de METTLER-Toledo equipado con el software STARe versión 6.1. Sobre los termogramas se registraron las temperaturas de “onset” (correspondiente al comienzo del cambio endotérmico) y de “pico” (aquella que corresponde al mínimo valor de flujo de calor (Φ) en función de la temperatura (T), durante dicho cambio) (Figura 3.1), asociadas al proceso de deshidratación de la HPMC.

El instrumento se calibró con indio y zinc. Cada muestra se calentó a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, desde una temperatura inicial de 5 °C hasta una temperatura final de 100 °C. Se utilizaron capsulas de aluminio con una capacidad de 160 μ l (Mettler-Toledo), las cuales se cargaron con un volumen aproximado de 50 μ l de muestra.

El procedimiento de carga de las cápsulas se realizó con una electro-balanza modelo AG245 de Mettler-Toledo (precisión, \pm 0,01 mg). Como referencia térmica se utilizó una cápsula vacía. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

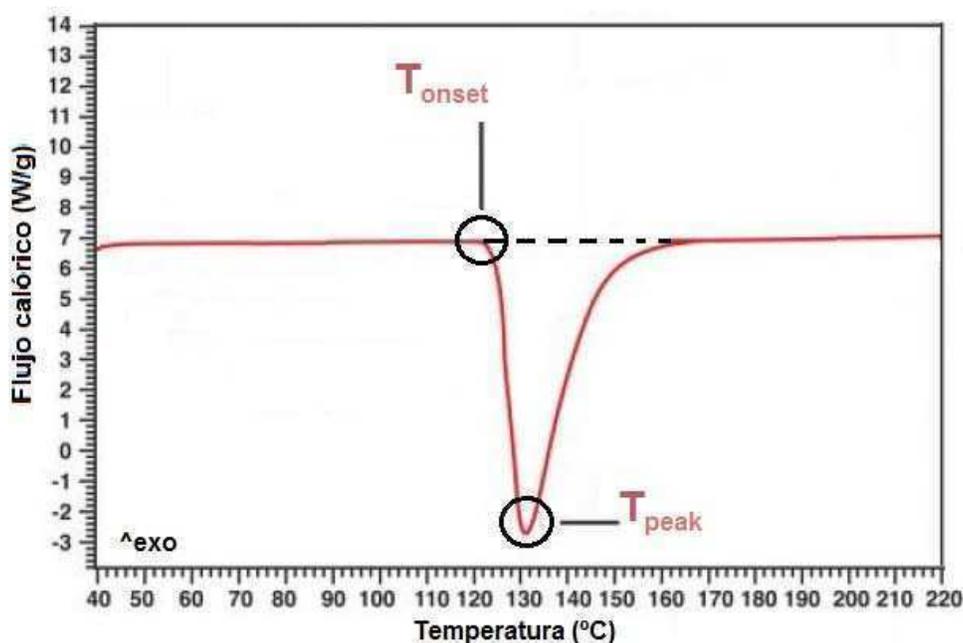


Figura 3.1. Esquema de un termograma (flujo de calor en función de la temperatura) obtenido por DSC. Se visualiza cómo se determinan las temperaturas de “onset” y de “pico”, en una transición endotérmica como lo es la deshidratación de las cadenas de la HPMC.

3.3.6. Dinámica de gelificación.

Se realizaron mediciones reológicas de oscilación dinámica para las soluciones WPC, E50LV y sus mezclas. Para ello se utilizó un reómetro de estrés controlado (modelo MCR 300, Paar Physica, Graz, Austria).

Dichas soluciones se colocaron en un sistema de medición de placas paralelas, con una separación de 1 mm. La temperatura del sistema se controló mediante sistema Peltier (modelo Viscotherm VT2, también de Paar Physica). Sobre las superficies expuestas de la muestra, se aplicó una pequeña cantidad de silicona líquida para impedir la evaporación de agua durante el calentamiento. Se utilizó una frecuencia de 1 Hz, manteniéndose la deformación constante en un valor de 0,01%, condiciones en las cuales se garantiza que la experiencia se está realizando en la región viscoelástica lineal (Pérez y col., 2006).

Las muestras se calentaron desde 20 a 90° C con una velocidad de 10 °C/min, se mantuvieron durante 15 minutos a 90° C, y luego se enfriaron a una velocidad de 25° C/min hasta 20 °C. Sobre el reograma (Figura 3.2), se registraron los siguientes parámetros, en función del tiempo: el módulo de

almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de desfase δ (G''/G'). Por otra parte se registraron los valores de G' al finalizar el calentamiento (90 °C; módulo elástico de equilibrio) y a 35 °C (módulo elástico en frío). Finalmente se determinó la temperatura de gelificación (T_{gel}), como la temperatura a la cual se igualan los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''). Los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

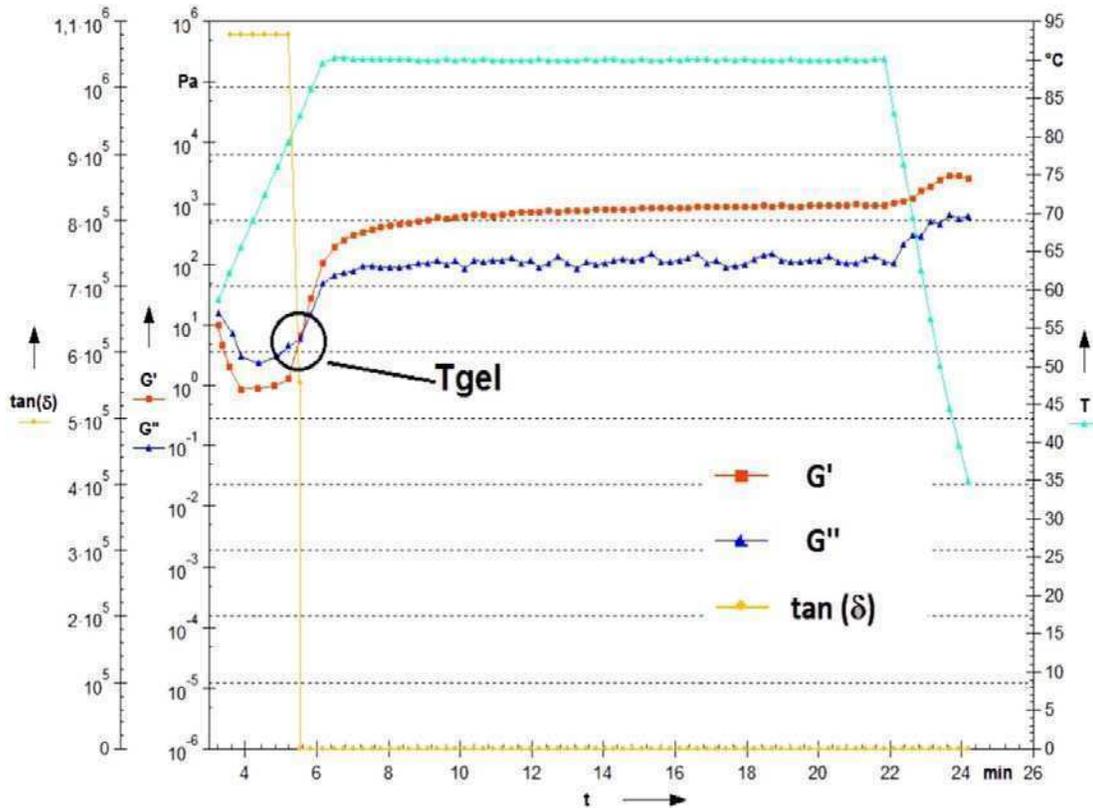


Figura 3.2. Reograma del proceso de gelificación obtenido por reometría dinámica oscilatoria. Se visualiza como se determina la temperatura de gelificación (T_{gel}). T: temperatura; t: tiempo; G' : módulo almacenamiento; G'' : módulo de pérdida; $\tan(\delta)$: tangente del ángulo δ .

3.3.7. Microscopía laser de barrido confocal (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy).

La técnica de microscopía confocal (CSLM) se utilizó en esta parte de trabajo para la obtención de imágenes microscópicas de las mezclas acuosas WPC/HPMC. Se utilizó un equipo de microscopia confocal Olympus (modelo

FV300 CLSM). Los siguientes objetivos ópticos fueron utilizados: Olympus UplanFI 10X/0.3NA/medio seco y UplanFI 10X/0.5NA/medio seco.

Previamente al análisis microscópico, la proteína en la muestra se marcó en forma no-covalente con una solución al 10% del fluoróforo rodamina B (excitación longitud de onda 560 nm; emisión longitud de onda 625 nm). Las imágenes digitales se almacenaron en archivos de formato múlti.tif, con resoluciones de 1024×1024 y 512×512 píxeles.

3.3.8. Propiedades de textura de los geles.

Desde un punto de vista físico, cuando se habla de textura de un producto alimenticio, se refiere al flujo, deformación o desintegración de una muestra bajo la acción de una fuerza. Sin embargo, la textura, junto con el sabor y el aspecto, definen la calidad sensorial de un alimento, y dicha calidad no es una característica intrínseca del alimento en sí, sino el resultado de la interacción entre el alimento y el consumidor. Así, la textura puede definirse como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y de superficie de un producto que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles, visuales y auditivos (Bourne y Szczesniak, 2003).

Existen diferentes métodos instrumentales que se utilizan para evaluar la textura de los alimentos. Uno de los más utilizados es el denominado Análisis del Perfil de Textura (TPA, Texture Profile Analysis). Este método trata de simular la masticación. Lamentablemente como otros muchos ensayos no puede replicar exactamente esta acción humana, ya que además de la acción mecánica, intervienen otros factores que no se pueden reproducir en el ensayo: el tamaño de la boca o que superficie va a estar en contacto con el alimento (la acción ejercida por los molares es distinta a la de los caninos); la acción de la saliva (reacciones enzimáticas) en el bolo alimenticio; el paladar y la lengua como acomodadores de lo ingerido o la acción de los labios en las primeras etapas de la masticación (Gunasekaram y Mehmet, 2003). Por todo lo anteriormente expuesto, se hace difícil correlacionar representativamente los ensayos analíticos con la percepción de las personas (paneles sensoriales) a pesar que últimamente hay progresos en ese campo.

Técnicamente el método consiste en que una muestra sólida o semisólida es comprimida dos veces hasta un 20 % de su altura original. De esta manera las dos compresiones representan las dos mordidas sucesivas realizadas en la boca. La Figura 3.3 muestra el esquema de una curva típica de fuerza (F) en función del tiempo (t), que se obtiene mediante el análisis de perfil de textura (TPA).

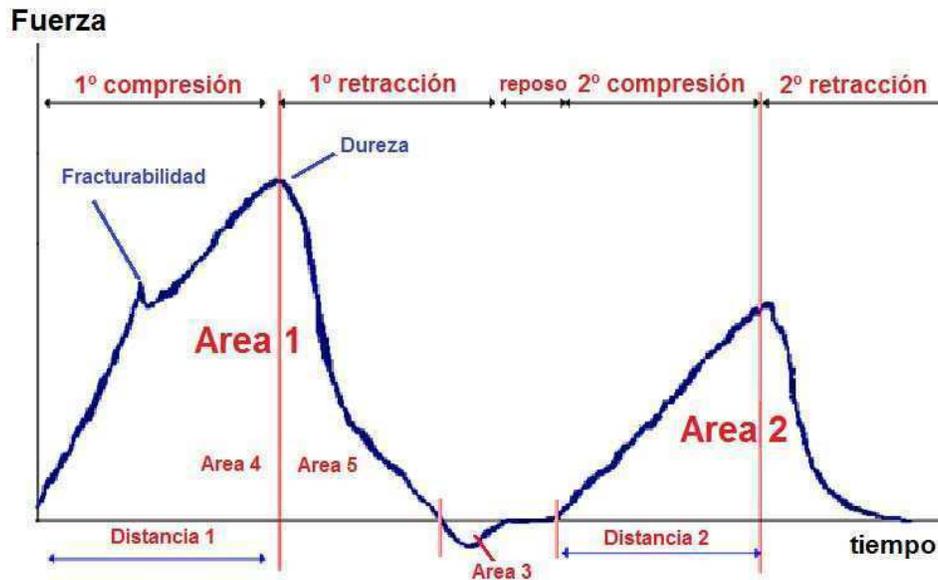


Figura 3.3. Diagrama esquemático de la curva Fuerza vs tiempo, obtenida por un TPA.

Según Bourne y Szczesniak (2003), algunos de los parámetros que pueden obtenerse de estas gráficas son los siguientes,

- Fracturabilidad: Fuerza máxima antes de producirse una caída en la curva de Fuerza vs tiempo. Corresponde a la fractura del material, producto de la primera mordida.
- Dureza: Punto donde se produce la caída de la curva de Fuerza vs. tiempo. Corresponde a la fuerza máxima de compresión durante en la primera mordida.
- Area 1: Corresponde al trabajo realizado durante la primera mordida.
- Adhesividad: Termino representativo del área 3. El trabajo necesario para separar la muestra del elemento compresor.
- Pegajosidad: La mayor fuerza negativa (mínimo en área 3). Fuerza necesaria para separar la muestra del elemento compresor.

- Area 2: Trabajo realizado durante la segunda mordida.
- Elasticidad: Corresponde a la relación distancia 1/distancia 2. Es el grado de recuperación de las dimensiones iniciales de la muestra después de eliminar la fuerza deformante.
- Cohesividad: Es la razón entre las áreas 2 y 1. Es la deformación durante la segunda mordida relativizada a la deformación de ocurrida en la primera mordida. También puede interpretarse como el grado en que un material puede ser deformado antes de alcanzar su punto de ruptura.
- Gomosidad: Resulta del producto entre la Dureza y la Cohesividad. Solo se aplica a los productos semisólidos.
- Masticabilidad: Relaciona la Dureza, la Cohesividad y la Elasticidad. Se define como el producto entre Gomosidad y la Elasticidad. Solo se aplica a productos sólidos.
- Resiliencia (“Resilience”): Es la razón entre las áreas 5 y 4. Puede definirse como "la tendencia de la muestra a recuperar su posición original". También se interpreta como una elasticidad instantánea, ya que la resiliencia se mide sobre la retirada de la primera penetración, antes de que el período de espera se ha iniciado.

En este trabajo, se prepararon geles de WPC y de las mezclas WPC/E50LV en tubos cilíndricos de vidrio (diámetro 13 mm; altura 55 mm) conteniendo 2 ml de la respectiva muestra. Estas muestras se calentaron durante 20 minutos a $90 \pm 0,1$ °C (Thermolyne Dry Bath modelo db 2812026). Luego se almacenaron a 4° C durante 24 hs. El análisis de perfil de textura (TPA, Texture Profile Analysis) se realizó a temperatura ambiente (25°C) en un analizador de textura (modelo TAXT2i, Stable Microsystems, Godalming, UK) utilizando una sonda de aluminio cilíndrica (modelo P/36R; diámetro 36 mm). Los geles se cortaron en forma de cilindros de 13 mm de diámetro y 11 mm de altura, se comprimieron hasta un 30% de su tamaño a una velocidad de compresión de 0,5 mm/s. El ensayo se realizó por triplicado. Para cada muestra se determinaron los parámetros de dureza y elasticidad.

3.3.9. Análisis estadísticos.

Los distintos parámetros (térmicos; reológicos; texturales) obtenidos para los distintos replicados, se promediaron e informaron como una media más un desvío estándar. Para la determinación de estimadores estadísticos se utilizó el software Microsoft Excel (Microsoft Corp.).

3.4. Resultados y discusión.

3.4.1 Diagrama de fases del sistema ternario WPC/E50LV/agua.

Las mezclas de proteína y polisacárido a pH neutro son generalmente inestables, y por encima de una concentración crítica total de biopolímeros (aproximadamente 4 % p/p), se separan en dos fases, una rica en proteínas y la otra, rica en polisacárido (Tolstoguzov, 2003). Sin embargo, si no se supera esta concentración crítica la separación de fases puede darse por otros fenómenos, como ser, una modificación del pH, de la fuerza iónica, o incluso una variación de la entropía del sistema (Alves y col., 1999).

En términos generales, un diagrama de fases describe el comportamiento de mezclas de dos polímeros más un solvente, con diferentes proporciones de estos componentes. Así pues, constituye un esquema ilustrativo de las complejas interacciones que ocurren entre los polímeros, y con el solvente en estos sistemas ternarios (Clark, 2000; Doublier y col., 2000). Más específicamente, la curva binodal es el límite entre las mezclas termodinámicamente compatibles e incompatibles. La posición de este límite depende de la intensidad de las interacciones: (i) entre las moléculas de polímeros distintos, ii) entre moléculas de polímeros iguales, y (iii) entre los polímeros y el disolvente (diferencias en la hidrofobicidad de los polímeros).

La Figura 3.4 muestra el diagrama de fases para el sistema ternario WPC-E50LV-agua, a 25 °C y pH 6,5. Puede observarse que la curva binodal se sitúa muy cerca de los ejes, lo que significa que la zona de compatibilidad es relativamente pequeña y la separación de fases ocurre para una amplia gama de combinaciones de concentraciones de WPC y E50LV. Además, el diagrama de fases resultó asimétrico, reflejando la competencia entre ambos biopolímeros

por el agua, causada por las diferencias de peso molecular e hidrofobicidad (Zhuravskaya y col., 1986a; Zhuravskaya y col., 1986b).

Los segmentos sólidos (también denominados “tie-lines”) conectan los puntos sobre la curva binodal, los cuales representan las composiciones de las fases segregadas coexistentes (A y C). Además, este segmento puede dividirse en dos sub-segmentos (AB y BC), cada uno de los cuales se extiende desde el punto de composición de cada fase hasta el punto que representa la composición inicial de la mezcla (B).

Los volúmenes medidos para cada fase son proporcionales a la longitud de cada uno de estos sub-segmentos. El punto F representa la mínima concentración total de biopolímero requerida para que ocurra la separación de fases. En este caso, F corresponde a 7,5% p/p de proteína y un 2,5% p/p de E50LV.

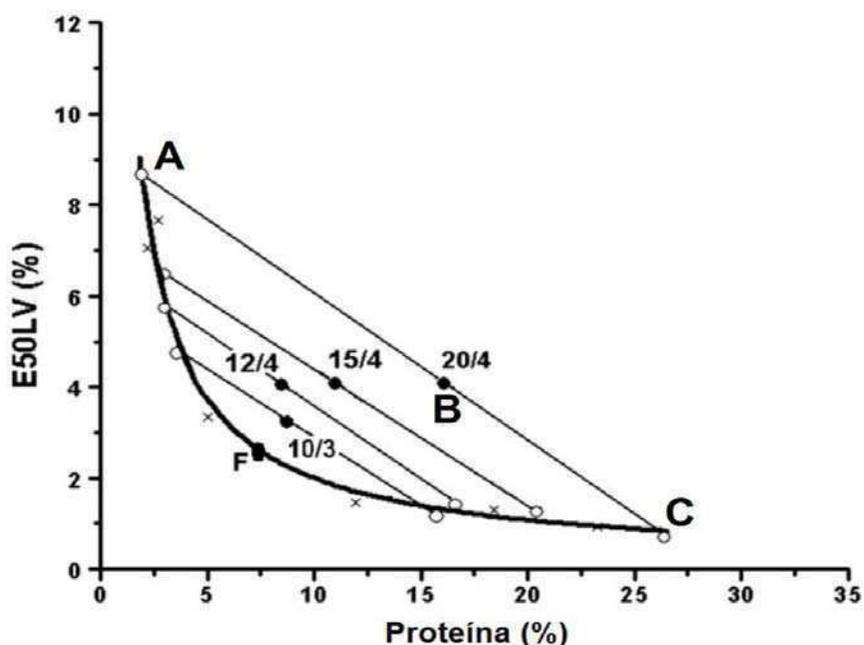


Figura 3.4. Diagrama de fases para el sistema mixto WPC/E50LV (25°C y pH 6,5). La línea sólida es la curva binodal; 10/3, 12/4, 15/4 y 20/4 representan las concentraciones iniciales (% p/p) de algunas mezclas. F: concentración crítica.

Existen factores que influyen notablemente en la posición de la curva binodal, los cuales la acercan a los ejes de concentración (aumento de la incompatibilidad). Estos son: i) el peso molecular y el incremento de la rigidez

en la estructura molecular; ii) la desnaturalización de las proteínas globulares, la cual provoca un aumento del tamaño molecular, iii) una mayor concentración de sales (aumento de la fuerza iónica), y iv) un aumento de la temperatura (Tolstoguzov, 2007). Por otra parte, la posición de la curva también está influida por la estructura del polisacárido, ya que los de estructura lineal son menos compatibles que los ramificados, perteneciendo la HPMC a esta última categoría (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

3.4.2. Separación de fases de las mezclas seleccionadas para los estudios de gelificación.

A partir del diagrama de fases, se seleccionaron tres sistemas mixtos para caracterizar su comportamiento durante el proceso de gelificación:

- WPC 12%/E50LV 0,25% p/p (sistema de una sola fase; ubicado bajo la curva binodal).
- WPC 12%/E50LV 4% p/p (mezcla incompatible; ubicado por encima de la curva binodal).
- WPC 20%/E50LV 4% p/p (idénticas condiciones que el sistema anterior)

Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de estas mezclas a temperatura ambiente (25 °C), con el fin de caracterizar su micro-estructura. La interpretación de estas imágenes se basa en la diferencia de la intensidad de emisión del fluoróforo asociado a la proteína.

La Figura 3.5 muestra la apariencia microscópica del sistema WPC 12%/E50LV 0,25%, el cual se ubica en la región compatible del diagrama de fases (debajo de la binodal) (Figura 3.4). Puede observarse un patrón homogéneo (sin dominios separados), es decir, no mostró una separación de fases.

Las otras dos mezclas, de naturaleza incompatible (se hallan por encima de la curva binodal), se separaron en dos fases, una rica en polisacárido (fase superior) y otra rica en proteínas (fase inferior). La Tabla 3.1 muestra la composición, en polisacárido (E50LV) y proteína de cada una de estas fases, junto con sus respectivos volúmenes (expresados como porcentajes del volumen total de la mezcla).

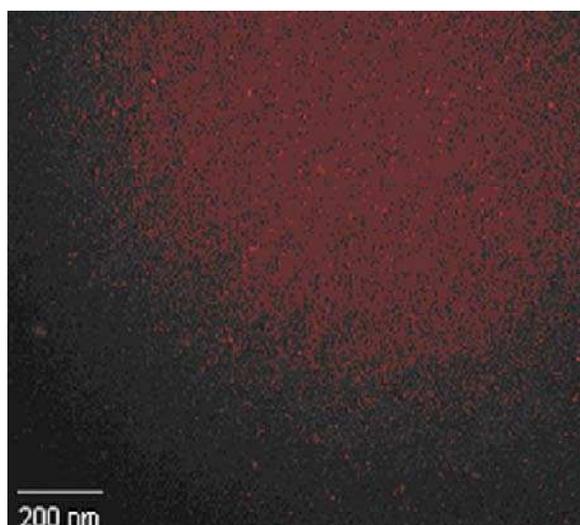


Figura 3.5. Imagen por CSLM de la mezcla homogénea WPC 12%/E50LV 0,25 % a 25 °C y pH 6,5 (barra de referencia: 200 nm).

El sistema mixto WPC 12%/E50LV 4% se segregó en una fase rica en E50LV con un volumen aproximado del 64% del volumen total, y una fase rica en proteína con un volumen del 36 %. Contrariamente, la mezcla WPC 20%/E50LV 4% se separó en una fase rica en polisacárido que representa el 33 % del volumen total, mientras que la fase rica en WPC resultó ser el 67 % del volumen total.

Tabla 3.1. Valores de composición y volumen de las fases segregadas de los sistemas WPC/E50LV.

Composición inicial (% p/p)		Fase rica en WPC (inferior)			Fase rica en E50LV (superior)		
WPC	E50LV	Proteína (% p/p)	E50LV (% p/p)	Volumen (%)	Proteína (% p/p)	E50LV (% p/p)	Volumen (%)
12	4	15,7 ± 0,2	1,3 ± 0,02	36,0 ± 0,5	3,0 ± 0,1	5,7 ± 0,2	64,0 ± 0,4
20	4	26,5 ± 0,3	0,8 ± 0,01	67,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	8,7 ± 0,2	36,0 ± 0,2

Media ± desvío estándar; n=3.

La microestructura que se genera durante el proceso de separación de estos dos sistemas (Figura 3.6a-b), corrobora que existe una inversión de fases comparando ambas mezclas.

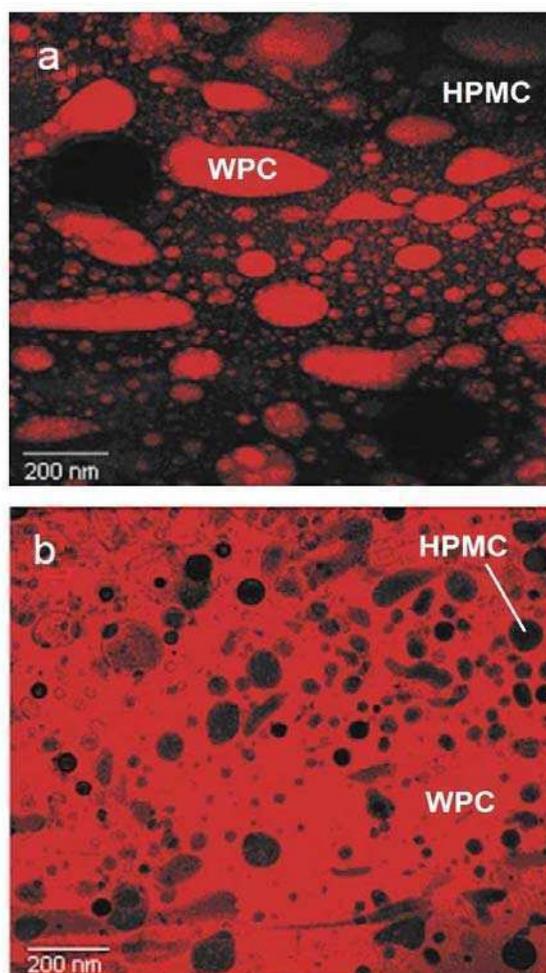


Figura 3.6. Imágenes CSLM de las mezclas incompatibles WPC 12%/ E50LV 4% (a) y WPC 20% /E50LV 4% (b) (25 °C; pH 6,5); zonas oscuras: dominios ricos en HPMC; zonas rojas: dominios ricos en WPC; (barra de referencia: 200 nm).

Puede observarse que la microestructura del sistema WPC 12%/E50LV 4% consta de dominios proteicos (rojos) dispersos una fase continua de E50LV (oscura) (Figura 3.6a). Por otra parte, la mezcla WPC 20%/E50LV 4% presentó una microestructura con inclusiones de E50LV (oscuras) en una fase continua de WPC (roja) (Figura 3.6b). Resultados similares se observaron para los sistemas binarios de gelatina/maltodextrina (Norton y Frith, 2003), pectina altamente metoxilada/WPC (Kim y col., 2006), goma garrofin/caseinato (Norton y Frith, 2001), y leche descremada/goma garrofin (Schorsch y col., 1999).

Normalmente, la fase de menor volumen existe como gotas, más o menos esféricas, dispersas en un continuo de la fase de mayor volumen. Esta inversión de fases se da a raíz del cambio en la composición inicial del sistema, dando como resultado un intercambio entre las fases continua y dispersa, durante el proceso de separación (Norton y Frith, 2003). En rigor, existe una región de inversión de fase (o una gama de concentraciones), en la cual se forman las estructuras observadas, o aún otras más complejas, como ser las bicontinuas o las gota-dentro-gota. Esta región resulta mucho más amplia de lo que generalmente corresponde a la inversión de fases de las emulsiones aceite-agua (Norton y Frith, 2001).

3.4.3. Dinámica de gelificación de los componentes individuales: WPC y E50LV.

Considerando el proceso de gelificación del WPC, se observó un aumento del G'_{eq} (plateau de este parámetro a 90 °C, Figura 3.7a-b) con un aumento de la concentración del WPC de 12 a 32 % p/p (Tabla 3.2). Respecto a esto, Fernandes (1994) comprobó que las soluciones de WPC muestran un aumento gradual de G' con su concentración, y una pequeña dependencia de este parámetro con la frecuencia de oscilación.

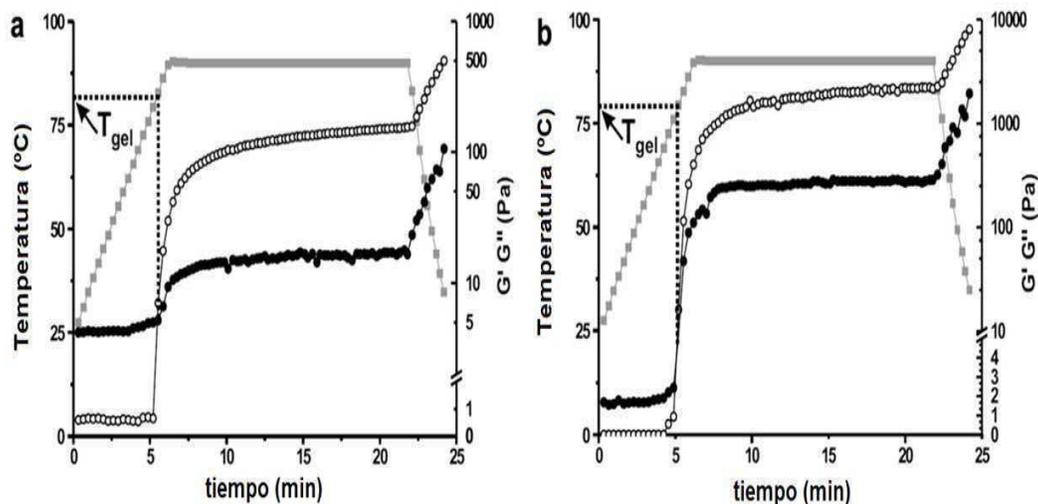


Figura 3.7. Evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), para la gelificación de una solución de WPC al 12% p/p (a) o al 20% p/p (b). Las flechas indican la temperatura de gelificación (T_{gel}). Temperatura: (■); G' : (○); G'' : (●).

La Tabla 3.2 también muestra las temperaturas de gelificación (T_{gel}) determinada por el cruzamiento de las curvas de G' y G'' en función del tiempo (Figura 3.7a-b).

Tabla 3.2. Parámetros de gelificación del WPC obtenidos por reometría dinámica.

WPC (% p/p)	T_{gel} (°C)	G'_{eq} (Pa)
12	$82,2 \pm 1,0$	$151,1 \pm 1,2$
15	$81,6 \pm 2,0$	$632,2 \pm 2,0$
20	$81,0 \pm 2,0$	$2.184,4 \pm 0,5$
32	$75,5 \pm 1,0$	$26.558,4 \pm 1,3$

Media \pm desvío estándar; n=3.

T_{gel} es la temperatura de gelificación.

G'_{eq} es el valor constante de G' al finalizar el calentamiento a 90 °C.

Puede observarse una disminución de aproximadamente 7°C, cuando la concentración del WPC aumentó de 12 a 32 % p/p. Estos resultados coinciden con estudios ya reportados en literatura para soluciones de WPI (Puyol y col., 2001).

La agregación de las moléculas proteicas en la etapa de calentamiento durante la gelificación (a pH neutro) se debe a la formación de puentes disulfuro por reacción de grupos tioles de las distintas cadenas peptídicas (Hoffmann y van Mil, 1999). Estas reacciones están favorecidas por la mayor concentración de proteína (Verheul y col., 1999).

Con respecto a la gelificación de E50LV, una caracterización detallada de gelificación de la HPMC fue hecha por Pérez y col. (2006), quienes utilizaron varias técnicas para describir los acontecimientos que ocurren durante el calentamiento de soluciones de HPMC a pH 7. La mayoría de los trabajos sobre este tema coinciden, en que el proceso de gelificación de este tipo de polisacárido consiste de dos etapas.

La primera etapa, denominada “régimen de pre-gelificación”, implica interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de HPMC que conducen a la formación de “clusters”. Kato y col. (1978) propusieron que esta etapa está principalmente determinada por la agregación de los dominios más hidrofóbicos entre las cadenas de HPMC (unidades trimetilglucosa que actúan como sitios de entrecruzamiento durante el calentamiento). Esta asociación da como resultado el aumento del tamaño de los agregados hidrofóbicos (“clusters”).

La segunda etapa o “régimen de gelificación” corresponde a la gelificación propiamente dicha (la formación de red de polímeros entrecruzados), la cual ocurre a temperaturas más altas y está comúnmente asociada a la separación de fases (Kobayashi y col., 1999). Según Kato y col. (1978) esta segunda etapa incluye la asociación hidrofóbica de los dominios de menor carácter hidrofóbico, es decir las unidades di y mono-metilglucosas. Debido a estas interacciones, los “clusters” crecen hasta formar cristales, causando la separación de fases (Yoguchi y col., 1995). La presencia de dichos cristales ha sido confirmada por las técnicas de difracción de rayos X (Kato y col., 1978) y micro-calorimetría (Yoguchi y col., 1995). Con la segunda técnica mencionada, dos picos endotérmicos se observaron durante el enfriamiento de geles de HPMC: uno cercano a los 60 °C el cual corresponde a la integración de las dos fases separadas, y otro aproximadamente a los 50 °C correspondiente a la fusión de los cristales (Yoguchi y col., 1995). Más aún, se ha reportado que la transición entre la etapa de pre-gelificación y el régimen de gelificación ocurre alrededor de los 50 °C (Kobayashi y col., 1999). Finalmente, existen varios modelos teóricos que apoyan esta interpretación expuesta para el proceso de gelificación de la HPMC (Tanaka, 1996).

Diferentes técnicas experimentales se utilizaron en esta sección del trabajo para caracterizar los fenómenos que ocurren durante el calentamiento de soluciones de E50LV de distintas concentraciones. Cabe destacar, que dichos fenómenos no fueron afectados por la concentración del polisacárido (datos no mostrados).

La Tabla 3.3 resume los parámetros térmicos determinados para una solución al 4% (p/p) de E50LV. Según Kobayashi y col. (1999), durante la primera etapa del calentamiento se observa que la solución pasa de ser transparente a turbia. La temperatura correspondiente a esta transición (“cloud point”), es de 30 °C e

indica el comienzo de agregación por medio de interacciones hidrofóbicas entre las unidades trimetilglucosa (mayor carácter hidrofóbico).

Tabla 3.3. Eventos que ocurren durante el calentamiento de una solución de E50LV al 4 % p/p.

E50LV		
cloud point	(°C)	30,0 ± 1,0
Parámetros de la dinámica de gelificación	T_{gel} (°C)	55,1 ± 1,0
	T_m (°C)	38,2 ± 0,5
	G'_{eq} (Pa)	47,2 ± 2,0
Parámetros de DSC	T_{onset} (°C)	56,5 ± 0,4
	T_{peak} (°C)	65,6 ± 0,4

Media ± desvío estándar; n=3.

T_{gel} es la temperatura de gelificación.

T_m es la temperatura de fusión.

G'_{eq} es el valor constante de G' a 90 °C.

T_{onset} es la temperatura del comienzo de la transición endotérmica.

T_{peak} es la temperatura del pico de la transición endotérmica.

En solución, las cadenas de HPMC poseen una capa de solvatación, compuesta de moléculas de agua que se ubican alrededor de los grupos hidrofóbicos, formando una estructura conocida como “tipo-jaula” (Kobayashi y col., 1999). En esta instancia, existen pocas interacciones polímero-polímero, y por ende la formación de “clusters” es casi nula. Con el aumento de la temperatura las moléculas de polisacárido adsorben energía traslacional, y van perdiendo gradualmente su capa de hidratación, resultando en una disminución de la viscosidad de la solución. Finalmente, las asociaciones entre las distintas cadenas de polímeros tendrán lugar, debido a las interacciones hidrofóbicas, provocando la turbidez en la solución, y posteriormente la formación de la estructura de red del gel (Sarkar y Walker, 1995).

Por otra parte, mediante DSC, se determinó transición endotérmica que correspondería a la deshidratación de las cadenas de E50LV, que comienza alrededor de los 56 °C (Tabla 3.3). Dicha transición presentó una gran amplitud

(datos no mostrados), la cual se atribuye al carácter polidisperso de las HPMC (Pérez y col., 2006; Sarkar y Walker, 1995). La temperatura del pico endotérmico, 65,6 °C, indica la mayor tasa de deshidratación.

La Figura 3.8 muestra la evolución de G' y G'' en el tiempo, para una solución al 4% p/p de E50LV.

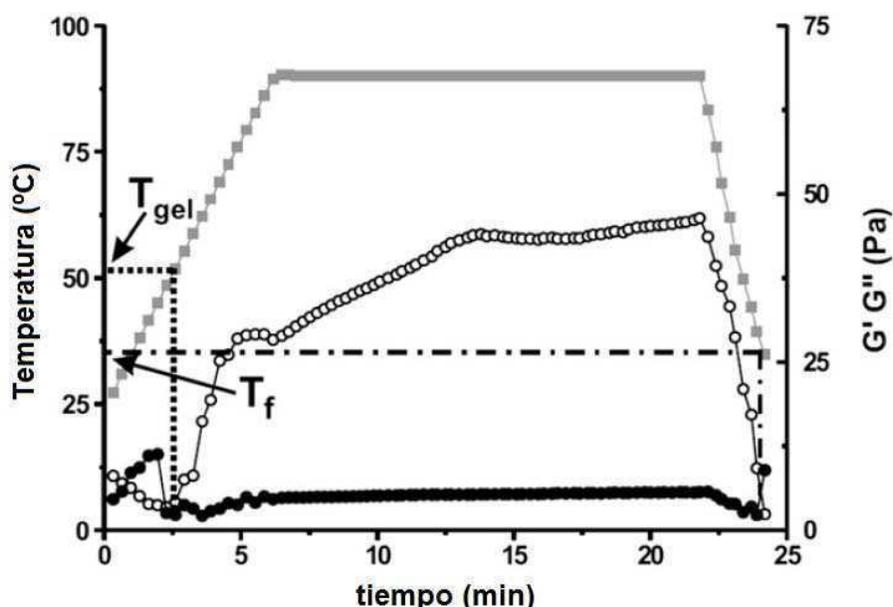


Figura 3.8. Evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), para la gelificación de una solución al 4% p/p de E50LV. Las flechas indican la temperatura de gelificación (T_{gel}) y de fusión (T_m). Temperatura: (■); G' : (○); G'' : (●).

Puede observarse un valor de T_{gel} cercano a 55 °C, el cual coincide con la temperatura a la cual comienza la deshidratación de las cadenas de E50LV, obtenida por DSC (Tabla 3.3). Este resultado indica que simultáneamente con la deshidratación de las cadenas celulósicas, comienza el desarrollo de los “clusters” hidrofóbicos dando lugar a la formación de una incipiente estructura de red a la temperatura de gelificación (T_{gel}). Esta temperatura también coincide con el punto-gel detectado por el “test inclinación”, que determina la temperatura a la cual la estructura del gel está completamente formada, es decir, cuando el gel no fluye con la inclinación (Pérez y col., 2006). Luego de formado el gel, G' aumentó hasta alcanzar un valor constante a 90 °C (G'_{eq}) de 47,2 Pa (Tabla 3.3). Finalmente, la fusión de la E50LV se produce a una temperatura de alrededor de 38 °C (T_m) (Tabla 3.3), y puede observarse en el

reograma como un nuevo cruce entre las curvas de G' y G'' durante el enfriamiento (Figura 3.8).

3.4.4. Dinámica de gelificación de los sistemas mixtos WPC/E50LV.

3.4.4.1. Temperaturas de gelificación (T_{gel}).

Firoozmand y col. (2009) realizaron experimentos reológicos de deformación mínima, en mezclas de gelatina y almidón oxidado, encontrando que la microestructura y la reología de dichas mezclas dependían tanto de su composición como de la distribución de los componentes dentro de la microestructura del sistema. Sin embargo, la composición de los dominios ricos en proteína o polisacárido dentro de la microestructura del gel, no puede ser determinada con precisión debido a su variación temporal. Por otra parte, en el Capítulo II, se demostró que las propiedades térmicas de mezclas deshidratadas de WPC y HPMC derivadas de mezclas acuosas parcialmente separadas en fases, dependían notablemente de la morfología y del grado de separación de fases de dicha solución binaria.

No obstante, en ausencia de un modelo que relacione la composición polimérica, la distribución de estos componentes en la microestructura del sistema mixto, y el comportamiento reológico, cualquier análisis cuantitativo o discusión sobre dichas relaciones puede carecer de sentido. A continuación se infieren algunas tendencias cualitativas con respecto a la relación entre la temperatura de gelificación (T_{gel}) y la separación de fases en estas mezclas WPC/E50LV. Para ello, se aplicaron modelos matemáticos simples (ecuaciones lineales) para estimar un valor T_{gel} a partir de la composición de la mezcla, y compararlo con los valores obtenidos experimentalmente.

La Figura 3.9 muestra el reograma correspondiente a la gelificación de esta mezcla homogénea WPC 12%/E50LV 0,25%, mientras que en la Tabla 3.4 puede observarse el valor experimental de T_{gel} , 79,3 °C.

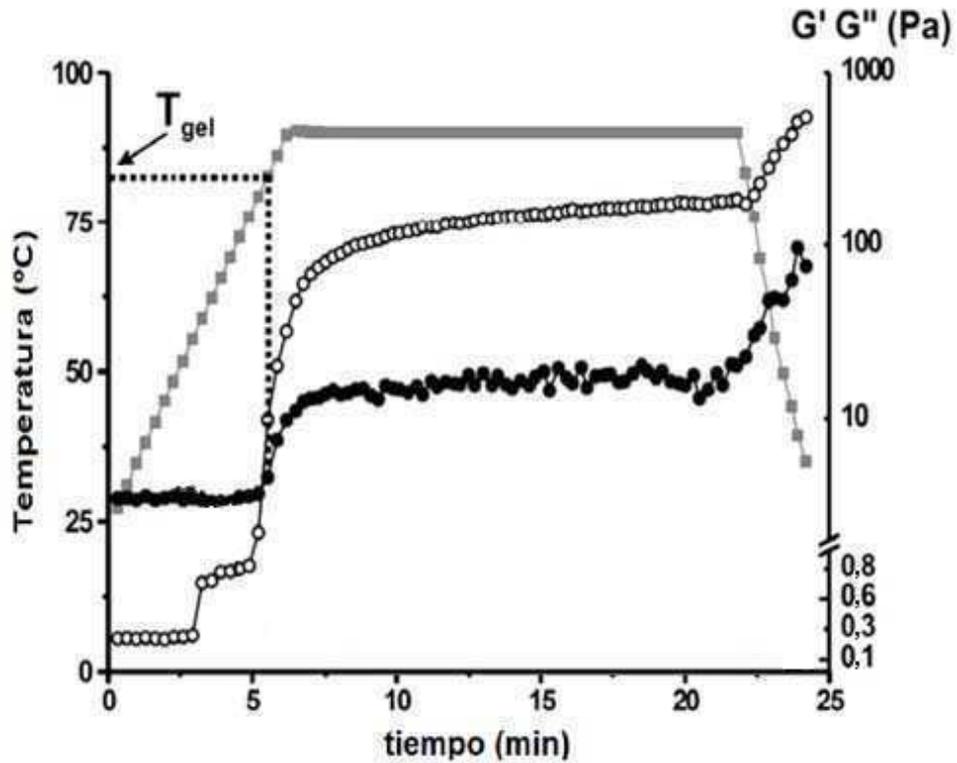


Figura 3.9. Evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G'), de pérdida (G''), para la gelificación de la mezcla WPC 12%/E50LV 0,25%. La flecha indica la temperatura de gelificación (T_{gel}). Temperatura: (■); G' : (○); G'' : (●).

Para esta mezcla, la temperatura de gelificación se relacionó con su composición utilizando la siguiente ecuación,

$$T_{gel}(MIX) = X_{WPC} \cdot T_{gel}(WPC) + X_{E50LV} \cdot T_{gel}(E50LV) \quad (2)$$

donde $T_{gel}(MIX)$ es la temperatura de gelificación del sistema mixto, $T_{gel}(WPC)$ y $T_{gel}(E50LV)$ son las temperaturas de gelificación de los distintos componentes individuales y X_{WPC} y X_{E50LV} son sus fracciones en peso. El valor de T_{gel} estimado a partir de esta ecuación (2) fue de 81,6 °C, el cual resulta similar al obtenido experimentalmente (79,3 °C).

Para los sistemas con separación de fases (E50LV 4 %/WPC 12 o 20 %) se estimaron dos temperaturas gelificación distintas: una para la fase rica en WPC y otra para la rica en E50LV, en base sus respectivas composiciones (Tabla 3.1). Las ecuaciones utilizadas son los siguientes,

$$T_{gel}(E) = X_{WPC}(E) \cdot T_{gel}(WPC) + X_{E50LV}(E) \cdot T_{gel}(E50LV) \quad (3)$$

$$T_{gel}(W) = X_{WPC}(W) \cdot T_{gel}(WPC) + X_{E50LV}(W) \cdot T_{gel}(E50LV) \quad (4)$$

donde $T_{gel}(E)$ y $T_{gel}(W)$ son las temperaturas de gelificación de las fases ricas en E50LV y WPC, respectivamente; $T_{gel}(WPC)$ y $T_{gel}(E50LV)$ son las temperaturas de gelificación de los componentes individuales; $X_{WPC}(W)$, $X_{E50LV}(W)$ son las fracciones en peso de WPC y E50LV en la fase rica en WPC; mientras que $X_{E50LV}(E)$, $X_{WPC}(E)$ son las fracciones en peso de E50LV y WPC en la fase rica en E50LV.

Los reogramas correspondientes a estas dos mezclas pueden observarse en la Figura 3.10, mientras que en la Tabla 3.4 se resumen los valores de T_{gel} experimentales, y estimados mediante las ecuaciones 3 y 4.

Tabla 3.4. Temperatura de gelificación para las mezclas WPC/E50LV.

Composición Inicial (% p/p)		T_{gel} (°C) ^a	Estimaciones de T_{gel}		
WPC	E50LV		T_{gel} (MIX) (°C)	T_{gel} (E) (°C)	T_{gel} (W) (°C)
12	0,25	79,3 ± 0,2	81,6	-	-
12	4	60,5 ± 0,4	-	65,9	80,5
20	4	60 ± 2,0	-	61,1	81,6

^aMedia ± desvío estándar; n=3. T_{gel} (MIX) es la temperatura de gelificación estimada con la ecuación (2). T_{gel} (E) y T_{gel} (W) son las temperaturas de gelificación estimadas con las ecuación (3) y (4) para las fases ricas en E50LV y WPC, respectivamente.

Para ambos sistemas, la T_{gel} estimada para la fase rica en WPC fue de aproximadamente 80 °C, mientras que el valor de T_{gel} estimado para la fase rica en E50LV, fue de 65,9 °C y 61,1 °C para las mezclas WPC 12%/E50LV 4% o WPC 20%/E50LV 4%, respectivamente (Tabla 3.4).

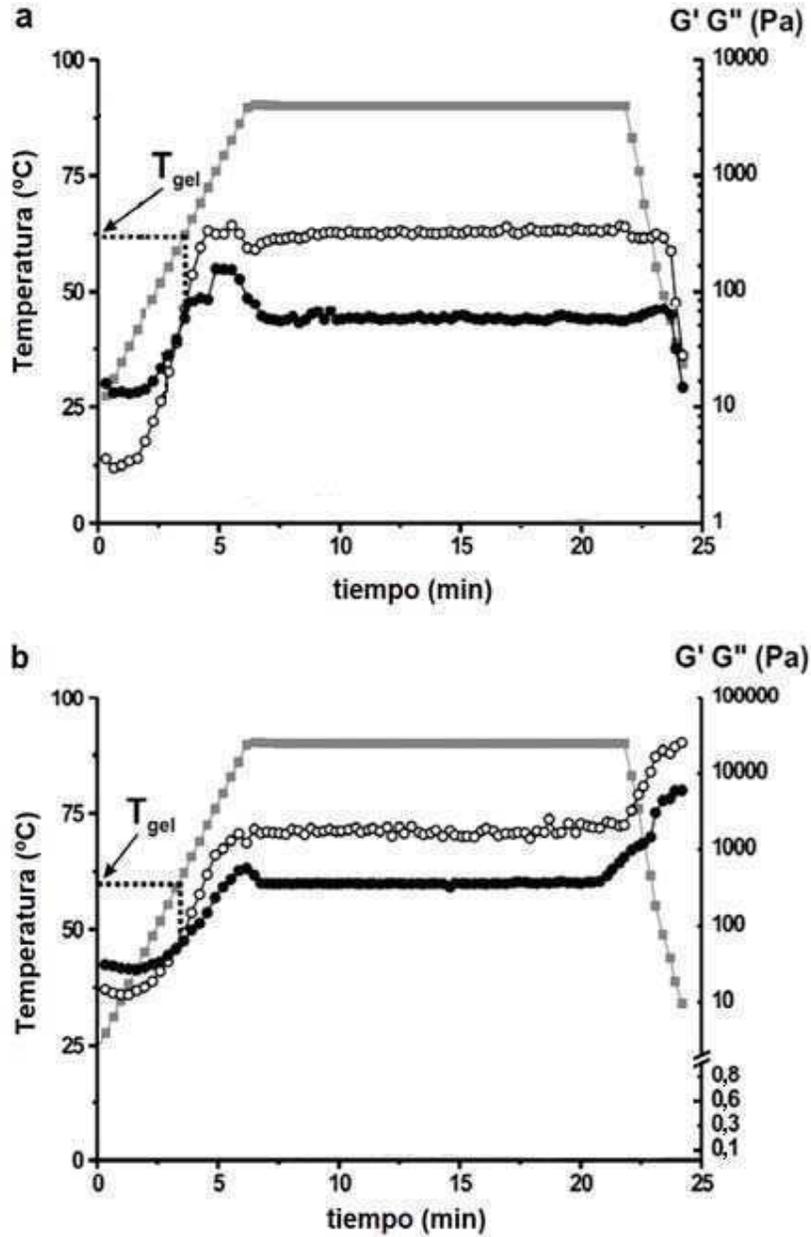


Figura 3.10. Evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G'), de pérdida (G''), para la gelificación de mezclas WPC 12%/ E50LV 4% (a) y WPC 20%/E50LV 4% (b). Las flechas indican las temperaturas de gelificación (T_{gel}). Temperatura: (■); G' : (○); G'' : (●).

En ambos casos, puede observarse que el valor experimental de T_{gel} es de aproximadamente 60 °C, el cual resulta en el orden de los valores de T_{gel} estimados para la fase rica en E50LV (mediante la ecuación 3). Estos resultados señalan que la T_{gel} determinada experimentalmente en estos sistemas, correspondería a la de la fase segregada rica en E50LV, independientemente de la naturaleza de la fase continua (rica en HPMC, sistema WPC12%/E50LV 4%, Figura 3.6a; rica en WPC, sistema WPC 20%/E50LV 4%, Figura 3.6b). Una posible explicación es que el reómetro detecte la T_{gel} de la fase que gelifica primero, independientemente de si esta es la fase continúa o la dispersa

Finalmente, puede decirse que los resultados expuestos en esta sección evidencian la existencia de una correlación entre la composición de mezclas WPC/HPMC (la cual determina o no la separación en fases) y la temperatura de gelificación de las mismas.

3.4.4.2. Evolución temporal de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') durante el calentamiento y el enfriamiento.

El comportamiento reológico del sistema mixto WPC 12%/E50LV 0,25%, ubicado debajo de la curva binodal (Figura 3.4), mostrado en la Figura 3.9 resultó ser similar al comportamiento reológico del gel de WPC al 12% p/p, mostrado en la misma figura, debido a que la baja concentración E50LV en la mezcla no tiene una influencia significativa sobre las propiedades reológicas de gel mixto.

La dinámica de gelificación que presentaron los sistemas incompatibles (ubicados encima de la curva binodal), WPC 12%/E50LV 4% y WPC 20%/E50LV 4%, se muestran en las Figura 3.10a y b, respectivamente. Puede observarse que, el sistema mixto WPC 20%/E50LV 4% presentó un comportamiento similar al observado para el WPC (Figura 3.7a). Contrariamente, el comportamiento reológico del sistema mixto WPC 12%/E50LV 4% fue similar al comportamiento de E50LV (Figura 3.8). Además, cabe destacar que esta última mezcla, aunque no presentó una temperatura de fusión neta correspondiente a E50LV durante el enfriamiento, si mostró una disminución de G' conjuntamente con un aumento del valor de $\tan \delta$

(Figura 3.10a), siendo este comportamiento reológico indicativo de una incipiente fusión de E50LV.

Estos resultados, y los que se expondrán a continuación, pueden atribuirse a la naturaleza de la fase continua: fase rica en WPC en la mezcla con 12% de WPC; fase rica en E50LV en sistema mixto con un 20% de WPC (Figura 3.6a y b, respectivamente).

La Figura 3.11a-c muestra la evolución en el tiempo del carácter sólido (G') durante el calentamiento para cada sistema mixto WPC/E50LV, junto con el G' correspondiente a los componentes individuales. En primer lugar, puede observarse que en todos los casos el módulo elástico alcanza su valor de equilibrio (G'_{eq} ; valor aproximadamente constante a 90 °C) alrededor de los 15 minutos de comenzado el calentamiento.

El comportamiento de G' de los sistemas mixtos ubicados dentro de la región incompatible del diagrama de fases, WPC 12%/E50LV 4% y WPC 20%/E50LV 4%, se muestra en las Figura 3.11b y c, respectivamente. Se observa un efecto sinérgico en G' para la mezcla con un 12% de WPC: por ejemplo, el valor de G'_{eq} aumentó casi dos veces para este sistema mixto (303,2 Pa) en comparación con el valor obtenido para el gel con un 12% de WPC (151,1 Pa) (Tabla 3.2; Figura 3.7a). En el caso del sistema binario con un 20% de WPC, el G'_{eq} no mostró ningún efecto sinérgico ya que exhibió un valor de 2184,4 Pa para la mezcla, mientras que para el gel de WPC al 20% presentó un valor de G'_{eq} de 2132,1 Pa (Tabla 3.2; Figura 3.7b). Sin embargo, este sistema mixto muestra un efecto sinérgico de G' al comienzo de gelificación (Figura 3.11c). Estos efectos sinérgicos sobre el G' pueden atribuirse a la separación de fases que tiene lugar antes del proceso de gelificación (Pérez y col., 2006; Simonet y col., 2000). Además de dicha separación de fases, otro factor importante que contribuye a este efecto sinérgico de G' sería la gelificación del polisacárido, la cual refuerza el carácter sólido global de la mezcla gelificante. Por el contrario, la falta de efectos sinérgicos en G' podría deberse a la alta concentración inicial de proteína en el seno de la solución binaria, lo que daría lugar a una rápida gelificación de este biopolímero antes de que se alcance un grado de separación fases importante; en este caso la contribución del polisacárido al carácter sólido del gel mixto no resulta de gran importancia (Tolstoguzov, 1995).

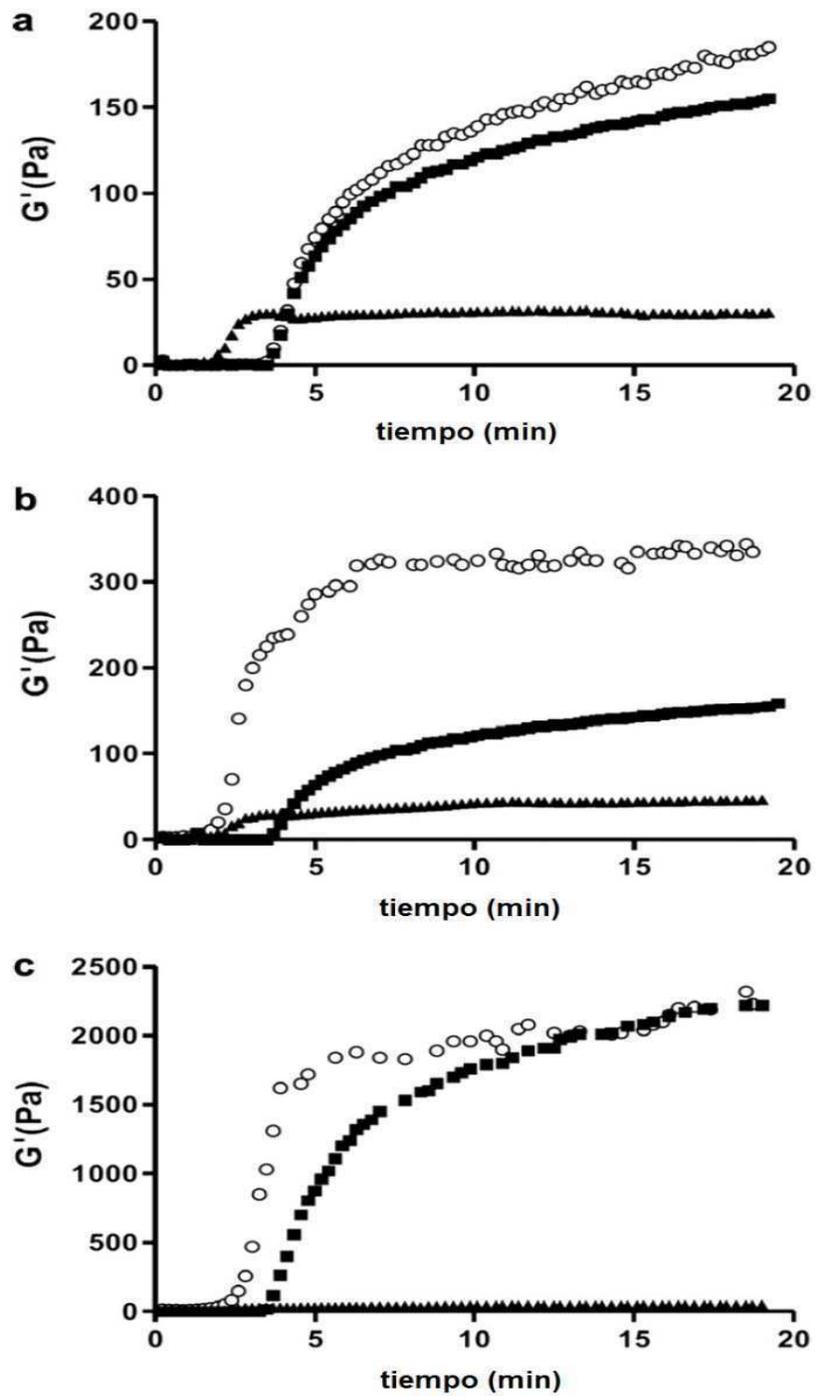


Figura 3.11. Evolución temporal de los módulos de almacenamiento (G') para la gelificación de los sistemas mixtos, WPC 12%/ E50LV 0,25% (a), WPC 12%/ E50LV 4% (b) y WPC 20%/E50LV 4% (c), comparados con los componentes individuales. WPC: (■); E50LV: (▲); mezcla: (○).

La Figura 3.12 muestra el módulo elástico de los geles mixtos WPC/E50LV al enfriarse ($G'_{35^{\circ}\text{C}}$), comparado con los valores de dicho carácter para los componentes individuales. Este parámetro, $G'_{35^{\circ}\text{C}}$, tuvo un comportamiento similar al G'_{eq} : es decir está principalmente determinado por el WPC cuando la cantidad de E50LV presente en la mezcla es baja (sistema mixto WPC 12%/E50LV 0,25%); en los sistemas mixtos con separación de fases, dicho parámetro depende principalmente de la naturaleza de la fase continua (fase rica en WPC para la mezcla WPC 20%/E50LV 4%; fase rica en HPMC en la mezcla WPC 12%/E50LV 4%) (Figura 3.6).

Cabe destacar que el valor de $G'_{35^{\circ}\text{C}}$ para las mezclas WPC 12% /E50LV 0,25% y WPC 20% /E50LV 4% resultó superior al valor de G'_{eq} de estos mismos sistemas (comparación Figuras 3.11 y 3.12). Este hecho indica el fortalecimiento del gel durante el enfriamiento, como consecuencia del desarrollo de puentes de hidrógeno y/o interacciones electroestáticas (Paraskevopoulou y Kiosseoglou, 2000).

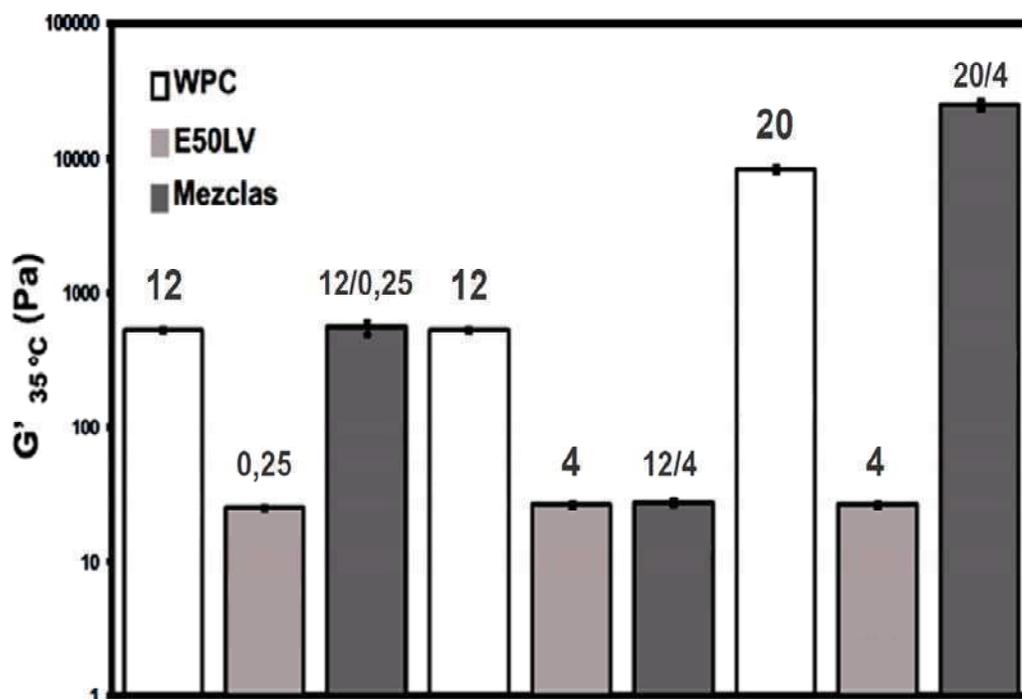


Figura 3.12. Comportamiento del carácter sólido ($G'_{35^{\circ}\text{C}}$) durante el enfriamiento para los geles mixtos WPC/E50LV comparados con los valores de los componentes individuales. El número sobre cada barra se indica el % p/p para WPC (12 o 20 %) y E50LV (0,25 o 4%). La barra de error corresponde a la desviación estándar de la medición.

Por el contrario, el $G_{35^{\circ}\text{C}}$ del sistema mixto WPC 12%/E50LV 4% fue inferior a su G'_{eq} , indicando un debilitamiento del gel atribuible a la incipiente fusión de E50LV (comparación Figuras 3.11 y 3.12; Figura 3.8). Con respecto a este hecho, Tolstoguzov (1997) señaló que el carácter sólido (G') de un gel mixto de proteína y polisacárido, estaría gobernado por este último polímero cuando este constituye la fase continua del sistema segregado.

Los valores de la tangente del ángulo δ (relación G''/G') durante el enfriamiento ($\tan \delta_{20^{\circ}\text{C}}$) para los tres geles mixtos WPC/E50LV, comparado con el valor de este parámetro determinado para los componentes individuales, se muestran en la Figura 3.13. El parámetro $\tan \delta$, también denominado “factor de amortiguación”, es una medida de la viscoelasticidad relativa de un gel (G''/G'). Como era esperable, este parámetro presentó un comportamiento que concuerda con los resultados obtenidos para el carácter sólido del gel durante el enfriamiento, $G'_{35^{\circ}\text{C}}$ (Figura 3.12).

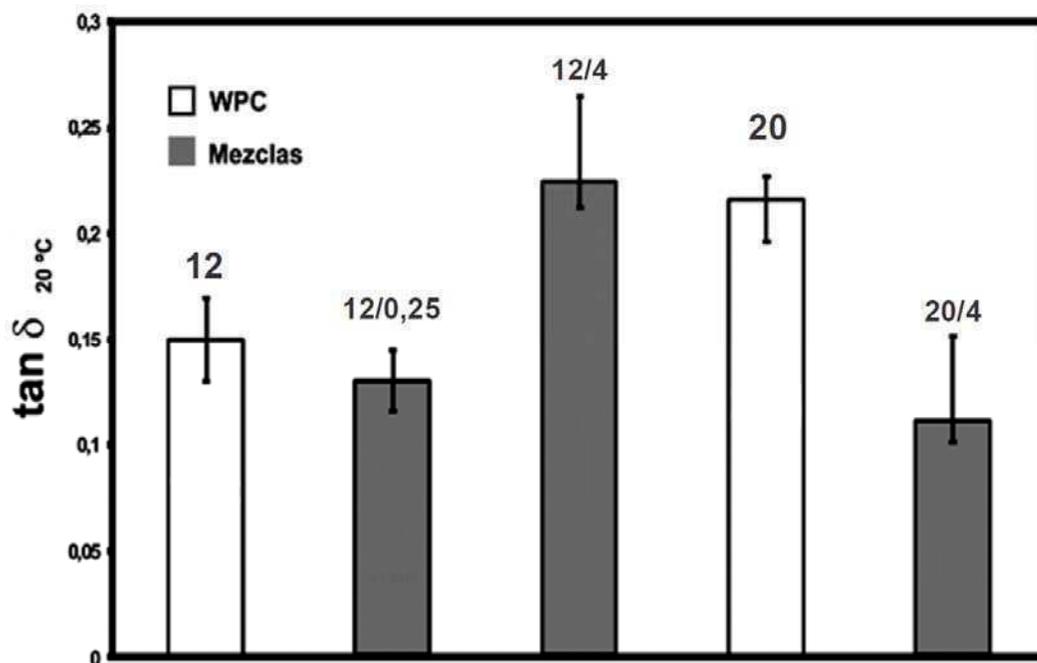


Figura 3.13. Viscoelasticidad relativa durante el enfriamiento ($\tan \delta_{20^{\circ}\text{C}}$) para los geles mixtos WPC/E50LV comparados con los valores de los componentes individuales. El número sobre cada barra se indica el % p/p para WPC (12 o 20 %) y E50LV (0,25 o 4%). La barra de error corresponde a la desviación estándar de la medición.

Por lo tanto, el gel mixto WPC 12%/E50LV 0,25% presentó un viscoelasticidad relativa similar al gel de WPC al 12%; el gel mixto WPC 12%/E50LV 4% resultó menos elástico (o más viscoso) que el gel con un 12% de WPC, debido a la incipiente fusión E50LV; finalmente, el gel mixto WPC 20%/E50LV 4% fue más elástico (o más sólido) que el gel de WPC al 20%, ya que existe un fortalecimiento del gel mixto (descrito anteriormente). Nuevamente, el comportamiento observado en estos dos últimos geles mixtos está relacionado con la naturaleza de la fase continua, constituida por la fase rica en E50LV en el primer sistema, y por la fase rica en WPC, en el segundo.

3.4.5. Macro-estructura y propiedades texturales de los geles mixtos WPC/E50LV.

La Figura 3.14 muestra el aspecto macroscópico de un gel al 12 % p/p de WPC (Figura 3.14a), y los geles mixtos con un 12% p/p de WPC, y un 0,25 o un 4 % p/p E50LV (Figura 3.14 b y c, respectivamente). Cabe destacar que ninguno de estos geles presentó sinéresis.

La apariencia del gel mixto WPC 12%/E50LV 0,25% es la de un gel auto-soportable, cohesivo y no opaco, similar al gel de WPC al 12% p/p (Figura 3.14a).

Al aumentar la concentración de polisacárido a un 4% p/p, se obtiene un gel que no se auto soporta (Figura 3.14c). Como ya se mencionó anteriormente, la fase rica en E50LV constituye la fase continua de este sistema mixto (Figura 3.6a). Por lo tanto, la incipiente fusión E50LV que tiene lugar en el enfriamiento de este gel mixto (Figura 3.10a) produce el debilitamiento de la matriz, dando lugar a un gel débil que no se auto-soporta.

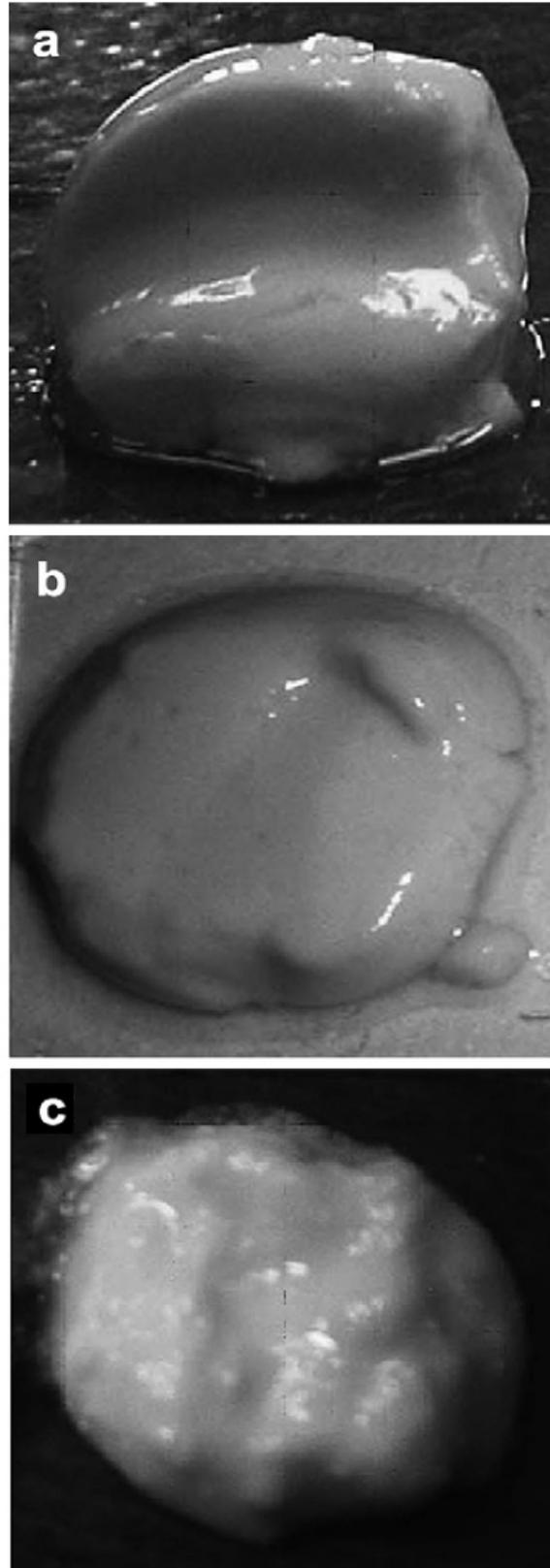


Figura 3.14. Vista macroscópica del gel de WPC 12% p/p (a), y de los geles mixtos WPC 12%/E50LV 0,25% (b) y WPC 12%/E50LV 4% (c).

Contrariamente, la fase continua del gel mixto WPC 20%/E50LV 4% está constituida por la proteína, siendo el carácter sólido del gel mixto determinado por el WPC. Así, dicho gel mixto (Figura 3.15) resulta ser auto-soportable y opaco, similar al gel de WPC al 20% p/p (Figura 3.15a).

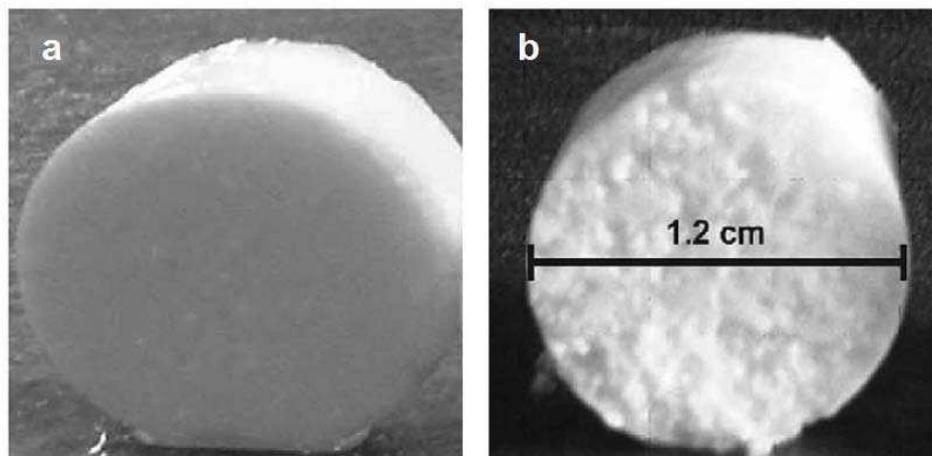


Figura 3.15. Vista macroscópica del gel de WPC 20% p/p (a), y del gel mixto WPC 20% p/p/ E50LV 4% p/p (b).

Sin embargo no se debe dejar de notar, que este gel mixto mostró una macro-estructura particulada, generada porque la fase continua rica en proteína gelificada mantiene atrapados a los dominios dispersos ricos en E50LV, también gelificados, durante la etapa de enfriamiento. Finalmente, ninguno de los dos geles presentó sinéresis, y este gel particulado resultó ser el más firme de los geles mixtos.

Los ensayos de textura, mostraron que la presencia de un 0,25% p/p de E50LV no modifica la dureza y/o la elasticidad de los geles mixtos (Figura 3.16a-b), ya que estos parámetros texturales resultaron similares a los determinados para el gel de WPC al 12% p/p.

Por otra parte, independientemente de si E50LV constituye la fase continua (sistema WPC 12%/E50LV 4%) o la dispersa (WPC 20%/E50LV 4%) la dureza de gel mixto disminuye marcadamente, en comparación con los geles de WPC (Figura 3.16a).

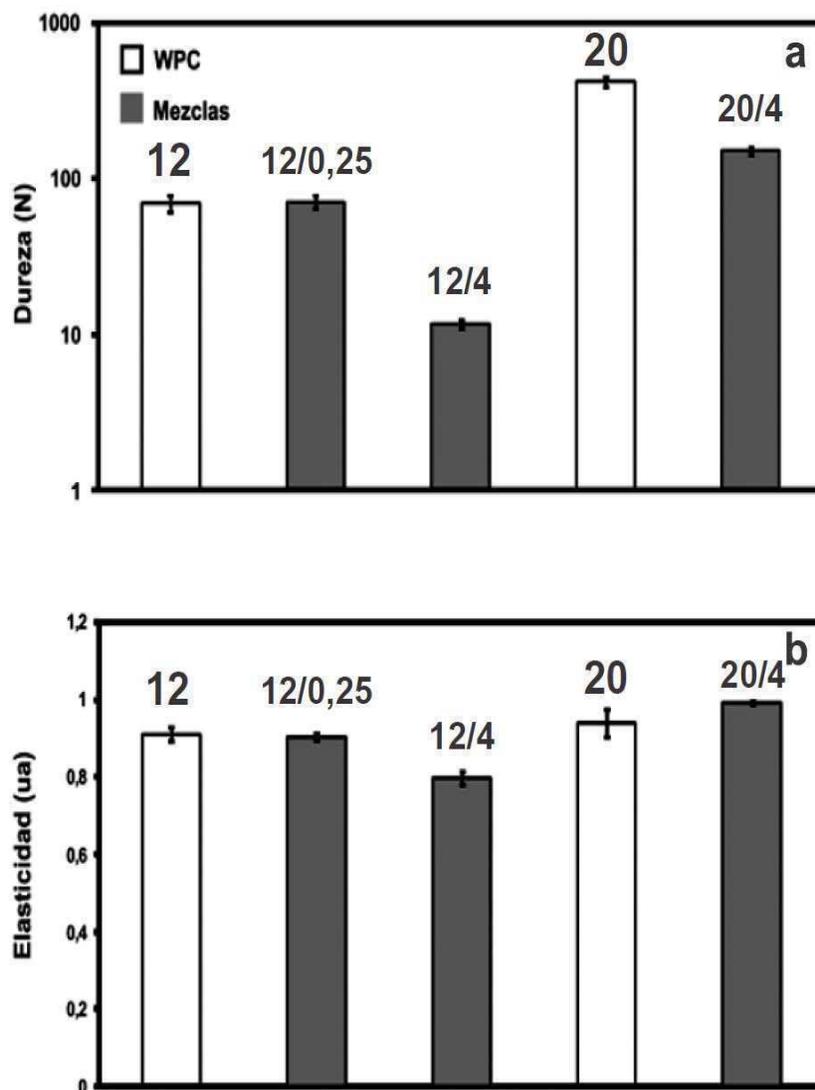


Figura 3.16. Dureza (a) y elasticidad (b) de los geles mixtos WPC/E50LV comparadas con los valores obtenidos para WPC. El número sobre cada barra se indica el % p/p para WPC (12 o 20 %) y E50LV (0,25 o 4%). Las barras de error corresponden al desvío estándar de las mediciones.

Con respecto a este hecho, Rosell y Foegeding (2007) sugirieron que la HPMC podría interferir con la asociación proteica inicial y su ulterior agregación durante el calentamiento, probablemente ocupando espacio dentro de la red de proteína, causando su debilitamiento, y por ende la disminución de su dureza.

Por último, la elasticidad disminuyó ligeramente en el gel mixto WPC 12 %/E50LV 4 % p/p, lo cual está relacionado a la existencia de una fase

continua de HPMC parcialmente fundida. En los otros geles no se observaron diferencias importantes (Fig 3.16b).

3.5. Conclusiones.

Los estudios llevados a cabo en el presente capítulo demostraron que los sistemas ternarios WPC/HPMC/agua se comportan como una emulsión agua-en-agua, donde la micro-estructura de la misma está determinada por la relación de volúmenes entre las fases segregadas.

Así mismo, se encontró que dicha micro-estructura define tanto el comportamiento reológico como las características macroestructurales de los geles mixtos,

- i) El carácter sólido (G') de los geles está determinado por el componente que constituye la fase continua, tanto en el equilibrio durante el calentamiento, cuando el gel ya está formado (G'_{eq}), como durante el enfriamiento cuando la matriz se endurece debido, principalmente, a la formación de puentes de hidrogeno ($G'_{35^{\circ}C}$)
- ii) De igual manera la viscoelasticidad relativa del gel en frío, $\tan \delta_{20^{\circ}C}$, queda demarcada por la naturaleza de la fase continua.
- iii) Sin embargo, la temperatura gelificación (T_{gel}) resultó siempre similar a la temperatura de gelificación de la fase rica en HPMC. Una posible explicación de este hecho, es que el reómetro detecte la T_{gel} de la fase que gelifica primero, independientemente de si esta es la fase continua o la dispersa.
- iv) Finalmente, al igual que los parámetros reológicos las características macro-estructurales de los geles están correlacionadas con la naturaleza de la fase continua.

3.6. Referencias.

Alves M. M., Antonov Y. A., and Goncalves M. P. (1999). The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 13, 157-166.

Antonov Y. U., Losinskaya N. V., Grinberg V. Y., Dianova V. T., and Tolstoguzov V. B. (1979). Phases equilibria in water-protein-polysaccharide systems III. Water bean globulins-polysaccharide systems. *Colloid and Polymer Science*, 257, 1159-1179.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official methods of analysis (16th edition). AOAC Press, Arlington, TX, USA.

Baeza R. I., and Pilosof A. M. R. (2001). Mixed biopolymer gel systems of β -lactoglobulin and non-gelling gums. *Food Colloids, Fundamentals of Formulation*. Eds: E. Dickinson and R. Miller, (pp. 392-403). RSC Cambridge, UK.

Bourne M. C., and Szczesniak A. S. (2003). SENSORY EVALUATION-Texture. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd edition)*. Eds: B. Caballero, P. Finglas and L. Trugo, (pp. 5167-5174). ACADEMIC PRESS, Maryland Heights, MO, USA.

Clark A. H. (2000). Direct analysis of experimental tie line data (two polymer-one solvent systems) using Florye-Huggins theory. *Carbohydrate Polymers*, 42, 337-351.

Doublier J. L., Garnier C., Renard D., and Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 202-214.

Ercelebi E. A., and Ibanoglu E. (2007). Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 80, 454-459.

Fernandes P. (1994). Viscoelastics characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 8, 277-285.

Firoozmand H., Murray B. S., and Dickinson E. (2009). Microstructure and rheology of phase-separated gels of gelatin + oxidized starch. *Food Hydrocolloids*, 23, 1081-1088.

Fitzsimons S. M., Mulvihill D. M., and Morris E. R. (2008). Co-gels of whey protein isolate with crosslinked waxy maize starch: analysis of solvent partition and phase structure by polymer blending laws. *Food Hydrocolloids*, 22, 468-484.

Grinberg V. Y., and Tolstoguzov V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11, 145-158.

Gunasekaram S., and Mehmet A. K. M. (2003). Cheese Rheology and Texture. (pp. 437). CRC Press, Florida, FL, USA.

Hoffmann M. A. M., and van Mil P. J. J. M. (1999). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1898-1905.

Kato T., Yokoyama M., and Takahashi A. (1978). Melting temperatures of thermally reversible gels IV. Methyl cellulose-water gels. *Colloid and Polymer Science*, 266, 15-21.

- Kim H. J., Decker E. A., and McClements D. J. (2006). Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 20, 586-595.
- Kobayashi K., Huang C., and Lodge T. P. (1999). Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules*, 32, 7070-7077.
- Lorén N., and Hermansson A. M. (2003). Structure evolution during phase separation and gelation of biopolymer mixtures. *Food Colloids, Biopolymers and Materials*. Eds: E. Dickinson and T. V. Vliet, (pp. 298-308). RSC Publishing, Cambridge, UK.
- Norton I. T., and Frith W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15, 543-553.
- Norton I. T., and Frith W. J. (2003). Phase separation in mixed biopolymer systems. *Food Colloids, Biopolymers and Materials*. Eds: E. Dickinson and T. v. Vliet, (pp. 282-296). RSC Press, Cambridge, UK.
- Paraskevopoulou A., and Kiosseoglou V. (2000). Small deformation measurements of single and mixed gels of low cholesterol yolk and egg white. *Journal of Texture Studies*, 31, 225-244.
- Pérez O. E., Wargon V., and Pilosof A. M. R. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/ hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 966-974.
- Puyol P., Perez M. D., and Horne D. S. (2001). Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids*, 15, 233-237.
- Rosell C. M., and Foegeding A. (2007). Interactions of hydroxypropylmethylcellulose with gluten proteins: Small deformation properties during thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 21, 1092-1100.
- Sarkar N., and Walker L. C. (1995). Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 27, 177-185.
- Schorsch C., Jones M. G., and Norton I. T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/ locust bean gum/ sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 89-99.
- Simonet F., Garnier C., and Doublier J. L. (2000). Partition of proteins in the aqueous guar/ dextran two-phase system. *Food Hydrocolloids*, 14, 591-600.
- Tanaka F. (1996). Phase formation of associating polymers: gelation, phase separation and microphase formation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 63, 23-40.
- Tolstoguzov V. (2007). Ingredient interactions in complex foods: aggregation and phase separation. *Understanding and controlling the microstructure of complex foods*. Ed: J. McClements, (pp. 186-206). CRC Press, Cambridge, UK.
- Tolstoguzov V. B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), 317-322.

Tolstoguzov V. B. (1997). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, 11, 159-170.

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

Verheul M., Pedersen J. S., Roefs S. P. F. M., and Kruif K. G. d. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.

Yoguchi Y., Urakawa H., Kitamura S., Ohno S., and Kajiwara K. (1995). Gelation mechanism of methylhydroxypropylcellulose in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 9(3), 173-179.

Zhuravskaya N. A., Kiknadze E. V., Antonov Y. A., and Tolstoguzov V. B. (1986a). Concentration of proteins as a result of the phase separation of water-protein-polysaccharide systems. Parts 1. Phase equilibria in water-milk proteins-polysaccharide systems. *Die Nahrung*, 30(6), 591-599.

Zhuravskaya N. A., Kiknadze E. V., Antonov Y. A., and Tolstoguzov V. B. (1986b). Concentration of proteins as a result of the phase separation of water-protein-polysaccharide systems. Part 2. Concentration of milk proteins *Die Nahrung* 30(6), 601-613.

Capítulo IV

**Comportamiento interfacial de
mezclas de β -lactoglobulina e
hidroxipropilmetilcelulosa.**

Efecto del pH

4.1. Introducción.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos en interfases son de gran importancia para la formación y la estabilidad de espumas y emulsiones, así como para el diseño de películas interfaciales con propiedades específicas.

En los últimos años se ha abordado el estudio de las propiedades interfaciales aire-agua de proteínas del suero lácteo y otras proteínas en presencia de polisacáridos con y sin actividad interfacial (Baeza y col., 2005; Baeza y col., 2004; Ganzevles y col., 2006; Martínez y col., 2007; Pérez y col., 2009; Pérez y col., 2006; Pérez y col., 2007) en condiciones donde pueden existir fenómenos de limitada compatibilidad termodinámica (no hay separación macroscópica de fases predominando el fenómeno de volúmenes de exclusión). Estas condiciones son: pH 7, concentración de proteína 2% máximo, concentración de polisacárido 1 % máximo. Los estudios interfaciales realizados permitieron determinar la existencia de fenómenos competitivos o cooperativos entre los biopolímeros a nivel de las películas interfaciales.

En el caso de las proteínas, sus propiedades tensioactivas radican en su naturaleza anfifílica: son capaces de formar una monocapa interfacial ya que pueden orientar sus segmentos hidrofóbicos hacia la fase hidrofóbica (aire o aceite) mientras que sus regiones hidrofílicas estarán orientadas hacia la fase acuosa (Damodaran, 1996). Más aún, el número de segmentos que se distribuyen en la interfase dependerá de la flexibilidad molecular y de la afinidad de la proteína por la subfase (Dickinson, 1992). Como se mencionó anteriormente, las principales proteínas del suero lácteo son la β -lactoglobulina (β -lg), la α -lactalbúmina (α -lac) y seroalbúmina bovina (BSA), las cuales son responsables de la capacidad espumante y emulsificante de los concentrados y aislados de proteínas de suero (WPC y WPI, respectivamente) (Wong y col., 1996)

Con respecto a los polisacáridos, en general, aquellos de alto peso molecular y de naturaleza principalmente hidrofílica, no tienen una gran tendencia a adsorberse en la interfase aire-agua. Sin embargo, los polisacáridos derivados de la celulosa constituyen una excepción ya que son tensioactivos, debido a la introducción de grupos hidrófobos que les permiten comportarse como

surfactantes. En el caso específico de la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), dichos grupos son los sustituyentes hidroxipropilos y metilos. Así, esta macromolécula es capaz de adsorberse tanto en las interfase aire-agua como aceite-agua (Ochoa-Machiste y Buckton, 1996 ; Wollenweber y col., 2000). Pérez y col. (2006) determinaron las propiedades tensioactivas y las características estructurales de las películas interfaciales aire-agua de tres tipos de HPMC comerciales (denominadas E4M, E50LV y F4M). Estos autores encontraron que las moléculas de HPMC son capaces de difundir y saturar la interfase aire-agua a concentraciones muy bajas en la subfase. Además, los tres tipos de HPMC forman películas muy elásticas.

Pérez y col. (2009; 2007) estudiaron las propiedades interfaciales dinámicas y en el equilibrio, para mezclas de WPC (concentrado de proteína de suero) y HPMC a pH 7 y concentraciones de proteína y polisacárido que permiten la saturación de la interfase (1 a 2 % p/v). En estas condiciones dichos biopolímeros presentan una limitada compatibilidad. La evolución de la presión superficial con el tiempo para mezclas de HPMC con WPC, mostró una conducta competitiva, dominada por HPMC a causa de su actividad superficial excepcionalmente alta. La componente elástica del módulo dilatacional (E_d) de las películas mixtas en tiempos cortos de adsorción fue dominada por el componente que se adsorbe más rápidamente (HPMC). En tiempos largos de adsorción, E_d fue dominado por el componente con el mayor E_d (WPC). En mezclas de HPMC y proteína de soja se observó un comportamiento semejante, siendo dominada la elasticidad de la película por la HPMC, la cual presentó un E_d mucho mayor que la proteína de soja (Martínez y col., 2007). Por otra parte, en la mezcla WPC/HPMC, en condiciones donde ninguno de los dos componentes por sí mismo satura la interfase (concentraciones del orden de $1 \cdot 10^{-2}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ % p/v) no se observa un comportamiento competitivo, sino más bien aditivo o sinérgico, indicando que ambos componentes coexisten en la interfase contribuyendo en forma cooperativa al aumento de la presión superficial. En este caso, sin embargo, la elasticidad dilatacional de las películas mixtas muestra valores menores que los componentes puros señalando que en condiciones de no saturación, la presencia de HPMC

interfiere en la agregación interfacial de WPC necesaria para estructurar la interfase (Pérez y col., 2007)

Aunque se conoce bastante de estos sistemas, las propiedades de las películas interfaciales mixtas proteína/polisacárido, no están del todo caracterizadas. Como ya se menciona, en la “Introducción General” (Capítulo I, sección 1.5.2.4.), el efecto de los polisacáridos en las propiedades interfaciales de una proteína es complejo por lo cual no se puede predecir en forma simple el comportamiento de mezclas de proteínas y polisacáridos debido a la coexistencia de diferentes y complejos fenómenos (Figura 1.22).

En particular, se hace necesario estudiar la relación entre las propiedades de la película interfacial y las características de la subfase acuosa, dado que las propiedades de la interfase están afectadas por el estado estructural de los segmentos macromoleculares subyacentes en la fase acuosa (Dickinson, 2003; Murray, 2002). Es sabido que las propiedades de flexibilidad y afinidad tanto de proteínas como de polisacáridos, resultan ampliamente influenciadas por factores como el pH, la fuerza iónica, y la temperatura de la subfase (Damodaran, 1996).

Por tanto, la comprensión del impacto de las condiciones existentes en la subfase sobre las propiedades de las películas interfaciales mixtas proteína/polisacárido, resulta crucial para el desarrollo tecnológico y funcional de las dispersiones alimenticias.

4.2. Objetivo.

Estudiar el comportamiento interfacial en relación al pH, de mezclas de β -lactoglobulina y HPMC en condiciones de compatibilidad termodinámica.

4.3. Materiales y Métodos.

4.3.1. Materiales.

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se utilizó una hidroxipropilmetilcelulosa de amplio uso comercial, denominada Methocel[®] E50LV (Dow Chemical

Company[®]), la cual fue gentilmente donada por Colorcon-Argentina. Esta es una HPMC de calidad alimentaria y fue utilizada sin purificación posterior.

β -lactoglobulina (β -lg). La β -lactoglobulina utilizada (BioPURE β -lactoglobulin) se adquirió de Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, MN, USA). Composición del polvo: 97,8 % de proteína (base seca) siendo β -lactoglobulina el 93,6 % del total de proteínas, 0,3 % de grasa, 1,8 % de ceniza y 5,0 % de humedad.

Otros reactivos químicos. Todo el material de vidrio a emplear para preparar cualquier solución se lavó perfectamente con detergente, se enjuagó con agua destilada, y se trató con mezcla sulfocrómica (ácido sulfúrico concentrado y persulfato amónico, en una concentración de 8 g/l); después se volvió a enjuagar con agua destilada. Este procedimiento tiene como objeto eliminar residuos de grasa o cualquier sustancia tensioactiva.

Las soluciones buffer se prepararon en agua desionizada (resistividad 18 M Ω .cm) obtenida de una unidad Milli-Q[™] (Millipore, Billerica, MA, USA). Cada reactivo en polvo se pesó en una balanza analítica (VXI, Modelo 60/220, PCE Grupo Ibérica S. L., Tobarra, España). El buffer de pH 3 (acetato) se obtuvo disolviendo en agua desionizada ácido acético (CH₃-COOH) y acetato de sodio (CH₃COONa) de grado analítico (ambos de Sigma-Aldrich Chemie GmbH; pureza > 99,99%) en las proporciones adecuadas para que la fuerza iónica de la solución sea 0,05 M. A dicho buffer se le añade unas gotas de solución de azida sódica (NaN₃) 0,2 N (Sigma-Aldrich, de pureza > 99,99 %), la cual actúa como agente antimicrobiano, y se ajusta el pH con el agregado de HCl 1N o NaOH 1N. Para preparar el buffer de pH 6 (fosfato) se disolvió también en agua desionizada, potasio di-hidrogeno fosfato (KH₂PO₄) y potasio hidrogeno fosfato (K₂HPO₄) (ambos provistos por Sigma-Aldrich Chemie GmbH; pureza 99,9 %) en la proporción adecuada para conseguir una solución de fuerza iónica 0,05. En este caso también se agregan unas gotas de azida sódica 0,2 N, y se ajustó el pH con HCl 1N o NaOH 1N. El pH de las de los buffer se verificó con un medidor de pH modelo A920 de Orion Research Inc. (Beverly, MA, USA).

4.3.2. Preparación de soluciones madres.

Se preparó una solución madre de β -lg en buffer fosfato (pH 6) o buffer acetato (pH 3), a una concentración del 4% p/v. La masa requerida de polvo se pesó en una balanza analítica (VXI, Modelo 60/220, PCE Grupo Ibérica) y fue dispersado en el buffer correspondiente a temperatura ambiente (25°C), con agitación durante 15 minutos (agitador magnético modelo C-MAG HS7, IKA®, Wilmington, NC, USA) para permitir la completa disolución. Después de la preparación, esta solución se almacenó en heladera (4°C).

La solución madre de E50LV se preparó al 1% p/v dispersando el polvo en el buffer, de pH 6 o 3 (previamente calentado a 85 °C), con agitación manual para permitir la disolución completa del polvo. Luego, se enfrió la solución a temperatura ambiente (25 °C) mediante baño en agua, y se agregó la masa de agua perdida por evaporación. Por último, esta solución se almacenó en heladera a 4 °C por 24 hs para permitir que el polisacárido alcanzara el máximo grado de hidratación.

Antes de los experimentos, ambas soluciones madres fueron llevadas a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un baño termostático (modelo HBR 4, IKA®, Wilmington, NC, USA).

4.3.3. Preparación de los sistemas mixtos.

Las soluciones binarias de proteína y HPMC se prepararon mezclando volúmenes de ambas soluciones de modo tal de obtener el sistema mixto con 2 % p/v β -lg y 0,5 % p/v de E50LV al pH requerido. Posteriormente, la mezcla se sometió a agitación durante 30 minutos (agitador magnético modelo C-MAG HS7, IKA®) para lograr una distribución homogénea de los componentes. Luego se controló el pH con un pH-metro modelo A920 de Orion Research Inc., y se almacenó en heladera a 4 °C por 24 hs para lograr el equilibrio de los componentes en la mezcla. Antes de los experimentos, la mezcla fue llevada a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un baño termostático (modelo HBR 4, IKA®).

4.3.4. Determinación de las propiedades interfaciales.

Por definición, la tensión superficial se mide en la interfase gas-líquido, mientras que la tensión interfacial es medida en la interfase líquido-líquido. Ambas propiedades son determinadas usando instrumentos denominados tensiómetros superficiales o interfaciales, respectivamente. Estos tensiómetros son empleados para obtener información sobre las características de las superficies o de las interfases y las propiedades de los emulsionantes en solución, tales como su concentración en exceso, su presión superficial, la concentración micelar crítica y la cinética de adsorción (Carrera Sánchez, 2000; Evans y Wennerstrom, 1994).

Existe una amplia variedad de tensiómetros; estos difieren dependiendo del principio físico en el que se basan, el diseño mecánico, de si las medidas son estáticas o dinámicas y de si son capaces de medir la tensión superficial, la interfacial, o ambas. Las medidas estáticas se realizan en superficies o interfases que se encuentran en equilibrio, mientras que las dinámicas se llevan a cabo en sistemas que no se encuentran en equilibrio (Carrera Sánchez, 2000).

4.3.4.1. Determinación de la tensión superficial.

Los métodos empleados en esta parte del trabajo fueron los siguientes,

- i) Método estático basado en la medida de una fuerza: Tensiómetro tipo Wilhelmy.
- ii) Método dinámico basado en una medida geométrica: Tensiómetro de gota.

Mediante estas técnicas se estudiaron las propiedades interfaciales de la proteína y el polisacárido individualmente, así como también de las mezclas detalladas en la sección anterior.

En el tensiómetro tipo Wilhelmy sólo se estudiaron los biopolímeros individualmente, a pH 6 y 3, en concentraciones seriadas que fueron desde

1.10^{-1} hasta 1.10^{-8} % p/v. En el tensiómetro de gota, las mediciones de la proteína y el polisacárido individuales se llevaron a cabo a pH 6 y 3, en concentraciones de 2 y 0,5 % p/v, respectivamente.

i) Tensiómetro Tipo Wilhelmy. Determinación de isothermas presión superficial (π) en función de la concentración.

Esta técnica posee una gran importancia debido a su universalidad, precisión y simplicidad. Se fundamenta en que las moléculas de la interfase están sujetas a un esfuerzo (tensión). Cuando un cuerpo sólido se pone en contacto con la interfase, la tensión interfacial actúa a lo largo de la línea de mojado.

El equipo empleado para realizar las medidas de tensión superficial en el equilibrio fue un tensiómetro digital Sigma 701 (KSV, Finlandia). En este tipo de tensiómetro se utiliza como sistema de medida una lámina de platino rectangular, suspendida verticalmente, con una geometría exactamente conocida. El borde inferior de la lámina se pone en contacto con el líquido y se moja, de ese modo la fuerza F con que es empujada la lámina mojada hacia el líquido puede medirse (Figura 4.1).

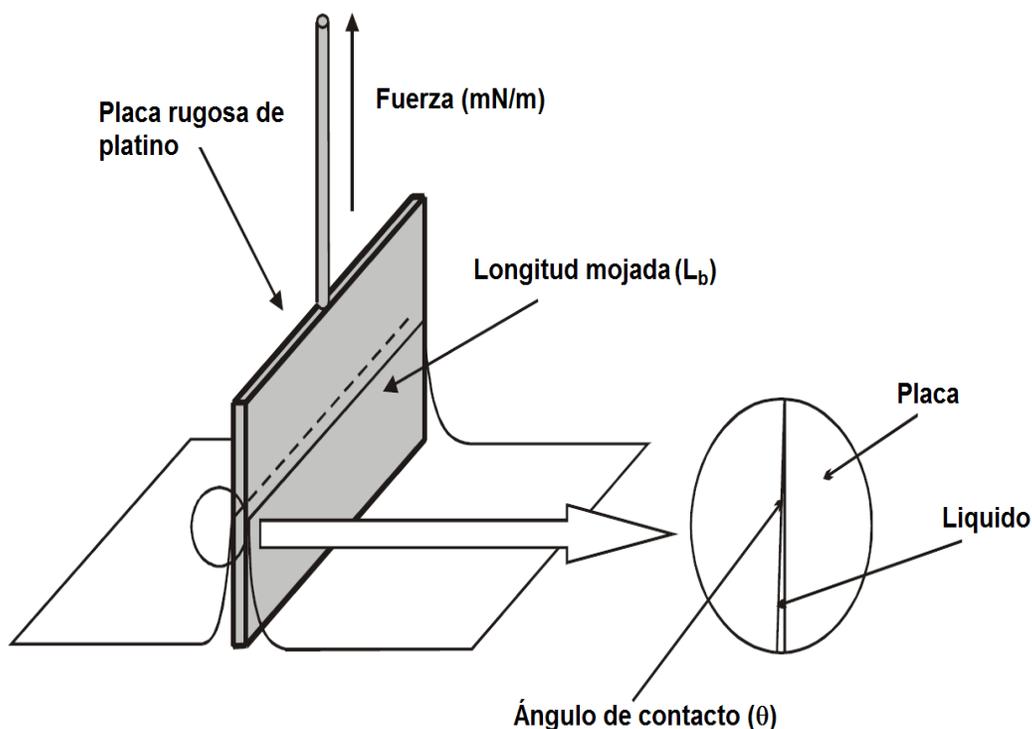


Figura 4.1. Placa del tensiómetro tipo Wilhelmy en posición de medida.

Si L_b es la longitud mojada, entonces la tensión superficial (σ) se define como,

$$\sigma = \frac{F}{L_b \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

donde θ es el ángulo de contacto (entre la superficie de la lámina y la tangente a la línea de mojado). Para medir tensiones interfaciales, la placa debe mojarse completamente en el líquido que se encuentra en un vaso o cápsula de medición.

El tensiómetro mencionado anteriormente, consta de un vaso circular (termostatzado) con un área $63,6 \text{ cm}^2$ donde se introduce la cápsula conteniendo la solución acuosa que se desea medir. La longitud mojada de la placa de platino está determinada por $2l + 2b$, donde l , es el largo de la placa y b , su espesor. En este caso las dimensiones de la placa son: $l = 19,9 \text{ mm}$ y $b = 0,1 \text{ mm}$ por lo que $L_b = 40 \text{ mm}$. La temperatura del sistema se mantiene constante $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, mediante circulación de agua por una camisa que rodea el recipiente de medida desde un termostato. La Figura 4.2 es una representación esquemática del equipo.

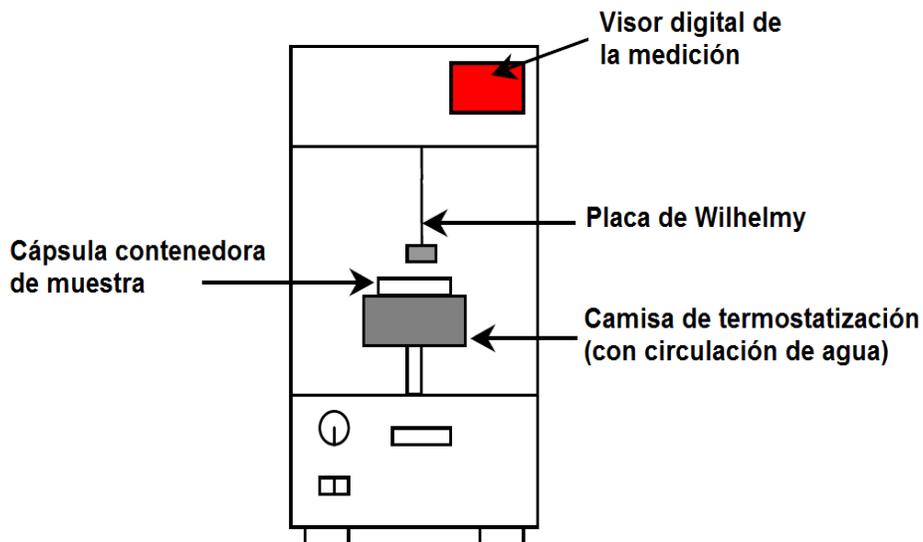


Figura 4.2. Esquema del Tensiómetro de Wilhelmy.

Este equipo se utilizó para realizar medidas de la presión superficial de equilibrio de todas las sustancias tensioactivas empleadas.

Dicha presión (π_{eq}) se determina a partir de la medida de la tensión superficial,

$$\pi_{eq} = \sigma_0 - \sigma_e \quad (2)$$

donde σ_0 es la tensión superficial de la fase acuosa en ausencia de tensioactivo y σ_e es el valor de equilibrio correspondiente a la tensión superficial cuando en la interfase acuosa hay un exceso de tensioactivo.

Para obtener los valores de equilibrio, se siguió el siguiente procedimiento: una vez preparadas las soluciones, se conservaron a 4 °C durante 24 h con el objetivo de alcanzar el estado de equilibrio, momento en cual la tensión superficial fue medida. Se vertieron aproximadamente 25 ml de solución de la proteína o el polisacárido a medir en la cápsula de medición. En primer lugar se ajustó el cero con la placa suspendida cerca del líquido. Luego, se subió la plataforma con el vaso que contiene el líquido hasta que este entra en contacto con la placa, momento en el cual comenzó la medida. De esta manera se mide la tensión superficial de la interfase a la temperatura constante, 25 °C. Se asumió que la tensión superficial alcanza el equilibrio, cuando la medida no varía más de 0,1 mN/m en 30 minutos, momento en el cual finalizó la medición. Como norma general, en todas las experiencias realizadas con el tensiómetro de Wilhelmy, antes de realizar cualquier medida de tensión superficial, la placa de platino se calentó a la llama de un mechero Bunsen, con el fin de eliminar cualquier impureza que pudiera contaminar la superficie. Los vasos que contenían las soluciones se limpiaron cuidadosamente, usando mezcla sulfocrómica, enjuagadas con agua destilada varias veces y secadas por último a la llama del mechero.

Con los datos obtenidos de la tensión superficial de equilibrio, se construyeron las isotermas de presión superficial, las cuales constituyen la representación de la presión superficial en función del logaritmo en base diez de la concentración del biopolímero en el seno de la fase.

ii) *Tensiómetro de Gota. Determinación dinámica de la presión superficial (π) a partir del perfil de la gota.*

Los métodos de gota sésil y pendiente pueden ser empleados para determinar tensiones dinámicas superficiales o interfaciales de líquidos (Couper, 1993; Hunter, 1986).

La forma de una gota de líquido depende de un balance entre fuerzas gravitacionales y superficiales. Las fuerzas superficiales favorecen la forma esférica de la gota debido a que esta forma minimiza el área de contacto entre el líquido y su alrededor. Por otro lado, las fuerzas gravitacionales tienden a ocasionar una gota aplanada (si se encuentra sobre una superficie sólida) o una gota elongada (si se encuentra colgando de una superficie sólida). La forma de equilibrio adoptada por la gota está determinada por su volumen, densidad y su tensión superficial o interfacial (McClements, 1999).

A continuación se describe el método de la gota pendiente, que fue el método empleado en el presente trabajo. Mediante este método se puede obtener dinámica y simultáneamente la tensión interfacial/superficial de la película y las propiedades reológicas de las mismas.

Las mediciones dinámicas de tensión superficial de las películas interfaciales aire-agua se realizaron en un tensiómetro automático de gota modelo Tracker IT Concept (Longessaigne, Francia). La Figura 4.3 muestra un esquema del equipo donde se pueden distinguir dos zonas principales, las cuales se describen a continuación,

- i) Dispositivo de formación de la gota. En éste se forma y se controla la gota que se encuentra dentro de la cubeta. Consta de dos partes; la primera de ellas formada por la jeringa que termina en un capilar (aguja), su cubierta (control de temperatura), y su sistema de impulsión; la segunda, formada por una cubeta de vidrio (paralelepípedo de dimensiones: alto 40 mm, largo 20 mm, ancho 10 mm) y una camisa termostalizada donde se introduce ésta. En ambos casos, la temperatura se controla por medio de un baño de circulación de agua, que opera en un rango de 10 a 60 °C. Finalmente, las dos partes están montadas en un dispositivo que permite realizar movimientos verticales y laterales de forma separada. Como ya se

mencionó en este trabajo se empleó la configuración de la gota pendiente. Esta se emplea cuando la densidad de la gota es mayor que la del fluido que se encuentra en el interior de la cubeta, en este caso, aire. Así, la gota queda colgando del extremo de la aguja de la jeringa, y la tensión interfacial entre dos fluidos se determina mediante el análisis del perfil de la gota cuya punta queda dentro de la cubeta.

- ii) Sistema óptico. Incluye una fuente de luz, lentes y una cámara CCD. La gota se ilumina mediante una fuente de luz uniforme, de forma que su perfil queda registrado con la ayuda de la cámara CCD y la computadora.

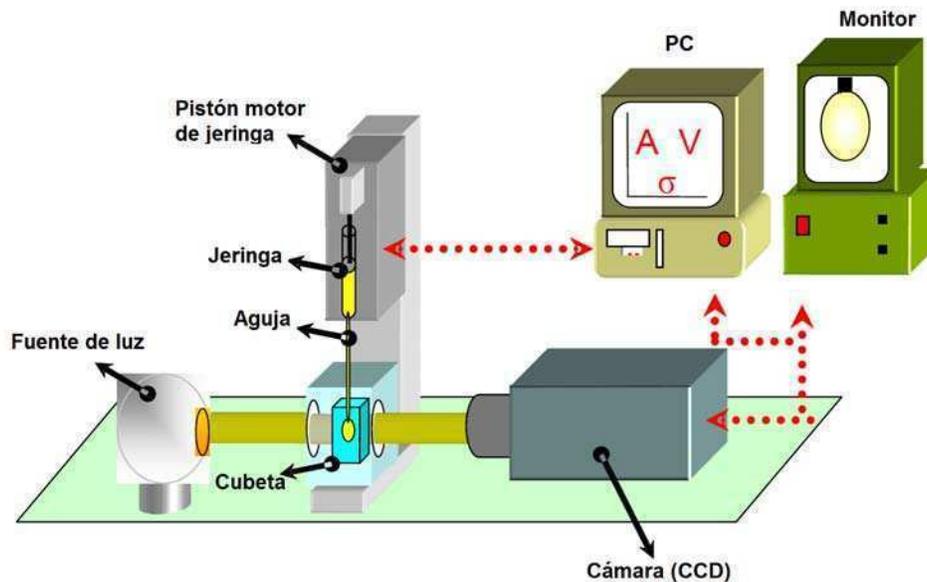


Figura 4.3. Representación esquemática del tensiómetro de gota, con detalle de sus componentes.

Finalmente, todo el equipo queda confinado dentro de una cámara de protección, la cual tiene sus paredes completamente oscuras. Dicha cámara está montada sobre una mesa anti-vibratoria. Ambas cumplen la función de proteger a la unidad de medición de las perturbaciones procedentes del exterior.

Antes de comenzar la medición se procede a la limpieza de la jeringa con la aguja en su extremo para eliminar toda impureza que pueda existir en el interior de la misma (repetidos lavados primero con hexano, luego con etanol, y

finalmente con agua desionizada). Una vez limpia y seca, se succiona un volumen de solución correspondiente a la capacidad total de la jeringa. Posteriormente se coloca la jeringa en un soporte especialmente diseñado para mantenerla en posición vertical teniendo en cuenta que la aguja quede introducida en la cubeta de vidrio. Se observa en la pantalla del monitor la punta de la aguja, la cual debe quedar perfectamente centrada en la parte superior de la imagen.

El paso que sigue es la formación de la gota en el extremo de la aguja que se produce automáticamente una vez que comienza la medición, indicando en el programa la cantidad de microlitros a descargarse para su formación. Una vez formada la gota, comienza inmediatamente la adquisición de datos de tensión superficial en función del tiempo. Para ello, la fuente de luz difusa permite la visualización de la gota, la cual es captada mediante la cámara de video. La señal de video se transmite a un procesador-digitalizador que graba y envía las imágenes a la computadora, la cual realiza el análisis de imagen y los cálculos necesarios sobre datos geométricos de la gota: con estas imágenes se obtiene el perfil completo de la gota, lo que permite calcular el valor de la tensión superficial en un período de tiempo muy corto y con una gran precisión mediante la optimización de dicho perfil con un sistema de ecuaciones. En este caso el perfil de la gota se procesó de acuerdo con la ecuación de Laplace para obtener la tensión superficial,

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \cdot \text{sen } \phi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad (3)$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas en una posición dada del perfil de la gota, b es el radio de curvatura en el punto más bajo de la gota, ϕ es el ángulo de la tangente al perfil de la gota y C es una constante de capilaridad ($C = g \Delta\rho/\sigma$, donde σ es la tensión interfacial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de las dos fases y g es la aceleración de la gravedad).

El software empleado calcula tres parámetros característicos de la gota, que son área(A), volumen (V) y la tensión interfacial (σ). La exactitud promedio de la tensión interfacial con el equipo utilizado en este trabajo es de 0,1 mN/m. Sin embargo la reproducibilidad de los resultados se encuentra en un rango que

oscila entre 0,5 y 1,5 %, correspondiendo la reproducibilidad mínima a temperaturas altas (Rodríguez Patino y col., 1999). Cada medición tuvo una duración aproximada de 12000 segundos. Concluida esta, se retiró la jeringa, se descartó la solución y se procedió con el protocolo de limpieza que consta de repetidos lavados de la jeringa con hexano, seguidos de enjuagues con etanol, y finalmente con agua desionizada.

4.3.4.2. Determinación de las propiedades reológicas de las películas interfaciales.

Las propiedades reológicas describen el comportamiento mecánico de las interfases. Estas determinaciones también se realizaron en el tensiómetro automático de gota Tracker IT Concept.

Se determinaron los siguientes parámetros viscoelásticos: el módulo dilatacional superficial (E), con sus componentes elástica (E_e) y viscosa (E_v), y el ángulo de desfase (δ) que es una medida de la viscoelasticidad relativa de la película. Estos datos se registraron en función del tiempo, de la amplitud de la deformación ($\Delta A/A$) y de la frecuencia de oscilación (ω). El método consiste en someter a la gota a una compresión-expansión sinusoidal controlada automáticamente, a la frecuencia y amplitud deseadas, para la obtención de los parámetros reológicos. Se determinó la variación del área (%), de manera que estuviera en la región viscoelástica lineal. De este modo, en todas las experiencias se mantuvo constante la amplitud y la frecuencia a 10 % y 100 mHz, respectivamente. A partir de los 180 segundos, se somete a la gota a repetidos ciclos de oscilaciones sinusoidales (duración 200 segundos) seguidos por periodos sin oscilación (duración 400 segundos), hasta completar el tiempo total de la medición (12000 segundos).

El software permite la adquisición, el análisis de imagen y la realización de los cálculos necesarios para la obtención de los parámetros reológicos.

El módulo dilatacional superficial se determina a través del cambio de tensión superficial, $d\sigma$, (ecuación 4), que resulta de un pequeño cambio sinusoidal en el área superficial de la gota, dA , (ecuación 5), según la ecuación 6 (Lucassen y Van Den Tempel, 1972),

$$\sigma = \sigma_0 \text{sen} (\omega \cdot t + \delta) \quad (4)$$

$$A = A_0 \text{sen} (\omega \cdot t) \quad (5)$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = - \frac{d\pi}{d \ln A} \quad (6)$$

donde σ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y deformación, respectivamente, δ es el ángulo de desfase entre la deformación y esfuerzo aplicado, y t es el tiempo.

El módulo dilatacional superficial (E) se compone de una parte real y otra imaginaria,

$$E = E_d + iE_v \quad (7)$$

La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional superficial, $E_d = |E| \cdot \cos \delta$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, es la viscosidad dilatacional superficial, $E_v = |E| \cdot \text{sen} \delta$.

Mediante la relación entre la componente de pérdida y la de almacenamiento puede determinarse la tangente del ángulo de pérdida (ecuación 8), que es el desfase de la respuesta de la tensión (o la presión) superficial respecto a la deformación que se ha realizado.

$$\tan \delta = E_v / E_d \quad (8)$$

Esta magnitud proporciona una idea de cuán elástica es la película, de forma que si su valor es muy pequeño se considera que la película es prácticamente elástica, y por ello, la respuesta de la película será inmediata a la perturbación a la que se somete. Si por el contrario se trata de un valor alto, nos indicará que en la película hay pérdida de energía suministrada, por lo cual no

responderá tan rápidamente a la perturbación externa. En estos casos, se asocia a la película un comportamiento viscoso en cierto grado, que depende del valor del ángulo de pérdida.

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\delta = 0^\circ$), y el término de la parte imaginaria del módulo es cero. En este caso, la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$) es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, $\delta = 90^\circ$, la parte real del módulo es cero y $\tan \delta = 1$.

Todas las mediciones fueron realizados a una temperatura de 25 °C, la cual se mantuvo constante con una variación de 0,1 °C por circulación de agua desde un baño termostatzado. Antes de comenzar la medición y al finalizar la misma, la jeringa se limpió según el protocolo mencionado anteriormente.

4.3.5. Análisis estadísticos.

Los datos de los distintos parámetros interfaciales obtenidos para tres réplicas se promediaron y se informan como su media y desvío estándar. Para la determinación de dichas medidas o parámetros estadísticos se utilizó el software Microsoft Excel (Microsoft Corp.).

4.4 Resultados y discusión.

4.4.1. Isotermas de adsorción (π vs concentración) para β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3.

En primer lugar se estudió el comportamiento individual de β -lg y E50LV en las interfases aire-agua en el equilibrio, mediante el tensiómetro tipo Wilhelmy, a pH 6 y 3. Las isotermas de adsorción (π vs concentración) para β -lg y E50LV se muestran en las Figuras 4.4 y 4.7, respectivamente. Tanto para la proteína como para el polisacárido, las isotermas de presión superficial mostraron un comportamiento sigmoideo, típico de biopolímeros surfactantes (Álvarez Gómez y Rodríguez Patino, 2006; Pérez y col., 2006; Pérez y col., 2007; Rodríguez Patino y col., 2008).

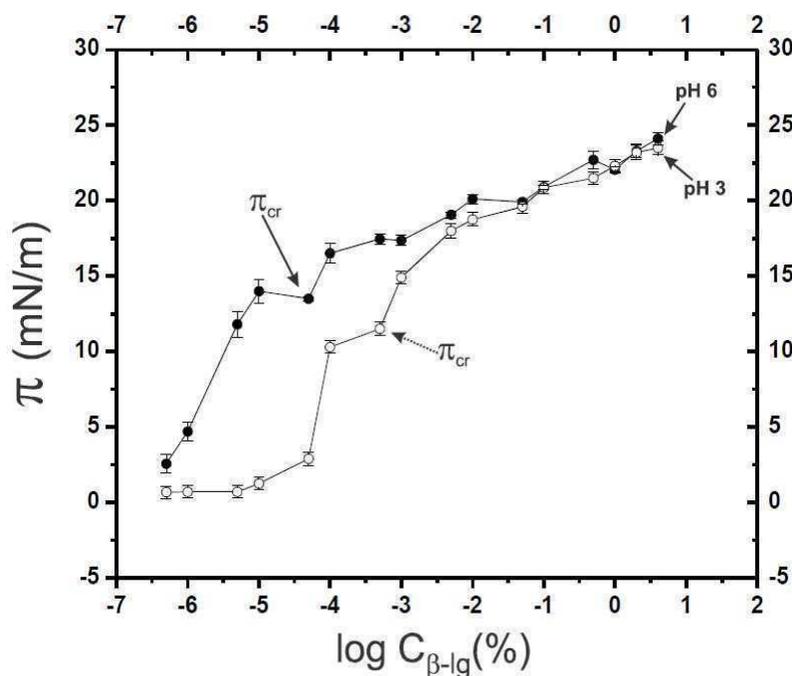


Figura 4.4. Isotermas de adsorción para β -Ig a pH 6 (●) o pH 3 (○). Temperatura 25 °C, $I = 0,05M$, (flechas: indican el cambio de estructura molecular “expandida” a “condensada”; pH 6: línea continua, pH 3: línea punteada; barra error: desvío estándar).

Con respecto a las proteínas en general, y para β -Ig en particular, la adsorción a la interfase aire-agua puede ser interpretada de la siguiente manera. A bajas concentraciones, cuando la presión superficial está cercana a cero, los residuos hidrofóbicos se ubican en la interfase aire-agua pero el número de ellos es pequeño como para causar un descenso notable en la tensión superficial. A mayores concentraciones, se constituye una monocapa de moléculas adsorbidas con una conformación “expandida” la cual sufre una transición a estructura “condensada” al continuar aumentando la concentración del biopolímero en la interfase. La presión a la cual ocurre esta transición se denomina “presión crítica”, π_{cr} . El estado de pseudo-equilibrio es alcanzado cuando la monocapa está saturada de moléculas de proteína irreversiblemente adsorbidas. A más altas concentraciones, las moléculas de proteína forman multicapas. Este fenómeno corresponde al colapso de la monocapa, y ocurre a una presión denominada “presión de colapso”, π_{col} (Graham y Phillips, 1979a; 1979b; Pérez y col., 2006). En el caso de las proteínas se habla de un estado de pseudo-equilibrio, ya que no es posible observar un equilibrio real de

adsorción. Por lo tanto se asume el valor de pseudo-equilibrio cuando la presión superficial medida después de 24 horas no cambia por más de 0,1 mN/m comparándolos con los valores a 48 horas (Benjamins, 2000; Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 1998).

Como puede observarse en la Figura 4.4, en el rango de concentraciones $5 \cdot 10^{-7} < C < 1 \cdot 10^{-2}$ % p/p, β -lg muestra una actividad superficial significativamente mayor cuando se encuentra a pH 6. En este caso, la presión superficial aumentó con la concentración desde un valor de $2,5 \pm 0,5$ hasta uno de $17,3 \pm 0,3$ mN/m. Wüstneck y col (1999) encontraron un comportamiento similar trabajando con esta proteína a pH 7. Luego, se observó un ascenso gradual en la presión superficial hasta alcanzar el estado final de pseudo-equilibrio. Como se mencionó anteriormente, este fenómeno se debe a que la interfase se encuentra saturada con el biopolímero, produciéndose el colapso de la monocapa a una “presión de colapso” (π_{col}). En este caso π_{col} fue de $23,5 \pm 0,5$ mN/m, a una concentración de $1 \cdot 10^{-1}$ % p/p. Wüstneck y col (1999) reportaron una π_{col} de aproximadamente 25 mN/m para β -lg a pH 7. En la Figura 4.4, también se señalan con flechas la transición de la proteína, desde la estructura molecular “expandida” a la “condensada”, para cada pH (6: línea continua; 3: línea punteada). Puede observarse que a pH 6, β -lg sufre dicha transición a un valor de π_{cr} de $13,5 \pm 0,2$ mN/m con una concentración $5 \cdot 10^{-5}$ % p/p. Valores similares de π_{col} y π_{cr} se reportan en literatura, para β -lg a pH 7 (Baeza y col., 2004; Wüstneck y col., 1999).

Cuando se trabajó con la β -lg a pH 3, la isoterma de adsorción presentó una tendencia similar a la observada a pH 6, considerando el mismo rango de concentraciones ($5 \cdot 10^{-7} < C < 1 \cdot 10^{-2}$ % p/p): es decir, la presión superficial aumentó con la concentración, pero en este caso desde un valor de $0,7 \pm 0,1$ hasta uno de $15,0 \pm 0,3$ mN/m (Figura 4.4). También cabe destacar que dentro de este rango de concentraciones la presión superficial permaneció aproximadamente constante alrededor de un valor 0,7 mN/m, hasta alcanzar la concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ % p/p, donde comienza a aumentar hasta alcanzar el valor pseudoequilibrio. En cuanto a la transición de la proteína, desde la estructura molecular “expandida” a la “condensada” (Figura 4.4, flecha punteada), ésta ocurrió a un valor de π_{cr} de $11,5 \pm 0,2$ mN/m, levemente menor

al obtenido a pH 6 ($13,5 \pm 0,2$ mN/m), pero en este caso a una concentración un orden menor, $5 \cdot 10^{-4}$ % p/p.

La disminución en la actividad superficial de la β -Ig a pH 3 y a concentraciones menores a $1 \cdot 10^{-2}$ % p/p se debe a cambios conformacionales de la proteína con el pH. Aunque la β -Ig mantiene su estado nativo en un amplio rango de pH, ésta sufre leves cambios conformacionales pH dependientes (Taulier y Chalikian, 2001). Dentro de dichos cambios, la transición de Tanford es la más importante porque se cree que está relacionada con la función biológica de la proteína (principalmente, el transporte de ácidos grasos). Tanford y col. (1959) encontraron que este cambio conformacional está acompañado por una des-protonación reversible del grupo carboxilo del ácido glutámico ubicado en la posición 89 (Glu 89) (Figura 4.5). Este aminoácido se encuentra en el “rulo” ubicado sobre unos de los extremos de la cavidad central. Cuando Glu 89 se halla protonado se esconde dentro de dicha cavidad llevando a la β -Ig a una estructura “cerrada”. Si este residuo, en cambio, está expuesto y des-protonado la β -Ig se encuentra en forma “abierta” (Figura 4.6). Este cambio conformacional parecería controlar la unión a ligandos de la β -Ig, dado que este “rulo” regularía el acceso a la cavidad central hidrofóbica (Qin y col., 1998).

Una de las principales características de la β -Ig es su capacidad de unir diversos ligandos hidrofóbicos, por ejemplo ácidos grasos, siendo la cavidad central el principal sitio de unión de dichos ligandos (Kontopidis y col., 2004).

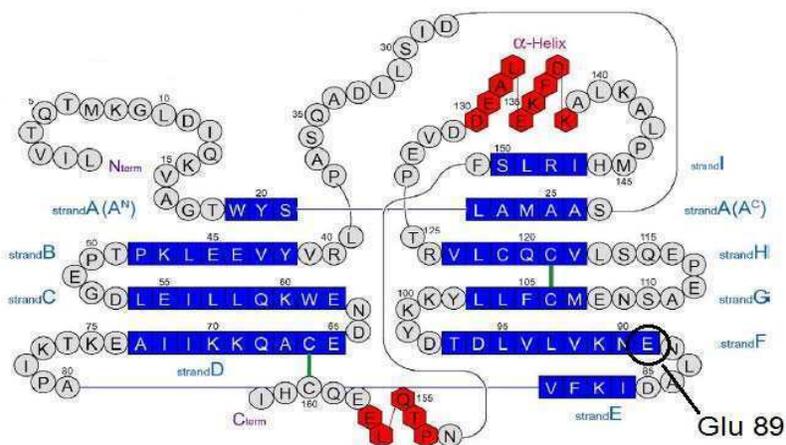


Figura 4.5. Representación esquemática de la secuencia aminoacídica de β -Ig, mostrando el residuo de ácido glutámico ubicado en la posición 89 (Glu 89).

Adaptado de Sakurai y col. (2009)

Sakurai y col. (2009) estudiaron el plegamiento de β -lg en función del pH determinando que a pH 3 la mayoría de las moléculas de proteína se encuentran en el estado “cerrado”, mientras que a pH 6 existe una mayor proporción de moléculas que se encuentran en el estado “abierto” (Figura 4.6).

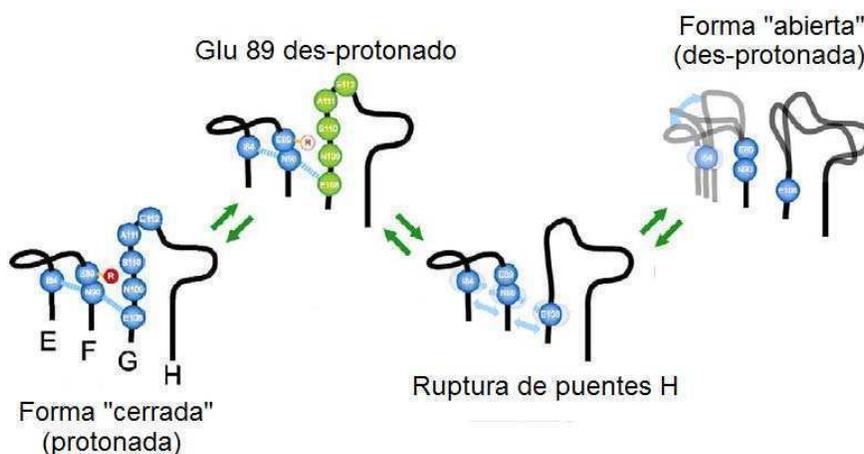


Figura 4.6. Proceso de la transición conformacional de β -lg, desde el estado “cerrado” al “abierto”. Esta es una ilustración de los pasos de la transición de Tanford.

Adaptado de Sakurai y col. (2009)

Por lo tanto, a pH 6, β -lg en su estado “abierto” expone una mayor cantidad de grupos hidrofóbicos, lo que permitiría adsorberse a la interfase aire-agua con mayor facilidad que a pH 3, donde se encuentra en su forma “cerrada”.

Finalmente, por encima de una concentración de $1 \cdot 10^{-2}$ % p/p, la presión superficial continúa aumentando con el incremento de la concentración, pero ya no se observan diferencias en el comportamiento de la proteína con respecto al valor del pH, debido a que la cantidad de β -lg a dicha concentración sería suficiente para saturar la interfase independientemente del estado conformacional de la proteína.

La Figura 4.7 muestra el efecto de la concentración de E50LV sobre la presión superficial de equilibrio a pH 3 y 6. Al igual que en el caso de la β -lg, y también como otros polisacáridos (Pérez y col., 2006) se consideró el equilibrio en la presión superficial después de 24 h. El comportamiento observado para las

soluciones de E50LV a ambos valores de pH fue sigmoideo, típico de biopolímeros con actividad superficial.

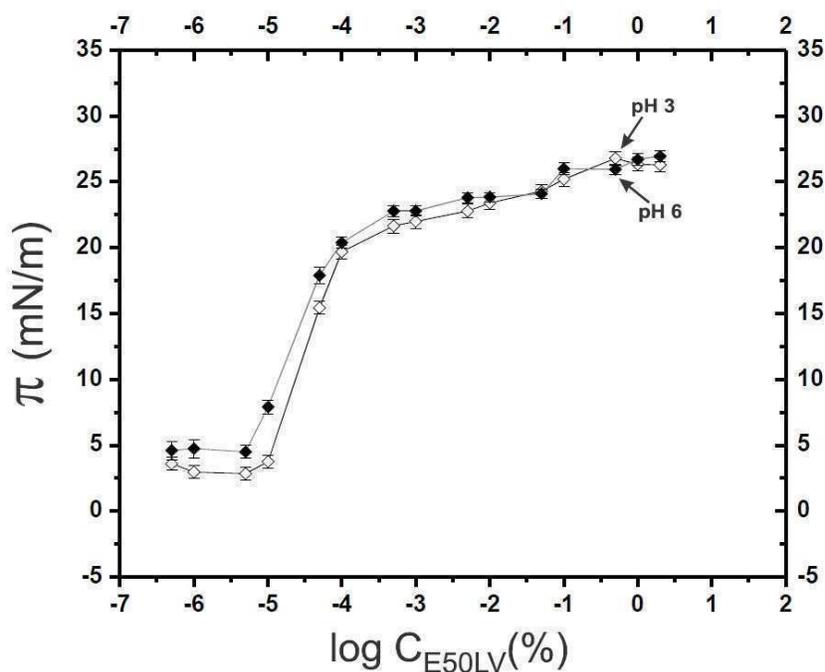


Figura 4.7. Isotermas de adsorción para E50LV. pH 6 (◆), a pH 3 (◇). Temperatura 25 °C, $I = 0,05$ M, (flecha: indican el cambio de estructura molecular “expandida” a “condensada”; pH 6: línea continua, pH 3: línea punteada; barra error: desvío estándar).

El valor de la presión superficial aumentó con la concentración de E50LV en todo el rango de concentración estudiado. A los dos valores de pH estudiados, la E50LV mostró actividad superficial desde una concentración de $5 \cdot 10^{-7}$ % p/p. Existen diferencias significativas a concentraciones menores a $1 \cdot 10^{-4}$ % p/p, donde se da un mayor valor de π a pH 6. A valores de concentración más altos, no se observaron diferencias significativas entre pH 6 y 3, respecto de las isotermas π -concentración (E50LV). A diferencia de la proteína, en este caso, no se observó una transición estructural en la isoterma (π_{cr}) lo cual coincide con lo reportado previamente por Li y col. (2008) y Pérez y col. (2006), para esta HPMC. Sin embargo, para hidroxipropilmetilcelulosas con otras características moleculares se ha observado la existencia de una π_{cr} (Pérez y col., 2006),

Aunque las diferencias resultan levemente significativas, existe una menor actividad interfacial de E50LV a pH 3 y concentraciones menores a 1.10^{-4} % p/p. Si bien la HPMC es un polisacárido no-ionico, Camino y col. (2009) demostraron que el potencial Z (medida de la densidad de carga de una molécula) presenta un valor ligeramente negativo a pH 3. Así, las moléculas que van llegando a la interfase desde la subfase, ven impedida su adsorción debido a la presencia de la carga de las moléculas previamente adsorbidas. Más aún estos autores demostraron que las propiedades de las películas interfaciales formadas por dicho polisacárido se ven disminuidas cuando el pH es igual a 3.

4.4.2. Dinámica de formación de las películas mixtas de β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3.

La evolución de la presión superficial con el tiempo para la mezcla β -lg/E50LV a pH 6 o 3, fue determinada por medio de un tensiómetro automático de gota, en un sistema mixto con 2 % p/p de β -lg y 0,5 % p/p de E50LV, concentraciones a las cuales ambos biopolímeros saturaron la interfase aire-agua en el equilibrio (isotermas π -concentración en la subfase, descritas en apartado anterior del presente capítulo).

La presión superficial (π) en función del tiempo para el sistema mixto β -lg/E50LV se muestra en la Figura 4.8 a y b, para pH 6 o 3, respectivamente.

En la misma figura se presenta también la evolución de la presión superficial con el tiempo para los componentes solos (β -lg y E50LV) a la concentración en que se presentan en la mezcla.

La presión superficial aumentó inmediatamente después de la formación de la gota lo cual está asociado con la adsorción de la proteína (Baeza y col., 2005; Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979a; 1979b) y/o el polisacárido (Pérez y col., 2006; Pérez y col., 2008).

En primer lugar, cabe destacar que el comportamiento dinámico de la presión superficial de los componentes individuales no varía con el pH (comparación Figura 4.8 a y b); este resultado se debe a que ambos biopolímeros están en concentraciones (2% p/v de β -lg y 0,5 % p/v de E50LV) por encima de la

saturación de la interfase: como evidenciaron las isothermas π -concentración (Figuras 4.4 y 4.5). No existe variación de la presión superficial de equilibrio con el pH, para ninguno de los dos biopolímeros, cuando están en concentraciones de saturación de la interfase.

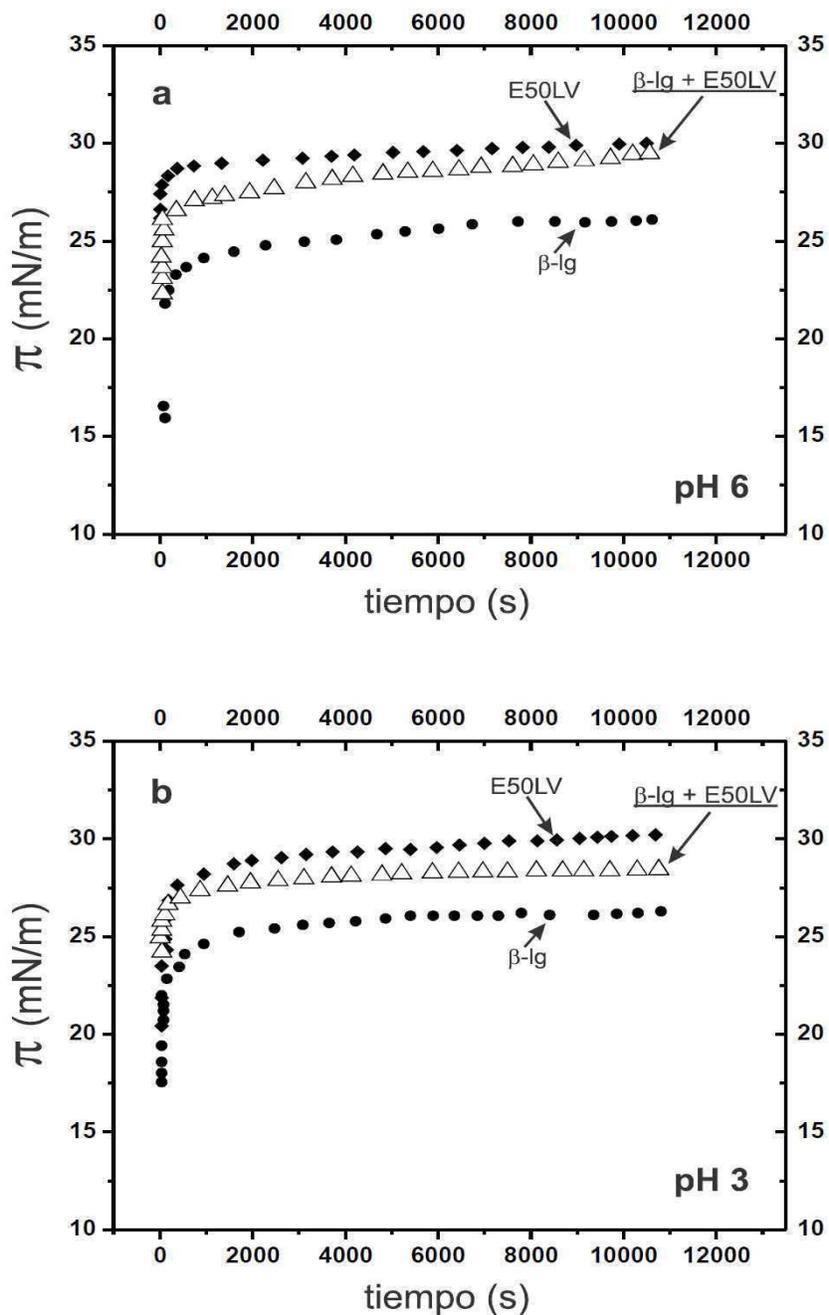


Figura 4.8. Dependencia de la presión superficial con el tiempo de adsorción para la mezcla de β -Ig (2% p/v) y E50LV (0,5 % p/v) adsorbida en la interfase aire-agua, a pH 6 (a) o 3 (b).

Temperatura 25 °C, I = 0,05 M (●: β -Ig; ◆: E50LV; △: mezcla).

Por otra parte, independientemente del pH, E50LV tiene mayor actividad superficial que β -lg. La β -lg alcanzó un valor de presión superficial a altos tiempos de adsorción (6000 s) de $25,5 \pm 1,2$ mN/m, el cual está dentro del orden de los valores reportados previamente para esta proteína. Baeza y col. (2005) reportaron un valor de π (5000 s) de 23 mN/m trabajando con una solución de β -lg al 2 % p/v a pH 7, el cual coincide con el valor encontrado por Waniska y Kinsella (1985) para una solución de β -lg, también al 2 % p/v, pero a pH 6,3 y luego de 6000 s de adsorción.

Con respecto a E50LV, se ha reportado en literatura un valor de 28,7 mN/m luego de 10800 s de adsorción, para una solución al 1 % p/v a pH 7 (Pérez y col., 2008). Para dicho tiempo de adsorción, el valor de presión superficial encontrado para la solución al 2 % p/v de E50LV a pH 6 resultó dentro del mismo orden, $30 \pm 1,5$ mN/m.

Independientemente del pH, existe una adsorción competitiva entre β -lg y E50LV, la cual puede deducirse de la comparación de las curvas π -tiempo para los biopolímeros simples y para la mezcla. Debido a que β -lg es menos activa superficialmente que E50LV a estas concentraciones, el reemplazo de E50LV por β -lg, en los sistemas mixtos disminuye el valor de la presión superficial en la mezcla. La adsorción competitiva entre biopolímeros puede afectar en forma directa a la presión superficial por desplazamiento del componente más activo superficialmente por otro con menor tensioactividad.

A pH 6 (Figura 4.8a) puede observarse que E50LV siempre dominó la presión superficial de la mezcla, lo cual se hace más evidente a largo tiempo de adsorción (más de 8000 s). Resultados similares se reportaron para mezclas de WPC y E50LV a pH 7 (Pérez y col., 2007). En cuanto a la mezcla de pH 3 (Figura 4.8b), el comportamiento dinámico es levemente diferente: a tiempos cortos de adsorción (menos de 1000 segundos) la presión superficial de la mezcla está dominada por la E50LV, mientras que a tiempos largos (más de 8000 s) la presión superficial de la misma alcanza un valor intermedio a la de los componentes individuales. Esto indica que a pH3 la β -lg compite más con E50LV por la interfase que a pH 6. Este comportamiento se debería a las diferentes condiciones de compatibilidad entre ambos biopolímeros al variar el pH. A pH 6 y a la concentración del presente ensayo, β -lg y E50LV presentan

una limitada compatibilidad termodinámica lo cual se deduce del diagrama de fases del sistema mixto WPC/E50LV descrito en el Capítulo III (sección 3.4.1.; Figura 3.4) y considerando que la β -lg es la proteína mayoritaria del WPC.

En cambio a pH 3, β -lg y E50LV son parcialmente compatibles. A pH 3 la β -lg está cargada positivamente ($\text{pH} < \text{pI}$), mientras que E50LV, a pesar de ser un polisacárido no-iónico, posee una densidad de carga negativa (Camino y col., 2011). Esta existencia de cargas opuestas en ambos biopolímeros promueve la mayor compatibilidad. De hecho, en el Capítulo II (sección 2.4.1.2.; Figura 2.6b) se demostró que el sistema mixto WPC/HPMC a pH 3, no presentó una separación de fases macroscópica.

Por lo tanto la coexistencia de β -lg y E50LV en la interfase está más favorecida a pH 3 que a 6.

4.4.3. Características viscoelásticas de las películas mixtas de β -lactoglobulina (β -lg) y E50LV en la interfase aire-agua a pH 6 y 3.

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos del presente capítulo, el estudio de la reología dilatacional de una muestra se realiza simultáneamente en la misma experiencia en la cual se determina la evolución de la presión superficial en el tiempo, mediante un tensiómetro automático de gota.

La evolución temporal de la componente elástica (E_d) del módulo dilatacional superficial (E), para la película mixta de (β -lg) y E50LV a pH 6 y 3, se muestra en la Figura 4.9 a y b, respectivamente. En esta misma figura también se muestran a modo comparativo la evolución de E_d con el tiempo, para los componentes solos (β -lg y E50LV) a la concentración en que se presentan en la mezcla (β -lg 2% p/v, E50LV 0,5 % p/v).

El aumento E_d con el tiempo se debe a la adsorción de la proteína y/o el polisacárido en la interfase. El hecho de que la dependencia en el tiempo de la elasticidad dilatacional superficial (E_d) siga la misma tendencia que la presión superficial indica que E_d depende de la formación de la película interfacial, la cual aumenta con el tiempo (Rodríguez Patino y col., 1999).

Con respecto al comportamiento reológico de las películas formadas por los biopolímeros individuales, a diferencia de la cinética de adsorción, el comportamiento de E_d varía con el pH.

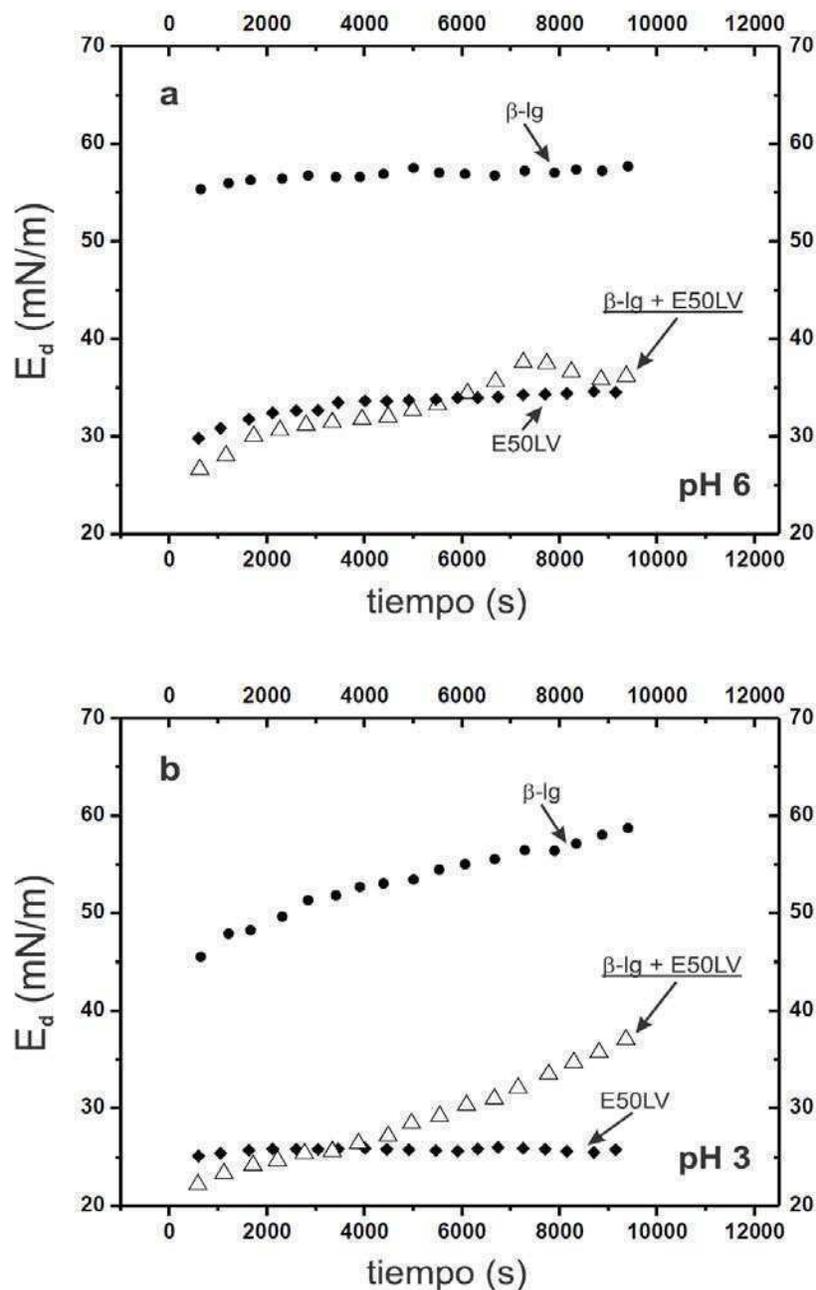


Figura 4.9. Evolución en el tiempo de la elasticidad dilatacional superficial (E_d) durante la formación de la película mixta de β -lg (2% p/v) y E50LV (0,5 % p/v) en la interfase aire-agua, a pH 6 (a) o 3 (b). Temperatura 25 °C, I = 0,05 M (●: β -lg; ◆: E50LV; △: mezcla).

A pH 6, la película de β -lg alcanzó un E_d de equilibrio (constante) de $56,5 \pm 2,3$ mN/m a tiempos de adsorción cortos, aproximadamente 2000 s (Figura 4.9a). Martínez y col. (2009) encontraron un comportamiento similar trabajando con una solución de β -lg al 4% p/v y pH igual a 7. Por otra parte, cuando la β -lg se encuentra a pH 3 (Figura 4.8b), el E_d se incrementa en forma gradual con el tiempo no alcanzando un valor de equilibrio, incluso a largos tiempos de adsorción (9000 s).

Como se explicó previamente, a pH 6 la β -lg se encuentra mayoritariamente en su forma “abierta” (exponiendo aminoácidos hidrofóbicos) mientras que a pH 3 la mayor parte de la población de las moléculas de β -lg se encuentra en la forma “cerrada” (Sakurai y col., 2009). Aparentemente, este hecho permitiría que la β -lg se desplegara y reordenara con mayor facilidad en la interfase, a pH 6 que a 3, formando un film interfacial elástico más rápidamente (Damodaran y Song, 1988)

En el caso de E50LV, se da una tendencia inversa a la de β -lg. A pH 3, el E_d alcanzó un valor de equilibrio promedio de $25,6 \pm 1,3$ mN/m a tiempos de adsorción cortos (menos de 1000 s) (Figura 4.9b). Por el contrario, a pH 6 E_d incrementó en forma gradual con el tiempo, alcanzando un valor de equilibrio de $34,2 \pm 1,5$ mN/m, luego de 5000 s de adsorción (en Figura 4.6b). La menor elasticidad de las películas a pH 3 se atribuye a la mayor densidad de carga neta negativa que posee la molécula de E50LV a pH 3, lo que provocaría una reducción de la adsorción del polisacárido en la interfase y una disminución de las interacciones moleculares en la película interfacial (Camino y col., 2011). Estos autores han demostrado que a pH 3 existe una disminución de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de HPMC (dada su carga neta). Esto conduciría a una reducción de E_d , ya que este parámetro correlaciona positivamente con la capacidad que tienen las HPMCs de asociarse mediante sus grupos hidrofóbicos una vez que se han adsorbido en la interfase (Pérez y col., 2008).

Al analizar el comportamiento de E_d para la mezcla de β -lg/E50LV para ambos pH (Figura 4.9 a y b, respectivamente) se observa que a pH 6 el comportamiento de E_d de la mezcla es similar al de E50LV indicando que el polisacárido domina la elasticidad de la película, lo cual concuerda con los

resultados cinéticos obtenidos, donde se mostró que E50LV también domina la presión superficial. En cambio a pH 3 y tiempos mayores a 5000 s, la proteína comienza a dominar el carácter elástico de interfase, aumentando el E_d de la película mixta. Este comportamiento también correlaciona con lo observado para la cinética de adsorción (Figura 4.8b).

Finalmente, la evolución temporal de la viscoelasticidad relativa ($\tan \delta$) para β -lg, E50LV y la película mixta a pH 6 y 3, se muestra en la Figura 4.10 a y b, respectivamente.

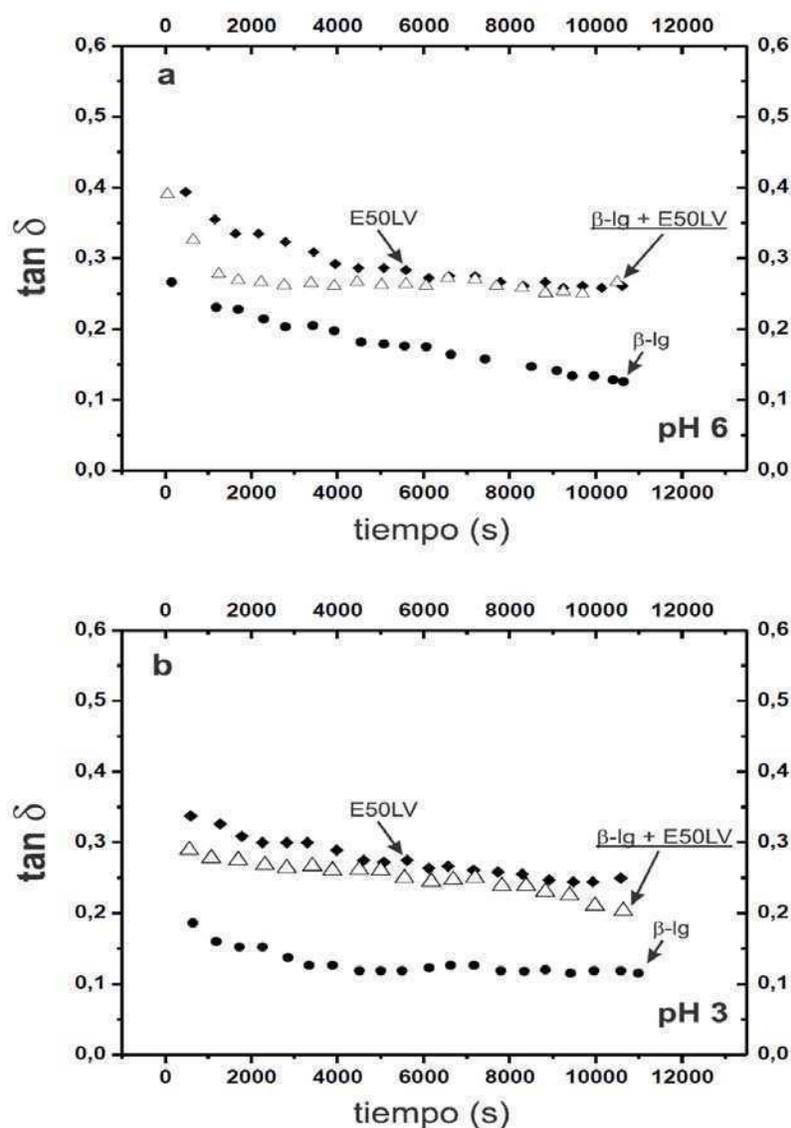


Figura 4.10. Evolución en el tiempo la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) durante la formación de la película mixta de β -lg (2% p/v) y E50LV (0,5 % p/v) en la interfase aire-agua, a pH 6 (a) o 3 (b). Temperatura 25 °C, I = 0,05 M (●: β -lg; ◆: E50LV; △: mezcla).

Tanto para los biopolímeros individuales como para la película mixta, $\tan \delta$ disminuyó con el tiempo de adsorción indicando la formación de una película viscoelástica estructurada (Rodríguez Patino y col., 1999). El comportamiento de este parámetro concuerda con los resultados obtenidos para E_d ; i) la β -lg forma películas más viscoelásticas ($\tan \delta$ 0,1-0,25) que la E50LV ($\tan \delta$ 0,25-0,4). Baeza y col (2004) encontraron un comportamiento similar para β -lg ($\tan \delta$ 0,05-0,2), mientras Pérez y col. (2009) reportaron un rango de valores de $\tan \delta$ de 0,1-0,35 para E50LV; ii) independientemente del pH, el polisacárido (E50LV) es el que domina la viscoelasticidad relativa ($\tan \delta$) de la película mixta.

4.5. Conclusiones.

Los datos presentados en este capítulo demuestran que las propiedades interfaciales tanto de proteínas del lactosuero (β -lactoglobulina) como de las hidroxipropilmetilcelulosas (E50LV), así como las de sus mezclas, se ven afectadas por el pH.

En cuanto a los estudios dinámicos (presión superficial vs tiempo), el comportamiento de los componentes individuales no varió con el pH, ya que fueron realizados en condiciones de saturación. La E50LV presentó mayor actividad superficial que la β -lg, para todo el rango de tiempo estudiado. Con respecto a la mezcla se observó una adsorción competitiva entre β -lg y E50LV, independientemente de cuál fuese el valor de pH en la subfase. A pH 6 E50LV domina tanto la presión superficial como la reología de la película interfacial mixta, mientras que a pH 3 ambos componentes participan de la interfase, especialmente a tiempos largos de adsorción.

La mezclas de proteínas del lactosuero (β -lactoglobulina) e hidroxipropilmetilcelulosas (E50LV) en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica y concentraciones que permiten la saturación de la interfase por ambos componentes, presentan un comportamiento competitivo en la interfase aire-agua, modulado por el pH. Debido a su mayor carácter tensioactivo y buenas propiedades formadoras de películas, la HPMC domina tanto la presión superficial como las propiedades viscoelásticas de las películas interfaciales.

4.6. Referencias.

- Álvarez Gómez J. M., and Rodríguez Patino J. M. (2006). Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β -Lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(22), 7510-7519.
- Baeza R., Carrera Sánchez C., Pilosof A. M. R., and Rodríguez Patino J. M. (2005). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 239-248.
- Baeza R. I., Carrera Sánchez C., Pilosof A. M. R., and Rodríguez Patino J. M. (2004). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 18, 959-966.
- Benjamins J. (2000). Static and dynamic properties of protein adsorbed at liquid interfaces. Ph.D. (pp. Laboratorium voor Fysische chemie en kolloïdkunde, University of Wageningen Wageningen, The Netherlands.
- Camino N. A., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25, 1-11.
- Camino N. A., Pérez O., Carrera Sanchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2009). Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air-water and oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23, 2359-2368.
- Carrera Sánchez C. (2000). Estructura, estabilidad, morfología y características reológicas de películas de emulsionantes alimentarios (lípidos y proteínas) esparcidas sobre la interfase aire-agua. Ph.D. (pp. 548). Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Couper A. (1993). Physical Methods of Chemistry. Eds: B. W. Rossiter and R. C. Baetzold. John Wiley & Sons, New York.
- Damodaran S. (1996). Functional properties. *Food proteins. Properties and characterization*. Eds: S. Nakai and H. W. Modler, (pp. 167-234). VCH, New York, NY, USA.
- Damodaran S., and Song K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 954, 253-264.
- Dickinson E. (1992). Protein at liquid interfaces. *An introduction to food colloids*. (pp. 140-173). Oxford University Press, Oxford.
- Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Evans D. F., and Wennerstrom H. (1994). The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet. VCH Publishers, New York, USA.

- Ganzevles R. A., Zinoviadou K., vanVliet T., CohenStuart M. A., and deJongh H. H. J. (2006). Modulating Surface Rheology by Electrostatic Protein/ Polysaccharide Interactions. *Langmuir*, 22(24), 10089-10096.
- Graham D. E., and Phillips M. C. (1979a). Proteins at liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403-414.
- Graham D. E., and Phillips M. C. (1979b). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70, 415-426.
- Hunter R. J. (1986). Foundations of Colloids Science. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Kontopidis G., Holt C., and Sawyer L. (2004). β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.
- Li Y. M., Xu G. Y., Xin X., Cao X. R., and Wu D. (2008). Dilatational surface viscoelasticity of hydroxypropylmethylcellulose and C_nTAB at the air-water surface. *Carbohydrate Polymers*, 72, 211-221.
- Lucassen J., and Van Den Tempel M. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(6), 1283-1291.
- Martínez K. D., Carrera Sánchez C., Pízones Ruiz-Henestrosa V., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2007). Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 804-812.
- Martinez M. J., Carrera Sanchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2009). Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air-water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and β -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(39-47), 39-47.
- McClements D. J. (1999). Interfacial properties and their characterization. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Ed: D. J. McClements, (pp. 127-160). CRC Press, Florida, FL, USA.
- Murray B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 426-431.
- Ochoa-Machiste E., and Buckton G. (1996). Dynamic surface tension studies of hydroxypropylmethylcellulose film-coating solutions *International Journal of Pharmaceutics*, 145, 197-201.
- Pérez A. A., Carrara C. R., Sánchez Carrera C., Santiago L. G., and Rodríguez Patino J. M. (2009). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/ polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1253-1262.
- Pérez O. E., Carrera Sanchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2006). Thermodynamic and Dynamic Characterization of Hydroxypropylmethylcellulose adsorbed films at the air water interfase. *Biomacromolecules*, 7, 388-393.

- Pérez O. E., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 794-803.
- Pérez O. E., Carrera Sánchez C., Rodríguez Patino J. M., and Pilosof A. M. R. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 22, 387-402.
- Qin B. Y., Bewley M. C., Creamer L. K., Baker M. N., Baker E., and Jameson G. B. (1998). Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*, 37, 14014-14023.
- Rodríguez Niño M. R., and Rodríguez Patino J. M. (1998). Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqueous phase interface. *Journal American Oil Chemistry Society*, 75, 1233-1239.
- Rodríguez Patino J. M., Carrera Sánchez C., and Rodríguez Niño M. R. (2008). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 187-195.
- Rodríguez Patino J. M., Rodríguez Niño M. R., and Carrera Sánchez C. (1999). Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as function of processing conditions: a rheokinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3640-3648.
- Sakurai K., Konuma T., Yagi M., and Goto Y. (2009). Structural dynamics and folding of β -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(6), 527-537.
- Tanford C., Bunville L. G., and Nozaki Y. (1959). The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of American Chemical Society*, 81, 4032-4036.
- Taulier N., and Chalikian T. V. (2001). Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, 314, 873-889.
- Waniska R. D., and Kinsella J. E. (1985). Surface properties of β -lactoglobulin: adsorption and rearrangement during film formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(6), 1143-1148.
- Wollenweber C. A. V., Makievski R., and Daniels R. (2000). Adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect of the emulsion stability. *Colloids and Surface A*, 172(91-101).
- Wong D. W. S., Camirand W. M., and Pavlath A. E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
- Wüstneck R., Moser B., and Muschiolik G. (1999). Interfacial dilational behaviour of adsorbed β -lactoglobulin layers at the different fluid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 263-273.

Capítulo V

**Fraccionamiento de
 α -lactalbúmina y β -lactoglobulina
promovido por la
incompatibilidad termodinámica
entre WPC y HPMC**

5.1. Introducción.

Las proteínas del suero usualmente son obtenidas por una combinación de procesos de concentración por membrana y cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y/o de flujo radial (Cheang y Zydney, 2004). Aunque, estas técnicas resultan muy eficientes para dicho fraccionamiento, también provocan desnaturalización proteica, generando una disminución en las propiedades funcionales de las proteínas (Sivars y Tjerneld, 2000).

La partición en “sistemas acuosos de dos fases” (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) resulta un método alternativo a estas técnicas, para ser utilizado como un primer paso de purificación. Numerosos autores han desarrollado esta técnica de fraccionamiento para la separación de proteínas, enzimas, componentes de virus y células, e incluso organelas celulares (Albertsson y col., 1987; Johansson y Walter, 2000; Zaslavsky, 1995). Esta amplia utilización de los ATPS para separar materiales biológicos, se debe a que el alto contenido acuoso de las dos fases (80-95 %) brinda condiciones de extracción suaves, las cuales no dañan prácticamente dichos materiales. Se ha reportado, que este alto contenido acuoso protege eficazmente a las proteínas de la desnaturalización (Christian y col., 1998; Rito-Palomares, 2004).

En la mayoría de los casos, los ATPS se forman combinando dos polímeros solubles en agua, pero que difieren en su estructura química. Los sistemas más utilizados para la separación de biomateriales están constituidos por dextranos combinados con polímeros sintéticos, como ficoll o polivinilpirrolidona (PVP) (Simonet y col., 2000). También, existen estudios sobre la separación de biomoléculas, realizados en sistemas bifásicos constituidos con polisacáridos, como ser dextrano/metilcelulosa, goma guar/amilopectina, y polietilenglicol (PEG)/maltodextrina (Closs y col., 1999; da Silva y Meirelles, 2000).

Como ya se ha demostrado en capítulos anteriores de este trabajo, las mezclas de proteínas y polisacáridos generalmente tienden a separarse en dos fases debido a un fenómeno de incompatibilidad termodinámica. Esta separación, normalmente ocurre cuando el pH del sistema está por encima del punto

isoeléctrico de la proteína, y/o la concentración total de biopolímero supera el 4 % p/p (Tolstoguzov, 2003).

Polyakov y col. (1997) caracterizaron el proceso por el cual una proteína puede concentrarse en un pequeño volumen por la adición de un polisacárido, al cual denominaron ósmosis sin-membrana. Brevemente, este proceso consiste en aprovechar el fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos (descrito en secciones anteriores), para concentrar y/o purificar una proteína en particular, mediante el agregado de concentraciones crecientes de un polisacárido que presente un alto grado de incompatibilidad con dicha proteína. De esta manera, se obtiene una fase acuosa altamente concentrada en proteína pero diluida en el polisacárido, sin el uso de ningún dispositivo osmótico.

En el Capítulo III de este trabajo, se determinó el diagrama de fases del sistema formado por E50LV (hidroxipropilmetilcelulosa) y WPC (proteínas del lactosuero). Como se describió, la zona de compatibilidad en dicho diagrama es relativamente pequeña en comparación con la región de incompatibilidad termodinámica, dando lugar a que la separación de fases ocurra en un amplio rango de concentraciones. Con respecto al fenómeno de separación, debe mencionarse que el WPC constituye una mezcla compleja de proteínas, las cuales podrían tener distintos grados de incompatibilidad con la HPMC. Si esta hipótesis fuera correcta, entonces es de esperar una partición diferencial de cada proteína, entre las fases ricas en proteína o rica en HPMC.

5.2. Objetivo.

Determinar la posible utilización de la incompatibilidad termodinámica entre las distintas proteínas del lactosuero y E50LV (HPMC), como un método de fraccionamiento y purificación de α -lactalbúmina (α -lac) y β -lactoglobulina (β -lg) a partir de WPC.

5.3. Materiales y Métodos.

5.3.1. Materiales.

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se utilizó una hidroxipropilmetilcelulosa comercial denominada Methocel[®] E50LV, gentilmente donada por Colorcon-Argentina, representantes argentinos de Dow Chemical Company. Esta HPMC de calidad alimentaria fue usada sin purificación posterior. Según el proveedor, este derivado celulósico tiene un 29,1 % de grupos metilo, un 9,2 % de grupos hidroxipropilo, siendo el relación metilo/hidroxipropilos, 3,2%; su peso molecular es de 18 kDa; contenido de humedad, 1,6%. La viscosidad de una solución acuosa de este polímero al 2% p/v y a 20°C es de 41 mPa.s.

Concentrado de proteínas del suero lácteo (WPC). Se utilizó un concentrado de uso comercial denominado, WPC80. Este producto en polvo fue provisto por Milka Frank-Santa Fe, Argentina. Su composición fue la siguiente: 78,9% de proteínas totales, determinado por el método de Kjeldhal (Nx6,25) AOAC (1995), lactosa 5%, grasa 6%, cenizas 4,3% y 5,6% de humedad (Pérez y col., 2006) .

Proteínas del suero lácteo. Se utilizó una β -lactoglobulina comercial denominada β -lg BioPURE, provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, MN, USA). Su composición fue: 97,8 % de proteína (base seca) siendo β -lactoglobulina el 93,6 % del total de proteínas, 0,3 % de grasa, 1,8 % de cenizas y 5,0 % de humedad.

Otros reactivos químicos. Se utilizaron de grado analítico.

5.3.2. Preparación de soluciones madres.

Se prepararon soluciones madres de WPC80, E50LV y β -lactoglobulina comercial al 40% p/p, 4% p/p y 10 % p/v, respectivamente. Se disolvió el correspondiente polvo en agua destilada, los cuales se pesaron en una balanza analítica (VXI,

Modelo 60/220, PCE Grupo Ibérica S. L., Tobarra, España). En el caso del WPC y la β -lactoglobulina comercial, el polvo fue dispersado en el agua a temperatura ambiente (25°C) con agitación durante 4 hs y 30 min, respectivamente (agitador magnético modelo C-MAG HS7, IKA®, Wilmington, NC, USA) para permitir la completa disolución del polvo. Después de la preparación, estas soluciones se almacenaron en heladera a 4°C.

En cuanto a la HPMC, la solución se preparó dispersando el polvo en el agua destilada a 85 °C, con agitación manual para permitir la disolución completa del polvo. Luego, se enfrió la solución a temperatura ambiente (25 °C) mediante baño en agua, y se agregó la masa de agua perdida por evaporación. Por último, esta solución se almacenó en heladera a 4 °C por 24 hs para que el polisacárido alcance el máximo grado de hidratación.

Antes de los experimentos, todas las soluciones madres fueron llevadas a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un baño termostático (modelo MASSON II, Vicking SRL, Buenos Aires, Argentina).

5.3.3. Preparación de los sistemas acuosos de dos fases (ATPS).

Los sistemas bifásicos (masa total 10 g) se prepararon mezclando cantidades apropiadas de las soluciones madres de WPC y HPMC, en proporciones que permitiesen obtener mezclas con concentraciones de WPC de 8, 12, 15 o 20 % p/p y de 0,5 o 2% p/p de E50LV. Estos sistemas se mezclaron, con agitador magnético, dentro de un baño con camisa termostatizada (25,0 \pm 0,1 °C) con un baño externo (equipo Polystat, modelo 12108-15, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) durante 2 hs para permitir una distribución homogénea de los componentes. El pH de las mezclas fue de 6,5 (pH-metro, modelo A920, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA), el cual no fue ajustado posteriormente. Posteriormente se procedió a separar completamente las fases por medio de centrifugación. Se colocaron los 10 g del sistema equilibrado, en tubos plásticos graduados de 15 ml, los cuales se centrifugaron a 13.000 x g durante 2 hs en una centrifuga termostatizada modelo 5810 R de Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo,

Alemania). Luego, los tubos se colocaron en un baño termostático a 25 °C durante 10 hs para lograr equilibrar las fases segregadas.

Los volúmenes de la fase superior (VU) e inferior (VL) se determinaron visualmente. Luego, ambas fases fueron separadas, removiendo la fase superior con una pipeta. Ambas fases se pesaron en una balanza analítica (VXI, modelo 60/220, PCE Group Ibérica S.L.). El ensayo completo se realizó al menos por triplicado.

5.3.4. Determinación del contenido de proteína y polisacárido en cada fase.

Luego de ser aislada, cada fase fue homogeneizada por 5 minutos en un vortex (Vicking, Buenos Aires, Argentina). Entonces, muestras de aproximadamente 0,5 g se utilizaron para la determinación del contenido de cada biopolímero. La concentración de proteína en cada fase, se determinó por el método de Kjeldahl según se detalla en el manual AOAC (1995) en un equipo de destilación automática (modelo Kjeltex Auto 1030 Analyzer, TECATOR AB, Höganäs, Suecia). La concentración de polisacárido tanto en la fase inferior (FI) como en la superior (FS) se calculó mediante la siguiente ecuación,

$$Y_{L,U} = [- (\alpha Y_0 + Y_0) / (\alpha X_0 + X_0)] \alpha X_{L,U} + (\alpha Y_0 + Y_0) \quad (1)$$

donde Y_L y Y_U , corresponden a las concentraciones del polisacárido en la FI y FS, respectivamente. Esta deriva de una solución, propuesta por Pérez y col. (2006), para determinar el largo del segmento que une las coordenadas de concentración inicial de la mezcla (X_0 , Y_0), con las coordenadas que definen la composición de las fases superior (X_U , Y_U) e inferior (X_L , Y_L), dentro de un diagrama de fases. La variable α corresponde a la relación de los volúmenes de las fases, (V_L/V_U). En todos los casos, las concentraciones se expresan en % p/p.

5.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Muestras de WPC80, de β -lactoglobulina comercial y de cada una de las fases segregadas fueron analizadas por electroforesis, para evaluar su composición proteica. Así, alícuotas de las soluciones madres de β -lactoglobulina comercial al 10% p/p y WPC80 al 40% w/p, junto con alícuotas de cada fase separada se diluyeron en agua destilada hasta una concentración final de proteína de 1% p/v.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se realizó en condiciones desnaturalizantes, es decir en presencia de SDS (sodio dodecil sulfato), siguiendo el protocolo desarrollado por (Laemmli, 1970). Se utilizó un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Cada muestra al 1% p/v de proteína se diluyó en una proporción 1:4 con el "buffer de muestra" (0,6 mL 1M Tris-HCl pH 6,8; 5 mL glicerol; 2 mL 10% p/v SDS; 1 mL 1% p/v azul de bromofenol, 0,9 mL agua destilada).

Se utilizaron geles de 10 calles, compuestos por un gel de separación al 12,5% de acrilamida (polimerización 45-60 minutos), y un gel de concentración al 4 % de acrilamida, el cual se deposita sobre el gel de separación polimerizado, 15 minutos antes de la siembra de las muestras. En todos los casos, se sembró un volumen de 20 μ L usando una pipeta de 50 μ L (Hamilton Co., Reno, USA). Como referencia de peso molecular se utilizó un estándar proteico Bio-Rad Std-2522 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Este se compone de miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116,3 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa), y aprotinina (6.5 kDa).

Las condiciones de corrida fueron las siguientes,

-200 Volts; corriente de 30 mA durante los primeros 10 minutos, la cual se incrementó a 60 mA, dejándola constante durante los 50 minutos restantes.

-Buffer de "corrida" (Tris-Base 0,025 M; glicina 1,4% p/v; SDS 0,1% p/v; pH 8,3).

Cuando la corrida finalizó, los geles se tiñeron con 50 mL de una solución al 0,1% p/v de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad Laboratories Inc.) con agitación durante aproximadamente 45 minutos (agitador orbital, modelo M-23, Vicking). Luego, los geles fueron desteñidos con 100 mL de una mezcla 1:1

metanol: ácido acético glacial durante una hora con agitación orbital. Finalmente, los geles se colocaron en un recipiente hermético con 100 mL de agua destilada y se almacenaron en heladera a 4 °C.

5.3.6. Cuantificación de cada tipo de proteína mediante análisis de imagen de los geles SDS-PAGE.

Los geles fueron escaneados con un scanner Bio-Rad modelo GS-800 (Bio-Rad Laboratories Inc.) con una resolución de 600 dpi, en formato .tif. El procesamiento de imagen fue realizado con seis imágenes escaneadas por gel, con los software Image Pro Plus v6 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA), y Matlab R2009a (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

Luego, dichas imágenes procesadas se analizaron con el software Quantity One v22 (Bio-Rad Laboratories Inc.): en primer lugar, los patrones de bandas de los seis replicados se alinearon mediante la función “Comparación de calles”, para determinar la precisión del proceso de escaneado; en segundo lugar, los pesos moleculares de cada banda se determinaron comparando el frente relativo (Rf) de cada una de ellas, con los del estándar proteico, utilizando la función “Estándares”; por último la cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método volumétrico. Este se realiza, con la función “Dibujar objeto” alrededor de cada banda que sea de interés. El valor de volumen que devuelve el software representa la sumatoria de las intensidades dentro del objeto dibujado, expresada como OD.mm² (unidades de densidad óptica por área; OD, Optical Density) lo cual es una medida de la cantidad de proteína dentro de una banda.

La proporción porcentual de las distintas proteínas en cada muestra (WPC80, β-lactoglobulina, y cada fase segregada) se calculó mediante la siguiente relación,

$$P_i = (BIV/TBV).100 \quad (2)$$

donde P_i es la proporción de la proteína de interés, BIV es el volumen de la banda de la proteína de interés, y TBV es el volumen de todas las bandas en la correspondiente calle.

La concentración de las diferentes proteínas fue calculada usando una modificación de la ecuación desarrollada Reed y Park (2008),

$$PC_i = P_i \times P_{Kj} \quad (3)$$

donde PC_i y P_i son la concentración y la proporción de la proteína interés, respectivamente, y P_{Kj} es la concentración de proteína total determinada por el método de Kjeldahl. Los valores de PC_i y P_i calculados para cada proteína, fueron posteriormente utilizados para determinar los coeficientes de partición y la recuperación proteica.

5.3.7. Determinación del coeficiente de partición y de la recuperación proteica para β -lg y α -lac en las fases separadas.

La partición de una proteína en un ATPS puede ser descrita por el coeficiente de partición, K , definido como la relación C_{FS}/C_{FI} , donde C_{FS} y C_{FI} son las concentraciones de proteína en las fases superior e inferior, respectivamente, cuando ambas se hallan en equilibrio termodinámico (Albertsson y col., 1987)). De acuerdo a esta definición, entonces el coeficiente de partición de cada proteína se calculó como,

$$K_i = PC_i^{UP} / PC_i^{LP} \quad (4)$$

donde P_i^{UP} y P_i^{LP} son la proporción de la proteína interés en fase superior (FS) e inferior (FI), respectivamente.

La recuperación proteica fue calculada en la fase superior utilizando la siguiente ecuación,

$$Y_i = \left(WP_{UP} P_i^{UP} / WP_0 P_i^{WPC80} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

donde Y_i es la recuperación proteica expresada en porcentaje, P_i^{UP} y P_i^{WPC80} son las proporciones proteicas en la fase superior (FS) y en el WPC80,

respectivamente; w_{PUP} es la masa total de proteína en la fase superior (FS), mientras que w_{P0} es la masa total de proteína presente en la mezcla inicial.

5.3.8. Análisis estadísticos.

Los datos se promediaron e informaron como una media más un desvió estándar. Para la determinación de dichos estimadores estadísticos se utilizó el software Microsoft Excel (Microsoft Corp.).

5.4. Resultados y discusión.

5.4.1. Segregación de sistemas mixtos WPC/HPMC.

Como se describió en el capítulo III, las mezclas WPC/E50LV a pH 6,5 y 25 °C son generalmente inestables, y por encima de una concentración crítica total de biopolímeros de aproximadamente 10 % p/p, el sistema se separa en una fase inferior (FI) rica en proteína, y en una fase superior (FS) rica en polisacárido. Estos sistemas proteína/polisacárido pueden considerarse como emulsiones agua-agua. Estas emulsiones se caracterizan por una co-solubilidad de los polímeros en las fases co-existentes (Turgeon y col., 2003). La Tabla 5.1 muestra las composiciones de la FS y FI, junto con composición inicial para cada sistema mixto.

Todas las FS resultaron ligeramente más concentradas en el polisacárido, que las soluciones binarias iniciales, mientras que las FI resultaron fuertemente concentradas en proteínas con respecto al sistema inicial, excepto cuando se partió inicialmente de un 20% p/p de WPC.

Puede observarse que la FS (rica en polisacárido) en todos los casos contiene una significativa concentración de proteína, la cual aumentó a medida que se incrementa la concentración inicial de WPC, siendo este efecto ligeramente inferior con un 2% p/p de HPMC. Esto último se debe a un efecto de aumento del volumen de exclusión en las soluciones mixtas más concentradas en polisacárido. En otras palabras, la disminución de la concentración inicial de HPMC, a igual

concentración de WPC, disminuiría la fuerza impulsora de la segregación, permitiendo que una mayor cantidad de proteína pueda coexistir con la HPMC en la FS. Como resultado, los sistemas con una baja concentración inicial de HPMC podrían concentrar más proteínas en la FS, siendo la mejor opción partir de un sistema mixto WPC 20% p/p/HPMC 0,5% p/p.

Además, la Tabla 5.1 resume los valores de volumen y masa para cada una de las fases segregadas. Estos valores reflejan un aumento de la densidad en las soluciones binarias con el aumento en su contenido de sólidos totales.

Tabla 5.1. Composición, volumen y masa de las fases segregadas a partir de mezclas WPC/E50LV a 25 °C y pH 6,5.

Composición inicial (% p/p)		Fase Inferior				Fase Superior			
WPC80	HPMC	Proteína (% p/p)	HPMC (% p/p)	V (ml)	m (g)	Proteína (% p/p)	HPMC (% p/p)	V (ml)	m (g)
8	0,5	15,0 ± 1,0	0,40 ± 0,02	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	4,5 ± 0,3	0,50 ± 0,03	6,7 ± 0,5	7,7 ± 0,3
12	0,5	17,0 ± 1,1	0,40 ± 0,02	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	7,0 ± 0,4	0,53 ± 0,04	6,2 ± 0,5	7,3 ± 0,3
15	0,5	19,0 ± 1,1	0,40 ± 0,03	2,2 ± 0,2	3,0 ± 0,1	8,0 ± 0,5	0,53 ± 0,03	5,5 ± 0,4	6,6 ± 0,2
20	0,5	20,5 ± 1,2	0,45 ± 0,03	2,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	13,0 ± 1,0	0,55 ± 0,03	5,0 ± 0,4	6,3 ± 0,2
8	2	18,0 ± 1,1	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,40 ± 0,05	4,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3	7,2 ± 0,5	8,3 ± 0,3
12	2	19,5 ± 1,3	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	6,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	6,3 ± 0,5	7,6 ± 0,3
15	2	21,0 ± 1,4	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	8,0 ± 0,4	2,1 ± 0,1	6,0 ± 0,5	7,3 ± 0,2
20	2	23,0 ± 2,0	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	11,0 ± 1,0	2,2 ± 0,1	5,0 ± 0,4	6,3 ± 0,2

Media ± desvío estándar, n=3.

V y m son el volumen y peso de la fase, respectivamente.

5.4.2. Fraccionamiento de α -lac, β -lg y BSA en las fases separadas.

Para seleccionar el sistema bifásico con la mejor capacidad de fraccionamiento proteico partiendo del WPC80, se calculó la proporción de cada proteína en ambas fases. La Figura 5.1a muestra el perfil electroforético para WPC80 y β -lg

comercial. WPC80 es el material inicial a ser fraccionado, mientras que la β -lg comercial constituye un control positivo.

En ambos casos pueden observarse cinco bandas bien definidas. Tres de ellas están asociadas con los siguientes pesos moleculares (PM) en comparación con el estándar: 14,2, 18,3 y 66 kDa, las cuales se identificaron como la α -lac, la β -lg y BSA respectivamente (Liu y col., 2005). Las otras dos bandas, denominadas arbitrariamente B I y B II, tienen pesos moleculares de aproximadamente 36 y 116 kDa, respectivamente. De acuerdo con estos PM, B I podría llegar a ser un dímero de β -lg, mientras que B II podría corresponder a agregados proteicos no-específicos (Liu y col., 2005). Probablemente, esta agregación podría ser consecuencia de la desnaturalización proteica que tiene lugar durante la obtención del WPC.

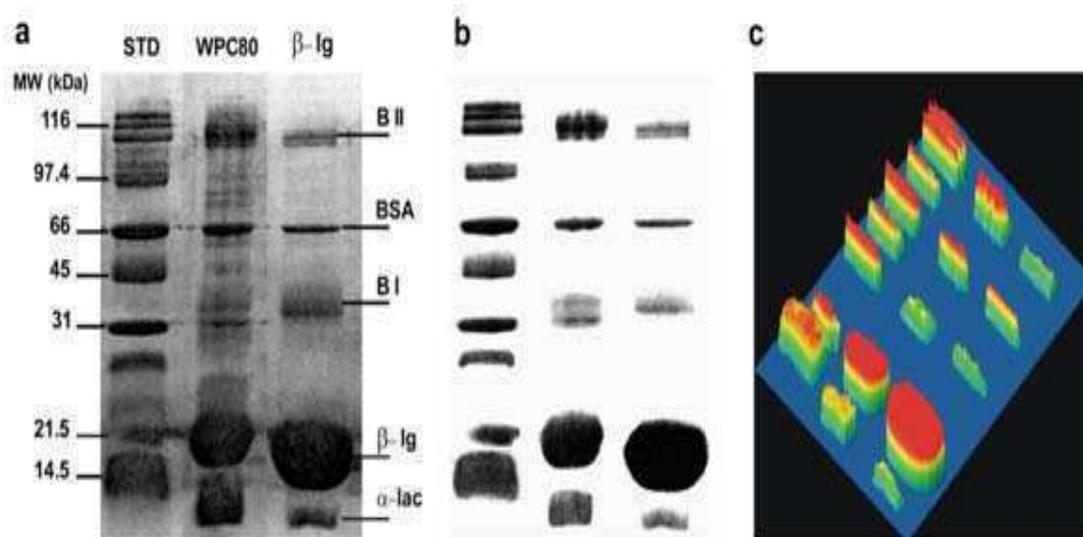


Figura 5.1. Perfil electroforético de la β -lactoglobulina comercial y el WPC80 (a), imagen procesada de un gel escaneado (b), y una vista 3D representativa de la cuantificación proteica mediante el análisis de imagen basado en el método volumétrico (c). STD: estándar de peso molecular, α -lac: α -lactalbúmina, β -lg: β -lactoglobulina, B I: banda I, BSA: sero albumina bovina, B II: banda II.

La Figura 5.1b es un ejemplo de una imagen procesada de un gel luego del escaneado, mientras que la Figura 5.1c muestra un diagrama de superficies o vista tridimensional de la intensidad de las bandas. Ambos tipos de imágenes

fueron las que se utilizaron para cuantificar la proporción de cada proteína en cada muestra.

Para todas las FI, los perfiles electroforéticos resultaron similares al patrón del WPC80. Por otra parte, en las FS las bandas de α -lac y β -lg aparecieron con mayor intensidad, mientras B I (36 kDa) está ausente y B II (116 kDa) aparece con menor intensidad (Figura 5.2).

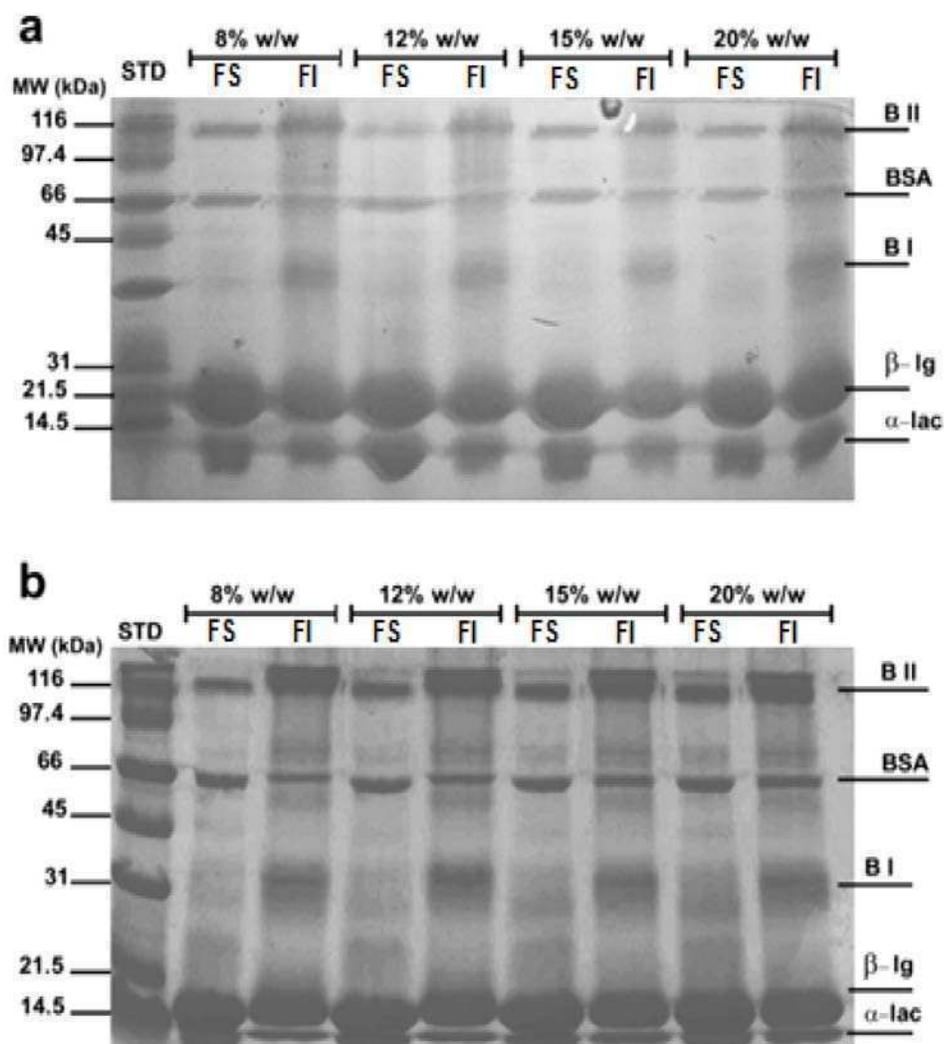


Figura 5.2. Perfil electroforético para las fases superior (FS) e inferior (FI) segregadas de mezclas WPC80/E50LV (% p/p): (a) WPC 8-20%/E50LV 0,5%; (b) WPC 8-20%/E50LV 2% p/p.

STD: estándar de peso molecular, α -lac: α -lactalbúmina, β -lg: β -lactoglobulina,

B I: banda I, BSA: sero albúmina bovina, B II: banda II.

Las proporciones de cada proteína en las fases segregadas, calculadas con la ecuación 2 (Materiales y métodos, sección 5.3.6), se resumen en las Tablas 5.2 y 5.3. Puede observarse que, cuando la concentración inicial de HPMC fue 0,5 % p/p, la FS presentó una mayor proporción de α -lac que la correspondiente FI. Más aún, estas FS resultaron más ricas en dicha proteína (24%) que el WPC80 (17%), independientemente de cuál sea la concentración inicial de WPC. Es notable que, un comportamiento inverso se observa cuando la cantidad inicial de HPMC es del 2 % p/p.

Tabla 5.2. Proporción de las diferentes proteínas del lactosuero, en las fases superiores segregadas de sistemas binarios WPC/E50LV, WPC80, y β -lg comercial.

Muestra	P α -lac (%)	P β -lg (%)	P B I (%)	P BSA (%)	P B II (%)
WPC80	17,0 \pm 0,7	47,0 \pm 2,4	9,00 \pm 0,45	8,0 \pm 0,4	19,0 \pm 1,0
β -lg comercial	5,50 \pm 0,25	77,0 \pm 4,0	6,0 \pm 0,3	5,0 \pm 0,2	6,5 \pm 0,3
FS $\frac{0,5}{8}$	23,0 \pm 1,2	50,0 \pm 2,3	-	8,0 \pm 0,4	19,0 \pm 1,0
FS $\frac{0,5}{12}$	24,0 \pm 1,1	53,0 \pm 2,6	-	8,0 \pm 0,3	15,0 \pm 0,6
FS $\frac{0,5}{15}$	24,0 \pm 1,2	57,0 \pm 2,8	-	8,0 \pm 0,3	11,00 \pm 0,46
FS $\frac{0,5}{20}$	24,0 \pm 1,0	58,0 \pm 4,4	-	8,0 \pm 0,3	10,0 \pm 0,5
FS $\frac{2}{8}$	18,0 \pm 1,0	48,0 \pm 2,3	-	9,00 \pm 0,45	25,0 \pm 1,3
FS $\frac{2}{12}$	17,00 \pm 0,75	60,0 \pm 3,0	-	8,00 \pm 0,36	15,0 \pm 0,7
FS $\frac{2}{15}$	16,0 \pm 0,7	62,0 \pm 3,1	-	9,00 \pm 0,38	13,00 \pm 0,56
FS $\frac{2}{20}$	15,0 \pm 0,6	54,0 \pm 2,5	-	9,0 \pm 0,4	22,0 \pm 1,0

Media \pm desvío estándar, n=18.

P: proporción proteica (ecuación 2; Materiales y métodos, sección 5.3.6).

FS: fase superior; subíndice y superíndice indican las concentraciones iniciales (% p/p) de WPC80 y HPMC, respectivamente.

Por otra parte, puede verse que la proporción de β -lg en la FS fue siempre mayor que en la correspondiente FI. Más aún, la FS resultó siempre más enriquecida en esta proteína (48-62 %) que el WPC80 original (47 %), independientemente de la concentración inicial de uno u otro biopolímero. Sin embargo, las proporciones de β -lg alcanzadas en la FS nunca superaron la proporción de esta proteína en la preparación comercial (77 %).

Por último, ninguna fase segregada mostró un enriquecimiento significativo en BSA, lo cual era esperable dada la baja proporción de esta proteína en el material de partida inicial, WPC80.

Tabla 5.3. Proporción de las diferentes proteínas del lactosuero, en las fases inferiores segregadas de sistemas binarios WPC/E50LV.

Muestra	P α -lac (%)	P β -lg (%)	P B I (%)	P BSA (%)	P B II (%)
FI $\frac{0,5}{8}$	12,0 \pm 0,6	34,0 \pm 1,7	23,0 \pm 1,1	9,00 \pm 0,45	22,0 \pm 1,1
FI $\frac{0,5}{12}$	11,0 \pm 0,5	36,0 \pm 1,5	22,0 \pm 0,9	8,00 \pm 0,32	23,0 \pm 1,0
FI $\frac{0,5}{15}$	14,0 \pm 0,6	35,0 \pm 1,5	18,0 \pm 0,8	8,00 \pm 0,36	25,00 \pm 1,25
FI $\frac{0,5}{20}$	11,00 \pm 0,55	34,0 \pm 1,4	24,0 \pm 1,2	9,0 \pm 0,4	22,0 \pm 0,9
FI $\frac{2}{8}$	18,0 \pm 0,9	40,0 \pm 2,0	14,0 \pm 0,7	8,0 \pm 0,4	20,0 \pm 1,0
FI $\frac{2}{12}$	20,00 \pm 0,92	37,0 \pm 1,7	15,0 \pm 0,6	8,00 \pm 0,34	20,0 \pm 0,8
FI $\frac{2}{15}$	21,0 \pm 1,0	38,0 \pm 1,5	12,0 \pm 0,5	8,00 \pm 0,37	21,00 \pm 0,95
FI $\frac{2}{20}$	23,0 \pm 0,94	34,0 \pm 1,7	14,00 \pm 0,55	9,0 \pm 0,5	20,0 \pm 0,9

Media \pm desvío estándar, n=18.

P: proporción proteica (ecuación 2; Materiales y métodos, sección 5.3.6).

FI: fase inferior; subíndice y superíndice indican las concentraciones iniciales (% p/p) de WPC80 y HPMC, respectivamente.

Las proporciones calculadas se correlacionan con el parámetro denominado “pureza”, el cual se define como la relación entre el contenido de una proteína en particular y la cantidad total de proteína presente en una determinada fase de un

ATPS (Picó y col., 2006). Teniendo en cuenta esto último, el enriquecimiento obtenido para α -lac y β -lg en los sistemas de dos fases estudiados, reflejan las purzas normalmente esperadas en un ATPS, las cuales están en el orden de 30-60 % (Boaglio y col., 2006; Capezio y col., 2005). En conclusión, la FS de un sistema mixto con una concentración inicial de HPMC de 0,5% p/p podría ser seleccionado preferentemente para aislar α -lac y β -lg.

Los resultados expuestos hasta aquí, indican que existe un fraccionamiento diferencial de las proteínas del lactosuero entre las dos fases (FI y FS) de distintos ATPS WPC/E50LV. La partición molecular en un sistema acuoso bifásico es un fenómeno complejo que depende del tipo de molécula, de su PM, de su concentración en la mezcla, así como también del pH y de la fuerza iónica (Sarubbo y col., 2000). Con respecto al caso particular del fraccionamiento de proteínas, el PM y las características químicas de las mismas resultan ser los factores más relevantes. Con respecto al PM, α -lac es la proteína lactosérica globular de menor peso molecular (14,2 kDa), mientras que a pH cercano a 7, β -lg existe en su forma dimérica (36 kDa) (Capezio y col., 2005). Por lo tanto, los diferentes comportamientos de partición observados entre estas dos proteínas podrían atribuirse a la facilidad con que sus moléculas pueden incluirse en el volumen libre de la fase rica en HPMC, dado el bajo PM que presentan. Sin embargo, cabe destacar en los sistemas con una concentración inicial de 2% p/p de HPMC, el fenómeno recién descrito no se observa, principalmente por una disminución de la difusión de las proteínas hacia la FS, debido a un incremento de la viscosidad de dicha fase (Schorsch y col., 1999).

Finalmente, existen una serie de factores en estos sistemas de partición WPC/E50LV que pueden influir en el fraccionamiento proteico:

- i) en cuanto al pH, este no tendría un efecto significativo sobre el comportamiento de partición observado. Dada la naturaleza no-iónica de la HPMC, y aunque las proteínas poseen una leve carga negativa a pH 6,5 (sus pI están entre 4,9 y 5,4), no habría interacciones electroestáticas entre ambos biopolímeros, de suficiente intensidad como para influenciar la partición.
- ii) el comportamiento de partición de una proteína dentro de una mezcla es diferente al que ésta presenta en forma individual debido a las interacciones

proteína-proteína que se vuelven un factor fundamental en la determinación del fraccionamiento (Franco y col., 1996).

- iii) la presencia de otras sustancias como ser grasas, lactosa o sales en la mezcla WPC/E50LV, agregan una mayor complejidad al particionamiento proteico.
- iv) la naturaleza polidispersa del polisacárido agrega mayor complejidad; de hecho el PM de E50LV cae en un rango de 5,6 a 25 kDa (Pérez y col., 2009). Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que el polisacárido también sufra un fraccionamiento diferencial.

5.4.3. Particionamiento de α -lac y β -lg.

Los coeficientes de partición para α -lac (K_a) y β -lg (K_b) se muestran en la Figura 5.3. De acuerdo con Johansson (1985) los coeficientes de partición para proteínas en los ATPS más comúnmente utilizados para su fraccionamiento, están en el orden de 0,1 a 10. De esta manera, un coeficiente de partición menor que uno significa que la molécula en partición, permanece preferentemente en la fase inferior, mientras que un valor de K mayor a la unidad indica que dicha molécula migra mayoritariamente hacia la fase superior.

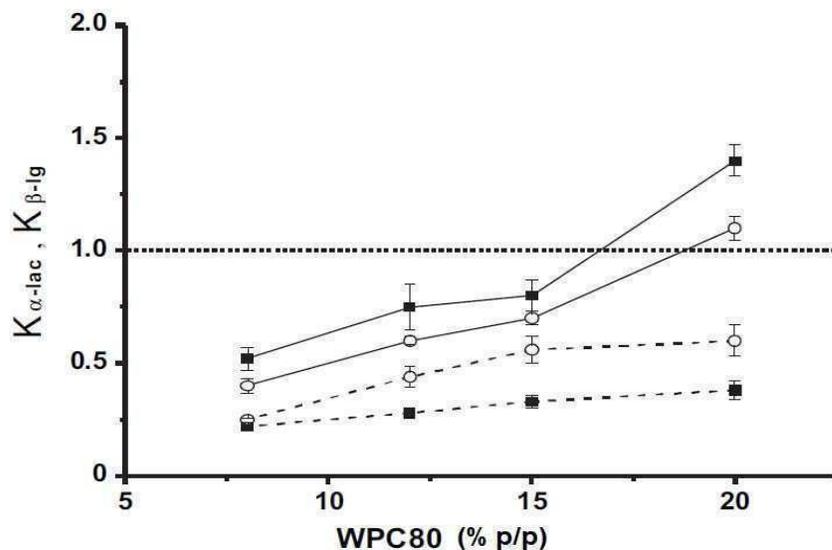


Figura 5.3. Coeficientes de partición (K) para las proteínas del suero en ATPS WPC/HPMC con concentraciones iniciales de E50LV de 0,5% p/p (línea sólida) o 2% p/p (línea punteada), y concentraciones crecientes de WPC80. $K_{\beta\text{-lg}}$: (○), $K_{\alpha\text{-lac}}$: (■).

Analizando los valores de K para todos los sistemas mixtos en conjunto, puede observarse que tanto α -lac como β -lg permanecen predominantemente en la fase inferior. Sin embargo, existe una marcada diferencia entre los valores de K de acuerdo a la concentración inicial de polisacárido. Con un 2 % p/p de HPMC, los valores de K nunca superan un 0,6, mientras que con 0,5 % p/p los valores de K aumentan hasta 1,4 y 1,1 para K α -lac y K β -lg, respectivamente.

Por otra parte, en todos los casos puede verse que al incrementarse la concentración inicial de WPC, aumenta el valor de K. Este fenómeno podría ser atribuido al hecho de que al aumentar la concentración de WPC también se incrementa la concentración de otros compuestos presentes en el concentrado proteico, como ser grasas, azúcares y sales, dando lugar a sistemas ATPS con diferentes capacidades de fraccionamiento proteico, lo que conduce a una variación en los valores de K.

Particularmente, el sistema binario WPC 20/HPMC 0,5 % p/p presenta los valores de $K_{\alpha\text{-lac}}$ y $K_{\beta\text{-lg}}$ más altos (1,4 y 1,1, respectivamente). Estos valores indican que dichas proteínas se distribuyen en forma equitativa entre ambas fases. Sin embargo, estos valores de K están dentro de los rangos reportados en literatura para las proteínas lactoséricas en otros sistemas ATPS. En un ATPS constituido por polietilenglicol y maltodextrina, da Silva y Meirelles (2000) obtuvieron valores de K entre 0,38 y 4,93 para α -lac, y de 0,13 a 1,28 para β -lg. Más aún, de Oliveira y col. (2007) encontraron valores de $K_{\alpha\text{-lac}}$, $K_{\beta\text{-lg}}$ de 2,5 y 1,1, respectivamente, trabajando con un ATPS conteniendo carbamato de amonio/co-polimeros-entrelazados.

Con respecto a la recuperación proteica, calculada con la ecuación 5 (sección 5.3.7, Materiales y métodos), este parámetro es una medida de la cantidad de la proteína deseada que se recuperó en la FS en relación a la cantidad total de proteína inicial. Los valores de recuperación proteica para α -lac y β -lg se resumen en la Tabla 5.4.

En primer lugar, puede observarse que la recuperación proteica, teniendo en cuenta ambas proteínas, alcanza valores que van desde 35 a 73 %. En términos generales, la recuperación proteica está en un rango de 60 a 95 % para los sistemas ATPS más utilizados (Boaglio y col., 2006; Bolognese y col., 2005).

Incluso, cabe mencionar que los autores Alomirah y Alli (2004), obtuvieron un valor promedio de 45 % para la recuperación proteica de α -lac y β -lg, partiendo de WPC y utilizando un proceso de purificación de múltiples pasos. Teniendo en cuenta los resultados de estos autores, puede concluirse que los valores de recuperación proteica obtenidos en el presente trabajo resultan aceptables.

En segundo lugar, se debe destacar que en las mezclas que inicialmente contenían un 0,5 % p/p de HPMC, la recuperación proteica en la FS llegó a valores de 73 y 60%, para α -lac y β -lg, respectivamente (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Recuperación proteica de α -lac y β -lg en la fase superior, junto con la relación de concentraciones totales de proteína y HPMC.

Composición inicial (% p/v)		PR ^a (%)		Proteína/HPMC ^b	
WPC80	HPMC	α -lac	β -lg	FI	FS
8	0,5	70,0 ± 3,5	55,0 ± 2,7	37,0 ± 2,6	9,0 ± 0,6
12	0,5	70,0 ± 3,1	56,0 ± 2,2	43,0 ± 2,8	13,0 ± 0,8
15	0,5	61,0 ± 3,0	50,0 ± 2,1	47,0 ± 3,0	15,0 ± 1,0
20	0,5	73,0 ± 3,7	60,0 ± 3,0	46,0 ± 2,7	25,0 ± 1,6
8	2	52,0 ± 2,6	50,0 ± 2,5	12,0 ± 0,8	2,0 ± 0,1
12	2	50,0 ± 2,2	62,0 ± 3,1	12,0 ± 0,7	3,0 ± 0,2
15	2	43,0 ± 2,1	60,0 ± 2,5	13,00 ± 0,85	4,0 ± 0,3
20	2	35,0 ± 1,7	46,0 ± 2,3	14,0 ± 1,0	5,00 ± 0,35

PR es la recuperación proteica (ecuación 5; Materiales y métodos, sección 5.3.7).

FS y FI indican fase superior e inferior, respectivamente.

^a Media ± desvío estándar, n=18.

^b Media ± desvío estándar, n=3.

Por otra parte, los valores de recuperación, independientemente del tipo de proteína, resultaron entre 35 y 62 % cuando se partió de una mezcla con una concentración de 2% p/p de polisacárido. Nuevamente, este comportamiento diferencial puede atribuirse a la reducción de la difusión proteica hacia la FS como resultado del aumento en la viscosidad de la fase rica en HPMC. Además, el cambio de la concentración inicial de WPC produjo un cambio en el valor de la recuperación proteica, hecho que tiene la misma explicación expuesta anteriormente para el caso de los coeficientes de partición, es decir que el cambio de concentración de WPC va acompañado de un cambio de otros componentes presentes en este concentrado, dando lugar a un ATPS con capacidades de fraccionamiento distintas.

Finalmente, otro parámetro interesante de analizar es la cantidad de HPMC que permanece en las fases segregadas dado que el polisacárido debería ser removido en un paso posterior del proceso de purificación. En la Tabla 5.4 se observa la relación entre las concentraciones de proteína y HPMC tanto para la FS como para la FI de todos los sistemas mixtos. Como era esperable, estos cocientes son altos para todas las FI dado sus altos contenidos proteicos. Sin embargo, a lo largo de este capítulo se han enunciado varios factores por los cuales estas FI no resultaron ser las fracciones con mejor capacidad para aislar la α -lac y β -lg debido a los bajos valores de enriquecimiento en dichas proteínas, alcanzados en las fases inferiores. Por lo tanto, focalizándose en la relación cantidad de proteína:HPMC para las FS, se encontró que el sistema mixto WPC 20 %/E50LV 0,5 % p/p presenta la relación más alta, 25:1.

5.5. Conclusiones.

Los datos presentados en este capítulo demuestran la capacidad de los ATPS constituidos por WPC/HPMC, para fraccionar las proteínas lactoséricas de bajo PM, α -lac y β -lg.

Esta capacidad radica en la incompatibilidad diferencial existente entre las distintas fracciones de la E50LV y las distintas proteínas del lactosuero.

La mezcla WPC 20 %/E50LV 0,5 % constituye el ATPS que presentó la mejor combinación de condiciones para el fraccionamiento α -lac y β -lg (enriquecimiento en FS: α -lac 24 %, β -lg 58 %).

La FS del sistema WPC 20 %/HPMC 0,5 % puede ser considerada una fracción enriquecida en α -lac y β -lg. En dicha fase superior, se alcanzó una proporción conjunta de ambas proteínas de alrededor de un 80%, recuperándose un 73 y 60 % de α -lac y β -lg, respectivamente, con respecto a la cantidad de proteína inicial en el WPC.

Por último, la relación proteína a HPMC en esta FS resultó, 25:1. Esta pequeña cantidad de polisacárido residual podría permanecer o ser removida en un paso posterior de purificación simple, como ser un cambio de pH o fuerza iónica.

5.6. Referencias.

Albertsson P. A., Cajarville A., Brooks D. E., and Tjerneld F. (1987). Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 926(87-93).

Alomirah H. F., and Alli I. (2004). Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. *International Dairy Journal* 14, 411-419.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official methods of analysis (16th edition). AOAC Press, Arlington, TX, USA.

Boaglio A., Bassani G., Picó G., and Nerli B. (2006). Features of the milk whey protein partitioning in polyethyleneglycolesodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 837, 18-23.

Bolognese B., Nerli B., and Picó G. (2005). Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification. *Journal of Chromatography B*, 814, 347-353.

Capezio L., Romanini D., Picó G. A., and Nerli B. (2005). Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819, 25-31.

Closs C. B., Conde-Petit B., Roberts I. D., Tolstoguzov V. B., and Escher F. (1999). Phase separation and rheology of aqueous starch/ galactomannan systems. *Carbohydrate Polymers*, 39, 67-77.

Cheang B., and Zydney A. L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*, 231, 159-167.

Christian T. J., Manley-Harris M., and Richards G. N. (1998). A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems *Carbohydrate Polymers*, 35, 7-12.

da Silva L. H., and Meirelles A. J. (2000). Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/ maltodextrin aqueous-two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, 42, 279-282.

de Oliveira M. C., de Abreu Filho M. A., and de Alcântara Pessôa Filho P. (2007). Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO. *Biochemical Engineering Journal*, 37(311-318).

Franco T. T., Andrews A. T., and Asenjo J. A. (1996). Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface charge. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(3), 309-315.

- Johansson G. (1985). Partitioning proteins. *Partitioning in aqueous-two-phase systems*. Eds: H. Walter, D. E. Brooks and D. Fisher, (pp. 161-198). Academic Press, Orlando, FL, USA.
- Johansson G., and Walter H. (2000). Partitioning and concentrating biomaterials in aqueous phase systems. *Microcompartmentation and phase separation in cytoplasm* *International Review of Cytology*. Eds: H. Walter, D. E. Brooks and P. A. Sreere, (pp. 33-60). Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-687.
- Liu X., Powers J. R., Swanson B. G., Hill H. H., and Clark S. (2005). Modification of whey protein concentrate hydrophobicity by high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 310 - 317.
- Pérez O. E., Carrera Sánchez C., Pilosof A. M. R., and Rodríguez Patino J. M. (2009). Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336, 485-496.
- Pérez O. E., Wargon V., and Pilosof A. M. R. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/ hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 966-974.
- Picó G., Romanini D., Nerli B., and Farruggia B. (2006). Polyethyleneglycol molecular mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 830(286-292).
- Polyakov V. I., Grinberg V. Y., and Tolstoguzov V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins. *Food Hydrocolloids*, 11, 171-180.
- Reed Z. H., and Park J. W. (2008). Qualification and quantification of fish protein in prepared Surimi crabstick. *Journal of Food Scienc*, 73, 329-334.
- Rito-Palomares M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products *Journal of Chromatography B*, 807(3-11).
- Sarubbo L. A., Oliveira L. A., Porto A. L. F., Duarte H. S., Carneiro-Leao A. M. A., Lima-Filho J. L., Campos-Takaki G. M., and Tambourgi E. B. (2000). New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). *Journal of Chromatography B*, 743, 79-84.
- Schorsch C., Jones M. G., and Norton I. T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/ locust bean gum/ sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 89-99.
- Simonet F., Garnier C., and Doublier J. L. (2000). Partition of proteins in the aqueous guar/ dextran two-phase system. *Food Hydrocolloids*, 14, 591-600.

Sivars U., and Tjerneld F. (2000). Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning indetergent/ polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474, 133-146.

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

Turgeon S. L., Beaulieu M., Schmitt C., and Sanchez C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 401-414.

Zaslavsky B. Y. (1995). Aqueous two-phase partitioning. *Physical chemistry and bioanalytical applications*. (pp. 221-290). Marcel Dekker New York, NY, USA. .

CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios llevados a cabo forman parte de un proyecto integral cuyo desarrollo permitió caracterizar el comportamiento de diversos sistemas mixtos de WPC y HPMC. Dicho proyecto apuntó, en términos generales,

- al entendimiento de las interacciones entre proteínas y polisacáridos en solución, es decir, la definición del límite entre incompatibilidad/compatibilidad termodinámica de estos sistemas mixtos, en condiciones definidas de temperatura, pH y fuerza iónica.
- a la aplicación de dicho conocimiento a fin de controlar diferentes propiedades físico-químicas de estas mezclas.

En particular, de los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

-  los sistemas ternarios WPC/HPMC/agua se comportan como una emulsión agua-en-agua, donde la micro-estructura de la misma está determinada por la composición inicial, que determina la relación de volúmenes entre las fases segregadas.
-  se pudo establecer que la temperatura de transición vítrea de mezclas deshidratadas de WPC y HPMC está determinada por dicha micro-estructura y el grado de separación de fases que ocurre en la correspondiente solución acuosa ternaria.
-  Esta micro-estructura también define tanto el comportamiento reológico como las características macro-estructurales de los geles mixtos.
-  La mezclas de proteínas del lactosuero (β -lactoglobulina) e hidroxipropilmetilcelulosas (E50LV) en condiciones de limitada compatibilidad termodinámica y concentraciones que permiten la saturación de la interfase por

ambos componentes, presentan un comportamiento competitivo en la interfase aire-agua, modulado por el pH. Debido a su mayor carácter tensioactivo y buenas propiedades formadoras de películas, la HPMC domina tanto la presión superficial como las propiedades viscoelásticas de las películas interfaciales.

 los “sistemas acuosos de dos fases” (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) constituidos por WPC/HPMC, son capaces de fraccionar las proteínas lactoséricas de bajo peso molecular, α -lactalbúmina y β -lactoglobulina, a partir del WPC.

Finalmente, los conocimientos aportados sobre las interacciones entre proteínas y polisacáridos (incompatibilidad/compatibilidad termodinámica), no sólo contribuyen a enriquecer el conocimiento básico en el área de la ciencia de los alimentos, sino que también podrían tener aplicación dentro de la industria alimentaria, por ejemplo, para crear nuevas texturas o apariencias, para el remplazo de grasas en productos bajos en calorías, o para la micro-encapsulación y desarrollo de matrices de liberación controlada de ingredientes bioactivos.