



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

FACULTAD DE QUÍMICA

REOLOGÍA Y ESTABILIDAD DE EMULSIONES
ELABORADAS CON MEZCLAS DE CASEINATO DE
SODIO Y GELANA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA -ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARÍA GUADALUPE SOSA HERRERA

TUTORA:

DRA. LAURA PATRICIA MARTÍNEZ PADILLA



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Alberto Tecante Coronel

Secretario: Dra. Adriana I. Rodríguez Hernández

1^{er.} Vocal: Dr. Jaime Vernon Carter

1^{er.} Suplente: Dr. Angel Enrique Chávez Castellanos

2^{do.} Suplente: Dr. Luis Miguel Trejo Candelas

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos, Departamento de Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dra. Laura Patricia Martínez Padilla

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) el apoyo otorgado mediante el Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA) para realizar los estudios de Doctorado en Ingeniería, Así como mi participación como estudiante de doctorado en el proyecto PAPIIT IN14205-2 “*Comportamiento reológico y estabilidad de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio y polisacárido gelificante*”, cuyo financiamiento contribuyó para la adquisición del tensiómetro de gota colgante (PAT 1, Sinterface Technologies, Berlin, Alemania).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada en el periodo de septiembre 2003 – agosto 2006, con número de registro 183256, para realizar los estudios de doctorado.

Agradezco al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la Beca Tesis Posgrado para doctorado COMECYT 2005.

Agradezco al Dr. Jaime Vernon Carter las facilidades otorgadas para la medición del tamaño de partícula en emulsiones, en las instalaciones de la UAM – Iztapalapa.

Agradezco también a los miembros del jurado sus valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a la Dra. L. Patricia Martínez Padilla por la dirección de este trabajo, por su gran apoyo y acertada orientación.

DEDICATORIAS

Con admiración, cariño y mi más profundo agradecimiento a mis padres Gladys y Antonio.

Con cariño a Gerardo, Minerva, Altair y Ricardo

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
CONCEPTOS BÁSICOS	
1. EMULSIONES	14
1.1 Propiedades de la emulsión	18
1.2 Reología de emulsiones	23
1.3 Reología interfacial	27
2. CASEINATO DE SODIO	31
3. GELANA	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MATERIALES	39
2. MÉTODOS	40
2.1 Preparación de muestras	40
2.2 Caracterización fisicoquímica	42
2.3 Pruebas reológicas	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 SISTEMAS ACUOSOS	44
3.1.1 Distribución de tamaño de partícula y potencial z	44
3.1.2 Comportamiento reológico	53
3.2 EMULSIONES	62
3.2.1 Distribución y tamaño de partícula	62
3.2.2 Comportamiento reológico	67
3.3 PROPIEDADES DE SUPERFICIE	76
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE CUADROS

1.1	Fenómenos de inestabilidad primarios en emulsiones aceite en agua	19
1.2	Características de caseínas	34
2.1	Resumen de los sistemas acuosos elaborados con los hidrocoloides individuales	41
2.2	Resumen de los sistemas acuosos elaborados con mezclas de caseinato de sodio y gelana	41
3.1	ζ (mV) de sistemas acuosos de caseinato de sodio y gelana solos	52
3.2	ζ (mV) de sistemas acuosos de caseinato de sodio y gelana en mezcla	52
3.3	Viscosidad de disoluciones de caseinato de sodio 1 y 2 % a 25 °C.	53
3.4	η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.s ⁿ), $n(-)$ de disoluciones de gelana, G, 0.03 y 0.05 % a 25 °C.	54
3.5	η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.s ⁿ), $n(-)$ de mezclas de caseinato de sodio 1%, C, con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C	57
3.6	η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.s ⁿ), $n(-)$ de mezclas de caseinato de sodio, C, 2% con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C	58
3.7	Diámetro Medio Sauter (μm) de emulsiones de caseinato solo a pH 5.4 y 6.8 con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C, 30% aceite puro de girasol	62
3.8	Diámetro Medio Sauter (μm) de emulsiones elaboradas con mezcla de caseinato y gelana a pH 5.4 y 6.8 con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C, 30 % aceite puro de girasol	64
3.9	Viscosidad de emulsiones de caseinato de sodio 1 y 2 % a 25 °C	67
3.10	η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.s ⁿ), $n(-)$ de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio 1%, C, con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C	70
3.11	η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.s ⁿ), $n(-)$ de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio, C, 2% con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C	70
3.12	Módulo elástico interfacial y viscosidad interfacial de disoluciones de caseinato de sodio	77

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Procesos de inestabilidad en emulsiones	16
1.2	Organización de partículas en función de la fracción volumen de la fase dispersa	21
1.3	Proporciones de las fracciones nitrogenadas de la leche	32
1.4	Estructura de la micela de caseína	33
1.5	Unidad repetitiva de la estructura del polisacárido gelana	37
3.1	Distribución de tamaño de partícula de caseinato de sodio 1% (a) y 2% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.	45
3.2	Distribución de tamaño de partícula de gelana 0.03% (a) y 0.05% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C	47
3.3	Distribución de tamaño de partícula de mezclas de caseinato de sodio 1% con gelana, pH 5.4 (a) y 6.8 (b), con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C	49
3.4	Distribución de tamaño de partícula de mezclas de caseinato de sodio 2% con gelana, pH 5.4 (a) y 6.8 (b), con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C	50
3.5	Viscosidad de disoluciones de gelana 0.03% (a) y 0.05% (b) a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C	55
3.6	Espectro mecánico de gelana 0.03 y 0.05% con 5 mM de CaCl_2 a pH 5.4 y pH 6.8, 25 °C.	56
3.7	Viscosidad de mezclas de caseinato de sodio 1% con gelana, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , pH 5.4 (a), pH 6.8 (b), 25 °C	59
3.8	Viscosidad de mezclas de caseinato de sodio 2% con gelana, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , pH 5.4 (a), pH 6.8 (b), 25 °C	51
3.9	Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 1% (a) y 2% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , 25 °C	63
3.10	Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 1% en mezcla con gelana, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , a pH 5.4 (a) y 6.8 (b), 25 °C	65

3.11	Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 2% en mezcla con gelana, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , a pH 5.4 (a) y 6.8 (b), 25 °C.	66
3.12	Viscosidad de emulsiones aceite-agua con 30% de aceite puro de girasol y disoluciones de caseinato de sodio 1%, en mezcla con gelana, a pH 5,4 (a) y 6.8 (b), 25 °C	68
3.13	Viscosidad de emulsiones aceite-agua con 30% de aceite puro de girasol y disoluciones de caseinato de sodio 2%, en mezcla con gelana, a pH 5,4 (a) y 6.8 (b), 25 °C	69
3.14	Viscosidad de emulsiones elaboradas con mezclas de gelana - caseinato de sodio 1% y de la fase acuosa correspondiente, con adición de 5 mM de CaCl_2 . pH 5.4 (a); pH 6.8 (b)	72
3.15	Viscosidad de emulsiones elaboradas con mezclas de gelana - caseinato de sodio 2% y de la fase acuosa correspondiente, con adición de 5 mM de CaCl_2 . pH 5.4 (a); pH 6.8 (b)	73
3.16	Módulo elástico de sistemas acuosos y sus respectivas emulsiones elaboradas con mezclas de gelana y caseinato a 1% (a) y 2% (b), pH 5.4, 25 °C	75
3.17	Tensión interfacial de disoluciones acuosas de caseinato de sodio 1%, 25 °C	78
3.18	Tensión interfacial de disoluciones acuosas de caseinato de sodio 2%, 25 °C	79

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron propiedades físicoquímicas y reológicas de mezclas de caseinato de sodio y gelana tanto en medio acuoso como en emulsión con 30% de aceite puro de girasol. Ello con la finalidad de correlacionar las propiedades de la fase continua con las características de las emulsiones elaboradas.

Estos sistemas se estudiaron bajo diferentes condiciones, modificando tanto el pH, el cual fue neutro (6.8) y cercano al punto isoeléctrico de la proteína (pH 5.4), como los iones presentes, adicionando cloruro de calcio a una concentración de 5 mM. Estas condiciones se eligieron con la finalidad de representar la complejidad de emulsiones alimenticias como crema, aderezos, sustitutos de crema, helado, entre otros.

Dentro de las pruebas físicoquímicas realizadas se encuentran la distribución de tamaño de partícula, potencial zeta y tensión superficial. El estudio reológico incluyó la caracterización de propiedades de flujo y viscoelásticas, así como pruebas de reología dilatacional de la interfase aceite agua.

En los sistemas acuosos se hizo evidente la formación de una red de gelana en presencia de iones, la cual dominó el comportamiento de los sistemas. En emulsiones fue posible observar que la red de gelana juega un papel importante sobre las propiedades de las mismas, impidiendo la asociación de glóbulos de grasa que se encuentran inmovilizados en ella.

Al estudiar las propiedades de superficie del caseinato de sodio, se observó que los iones calcio tienen un efecto importante sobre las mismas, favoreciendo las características elásticas de la interfase formada, lo que favorece la estabilidad de los sistemas.

INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de emulsiones recae en que éstas participan en la creación de muchas estructuras alimenticias en donde los ingredientes que las constituyen interaccionan de muchas formas, con el resultado de que ellos crean un ensamble único de moléculas dando origen a la estructura de un alimento en particular. De esta forma, un importante reto para la ciencia de emulsiones alimenticias es entender y controlar los cambios en las interacciones coloidales, reología y microestructura durante su formación. Para ello, en principio, podemos dividir de manera general a las emulsiones alimenticias en tres tipos, dependiendo de sus usos finales (Dalgleish, 2006):

- **Productos finales:** algunas emulsiones tales como crema para café y licor de crema son emulsiones relativamente simples cuyo único requerimiento es mantenerse estable al cremado y la coalescencia durante su producción y vida de almacenamiento (lo cual, sin embargo no es tan simple).
- **Ingredientes:** las emulsiones pueden ser usadas como ingredientes que participan en la formación de estructuras de productos más complejos. De este tipo de productos son los yogures y otros sistemas gelificados que contienen partículas de emulsión que pueden interaccionar con otros ingredientes alimenticios, pero no son desestabilizados en el proceso.
- **Ingredientes que participan en la formación de estructuras:** los glóbulos de una emulsión se pueden emplear para crear nuevas estructuras, tales como el helado o productos batidos donde la emulsión en sí misma se requiere desestabilizar para crear nuevas estructuras en el producto.

Muchas emulsiones alimenticias son más complejas que la definición tradicional de una emulsión: una dispersión coloidal de gotas líquidas inmersas en otra fase líquida. Esto es principalmente debido a que la fase continua a menudo posee agentes espesantes o gelificantes, así como mezclas de ambos, o inclusive puede contener material cristalino, como en un helado. En la gran mayoría de estas emulsiones las proteínas son componentes indispensables debido a que pueden, en principio, emulsificar una fase de aceite en agua y estabilizar la emulsión. En este sentido, destacan las proteínas de la leche por ser excelentes emulsificantes con aplicación en una gran variedad de productos lácteos y otros alimentos procesados (Cheftel y col., 1989).

De particular importancia es el caseinato de sodio, que es una proteína de origen lácteo compuesta por una mezcla de diferentes fracciones de caseína y que se usa ampliamente como ingrediente en la industria de alimentos. Su aplicación como emulsificante ha sido reconocida (Dalglish, 2006; Wilde y col., 2004; Lucassen-Reynders y Benjamins, 2001; Murray y col., 2001; Dickinson, 1999a y 1999b) debido a su habilidad para conferir rápidamente una baja tensión interfacial durante la emulsificación y a las características fuertemente anfifílicas de sus caseínas individuales mayoritarias (alfa s1 y beta caseína). Ambas fracciones son considerablemente sensibles al calcio debido a la presencia de residuos aniónicos de fosfoserina (Antipova y col., 2002; Dickinson y col., 2003) que generan un fuerte enlace específico con el ion calcio. El enlace de calcio a las caseínas reduce las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de caseína las cuales pueden promover interacciones entre dominios hidrofóbicos, permitiendo la formación de agregados.

A valores de pH, tales como 5.4, cercanos al su punto isoeléctrico de las caseínas (4.6), la capacidad de adsorción del caseinato en la interfase se ve favorecida, lo que genera un incremento en la superficie cubierta que se puede atribuir a cambios en su conformación y su estado de agregación, dando origen una molécula más compacta (Dickinson, 1999a; Dickinson y col., 1998).

Se ha establecido (Tolstoguzov, 1997) que un incremento en la actividad termodinámica de una proteína debido a la adición de un polisacárido incompatible mejora su adsorción en interfases. En el caso de emulsiones, las interacciones interfaciales polisacárido-proteína en la superficie de los glóbulos de grasa pueden influir sobre las propiedades de estabilidad coloidal del sistema de forma tal que en sistemas conteniendo gotas de aceite cubiertas con proteína, una interacción atractiva proteína-polisacárido puede incrementar la estabilidad de la emulsión por formación de una capa estérica estabilizante o puede desestabilizar la emulsión al formar enlaces poliméricos entre las gotas floculadas; mientras que una interacción repulsiva proteína-polisacárido puede estabilizar la emulsión al inmovilizar las gotas cubiertas de proteína en una red de gel de polisacárido o puede desestabilizar la emulsión induciendo una incipiente separación de fases entre el componente de la proteína adsorbida y el polisacárido disuelto (Dickinson y Stainsby, 1982).

Lo que en realidad sucede en algún sistema coloidal en particular depende de las concentraciones de los dos biopolímeros y de la naturaleza detallada de las interacciones intermoleculares o interpartícula, sobre las cuales influyen las condiciones del medio cuyas variaciones (pH, iones) inducen cambios en el comportamiento de las partículas coloidales, principalmente en su asociación (Antipova y col., 2002).

Existen polisacáridos que por ser relativamente recientes, han sido pocos los estudios de sus aplicaciones en mezcla con proteínas. Uno de ellos es la goma gelana que es un polisacárido aniónico gelificante de origen microbiano (Gibson y Sanderson, 1997), el cual, al ser un polímero hidrofílico, no presenta superficie activa, por lo que no forma emulsiones aceite en agua (Huang y col., 2001). Sin embargo, puede estabilizarlas, debido a su capacidad para gelificar a bajas concentraciones en presencia de iones (Rodríguez- Hernández y col., 2003).

Uno de los aspectos más importantes de cualquier emulsión alimenticia son sus propiedades reológicas. Las emulsiones alimenticias aceite en agua pueden variar desde líquidos newtonianos, tales como la leche, hasta productos no newtonianos con características viscoelásticas, tales como la mayonesa (Dickinson y Golding, 1997). Las propiedades reológicas de las emulsiones están determinadas por muchos factores diferentes, incluyendo la concentración de la fase dispersa y la viscosidad (y composición) de la fase continua, además de dos principales factores (Dickinson, 1999a): (i) la estructura y la composición de la capa de proteína adsorbida en la interfase aceite-agua y (ii) el estado de asociación y agregación de la proteína en la fase acuosa.

Dado que las emulsiones alimenticias son sistemas extraordinariamente complejos, el contenido de sal y el pH en éstos puede variar lo suficiente para tener efectos significativos sobre sus características en general, por lo que un aspecto importante en relación con las propiedades emulsificantes de una proteína es su comportamiento en sistema acuosos, tratando de distinguir la estabilidad conformacional de la proteína, de la agregación de proteína o precipitación debida a la reducción de solubilidad a pH cercano a su punto isoelectrico, a alta fuerza iónica o, a través de enlazar iones, considerando además que la agregación puede ocurrir sin ningún cambio conformacional de la proteína (Mc Clements, 1999).

Con base en lo anterior, en este estudio se consideró de primordial importancia analizar el efecto de fuertes enlaces específicos del ion calcio, y la influencia de un polisacárido aniónico a valores de pH neutro y cercano al punto isoelectrico de la proteína, sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas de sistemas acuosos de caseinato de sodio. Así como analizar su efecto sobre las propiedades de interfase y las características reológicas y de tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con dichos sistemas, considerando que son principales indicadores de la estabilidad de las mismas.

CONCEPTOS BÁSICOS

1. EMULSIONES

Una emulsión se puede definir como un sistema opaco, heterogéneo de dos fases líquidas inmiscibles (agua y aceite) donde una de las fases se encuentra dispersa en la otra como gotas de tamaño microscópico o coloidal. En la mayoría de los alimentos los diámetros de las gotas generalmente están entre 0.1 y 100 μm (Dickinson y Stainby, 1982; Dickinson, 1992; Morrison y Ross, 2002; Mc Clements, 2005). Existen dos tipos de emulsiones simples, aceite en agua y agua en aceite, dependiendo de la fase en la cual estén comprendidas las gotas. Las emulsiones aceite en agua consisten de glóbulos de aceite dispersos en agua y las emulsiones agua en aceite consisten de gotas de agua dispersas en una fase continua de aceite. Las emulsiones alimenticias pueden contener aparte de las dos fases líquidas, partículas sólidas tales como grupos de proteína coagulada, o burbujas de gas. Éstas son comúnmente sistemas aceite en agua más que agua en aceite.

Las emulsiones son generalmente inestables con respecto a las fases que las componen. Cuando se considera la estabilidad de una emulsión, es importante distinguir entre su estabilidad termodinámica y su estabilidad cinética (Dickinson, 1992). La inestabilidad termodinámica se puede demostrar cuando se agita una mezcla de aceite y agua puros, contenidos en un recipiente. La emulsión ópticamente opaca que se forma inicialmente por agitación se rompe con el tiempo hasta que una capa de aceite se forma en la superficie del agua. El origen de esta inestabilidad termodinámica se debe a un cambio en la energía libre del sistema antes y después de la emulsificación (Mc Clements, 2005). Por definición, para un proceso que involucra sólo un cambio en área interfacial, la diferencia en la energía libre interfacial entre el estado inicial y final ($\Delta G_{\text{formación}}$) es igual al

incremento en el área de contacto entre las fases aceite y agua (ΔA) multiplicado por la tensión interfacial (γ) (Barnes y Gentle, 2005):

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \Delta A \quad (1.1)$$

El cambio en la energía libre interfacial asociado con la creación de una emulsión puede estar representado por la ecuación 1.1, el cual es siempre positivo, debido a que el área de contacto se incrementa después de la homogenización. Este cambio en la energía libre determina si una emulsión es termodinámicamente estable o no, pero no proporciona ninguna información sobre la velocidad a la cual las propiedades de una emulsión cambian con el tiempo, el tipo de cambios que ocurren o los mecanismos físicos responsables de dichos cambios. De esta forma, se vuelve importante considerar la estabilidad cinética de una emulsión (Mc Clements, 2005). La importancia de los efectos cinéticos se destaca al comparar la estabilidad a largo tiempo de emulsiones con la misma composición, pero con diferente tamaño de partícula. Una emulsión que contiene pequeños glóbulos de grasa, generalmente tiene una mayor vida de anaquel (mayor estabilidad cinética) que aquella que contiene glóbulos más grandes, a pesar de que es termodinámicamente más inestable (debido a su mayor área interfacial).

En la mayoría de los casos la energía libre de una emulsión es mayor que la energía de las fases líquidas separadas, debido a la energía asociada con la interfase entre los líquidos. Por esta razón, para formar una emulsión se requiere de un aporte de energía, y cuando se forma, ésta es inestable (Hill, 1996). Sin embargo, es relativamente simple levantar barreras cinéticas a este proceso para alcanzar estados metaestables que para propósitos prácticos son completamente estables (Robins y Hibberd, 1998). Aunque las emulsiones alimenticias son termodinámicamente inestables, muchas de ellas permanecen cinéticamente estables (metaestables) por meses e inclusive años (Mc Clements, 2005).

La Figura 1.1 es un diagrama esquemático que ilustra los principales procesos de inestabilidad que puede sufrir una emulsión. La Figura 1.1a representa el estado metaestable antes de iniciar cualquier proceso de inestabilidad. Los glóbulos pueden ser polidispersos y en sistemas reales su movimiento se genera por cambios térmicos en la fase continua (movimiento browniano).

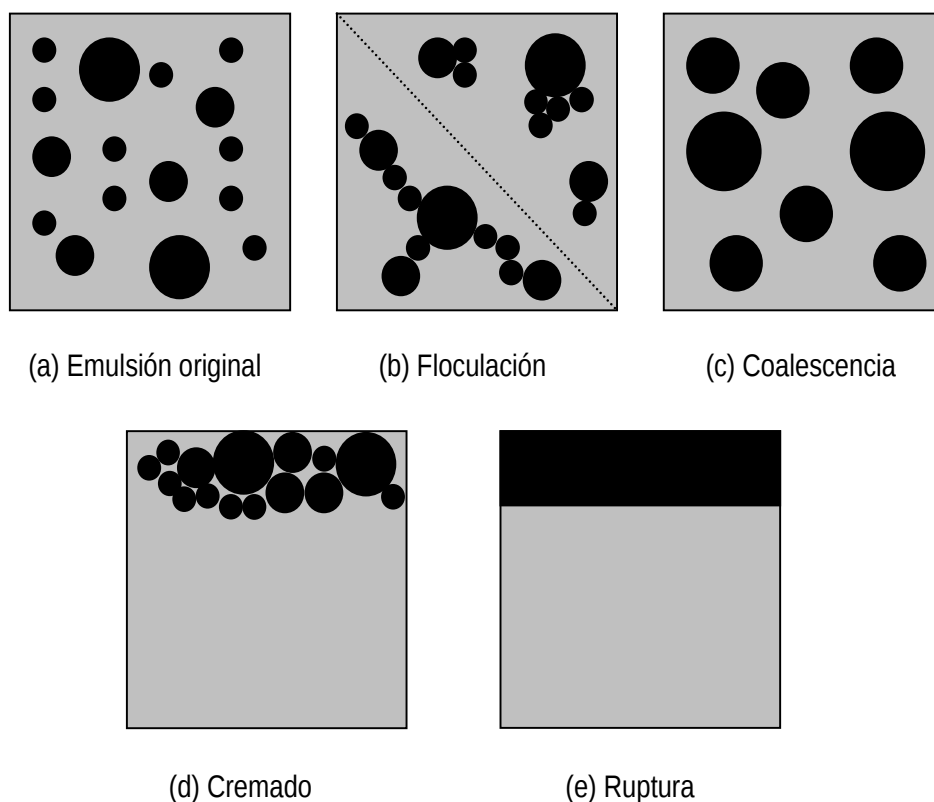


Figura 1.1 Procesos de inestabilidad en emulsiones (Robins y Hibberd, 1998)

Dentro de los fenómenos de inestabilidad más importantes se encuentra la floculación (Figura 1.1b) que es un proceso de agregación. La floculación ocurre cuando existe una fuerza atractiva global entre los glóbulos, la cual es suficientemente grande para vencer la agitación térmica y provocar la agregación. Mientras los glóbulos se mantienen juntos, no entran en contacto íntimo y se encuentran generalmente separados por una capa de polímero o surfactante.

La Figura 1.1b está dividida en dos secciones para mostrar que las partículas pueden estar condensadas en agregados llamados flóculos, o pueden estar conectadas en una estructura simple extendida (o red) que llena el espacio. La morfología que los glóbulos adopten depende de varios factores, incluyendo la concentración de glóbulos, el tamaño de los mismos y la fuerza de la floculación. En general, este proceso puede ser reversible tras el aporte de energía en menor cantidad que la que fue requerida para dispersar los glóbulos en la emulsión inicial.

Las emulsiones alimenticias pueden flocular por la adición de polímeros como los polisacáridos. Los procesos de floculación inducida por polímeros se pueden generar por dos mecanismos, puenteo (que se refiere a la unión de los glóbulos a través del polímero) o agotamiento (cuando la presencia polímeros coloidales promueve la atracción entre los glóbulos como consecuencia de un efecto osmótico). La floculación por puenteo ocurre cuando las superficies de los glóbulos son atractivas con el polímero adicionado y se presenta adsorción del mismo en la superficie del glóbulo. Cuando el polímero adicionado es insuficiente para cubrir completamente la superficie de los glóbulos, pueden ocurrir encuentros entre los glóbulos orientados de tal forma que un área con polímero adsorbido en un glóbulo se encuentra un área libre de polímero sobre un segundo glóbulo. Bajo estas circunstancias las moléculas de polímero adsorbidas en un glóbulo pueden posteriormente adsorberse en un segundo glóbulo, creando un puente polimérico. En contraste a la floculación por puenteo, la floculación por agotamiento ocurre cuando el polímero adicionado no se adsorbe en la superficie de los glóbulos. Bajo estas condiciones, existe una capa alrededor de los glóbulos donde la concentración de polímero es agotada en comparación con la mayor parte de la solución (Petsev, 1998).

Otro método de inestabilidad de emulsiones se presenta cuando el surfactante o capa de polímero que separa los glóbulos se desprende, generándose un contacto íntimo entre los glóbulos que da origen a la formación de un glóbulo de mayor

tamaño. A este proceso se le llama coalescencia (Figura 1.1c) y su velocidad de evolución depende de la velocidad de encuentro entre los glóbulos y las propiedades de superficie de los mismos.

Existen procesos de inestabilidad que pueden ocurrir sin la necesidad de que los glóbulos entren en contacto. Uno de ellos es el cremado, ejemplificado en la Figura 1.1d, el cual ocurre cuando existe una diferencia entre la densidad de la fase dispersa y la fase continua. Bajo la influencia de la gravedad, ocurre la separación con la fase más densa reunida en el fondo (fase acuosa) y la fase menos densa en la superficie (aceite).

Un eventual estado de equilibrio para emulsiones, mostrado en la Figura 1.1e, es la completa separación de fases. Este proceso conocido como el rompimiento de la emulsión puede tomar desde pocos minutos hasta varios años para que ocurra, dependiendo de la composición y microestructura de la emulsión, así como de las condiciones ambientales a las que se somete durante el almacenamiento (variaciones de temperatura, agitación mecánica y condiciones de almacenamiento). Los factores físicos que afectan de manera directa a los diferentes procesos antes mencionados se resumen en el Cuadro 1.1.

1.1 Propiedades de la emulsión

El comportamiento de las emulsiones aceite en agua de los sistemas alimenticios, en general, está definido por las tres partes que componen el sistema: la grasa o el aceite que está en el interior de los glóbulos de la emulsión; el material interfacial entre este material lípido y la fase acuosa; y la fase acuosa en sí misma. En estos sistemas, los aceites empleados para formar la emulsión, cuando se emplean a baja concentración, actúan esencialmente como rellenos, es decir, ocupan un espacio, pero no interaccionan física o químicamente con el resto del sistema.

Cuadro 1.1 Fenómenos de inestabilidad primarios en emulsiones aceite en agua
(Dickinson, 1992, Hill, 1996, Mc Clements, 2005, Roland y col., 2003)

	<i>Cremado</i>	<i>Floculación</i>	<i>Coalescencia</i>
Definición	Movimiento de los glóbulos dispersos, para formar una fase densa empacada, sin cambio en el tamaño de los mismos.	Agregación de glóbulos. Los glóbulos mantienen su integridad individual. La distribución del tamaño de partícula no cambia.	Dos o más glóbulos se unen para formar uno de mayor tamaño. Generalmente resulta en una separación de aceite y agua.
Factores que afectan	Diferencia de densidades Tamaño de glóbulo Concentración de la fase dispersa. Viscosidad de la fase continua Polidispersidad del tamaño de glóbulo de grasa. Cristalización de grasa Movimiento	Frecuencia de colisiones entre las moléculas (movimiento browniano, separación gravitacional, fuerzas mecánicas aplicadas) Fracción volumen de aceite, tamaño de glóbulo, viscosidad de la fase continua Fracción de colisiones que permiten la agregación Interacciones coloidales Interacciones hidrodinámicas	Naturaleza del emulsificante Naturaleza de las fuerzas que actúan sobre y entre ellas. Resistencia de la membrana del glóbulo a romperse. Espesor de la capa continua que separa los glóbulos Potencial del par interpartícula Tensión interfacial Viscoelasticidad del sistema
Métodos de control	Minimizar diferencia de densidades. Reducir tamaño del glóbulo Modificar reología de la fase continua Incrementar la concentración de glóbulos	Frecuencia de colisiones Incrementar viscosidad de la fase continua (movimiento browniano) Disminuir la distribución de tamaño de partícula Aumentar tamaño de partícula Disminuir la fracción volumen Eficiencia de colisiones pH	Prevenir contacto cercano entre glóbulos Variar pH, fuerza iónica, tipo de emulsificante o temperatura Prevenir la ruptura de la membrana

Por otro lado, uno de los principales factores que afectan las propiedades de dispersiones coloidales, como las emulsiones, es el empacamiento de las partículas (en este caso los glóbulos de grasa) dentro del sistema (Quemada y Berli, 2002) (Figura 1.2). La concentración de glóbulos en una emulsión se describe generalmente en términos de la fracción volumen de la fase dispersa, ϕ , la cual es igual al volumen de los glóbulos en la emulsión, dividida entre el volumen total de la emulsión. Frecuentemente, la concentración de glóbulos se expresa como porcentaje en volumen o masa, más que como fracción. Dependiendo de su valor se pueden diferenciar diferentes emulsiones (Mc Clements, 2005; Barnes, 2004; Morrison y Ross, 2002):

1. Sistema diluido ($\phi < 0.05$): las partículas están suficientemente alejadas, no interaccionan unas con otras y su movimiento sólo está determinado por fuerzas brownianas. Las emulsiones son fluidas con relativamente baja viscosidad que es dominada por la viscosidad de la fase continua.
2. Sistemas concentrados ($0.05 < \phi < 0.49$): las partículas interaccionan apreciablemente una con otra a través de interacciones hidrodinámicas y colisiones entre partículas, las cuales dificultan el movimiento. Las emulsiones aún son sistemas fluidos y su viscosidad se incrementa tanto como la concentración de partículas presentes.
3. Sistemas parcialmente cristalinos ($0.49 < \phi < 0.54$). Sobre este intervalo de concentración las partículas se separan en dos fases distintas: una fase “cristalina” que consiste de partículas estrechamente empacadas y una fase “fluida” consistiendo de partículas móviles con menor empacamiento.
4. Sistema vítreo ($0.58 < \phi < 0.64$): El movimiento de las partículas está severamente restringido debido a la proximidad entre partículas vecinas y se puede considerar que las partículas están atrapadas en una red de tal forma que no pueden moverse fácilmente una a través de otra. Este tipo de

emulsión puede exhibir tanto comportamiento sólido como líquido, actuando como sólido a bajos esfuerzos de cizalla y como fluido una vez que excede un esfuerzo crítico.

5. Sistema cristalino ($\phi > 0.64$). Las partículas están tan empaquetadas que no pueden tener movimiento vibracional o traslacional considerable. Este tipo de sistemas se comportan como sólidos elásticos.

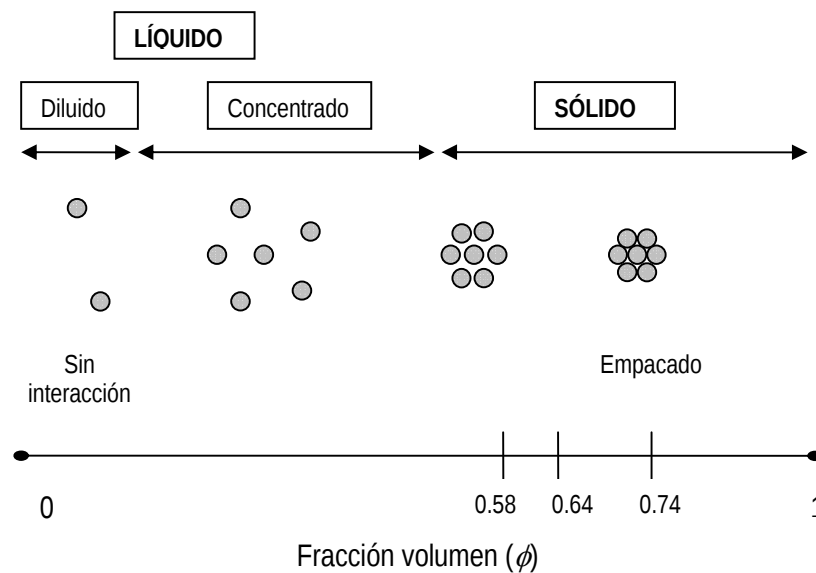


Figura 1.2 Organización de partículas en función de la fracción volumen de la fase dispersa.
Adaptado de Mc Clements, 2005; Quemada y Berli, 2002

La fracción volumen crítica en emulsiones generalmente es de 0.74, sin embargo puede variar para emulsiones alimenticias reales debido a que los glóbulos de aceite son deformables, además de que varios tipos de fuerzas coloidales atractivas y repulsivas actúan entre ellas.

La región interfacial que separa el aceite de la fase acuosa se conoce como interfase. Es una región estrecha y constituye sólo una pequeña fracción del volumen total de la emulsión. Sin embargo, tiene un importante efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de las emulsiones, incluyendo su formación, estabilidad y reología. La composición de la capa interfacial está gobernada principalmente por lo que está presente en el momento de formar la emulsión. En la mayor parte de las emulsiones alimenticias aceite en agua, la capa interfacial contiene proteínas.

Dentro de las características interfaciales que determinan las propiedades de emulsiones alimenticias se encuentran (Mc Clements, 2005):

1. Composición interfacial. El tipo y la concentración de sustancias de superficie activa presentes en la interfase influyen sobre su energía libre, estructura, dimensiones, características eléctricas y reología, por lo que, juega un papel importante en la determinación de las propiedades de la emulsión.
2. Estructura interfacial. El espesor y la estructura interna de la capa interfacial tienen relación directa con la magnitud y el intervalo de las fuerzas coloidales que actúan entre los glóbulos de la emulsión.
3. Propiedades eléctricas interfaciales. Las características eléctricas de la interfase (densidad de carga en la superficie y potencial de superficie) determinan la magnitud y el intervalo de las interacciones electrostáticas entre los glóbulos de la emulsión.
4. Energía interfacial. La energía libre almacenada en la interfase, la cual está descrita por la tensión interfacial, determina la facilidad con la cual el área interfacial puede cambiar. Esta energía interfacial es importante en la

formación de la emulsión debido a que influye sobre la cantidad de energía mecánica que debe ser impuesta durante la homogenización para deformar y romper los glóbulos.

5. Reología interfacial. Las características reológicas de la interfase tienen influencia sobre la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de emulsiones alimenticias, por ejemplo, sobre la agregación y cremado de los glóbulos (Bos y van Vliet, 2001) y la formación de la emulsión.

Finalmente la capa interfacial de los glóbulos de la emulsión debe ser capaz de interaccionar con los componentes de la fase acuosa, que en muchas emulsiones alimenticias incluye polisacáridos (Dalgleish, 2006).

Existen diferentes métodos y técnicas los cuales pueden dar información acerca de estas propiedades. Sin embargo, los más importantes para emulsiones es el valor real de la tensión interfacial estática y dinámica como una función de la deformación interfacial, que a su vez proporciona información acerca de la composición interfacial, cinética de adsorción y reología interfacial (Dickinson, 1999b).

1.2 Reología de emulsiones

Las propiedades reológicas de emulsiones son importantes desde ambos puntos de vista, ciencia básica y aplicación. A nivel fundamental, la determinación de propiedades reológicas bajo pequeña deformación puede dar información acerca de la estructura de la emulsión, estados de agregación de los glóbulos y de las fuerzas de interacción interpartícula. A nivel industrial o comercial, la medición de propiedades reológicas a grandes deformaciones es útil para la manufactura de productos al controlar propiedades de flujo durante las operaciones industriales, tales como mezclado, bombeo y vertido (Dickinson, 1998, Barnes, 2004), además

de que muchos de sus atributos sensoriales están directamente relacionados con sus propiedades reológicas (Mc Clements, 2005).

Los tipos de comportamiento reológico en emulsiones varían ampliamente, desde el fluido newtoniano simple de una emulsión diluida como leche homogeneizada, hasta la viscoelasticidad altamente compleja que exhiben materiales como mayonesa, crema y betún. Aunque estos últimos ejemplos obviamente se diferencian enormemente en términos de su composición química, existen en realidad sólo pocos factores físicos que controlan la reología de todas las emulsiones. Los factores clave son: diámetro promedio de partícula, distribución de tamaño de partícula, fracción volumen de aceite, naturaleza de la capa interfacial y la naturaleza de las fuerzas entre los glóbulos (Dickinson, 1998).

La reología de emulsiones está desde luego, relacionada con la estabilidad de la emulsión. La estabilidad de una emulsión con respecto a la floculación, en general, se logra haciendo glóbulos pequeños. Sin embargo, aún emulsiones finas pueden flocular hasta cierto grado y esta floculación puede tener un efecto predominante sobre la estructura y reología de la emulsión.

Aunque sea simplemente con el propósito de clasificar el comportamiento reológico, es conveniente distinguir entre sistemas floculados y no floculados. Esto es debido, en principio a que la posición teórica está mucho mejor desarrollada como una función de la fracción volumen de aceite para sistemas dispersos (no floculados) que para sistemas floculados, en segundo lugar, el comportamiento experimental de muchas emulsiones puede ser interpretado más efectivamente a nivel mecanicista de una detallada consideración del tipo y extensión de la floculación (Dickinson, 1998).

El tratamiento teórico de la reología de emulsiones está menos desarrollado que el creado para dispersiones particuladas. Por lo que parece apropiado dar una breve revisión del trabajo clásico sobre reología de partículas dispersas como preludeo

para discutir la reología de dispersiones de glóbulos. Otra justificación para esta aproximación es la observación de que en la práctica, muchos sistemas de emulsiones finas pueden ser confiablemente tratadas en términos reológicos como si éstas fueran una dispersión de partículas esféricas sólidas (Dickinson, 1998).

Para suspensiones diluidas de partículas sin carga, esféricas rígidas lisas, se ha demostrado que la viscosidad depende de la fracción volumen de la fase dispersa, ϕ :

$$\eta = \eta^0(1 + 2.5 \phi) \quad (1.2)$$

Donde η^0 es la viscosidad del medio de dispersión. Al deducir la ecuación (1.2), Einstein supuso que existe condición límite de no deslizamiento en la superficie de las partículas, y que las partículas están suficientemente separadas, en promedio, para asegurar que cada una actúa independientemente en términos de su efecto sobre el flujo dentro del medio de dispersión. Por lo tanto, la ecuación de Einstein es estrictamente aplicable sólo a alta dilución ($\phi < 0.01$) para un sistema de partículas no agregadas interactuando solamente a través de un potencial de interpartícula de esferas rígidas. La ecuación implica que la viscosidad de la dispersión es independiente del tamaño de partícula y la velocidad de cizalla (Dickinson, 1998).

La presencia de una capa adsorbida de polímero en la superficie puede permitir un aumento en la viscosidad de una dispersión diluida por incremento de la fracción volumen efectiva de la fase dispersa. El efecto de la capa adsorbida se vuelve más importante conforme disminuye el tamaño de las partículas dispersas.

Las cargas de los glóbulos también afectan la viscosidad, distinguiéndose tres efectos (también conocidos como efectos electroviscosos): el efecto primario es la distorsión de la doble capa eléctrica por el flujo de cizalla; el efecto secundario surge de la repulsión de la doble capa entre partículas y el efecto terciario aplica a

polielectrolitos y se atribuye a cambios en las dimensiones de los glóbulos con cambios en pH o en la fuerza iónica (Barnes y Gentle, 2005).

En las emulsiones alimenticias, las partículas no son rígidas, y los esfuerzos de cizalla se pueden transmitir de una fase líquida a otra. De esta forma, en un flujo de cizalla, la disipación de energía es menor que para esferas rígidas, de tal forma que la viscosidad de una emulsión diluida es menor que la establecida por la ecuación 1.2 (Barnes y Gentle, 2005). Si la tensión interfacial es alta, los glóbulos permanecen esféricos a bajas velocidades de cizalla. Con menor tensión interfacial, mayores velocidades de cizalla o combinación de ambos, los glóbulos pueden cambiar su forma a elipsoides e inclusive romperse a altas velocidades de cizalla, formando pequeños glóbulos.

El comportamiento de los glóbulos bajo condiciones de cizalla simple en ausencia de emulsificante es bien conocido. Para tales sistemas el comportamiento de un glóbulo depende sólo de la velocidad de cizalla, el radio del glóbulo sin deformar, r , la tensión interfacial en equilibrio, γ_{eq} , y las viscosidades de la fase dispersa y continua, η_d y η_c , respectivamente. Estas variables se pueden arreglar en dos grupos adimensionales, la relación de viscosidad, λ , y el número capilar, Ω (Williams y col., 1997).

$$\lambda = \frac{\eta_d}{\eta_c} \quad (1.3)$$

$$\Omega = \frac{\dot{\gamma} \eta_c}{(\gamma_{eq}/r)} \quad (1.4)$$

El número capilar es la relación entre las fuerzas viscosas que actúan para deformar el glóbulo y la tensión interfacial estabilizante, en la cual, para una interfase curva, las fuerzas de tensión interfacial están balanceadas por la diferencia en presión sobre los dos lados de la interfase, cuando el sistema está en equilibrio (Barnes y Gentle, 2005):

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (1.5)$$

Donde ΔP es la diferencia de presión sobre los dos lados de la interfase, r es el radio del glóbulo y γ la tensión interfacial.

1.3 Reología interfacial

En la mayoría de los casos de interés práctico, las interfases que separan dos fases fluidas están cubiertas por surfactantes solubles o insolubles. Bajo condiciones dinámicas la capa adsorbida sufre deformaciones las cuales conducen a la aparición de esfuerzos superficiales. Éstos causan un aumento en los valores de los esfuerzos ejercidos sobre la superficie por la mayor parte del fluido, modificando de esta forma el comportamiento del sistema. Este hecho afecta la ocurrencia de muchos procesos importantes tales como la formación, movimiento, deformación y ruptura de glóbulos, así como la interacción y coalescencia entre ellos y de esta forma, la formación y vida de almacenamiento de emulsiones (Ivanov y col., 2005, Miller y Fainerman, 2004).

Los esfuerzos pueden ser originados por dos tipos de deformación: cizalla y dilatación. Los coeficientes que caracterizan estos esfuerzos son conocidos como viscosidad superficial o interfacial de cizalla y viscosidad superficial o interfacial dilatacional, respectivamente. La viscosidad interfacial de cizalla es una cantidad bien definida. Probablemente la principal razón para esto es el hecho de que cuando la capa adsorbida se somete a cizalla, la adsorción no cambia a lo largo de la superficie (debido a que el área permanece constante), de tal forma el fluido que rodea la superficie tiene poco efecto sobre los procesos que ocurren en la interfase. En este caso, inclusive para surfactantes solubles la superficie puede ser considerada como una fase autónoma. El origen de la viscosidad interfacial de cizalla, para surfactantes simples puede ser debido a movimientos de las moléculas de una posición de equilibrio a otras y para polímeros y proteínas

adsorbidos, se puede atribuir también a cambios en la conformación y a interacción entre las moléculas.

A diferencia de la viscosidad interfacial de cizalla, la viscosidad dilatacional no posee una definición exacta en la literatura y, en muchos casos, los valores experimentales reportados dependen de los modelos usados para la interpretación de los datos obtenidos. La teoría reológica dilatacional más popular se discute brevemente a continuación.

La reología interfacial estudia las propiedades mecánicas de interfases fluidas, con la superficie en cuestión considerada como un medio continuo de dos dimensiones. Entre dos fluidos inmiscibles las propiedades mecánicas de la interfase son simples: la superficie puede ser considerada infinitamente flexible para curvarse y la distribución del esfuerzo en el plano está representado por una tensión simple, γ_0 (fuerza tangencial por unidad de longitud), el valor de la cual depende sólo de la naturaleza de los fluidos colindantes. (Esta tensión es más comúnmente interpretada como el trabajo reversible requerido para crear una unidad de la nueva área interfacial). En ausencia de contaminantes en la superficie, la tensión interfacial, γ_0 , es constante y es (a) isotrópica, es decir que ejerce la misma fuerza por unidad de longitud en todas las direcciones del plano; (b) uniforme, esto es, que posee la misma magnitud en todas las posiciones y (c) independiente del tiempo (Yeung y Zhang, 2006).

Cuando, moléculas anfifílicas se introducen en el sistema, una capa adsorbida se puede formar en la interfase; las propiedades mecánicas resultantes de la misma pueden ser considerablemente más complejas. Bajo este contexto las moléculas adsorbidas pueden a groso modo clasificarse en dos categorías: las que interaccionan y las que no interaccionan (Yeung y Zhang, 2006).

Surfactantes que no interaccionan y dilatación uniforme de área.

Los surfactantes que no interaccionan son aquellos que no se asocian o enredan uno con otro en la interfase fluida, están libres para moverse por los lados. La adsorción de estas moléculas da sólo un aumento de la presión superficial π , la cual actúa reduciendo la tensión intrínseca, γ_0 , esto es, la tensión interfacial es ahora $\gamma = \gamma_0 - \pi$. El estado de esfuerzo resultante en la interfase permanece isotrópico, caracterizado por un campo escalar γ . Este campo escalar, sin embargo, puede ahora no ser uniforme y dependiente del tiempo. Esto se debe a que la presión de la superficie π —la propiedad que modifica la tensión superficial—varía, con la concentración de la superficie de la molécula adsorbida. Conforme los surfactantes son transportados lateralmente (a lo largo de la interfase) y transversalmente (entre la superficie y el resto del fluido) sometido a varios mecanismos limitantes de la velocidad, la tensión interfacial, γ puede mostrar (a) gradientes de superficie, o (b) dependencia del tiempo; éstos son los llamados efecto Marangoni y tensión interfacial dinámica, respectivamente. El primero es de especial interés conforme los gradientes de tensión en la interfase deben ser balanceados por esfuerzos hidrodinámicos en los fluidos adyacentes. De tal forma que el campo de flujo en la interfase y en el resto del fluido están acoplados y pueden significativamente influenciar uno a otro (Miller y Fainerman, 2005).

Para una capa interfacial adsorbida formada con surfactantes que no interaccionan, un campo uniforme de tensiones resulta en un área dilatacional uniforme, caracterizada sólo por cambios en toda el área superficial. De esta forma, es posible formular relaciones constitutivas entre la tensión uniforme, γ , y el área global, A , para varios materiales interfaciales; estas relaciones son habitualmente expresadas en términos del módulo dilatacional, ε , *definido como*

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (1.6)$$

La relación constitutiva más simple es cuando ε es una constante real positiva. Esto, por ejemplo, puede corresponder a pequeñas deformaciones sobre una capa adsorbida formada por surfactantes insolubles, mientras permanecen sin interaccionar en la superficie. Sin embargo, es más común que la tensión interfacial de una capa adsorbida presentes esfuerzos de relajación seguido de un cambio de área repentino. Este proceso de relajación puede ser debido al transporte de surfactantes entre la interfase y el resto del fluido, o a procesos irreversibles dentro de la película adsorbida. Debido a la inherente dependencia del tiempo en estos fenómenos, el módulo dilatacional ε , será en general complejo y suele escribirse como:

$$\varepsilon = \varepsilon_0 e^{i\delta} \quad (1.7)$$

Donde ε_0 es la magnitud de ε y δ es el ángulo de fase. Tanto ε_0 como δ son reales y generalmente dependen de la frecuencia angular, ω (frecuencia, o excitación sinusoidal, o equivalentemente, la variable independiente sobre la transformada de Fourier de la función de relajación).

Uno de los modelos reológicos más citados, que toma en cuenta los mecanismos de relajación mencionados es el de Lucassen-van-den Tempel (LVDT), para describir la transferencia de surfactante desde la interfase hacia el resto del fluido o viceversa (Yeung y Zhang, 2006; Ivanov y col., 2005; Miller y Fainerman, 2005; Lucassen-Reyders y Benjamins, 2001). El modelo de LVDT supone que la adsorción/desorción del surfactante es instantáneo en la interfase y que la dinámica de relajación de esfuerzos está limitada por la difusión de surfactante entre la superficie y el resto del fluido, con difusividad, D . En éste se definen un módulo y una frecuencia, característicos, ε_c y ω_c , respectivamente:

$$\varepsilon_c \equiv -\frac{d\gamma}{d \ln \Gamma} \quad \text{y} \quad \omega_c \equiv D \left(\frac{dc}{d\Gamma} \right)^2 \quad (1.8)$$

En la ecuación 1.8, γ es la tensión interfacial; Γ y c , son las concentraciones de surfactante en la superficie y en el resto del fluido, respectivamente. De esta forma, la cantidad $dc/d\Gamma$ es la pendiente de la isoterma de adsorción, al equilibrio. El módulo característico, ε_c , es la elasticidad de Gibbs. El módulo dilatacional interfacial del modelo de LVDT está dado por las expresiones:

$$\varepsilon_0 = \frac{\varepsilon_c}{\sqrt{1+2\zeta+2\zeta^2}} \quad \text{y} \quad \tan \delta = \frac{\zeta}{(1+\zeta)} \quad (1.9)$$

Donde ζ es una cantidad intermedio dada por

$$\zeta = \frac{1}{\sqrt{2\omega/\omega_c}} \quad (1.10)$$

2. CASEINATO DE SODIO

Las proteínas son componentes indispensables en la gran mayoría de las emulsiones alimenticias debido a que pueden, en principio, emulsificar una fase de aceite en agua y estabilizar la emulsión. Su diversidad funcional se debe especialmente a su composición química: son polímeros muy complejos constituidos por hasta 20 aminoácidos distintos los cuales se unen vía enlaces amida sustituidos. Existen diferentes tipos de proteína, dentro de los que destacan las proteínas de la leche por ser excelentes emulsificantes con aplicación en una gran variedad de productos lácteos y otros alimentos procesados. A su vez, las proteínas lácteas se clasifican en dos grupos generales: las caseínas y las proteínas del suero (Figura 1.3).

Las caseínas constituyen aproximadamente el 80% de las proteínas totales de la leche y representan una familia bien diferenciada que puede subdividirse en cinco grandes grupos: caseínas alfa s_1 , alfa s_2 , beta, gamma y kappa. (Cuadro 1.2). Se encuentran bajo la forma de complejos macromoleculares que se conocen con el nombre de micelas, es decir, en estructuras supramoleculares altamente

ordenadas de agregados de moléculas individuales de forma aproximadamente esférica, aunque no poseen una superficie lisa (Figura 1.4). A su vez, las micelas, están constituidas de pequeñas unidades llamadas submicelas, las cuales pueden estar unidas por pequeños grupos de fosfato de calcio que forman un puente entre ellas. De esta forma las submicelas se agregan hasta que han formado una micela donde aquéllas con kappa-caseína se encuentran hacia el exterior, cuyas cadenas moleculares de grupos C-terminal de kappa-caseína sobresalen de la superficie de la micela formando una capa “velluda” que previene (por repulsión estérica y electrostática) cualquier agregación futura de submicelas (Walstra, 1999).

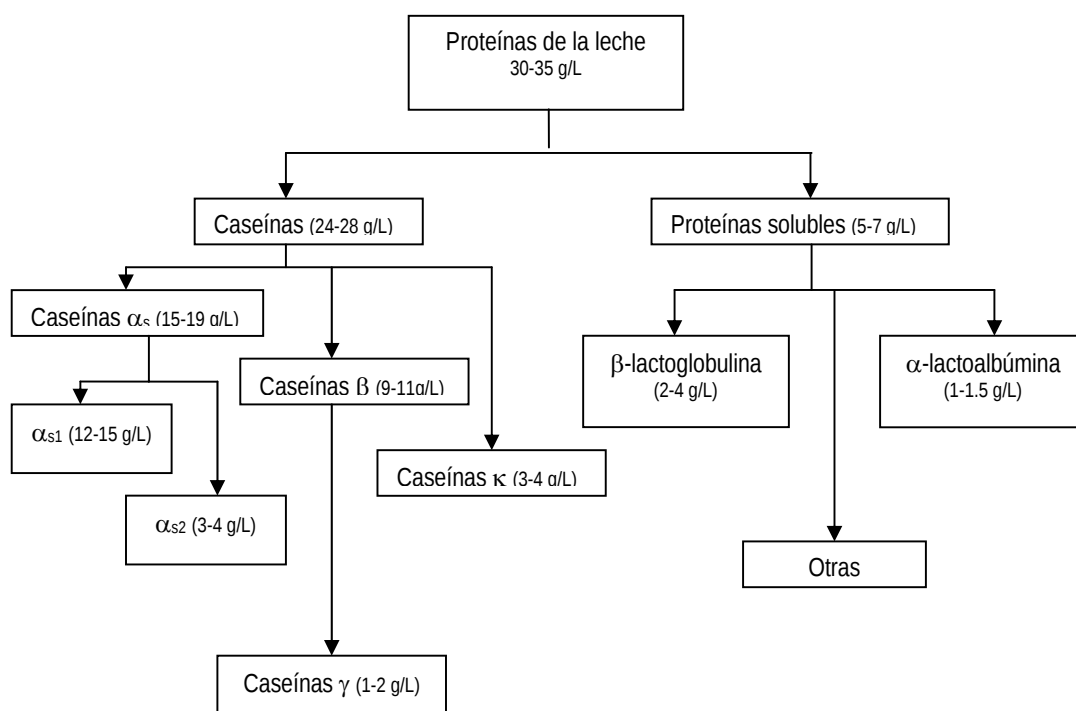


Figura 1.3 Proporciones de las fracciones nitrogenadas de la leche (Cheftel y col., 1989)

Industrialmente las caseínas existen en una variedad de formas, siendo de los subproductos más importantes de los derivados de la leche. Pueden ser ácidas o enzimáticas, pero estas últimas no se utilizan como ingredientes en la formulación de alimentos porque son muy insolubles.

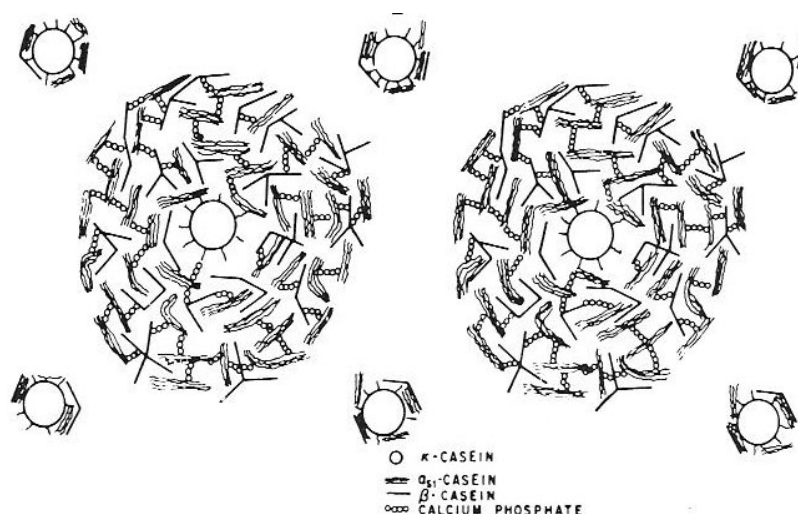


Figura 1.4 Estructura de la micela de caseína

La caseína ácida, también llamada caseína isoeléctrica, se obtiene por acidificación de la leche descremada hasta pH 4.6 con ácidos minerales u orgánicos, siendo los más utilizados los ácidos: clorhídrico, sulfúrico y láctico.

Aunque la caseína ácida como tal tiene poca aplicación, algunas de sus sales son más solubles y muy funcionales, además de tener muchas aplicaciones en los alimentos formulados, tal es el caso de los caseinatos de sodio y potasio que se obtienen por disolución de la caseína ácida en soluciones de hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, respectivamente. Posteriormente los caseinatos formados se desecan por atomización (o en rodillos). También se fabrica caseinato de calcio con hidróxido de calcio, pero es un producto menos soluble y con menores propiedades funcionales (Carić, 1994). Aunque los diferentes tipos de caseína están presentes en los caseinatos redissueltos, su separación en componentes individuales no es fácil debido a su fuerte tendencia a asociarse por sí mismos.

La caseína y los caseinatos se utilizan ampliamente en todos los países del mundo y la forma de uso más extendida es el caseinato de sodio. Cuando se reconstituye en agua, el caseinato de sodio existe como pequeñas partículas de proteína asociadas, submicelas de caseína, aproximadamente esféricas (10-20 nm diámetro) en equilibrio con moléculas de caseína libre (Dickinson, 1999a).

Cuadro 1.2 Características de caseínas (Dalglish, 1997; Cheftel y col., 1989; Goursaud, 1991)

<i>Proteína</i>	<i>% en total de caseína</i>	<i>Peso molecular (daltons)</i>	<i>Contenido Amino ácidos</i>	<i>Residuos fosfoserina</i>	<i>Propiedades</i>
α_{s1} - caseína	40-45	23551	199 No tiene cisteína	8-9	Comportamiento bipolar, sensible al calcio, estructura poco ordenada
α_{s2} - caseína	10	25238	207 2 residuos cisteína	10-13	Es la más hidrófila, por ser la más fosforilizada y rica en residuos catiónicos. Posee gran sensibilidad a los iones calcio.
β - caseína	35-40	24028	209 Sin cisteína	5	Alto contenido de prolina, repartido de forma regular, impide la presencia de estructuras ordenadas. Es la más hidrófoba de las caseínas. Carácter anfipolar muy marcado. Sensible al calcio
κ - caseína	9-15	19038	169 2 residuos cisteína	1-2	Al contener pocos residuos fosforilados, fija pocos iones Ca^{2+} . Carácter anfipolar

Su efectividad como emulsificante se puede atribuir a la fuerte tendencia de las dos caseínas individuales mayoritarias presentes (Cuadro 1.2), α_{s1} -caseína y β -caseína, para ser adsorbidas en la superficie hidrofóbica de aceite y para conferir gran estabilidad en emulsiones aceite-agua. Sin embargo, ambas proteínas son considerablemente sensibles al calcio, debido a la presencia de residuos aniónicos de fosfoserina (Antipova y col., 2002; Dickinson y col., 2003). El enlace del ion Ca^{2+} en los grupos fosfoserilos de las caseínas reduce las repulsiones electrostáticas entre las mismas, promoviéndose además interacciones entre dominios hidrofóbicos, permitiendo así la formación de agregados (Swaigood, 2003). Este cambio en el estado de agregación de las proteínas inevitablemente influye en su adsorción en interfases aceite/agua y la estabilidad de emulsiones resultantes.

Las proteínas estabilizan emulsiones al formar una capa viscoelástica adsorbida, cuyas propiedades mecánicas influyen la estabilidad de la emulsión. Tienen una morfología estructural compleja. Se sabe que la magnitud de la adsorción de proteína depende de la hidrofobicidad de la superficie y la carga. Una vez adsorbida, la proteína se desdobra y rearregla su estructura secundaria y terciaria para exponer sus residuos hidrofóbicos hacia la fase hidrofóbica. La alta concentración de proteína en la superficie permite la agregación y la formación de interacciones. De esta forma, las propiedades mecánicas de la capa adsorbida dependen de la estructura de la proteína adsorbida y de la fuerza de las interacciones entre ellas, las cuales pueden en turno, influir en la estabilidad de las emulsiones (Wilde y col., 2004). Los caseinatos son mejores emulsionantes, porque poseen, además de su fuerte solubilidad, una estructura disociada y desplegada naturalmente ("sin orden estadístico") al mismo tiempo que una hidrofobicidad global relativamente elevada con una separación neta de las zonas muy hidrófilas y muy hidrófobas de la cadena polipeptídica (Cheftel y col., 1989).

En emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio, a pH neutro, la capa de proteína adsorbida proporciona buena estabilidad contra la coalescencia debido a una combinación de efectos electrostáticos y repulsiones estéricas interpartícula. Sin embargo, estas emulsiones pueden flocular rápidamente en presencia de sales de calcio. La presencia de residuos aniónicos forfoserilos sobre las fracciones de caseína mayoritarias genera un enlace específico con el ion calcio, lo cual reduce la efectividad del mecanismo de estabilización electrostática. La disminución de la densidad de carga también induce un colapso de la capa de proteína adsorbida alrededor de los glóbulos de grasa y, de esta forma, una reducción de la estabilización estérica. La distribución no específica de la carga por el calcio que no está enlazado en la doble capa eléctrica también puede contribuir a inducir floculación debido a la posible formación directa de enlaces de calcio entre las moléculas de proteína adsorbida en diferentes glóbulos (Dickinson y Davies, 1999).

Los componentes que en particular no poseen superficie activa pueden también incorporarse a la capa interfacial. De esta forma, cristales de grasa y polisacáridos pueden influir sobre la reología interfacial de la película de proteína adsorbida.

3. GELANA

Existen polisacáridos en los que estudios de sus aplicaciones en mezcla con proteína son escasos. Uno de ellos es la goma gelana que es un polisacárido aniónico gelificante de origen microbiano, producido por la bacteria *Sphingomonas elodea* (anteriormente clasificada *Pseudomonas elodea*), con peso molecular de alrededor de 0.5×10^6 Da (Gibson y Sanderson, 1997). Estructuralmente está compuesta por un tetrasacárido que constituye la unidad repetitiva que forma la estructura primaria (Figura 1.5). La unidad comprende 1,3-β-D-glucosa, 1,4-β-D-ácido glucurónico 1,4-β-D-glucosa y 1,4-α-L-ramnosa (Jansson y col., 1983). Estudios de difracción de rayos X de la gelana desacilada muestran que en el estado sólido el polisacárido tiene un arreglo que involucra dos hélices izquierdas de tres espirales organizadas de manera paralela con doble entrelazamiento, con una repetición axial de 2.82 nm (Attwool y col., 1986). La conformación helicoidal también está presente en disoluciones acuosas diluidas de gelana con bajas concentraciones de sal.

La gelana desacilada forma geles firmes, duros y quebradizos que se obtienen generalmente por enfriamiento de la disolución caliente acompañado por la transición de un estado desordenado a uno ordenado que depende de la fuerza iónica, la concentración de polisacárido y la presencia de ciertos cationes, los cuales afectan las propiedades fisicoquímicas del gel en función del tipo y la concentración (Sanderson, 1990; Ikeda y col., 2004; Goh y col., 2006).

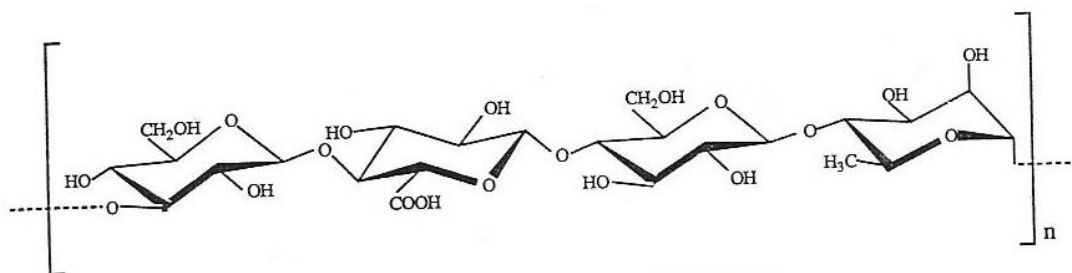


Figura 1.5 Unidad repetitiva de la estructura del polisacárido gelana

Se ha sugerido el mecanismo de gelificación como un proceso en dos pasos en el que la gelificación inicia con la formación de dobles hélices seguida de una asociación de las mismas inducida por iones mono y divalentes (Milas y col., 1990). La agregación de las dobles hélices sigue diferentes mecanismos: en presencia de iones divalentes, a una fuerza iónica dada, se forman geles más firmes y duros que con iones monovalentes. Los últimos promueven la agregación de las hélices de gelana mediante la asociación de los grupos carboxilo de la unidad repetitiva del tetrasacárido y las moléculas de agua, mientras que en presencia de CaCl_2 , por ejemplo, se establece un enlace intermolecular más fuerte entre el ion Ca^{2+} y los átomos de oxígeno del grupo carboxil de los residuos D-glucosil de la molécula de gelana, generando una mayor capacidad de entrecruzamiento de las hélices adyacentes (Tang y col., 1997; Chandrasekaran y Radha, 1995; Tako y col., 1989).

Por lo general, la gelana se ha estudiado ampliamente en sistemas acuosos (Ikeda y col., 2004; Rodríguez Hernández y col., 2003; Jampen y col., 2000) y en menor medida en mezcla con otros polisacáridos como la carragenina y la xantana, por ejemplo en geles sólidos (Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999) o en geles fluidos (Martínez-Padilla y col., 2004), pero en mezcla con proteína son escasos los estudios reportados. Al ser un polímero hidrofílico, no presenta superficie activa, por lo que no estabiliza emulsiones aceite en agua, tal como lo reportan Huang y col. (2001).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Bajo ciertas condiciones ambientales, como pH, concentración de iones calcio, concentración de biopolímero, se pueden inducir interacciones cooperativas entre el caseinato de sodio y la gelana que modifican al caseinato de sodio adsorbido en la interfase aceite agua y la estructura de la gelana en el seno de la fase acuosa, reduciendo la agregación de los glóbulos de la fase dispersa.

Objetivo general

Establecer el efecto de un polisacárido gelificante sobre las propiedades de caseinato de sodio en medio acuoso y su aplicación en emulsiones aceite en agua, a través del estudio del comportamiento reológico, densidad de carga, tamaño de glóbulo y propiedades de superficie.

Objetivos particulares

Determinar los cambios en tensión interfacial, potencial zeta, tamaño de partícula y propiedades reológicas de soluciones acuosas de caseinato de sodio inducidas por la presencia de gelana; la adición de iones calcio y la modificación del pH.

Determinar las propiedades reológicas dinámicas, rotacionales e interfaciales y el tamaño de glóbulo de las emulsiones aceite en agua, elaboradas con mezclas de caseinato de sodio-gelana a dos concentraciones del biopolímero, en presencia y ausencia de iones calcio, y a dos valores de pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Los hidrocoloides empleados fueron caseinato de sodio, (Lactonat EN, lote No. 31023, Lactoprot, Alemania) con $5.63\% \pm 0.09$ de humedad en concentraciones de 1 y 2% y gelana de bajo acilo (Kelcogel F, lote No. 2A0021A, Kelco, San Diego, USA) con $10.2\% \pm 0.25$ de humedad, en concentraciones de 0.03 y 0.05%. Las concentraciones se expresan como porcentaje en peso sobre base seca. Se usó cloruro de calcio (CaCl_2) grado analítico (Merck) a una sola concentración de 5 mM.

Los sistemas acuosos se prepararon en agua desionizada para pH 6.8 y en solución amortiguadora de acetato de sodio para pH 5.4 (80 mM Na^+).

En todos los sistemas se adicionó 0.03% de azida de sodio (NaN_3) como conservador. Cabe aclarar que este conservador no se emplea en alimentos. Sin embargo, se usa ampliamente en el estudio de emulsiones para prevenir contaminación fúngica y bacteriana por largos intervalos de tiempo.

En las emulsiones se usó aceite de girasol comercial, marca Capri (Aceites Industriales, Edo. Méx.).

2. MÉTODOS

2.1 Preparación de muestras

Sistemas acuosos

Las muestras de caseinato de sodio a 1 y 2% (porcentajes en peso), se prepararon adicionando la muestra en polvo en agua desionizada (pH 6.8) o en amortiguador acetato (pH 5.4), con agitación magnética a 25 °C, por 30 min. En los sistemas con iones, éstos se disolvieron previamente en el medio acuoso.

Las disoluciones de gelana a 0.03 y 0.05%, se obtuvieron por calentamiento de la dispersión de gelana a 90 °C durante 10 min, bajo agitación magnética, adicionando iones calcio (5 mM de CaCl_2), previamente disueltos en los casos requeridos, al final de la preparación de las mismas.

Las muestras de caseinato de sodio y gelana se prepararon mezclando partes iguales de las disoluciones de proteína y de gelana conteniendo el doble de la concentración requerida. Para éstas los iones se adicionaron en las muestras de proteína. Las mezclas se realizaron a 25 °C, empleando agitador magnético, durante 30 min. Las muestras se dejaron reposar durante 24 h bajo refrigeración. Los sistemas elaborados se resumen en los Cuadros 2.1 y 2.2.

Emulsiones

Emulsiones con 30% ($\phi = 0.32$), de aceite de girasol se elaboraron adicionando el aceite al sistema acuoso, ya sea de los componentes solos o de las mezclas, a una velocidad aproximada de 2 mL/min, manteniendo una agitación constante aproximada de 700 rpm (agitador de propela marca Heidolph), a 25 °C. Posteriormente se homogenizaron la muestras a una velocidad aproximada de 8000 rpm durante 10 min a 25 °C (homogenizador Silverson L4R, Inglaterra).

Cuadro 2.1 Resumen de los sistemas acuosos elaborados con los hidrocoloides individuales

<i>Muestra</i>	<i>iones</i>	<i>disolvente</i>	<i>nomenclatura</i>
Caseinato de sodio 1%	Sin iones	Amortig. acetato	C1pH5.4
		Agua desmin.	C1pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C1pH5.4-ca
		Agua desmin.	C1pH6.8-ca
Caseinato de sodio 2%	Sin iones	Amortig. acetato	C2pH5.4
		Agua desmin.	C2pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C2pH5.4-ca
		Agua desmin.	C2pH6.8-ca
Gelana 0.03%	Sin iones	Amortig. acetato	G03%pH5.4
		Agua desmin.	G03%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	G03%pH5.4-ca
		Agua desmin.	G03%pH6.8-ca
Gelana 0.05%	Sin iones	Amortig. acetato	G05%pH5.4
		Agua desmin.	G05%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	G05%pH5.4-ca
		Agua desmin.	G05%pH6.8-ca

Cuadro 2.2. Resumen de los sistemas acuosos elaborados con mezclas de caseinato de sodio y gelana

<i>Muestra</i>	<i>iones</i>	<i>disolvente</i>	<i>nomenclatura</i>
Caseinato de sodio 1% + gelana 0.03%	Sin iones	Amortig. acetato	C1G03%pH5.4
		Agua desmin.	C1G03%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C1G03%pH5.4-ca
		Agua desmin.	C1G03%pH6.8-ca
Caseinato de sodio 1% + gelana 0.05%	Sin iones	Amortig. acetato	C1G05%pH5.4
		Agua desmin.	C1G05%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C1G05%pH5.4-ca
		Agua desmin.	C1G05%pH6.8-ca
Caseinato de sodio 2% + gelana 0.03%	Sin iones	Amortig. acetato	C2G03%pH5.4
		Agua desmin.	C2G03%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C2G03%pH5.4-ca
		Agua desmin.	C2G03%pH6.8-ca
Caseinato de sodio 2% + gelana 0.05%	Sin iones	Amortig. acetato	C2G05%pH5.4
		Agua desmin.	C2G05%pH6.8
	5 mM CaCl ₂	Amortig. acetato	C2G05%pH5.4-ca
		Agua desmin.	C2G05%pH6.8-ca

Para mantener constante la temperatura (25 °C) y evitar el calentamiento de la muestra durante la homogenización se adaptó un baño de temperatura constante a 16 °C, midiendo la temperatura cada minuto con sensor de temperatura láser (Paytek Minitemp, Oaklon, Instruments, EUA). Las emulsiones se caracterizaron de inmediato.

2.2 Caracterización fisicoquímica

Distribución de tamaño de partícula y potencial zeta

La medición de tamaño de partícula y potencial zeta en disoluciones acuosas de caseinato de sodio, gelana y mezclas a 25 °C se realizó empleando el Zeta sizer Nano ZEN 3500, (Malvern, Instruments, Ltd, Malvern, Worcester, UK). El tamaño promedio y la distribución de tamaño de glóbulo de grasa en emulsiones se midieron, a 25 °C en el Malvern Mastersizer 2000 (Malvern, Instruments, Ltd, Malvern, Worcester, UK). En los analizadores de tamaño de partícula de Malvern Instruments se emplea la técnica de difracción láser, la cual genera una distribución de volumen a través de los datos analizados de energía de luz. Esta distribución de volumen puede ser convertida a cualquier diámetro en número o longitud, como el d_{32} que representa el diámetro de una esfera de área superficial equivalente (Diámetro Medio Sauter) al de la partícula en cuestión.

Tensión interfacial

En el presente estudio se empleó el tensiómetro de gota colgante PAT-1 (Sinterface Technologies, Berlin, Alemania) para medir la tensión interfacial. En éste, una gota colgante de aceite se forma en la punta de un capilar. La silueta de la gota es capturada con una cámara CCD y digitalizada. Las imágenes digitales de la gota son grabadas con el tiempo y ajustadas a la ecuación de Young-Laplace para adecuadamente determinar la tensión interfacial (± 0.1 mN/m). Las determinaciones se realizaron a 25 °C.

2.3 Pruebas reológicas

Reología de superficie

Se realizaron pruebas de flujo estacionario a 25 °C en un reómetro de control de esfuerzos (Physica, LS100) con geometría de doble espacio anular, DG 41 (48 y 50 mm de diámetro interno y externo respectivamente, 36 mm de longitud y una relación de radios de 1.041, $r_4/r_3 = r_2/r_1$). Se realizaron dos ciclos de ascenso-descenso en rampa, con intervalo de tiempo de 360 s en cada ciclo. Para determinar propiedades viscoelásticas, se empleó cizalla oscilatoria de pequeña amplitud, utilizando la misma geometría, DG 41, en un intervalo de frecuencias de 0.01 a 10 Hz, identificando previamente la zona viscoelástica lineal, para lo cual se realizaron barridos de amplitud de torque. Los valores de amplitud de torque empleados fueron de 0.025 mNm para gelana sola y 0.005 mNm para las mezclas.

Reología interfacial

Para esta determinación, también se usó el tensiómetro de gota colgante PAT -1 (Sinterface Technologies, Berlin, Alemania), el cual cuenta con un sistema de dosificación controlado por computadora. El sistema de dosificación se empleó para generar oscilaciones a diferentes frecuencias. Los dos parámetros reológicos, elasticidad y viscosidad, de la capa interfacial se obtuvieron mediante un análisis de Fourier de las señales medidas, empleando el programa incluido en el equipo para el tratamiento de los datos. El volumen de la gota fue de 10 µL. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SISTEMAS ACUOSOS

En esta sección se presentan los resultados de los sistemas acuosos elaborados, que constituyen la fase continua de las emulsiones en estudio. La finalidad de estudiar por separado las características de la fase continua es la de poder correlacionar sus propiedades fisicoquímicas y reológicas con las características específicas de las emulsiones obtenidas.

3.1.1 Distribución de tamaño de partícula y potencial zeta

Las Figuras 3.1 a y b, muestran la distribución de tamaño de partícula de los sistemas acuosos de caseinato de sodio a 1 y 2%, respectivamente, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 para ambos valores de pH empleados (5.4 y 6.8). Bajo condiciones neutras (pH 6.8) y sin la adición de iones calcio, la distribución de tamaño de partícula del caseinato de sodio es polidispersa y similar a la reportada para micelas de caseína (De Kruif y Holt, 2003), las cuales se caracterizan por ser menos polidispersas que muchos otros sistemas coloidales, tales como emulsiones, pero mucho más que otros agregados de proteína. Esta polidispersidad es, al parecer, reflejo de un sistema en donde la asociación entre partículas se realiza sin un estricto empaquetamiento o limitaciones simétricas que permitan estructuras esencialmente monodispersas. Cuando se reconstituye en agua, el caseinato de sodio existe como pequeñas partículas de proteína asociadas llamadas submicelas de caseína, de forma aproximadamente esférica en equilibrio con moléculas de caseína libre (Dickinson 1999a), lo que explica la aparición de curvas inclusive trimodales en la distribución del tamaño de partícula.

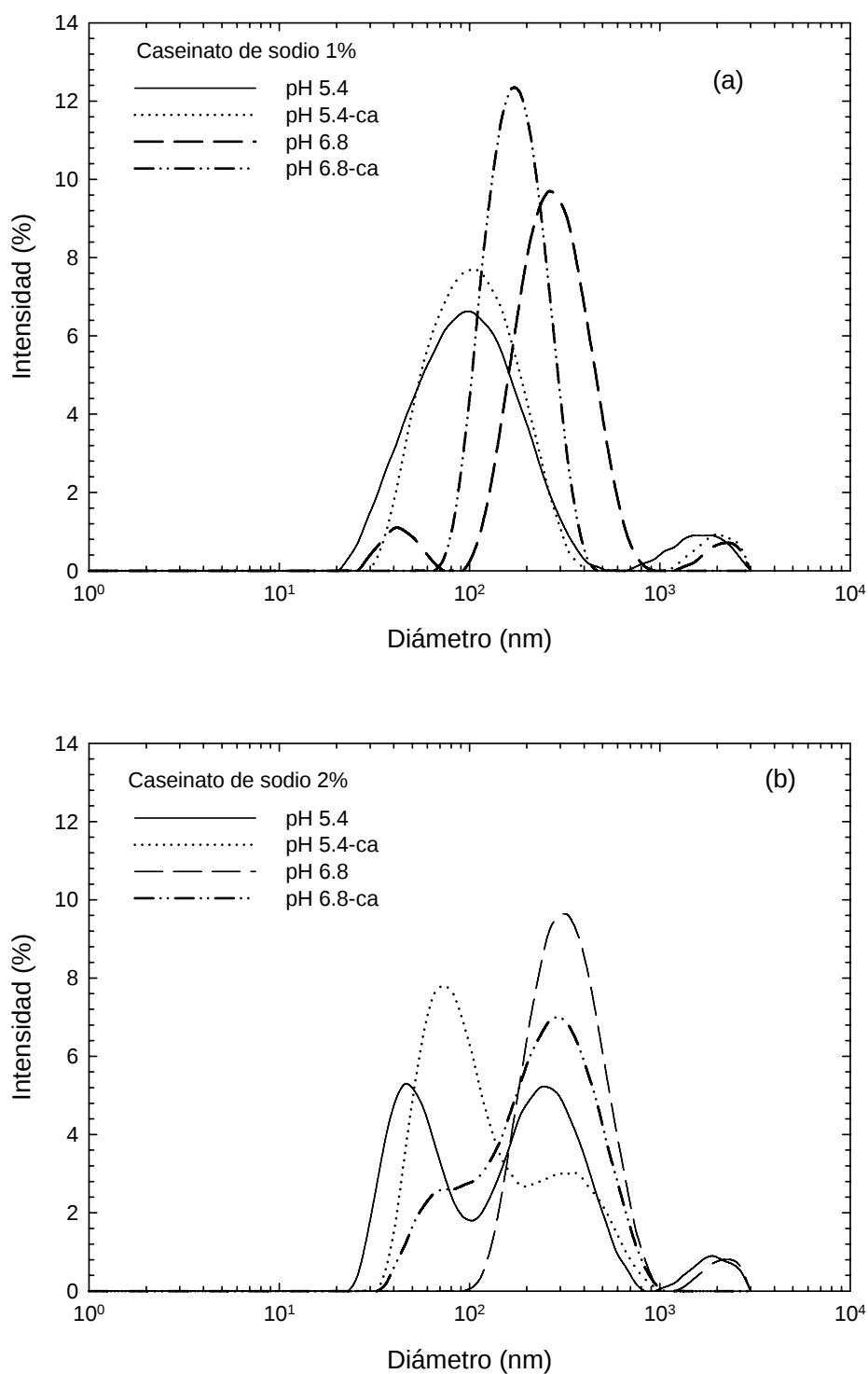


Figura 3.1 Distribución de tamaño de partícula de caseinato de sodio 1% (a) y 2% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.

Al comparar los valores a pH 5.4 y 6.8, se observa una marcada diferencia en la distribución de tamaños de partícula entre ambos valores de pH. Se ha sugerido la asociación de las submicelas de caseína en disoluciones acuosas como efecto de la modificación de pH, acentuándose a partir de pH de 5.1, sin embargo, a pH 5.4 existe disminución del tamaño de partícula. De acuerdo con Ye y Singh (2001), a pH de 5.4, más que un efecto del pH, el cambio de tamaño de partícula es una consecuencia de la acción de los iones sodio presentes en el amortiguador acetato (pH 5.4), por lo que la disminución en el tamaño de partícula se atribuye a que las partículas agregadas son disociadas debido a la presencia del ion Na^+ , quien compite directamente con el calcio por sitios específicos, disociando los agregados de caseína. Se ha establecido también que la magnitud de las asociaciones de las caseínas y el tamaño de los agregados depende fuertemente de la concentración de proteína, entre otros factores (Belyakova y col., 2003). Esto se pone de manifiesto al comparar la distribución de tamaño de partícula para 1 y 2 % de proteína, en donde para esta última concentración la forma de las curvas es bimodal, lo que se puede atribuir a que el efecto de los iones sodio y calcio depende de la relación estequiométrica del caseinato con los iones.

Se ha reportado (Carr y col., 2002; Dickinson y col., 2001) que la adición de iones calcio en las disoluciones de caseinato de sodio promueve la asociación de submicelas, es decir, un incremento en el valor del peso molecular promedio, lo que se atribuye al enlace de calcio con los residuos de fosfoserina de las caseínas mayoritarias, alfa s-1 y beta. Sin embargo, en estos estudios se ha señalado también que entre 2-6 mM de Ca^{2+} existe un mínimo grado de asociación de caseína (como si la asociación de calcio ocurriera principalmente en el interior de la misma molécula de proteína más que entre las diferentes moléculas de proteína), lo que podría explicar el cambio en la curva de distribución de tamaños a pH 6.8, en donde con la adición de CaCl_2 se observa una clara disminución del tamaño de partícula tanto a 1 como a 2% de caseinato.

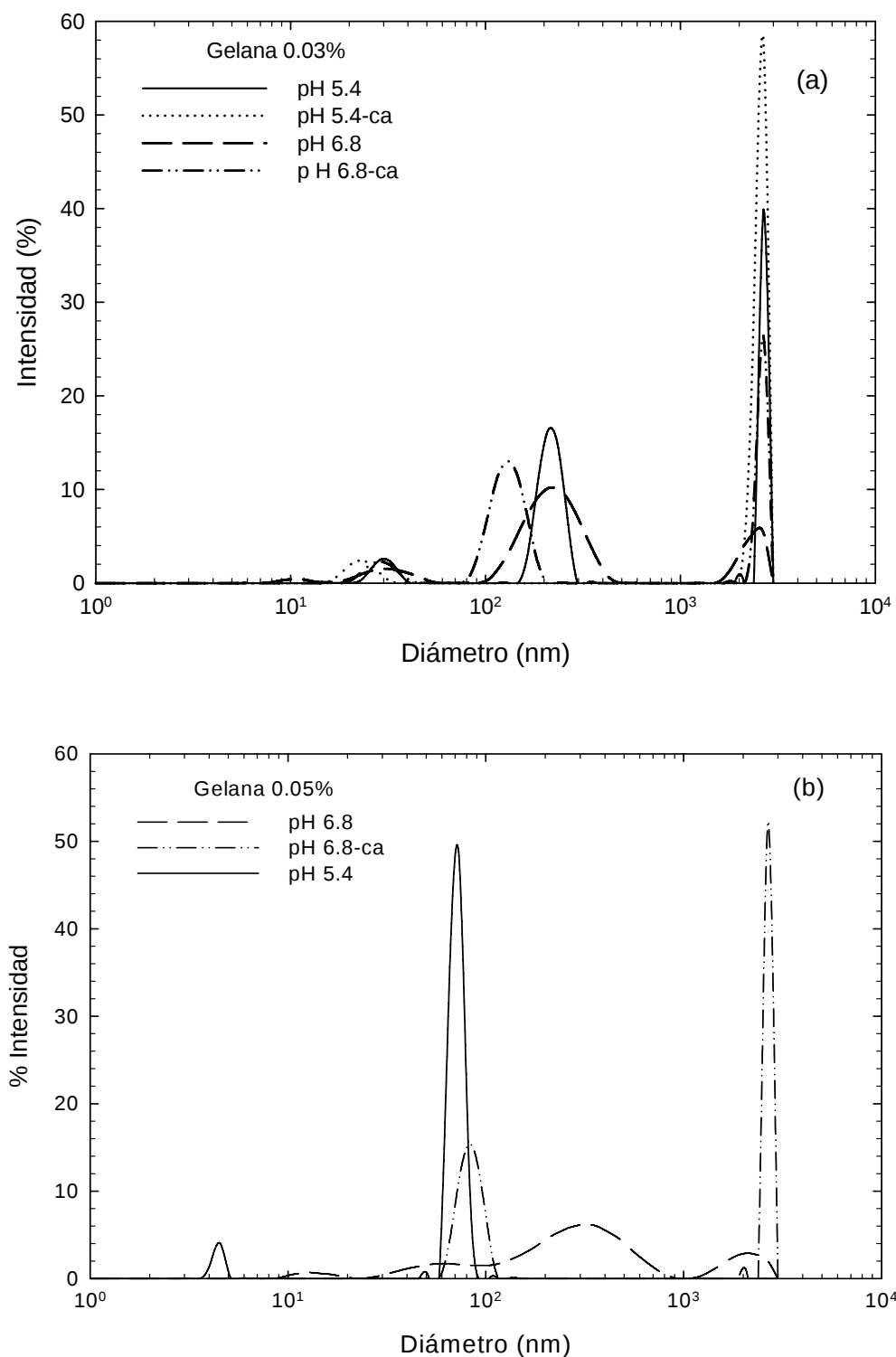


Figura 3.2 Distribución de tamaño de partícula de gelatina 0.03% (a) y 0.05% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.

La distribución de tamaño de partícula de disoluciones de gelana (Figuras 3.2 a y b) se puede atribuir a las asociaciones moleculares promovidas por los cationes presentes en el amortiguador acetato como es el caso del Na^+ (80 mM) (Milas y col., 1990), tomando en cuenta que el tamaño de las moléculas individuales es de 20-30 nm (Goh y col., 2006) y el de estas disoluciones oscila entre valores de 100 y 200 nm o hasta 1000 nm. De acuerdo con algunos autores (Chandrasekaran y Radha, 1995; Tang y col., 1997), estas interacciones moleculares involucran la asociación de los grupos carboxilo de la unidad repetitiva del tetrasacárido y las moléculas de agua, promovida por el catión Na^+ . Cuando se adiciona CaCl_2 , se observa una reducción general en la proporción de partículas en el intervalo del tamaño original, generándose aumento en la proporción de partículas grandes, es decir, > 1000 nm, mostrando, en algunos casos, casi una distribución monomodal.

Se ha sugerido que las moléculas de gelana se asocian más con cationes divalentes que con los monovalentes, y particularmente con Ca^{2+} (Tako y col., 1989; Tang y col., 1997), lo que justifica el cambio en la forma de la curva de distribución de tamaños.

Las mezclas de caseinato y gelana (Figuras 3.3 a y b; 3.4 a y b), a excepción de las muestras con caseinato de sodio a 1% en pH de 6.8, presentan distribución trimodal, particularmente a pH de 5.4, indicando la formación de partículas de tamaño intermedio. Cuando se adiciona CaCl_2 a las mezclas de caseinato de sodio-gelana, la distribución de tamaños es muy similar a la de caseinato solo, sugiriendo que las moléculas de caseína son mucho más efectivas que la gelana al competir por el calcio, interfiriendo así la asociación de las moléculas de gelana. Esto se aprecia más claramente a pH 6.8 (Figura 3.3b).

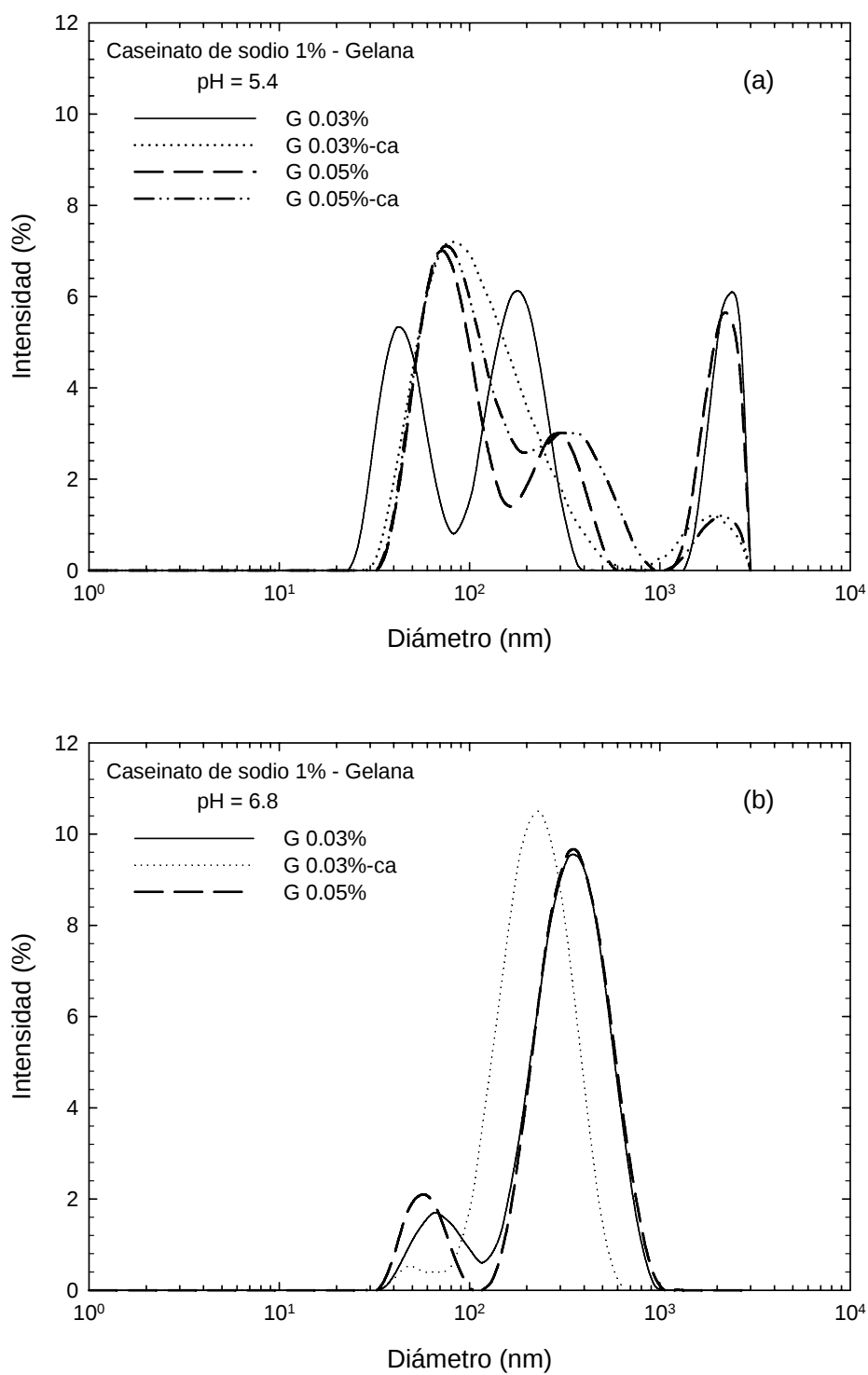


Figura 3.3 Distribución de tamaño de partícula de mezclas de caseinato de sodio 1% con gelana, pH 5.4 (a) y 6.8 (b), con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.

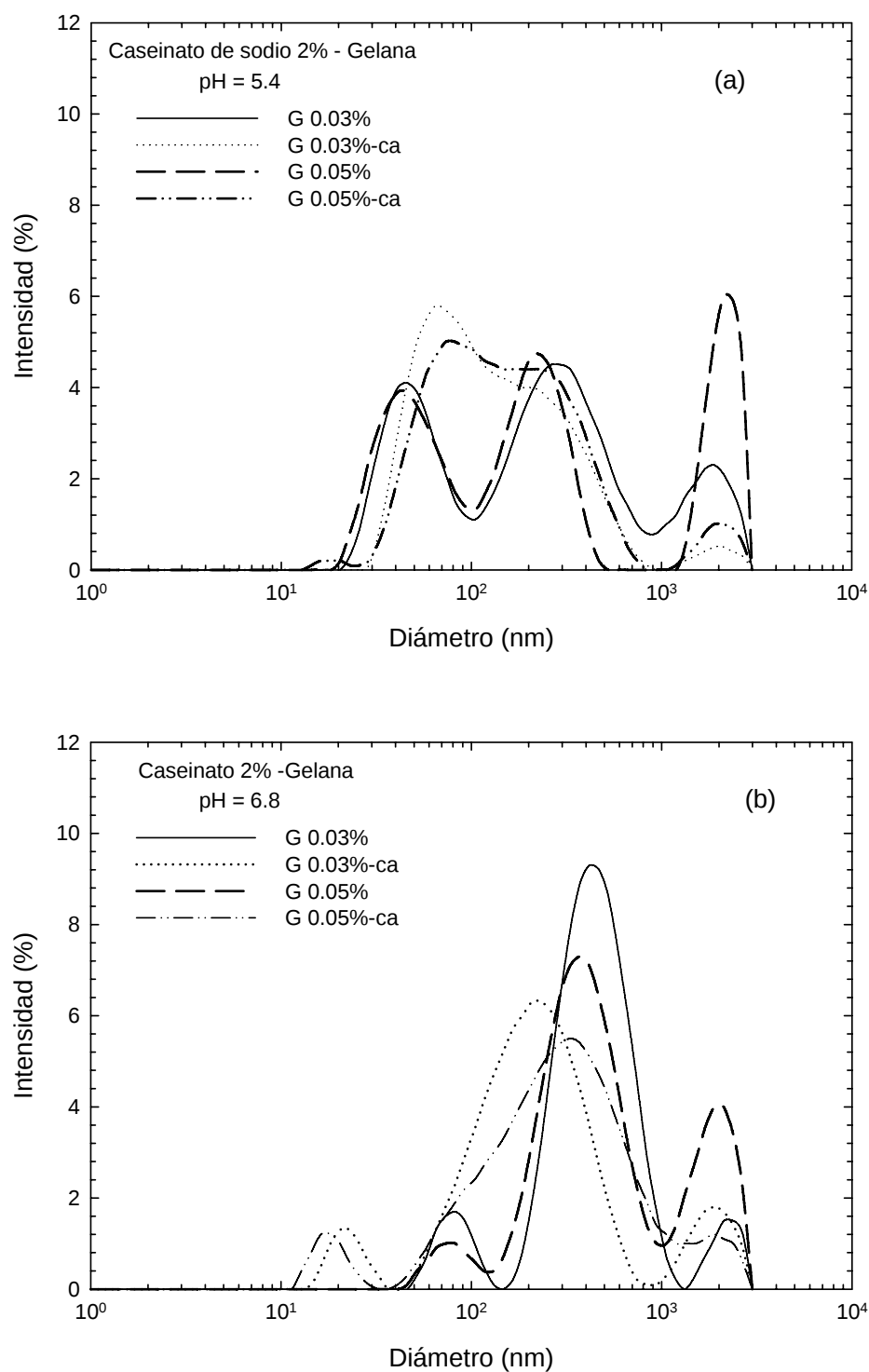


Figura 3.4 Distribución de tamaño de partícula de mezclas de caseinato de sodio 2% con gelana, pH 5.4 (a) y 6.8 (b), con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.

El potencial zeta describe la magnitud de la carga presente sobre una partícula coloidal. Se calcula a partir de la movilidad electroforética de un coloide y es definido como la carga sobre la partícula en el plano de corte. Este plano es una posición teórica por fuera del coloide, pasando la capa de Stern y la capa difusa (también conocida como doble capa), donde la partícula interacciona libremente con el medio que la rodea (Morrison y Roos, 2002). La medición de potencial zeta puede perseguir diferentes propósitos, entre otros, en sistemas que son estabilizados por una combinación de repulsiones electrostáticas y estéricas en donde la contribución del componente electrostático se determina por medición del potencial zeta.

Los valores de potencial zeta a pH 6.8 ($\approx$ neutro) es numéricamente cercano a lo reportado para micelas de caseína de -22 mV (Philippe y col., 2005). En condiciones ácidas (pH 5.4) la carga neta de caseína cambia, disminuyendo su valor numérico, lo cual se atribuye a la neutralización de la carga debido a su cercanía con el punto isoelectrico de la proteína. Cuando se adicionan iones calcio, se observa el mismo efecto.

A pH de 5.4, tanto el caseinato de sodio como la gelana, están cargados negativamente, como indican los valores de potencial zeta, ζ , reportados en los Cuadros 3.1 y 3.2, por lo que la coacervación, en principio, no es posible, es decir, que se agreguen para formar una fase rica en coloide. Sin embargo, las moléculas de caseína exhiben regiones cargadas positivamente sobre la superficie (residuos 97-112 de κ -caseína; Spagnuolo y col., 2005). Esto es importante porque una asociación entre cadenas de gelana y micelas de caseína puede ser posible debido a una interacción electrostática, tal como se ha reportado para diferentes sistemas de mezclas de proteína con polisacárido (Ye y col., 2006; Dickinson, 2003; De Kruif y Tuinier, 2001).

En este sentido cabe mencionar dos aspectos: 1) el pH de las muestras a 5.4 es apenas superior al del punto isoelectrico, pI , de las caseínas, y 2) la fuerza iónica

de las disoluciones es relativamente alta. Bajo estas condiciones, la interacción repulsiva entre porciones de caseína cargadas negativamente y las cadenas de gelana disminuye, siendo así posible la formación de complejos proteína-polisacárido (Dickinson, 2003).

Cuadro 3.1. ζ (mV) de sistemas acuosos de caseinato de sodio y gelana solos

	<i>pH</i> = 5.4	<i>pH</i> = 6.8
Caseinato 1%	-12.63	-22.09
Caseinato 1%-ca	-11.02	-15.12
Caseinato 2%	-9.80	-21.29
Caseinato 2%-ca	-9.20	-16.20
Gelana 0.03%	-24.49	-24.19
Gelana 0.05%	-22.30	-14.76

Cuadro 3.2. ζ (mV) de sistemas acuosos de caseinato de sodio y gelana en mezcla

	<i>pH</i> 5.4	<i>pH</i> 6.8
Caseinato 1%- gelana 0.03%	-23.98	-24.2
Caseinato 1% -gelana 0.03%-ca	-18.35	----
Caseinato 1%- gelana 0.05%	-26.18	-23.25
Caseinato 1% -gelana 0.05%-ca	-16.77	----
Caseinato 2%- gelana 0.03%	-22.6	-20.87
Caseinato 2% -gelana 0.03%-ca	-21.5	-18.68
Caseinato 2%- gelana 0.05%	-23.43	-20.9
Caseinato 2% -gelana 0.05%-ca	-21.68	-13.48

3.1.2 Comportamiento reológico

Las muestras de caseinato de sodio a 1 y 2%, en pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de iones mostraron baja viscosidad y comportamiento newtoniano (Cuadro 3.3). Cuando se reconstituye en agua, el caseinato de sodio se presenta como pequeñas partículas de proteína asociadas llamadas submicelas de caseína, de forma aproximadamente esféricas (10-20 nm diámetro) en equilibrio con moléculas de caseína libre (Dickinson, 1999a). Se ha sugerido (Belyakova y col., 2003) la asociación de estas submicelas de caseinato de sodio en sistemas acuosos como efecto de la modificación del pH, acentuándose principalmente a 5.1. Sin embargo, se ha establecido también que la magnitud de las asociaciones de las caseínas y el tamaño de los agregados depende de la concentración de proteína, entre otros factores.

Cuadro 3.3 Viscosidad de disoluciones de caseinato de sodio 1 y 2 % a 25 °C.

<i>Muestra</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad (Pa.s)</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	<i>r</i> ²
Caseinato 1% pH 5.4	Newton	1.14 x 10 ⁻³	3-70	0.999
Caseinato 1% pH 6.8	Newton	1.35 x 10 ⁻³	8-120	0.999
Caseinato 1% pH 5.4-ca	Newton	1.21 x 10 ⁻³	11-100	0.999
Caseinato 1% pH 6.8-ca	Newton	1.20 x 10 ⁻³	7-100	0.998
Caseinato 2% pH 5.4	Newton	1.57 x 10 ⁻³	6-250	0.999
Caseinato 2%pH 6.8	Newton	1.62 x 10 ⁻³	6-250	0.999
Caseinato 2% pH 5.4-ca	Newton	1.65 x 10 ⁻³	6-250	0.999
Caseinato 2% pH 6.8-ca	Newton	1.62 x 10 ⁻³	6-250	0.998

La Figura 3.5 muestra la viscosidad de los sistemas con gelana a 25 °C en concentraciones de 0.03% (a) y 0.05% (b). En éstas se incluye el comportamiento de las disoluciones en agua desionizada (pH 6.8) y en amortiguador acetato (pH 5.4), con y sin la adición de cloruro de calcio (5 mM CaCl₂). Los sistemas en

ausencia de iones, pH 6.8, muestran comportamiento newtoniano con aumento de la viscosidad a mayor concentración de polisacárido (Cuadro 3.4).

Estas características corresponden a sistemas diluidos en los cuales la gelana se encuentra en un estado desordenado en forma de madejas aleatorias que pueden cambiar su conformación fácilmente como resultado de efectos electrostáticos (Milas y col., 1990).

Cuadro 3.4 η (Pa.s), σ_0 (Pa), K (Pa.sⁿ), n(-) de disoluciones de gelana a 0.03 y 0.05 %, 25 °C

<i>Muestra</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad y parámetros</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	r^2
G03%pH5.4	Ley de la Potencia	K = 0.002, n = 0.95	2-300	0.998
G03% pH6.8	Newton	$\eta = 1.97 \times 10^{-3}$	20-300	0.999
G03% pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.07$, K = 0.024, n = 0.69	0.7-600	0.999
G03%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.13$, K = 0.026, n = 0.70	0.2-500	0.997
G05%pH5.4	Ley de la Potencia	K = 0.02, n = 0.60	6-300	0.999
G05%pH6.8	Newton	$\eta = 2.21 \times 10^{-3}$	2-350	0.994
G05%pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.55$, K = 0.073, n = 0.65	2-500	0.996
G05%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.7$, K = 0.061, n = 0.69	2-500	0.984

Los sistemas preparados con amortiguador acetato (pH 5.4) presentaron, en comparación con los sistemas antes mencionados, aumento de viscosidad, además de un cambio sobre su comportamiento reológico, mostrando fluidificación por cizalla. Esto se atribuye a la asociación de las moléculas de gelana observada en las Figuras 3.2 a y b, promovido por la presencia de sodio (80 mM) en el disolvente. Dicho catión induce cambios en la conformación del polímero que dan como resultado la transición de un estado desordenado de madejas aleatorias a otro ordenado formado por dobles hélices (Jampen, y col., 2000; Milas y col., 1990).

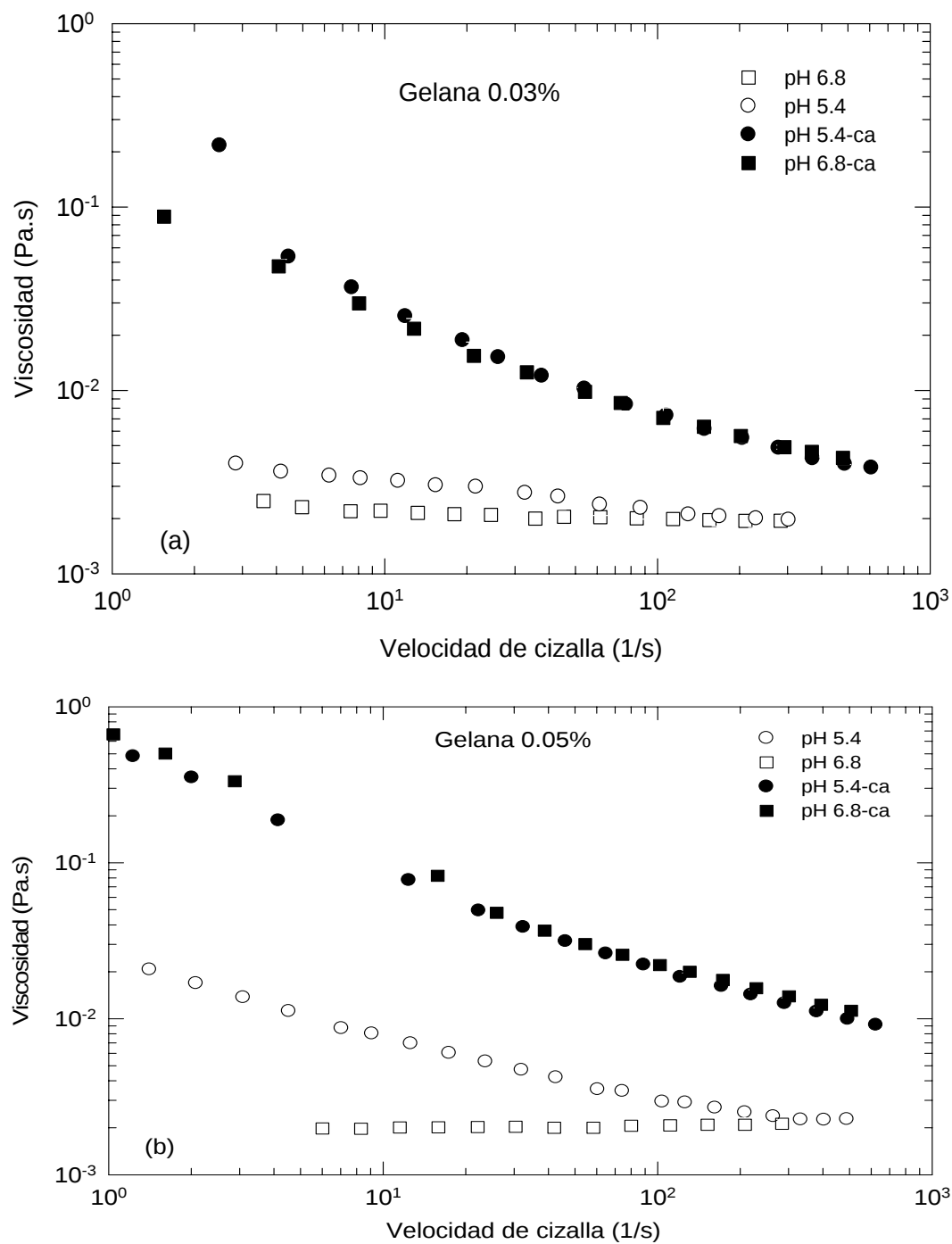


Figura 3.5 Viscosidad de disoluciones de gelana 0.03% (a) y 0.05% (b) a pH 5.4 y 6.8, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C.

La adición de CaCl_2 a las disoluciones de gelana indujo un importante aumento en la viscosidad, así como la aparición de un marcado comportamiento no newtoniano. El comportamiento al flujo de los sistemas muestra adelgazamiento a la cizalla, acompañado por la aparente manifestación de un esfuerzo de fluencia a bajas velocidades de cizalla ($<2 \text{ s}^{-1}$) (Cuadro 3.4).

Un comportamiento similar, así como la aparición de esfuerzo de fluencia se ha reportado en estudios previos para las mismas concentraciones de gelana conteniendo iones (Martínez-Padilla y col., 2004). La aparición del comportamiento no newtoniano así como el incremento en la viscosidad se atribuyó a la formación de una red tridimensional de gelana generada por la asociación de dobles hélices promovida por los iones calcio al formar un enlace iónico entre los grupos carboxilo de las cadenas vecinas (Tang y col., 1997; Chandrasekaran y Radha, 1995), tal como se puede apreciar en la Figura 3.6 donde se muestra el espectro mecánico de gelana.

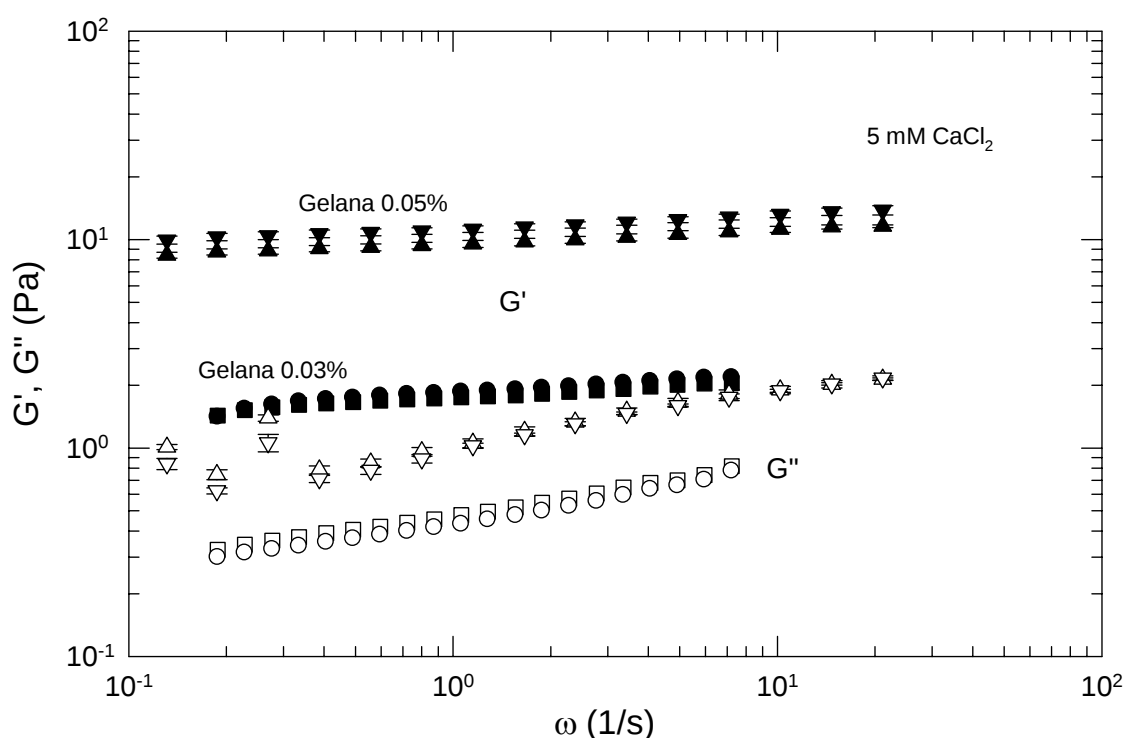


Figura 3.6 Espectro mecánico de gelana 0.03 y 0.05% con 5 mM de CaCl_2 a pH 5.4 (círculos y triángulos) y pH 6.8 (cuadros y triángulos invertidos), 25 °C.

A pesar de que los sistemas presentan una apariencia física fluida, los módulos de G' muestran poca dependencia con la frecuencia y los valores de G' son mayores que los valores de G'' en todo el intervalo de frecuencia observado, lo cual indica que el comportamiento predominante es el sólido, característico de un gel “débil” (Ross-Murphy, 1995).

Al estudiar las mezclas de caseinato de sodio y gelana (Figuras 3.7 a,b y 3.8 a,b) se observa el predominio de las propiedades reológicas de gelana sobre las del caseinato de sodio, a pesar de que, con base en la distribución de tamaño de partículas, el caseinato compite más eficazmente por los iones calcio. En las mezclas sin adición de CaCl_2 , la viscosidad es mayor en comparación con la viscosidad de los componentes individuales (Cuadros 3.5 y 3.6), lo que se atribuye a un aumento de concentración de macromoléculas que además generan asociaciones de mayor tamaño (Figuras 3.3 y 3.4). En consecuencia, el comportamiento de los sistemas se describe más adecuadamente por el modelo de Carreau, el cual describe la variación de la viscosidad con la velocidad de cizalla.

Cuadro 3.5 η y η_0 (Pa.s), t_c (s), σ_0 (Pa), K (Pa.sⁿ), n (-) de mezclas de caseinato de sodio 1%, C, con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C.

<i>Muestra</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad y parámetros</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	r^2
C1G03%pH5.4	Carreau	$\eta_0=3.4 \times 10^{-3}$, $t_c=0.0065$, $n=0.91$	2-300	0.999
C1G03%pH6.8	Newton	$\eta = 2.17 \times 10^{-3}$	2-250	0.997
C1G03%pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.05$, $K = 0.088$, $n = 0.79$	1.5-500	0.997
C1G03%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.05$, $K = 0.078$, $n = 0.88$	0.3-400	0.998
C1G05%pH5.4	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.07$, $K = 0.045$, $n = 0.61$	0.08-500	0.994
C1G05%pH6.8	Newton	$\eta = 1.71 \times 10^{-3}$	7-300	0.998
C1G05%pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.07$, $K = 0.038$, $n = 0.60$	0.06-500	0.992
C1G05%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.05$, $K = 0.033$, $n = 0.62$	0.2-500	0.994

Cuando se adicionan iones calcio, el comportamiento al flujo de las disoluciones de mezclas de gelana y caseinato de sodio muestran un marcado adelgazamiento a la cizalla e inclusive el esfuerzo de fluencia observado en la muestras de gelana. Sin embargo, para todos los casos, el valor de esfuerzo inicial es menor en mezcla en comparación con gelana sola, así como el índice de consistencia, particularmente para la concentración de gelana a 0.05%.

Esto se puede atribuir tanto a una competencia por los iones calcio, así como a una interferencia en la formación de la red tridimensional de gelana, por parte de las submicelas de caseinato, observados en la distribución de tamaños de partícula. A pesar de la comparativamente alta concentración de caseinato de sodio presente, la reología de la fase acuosa se encuentra dominada por el comportamiento de gelana.

Cuadro 3.6 η y η_0 (Pa.s), t_c (s), σ_0 (Pa), K (Pa.sⁿ), n (-) de mezclas de caseinato de sodio, C, 2% con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C.

<i>Muestra</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad y parámetros</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	r^2
C2G03%pH5.4	Newton	$\eta = 2.54 \times 10^{-3}$	3-400	0.997
C2G03%pH6.8	Newton	$\eta = 2.51 \times 10^{-3}$	3-400	0.999
C2G03%pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.05$, $K = 0.081$, $n = 0.86$	1.5-500	0.995
C2G03%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.04$, $K = 0.011$, $n = 0.78$	0.03-450	0.990
C2G05%pH5.4	Carreau	$\eta_0 = 4.6 \times 10^{-3}$, $t_c = 0.0068$, $n = 0.83$	2-400	0.995
C2G05%pH6.8	Carreau	$\eta_0 = 4.79 \times 10^{-3}$, $t_c = 0.009$, $n = .87$	2-400	0.998
C2G05%pH5.4-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.11$, $K = 0.025$, $n = 0.73$	0.5-400	0.992
C2G05%pH6.8-ca	Herschel-Bulkley	$\sigma_0 = 0.1$, $K = 0.045$, $n = 0.64$	0.5-400	0.995

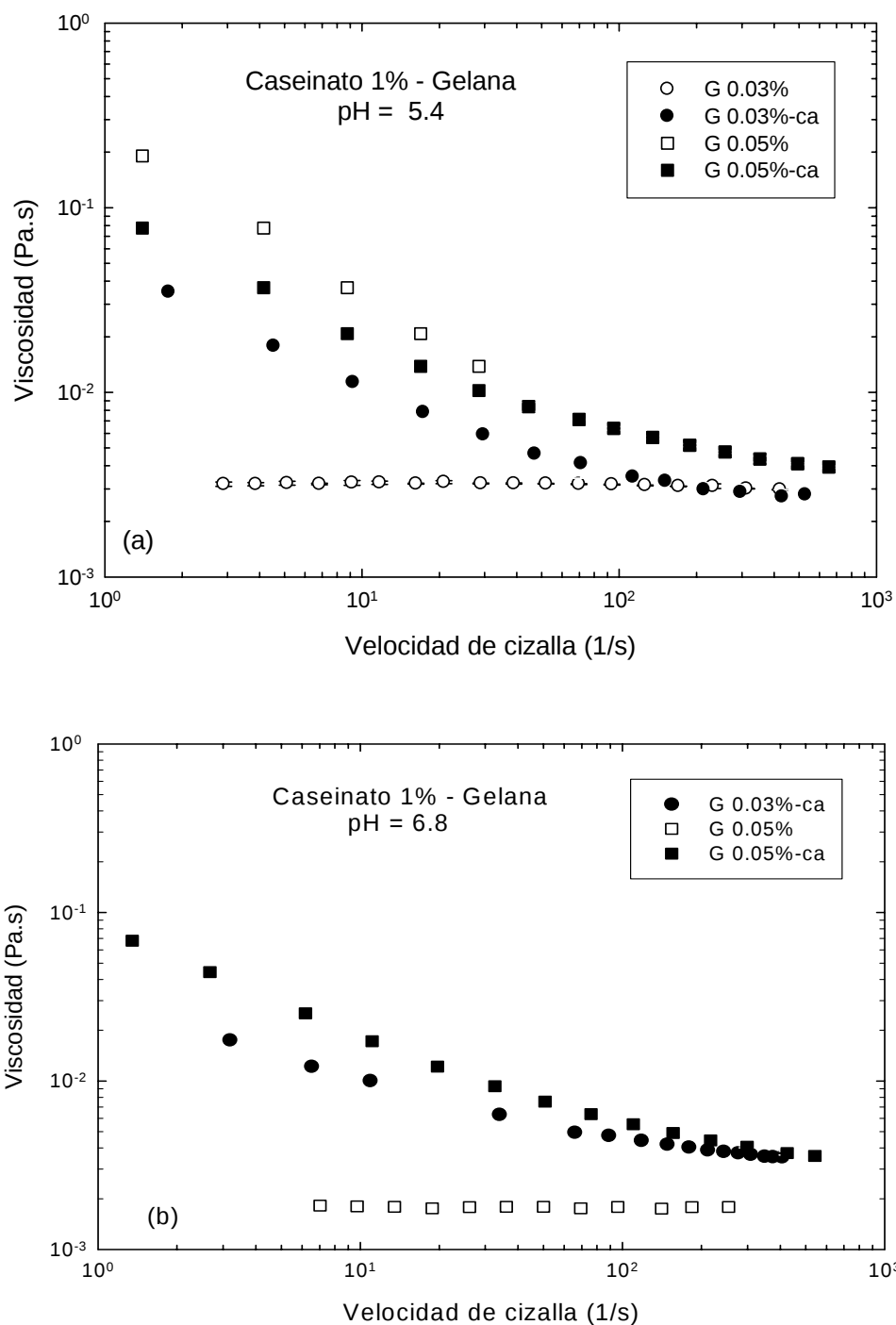


Figura 3.7 Viscosidad de mezclas de caseinato de sodio 1% con gelana, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , pH 5.4 (a), pH 6.8 (b), 25 °C.

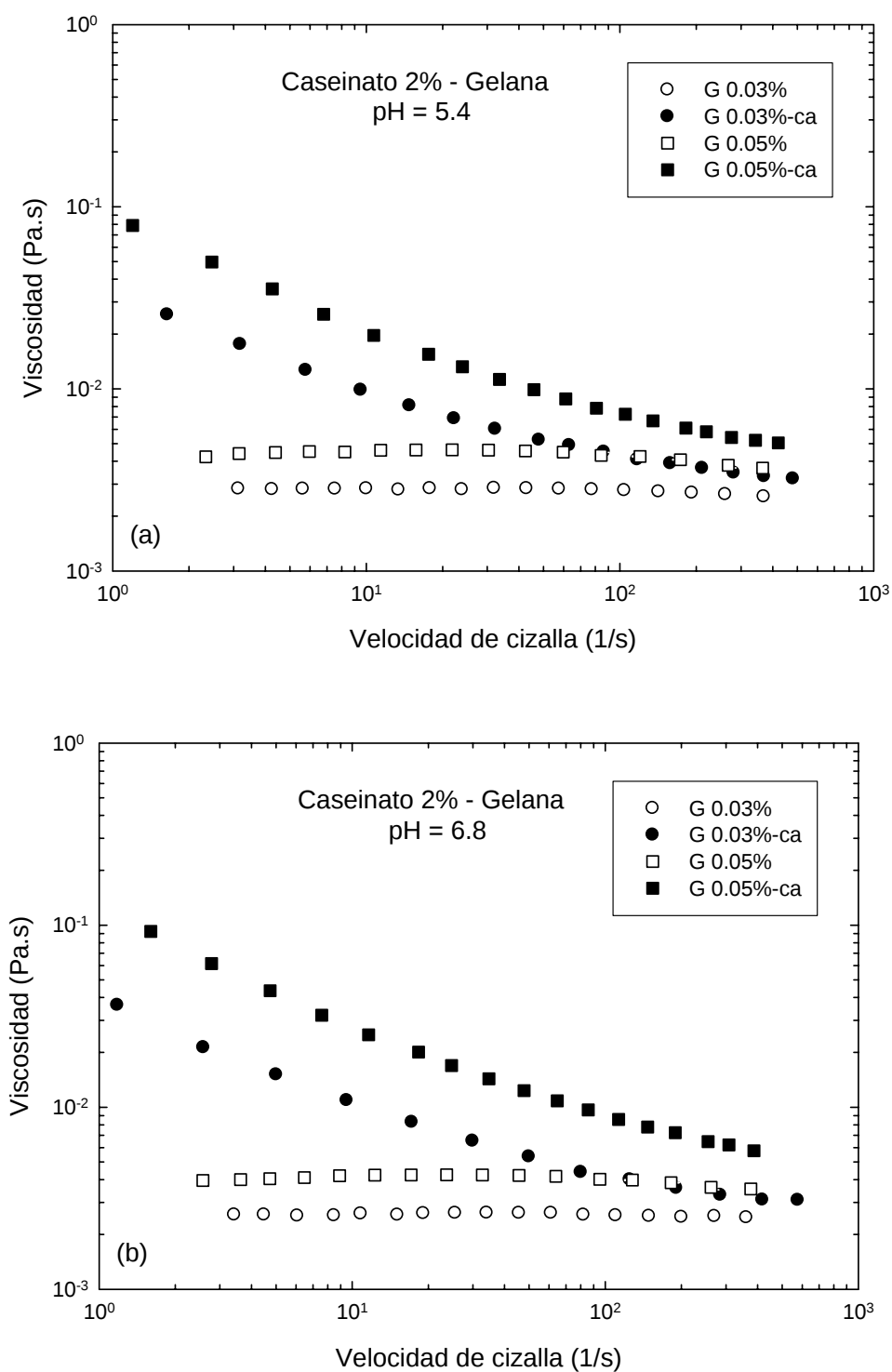


Figura 3.8 Viscosidad de mezclas de caseinato de sodio 2% con gelana, con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , pH 5.4 (a), pH 6.8 (b), 25 °C.

Con base en los resultados obtenidos sobre las propiedades reológicas y tamaño de partícula de los sistemas acuosos se puede pensar que en los sistemas elaborados con amortiguador acetato (pH 5.4) y en los que se adicionó CaCl_2 a pH 6.8, la gelana constituye una matriz en la cual los agregados de proteína actúan como partículas de relleno, de acuerdo con el esquema sugerido por Dickinson y Chen (1999), ya que las partículas de caseína contribuyen con la disminución de la viscosidad de la disolución de gelana, al inhibir de alguna forma el entrecruzamiento de las cadenas, debilitando así la matriz de polisacárido.

Esta especulación está de acuerdo con la microestructura observada en mezclas de caseína/ κ -carragenina, donde las cadenas del polisacárido forman una matriz débil en la cual las moléculas de caseína quedan atrapadas (Alexander y Dalgleish, 2007; Spagnuolo y col., 2005), actuando como rellenos inactivos, lo que coincide, además, con los resultados reportados por Moritaka y col., 2003, donde las partículas de relleno consisten en microgeles de gelana. En el presente trabajo, las partículas de caseína al parecer actúan siempre como rellenos inactivos, mientras que la magnitud de su efecto depende de la presencia de iones Ca^{2+} . Esta suposición implica que existe algún tipo de enlace proteína-polisacárido en presencia de los iones, como se mencionó anteriormente. En adición, se debe tomar en cuenta que los iones de calcio incrementan la fuerza iónica y disminuyen el potencial electrocinético, ζ , así como la tensión interfacial, como se podrá ver en la sección 3.3.

3.2 EMULSIONES

3.2.1 Distribución y tamaño de partícula

Las Figuras 3.9 a y b muestran la distribución de tamaños de glóbulos de grasa obtenidos de las emulsiones (30% aceite de girasol) elaboradas con caseinato de sodio solo a 1 y 2 %, respectivamente. En éstas es posible apreciar que la distribución de tamaño de partícula no depende apreciablemente de la concentración de caseinato. A pH de 5.4, particularmente a 1% de concentración, se observa disminución en la proporción de partículas pequeñas ($< 0.5 \mu\text{m}$ y $3-6 \mu\text{m}$) y aumento en la proporción de partículas de tamaño medio ($8-15 \mu\text{m}$, aproximadamente), originando que el Diámetro Medio Sauter ($d_{3,2}$), sea mayor (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7 Diámetro Medio Sauter (μm) de emulsiones de caseinato solo, a pH 5.4 y 6.8 con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C, 30% aceite puro de girasol.

<i>Condiciones</i>	<i>Caseinato 1%</i>	<i>Caseinato 2%</i>
pH 5.4	6.3	4.4
pH 5.4-ca	5.7	3.8
pH 6.8	5.2	4.7
pH 6.8-ca	4.8	4.3

Los valores de Diámetro Medio Sauter, $d_{3,2}$, de las emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio y gelana se muestran en el Cuadro 3.8. Con base en estos valores, la concentración de caseinato adsorbido en la interfase, C_{ad} , fue posible calcularla como $C_{\text{ad}} \approx 6\Gamma\phi_{\text{ac}}/d_{3,2}$ (Berli y col., 2002), donde, $\Gamma \approx 3 \text{ mg/m}^2$ corresponde a la superficie cubierta de proteína por unidad de área (Dickinson y Golding, 1997).

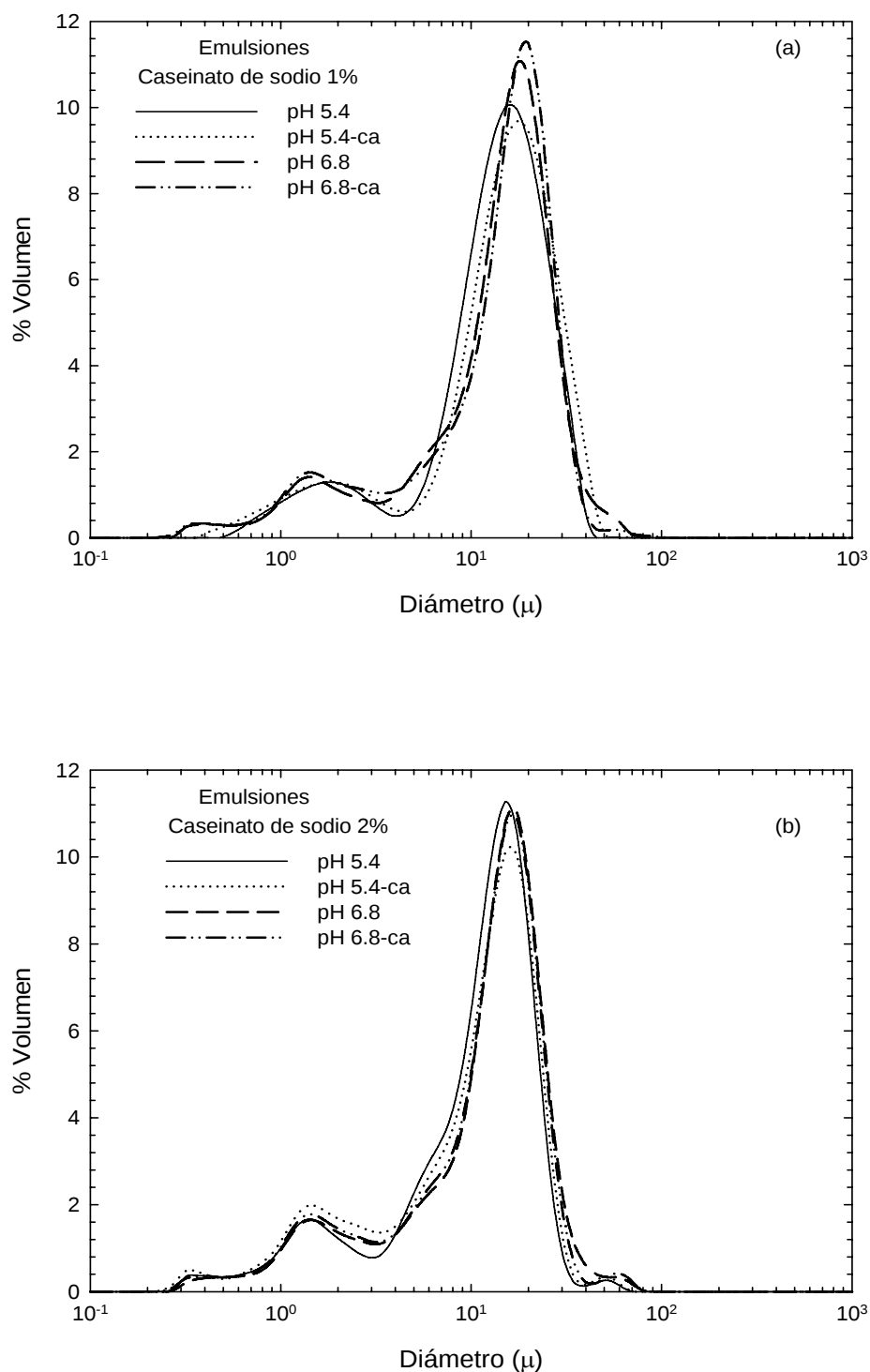


Figura 3.9 Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 1% (a) y 2% (b), a pH 5.4 y 6.8, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , 25 °C.

Considerando la fracción volumen de aceite empleada, $\phi_{ac} \approx 0.32$ y el mayor valor de C_{ad} obtenido (≈ 1.56 g/L), es posible concluir que la mayor parte del caseinato se encuentra en la fase acuosa de la emulsión.

Cuadro 3.8 Diámetro Medio Sauter (μm) de emulsiones elaboradas con mezcla de caseinato y gelana a pH 5.4 y 6.8 con y sin la adición de 5 mM de CaCl_2 , 25 °C, 30 % aceite puro de girasol.

<i>Condiciones</i>	<i>Caseinato 1%</i>	<i>Caseinato 2%</i>
Gelana 0.03 % pH 5.4	5.5	3.9
Gelana 0.03 % pH 5.4-ca	6.4	3.7
Gelana 0.03 % pH 6.8	5.2	4.6
Gelana 0.03 % pH 6.8-ca	5.0	3.9
Gelana 0.05 % pH 5.4	6.5	4.3
Gelana 0.05 % pH 5.4-ca	6.9	4.2
Gelana 0.05 % pH 6.8	5.0	4.4
Gelana 0.05 % pH 6.8-ca	5.0	4.2

La forma de la curva de distribución de tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con mezclas de gelana y caseinato de sodio a 1 y 2% (Figuras 3.10 y 3.11, respectivamente) muestra una mayor distribución de tamaños que la de las emulsiones elaboradas con caseinato solo, particularmente con la mezcla de caseinato de sodio a 2%. En las Figuras se aprecia la presencia de partículas de tamaño mayor a 40 μm , e inclusive, la existencia de un tercer pico a pH de 5.4 para caseinato de sodio a 1 y 2 % en combinación con ambas concentraciones de gelana (0.03 y 0.05%), como resultado de floculación por puenteo. Dicha floculación es irreversible inclusive por dilución (Dickinson y col., 2003) y puede ser promovida por los cationes presentes en el amortiguador (Na^+), que se acentúa con la adición de iones Ca^{2+} y probablemente mediada por las moléculas de gelana, ya que aún a pH de 6.8 se observa la formación de estos flóculos, aunque sólo a la mayor concentración de gelana y en presencia de CaCl_2 .

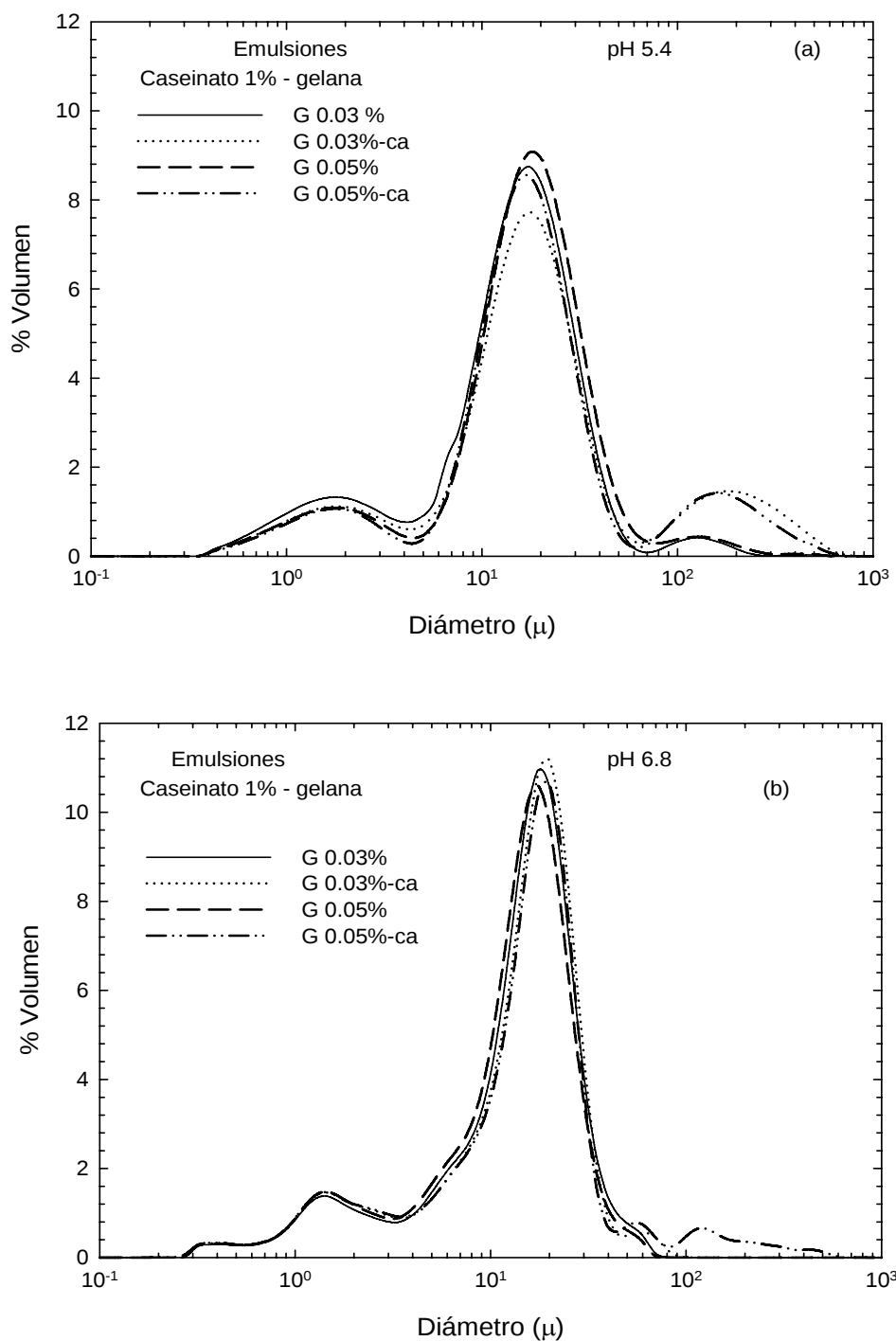


Figura 3.10 Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 1% en mezcla con gelana, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , a pH 5.4 (a) y 6.8 (b), 25 °C.

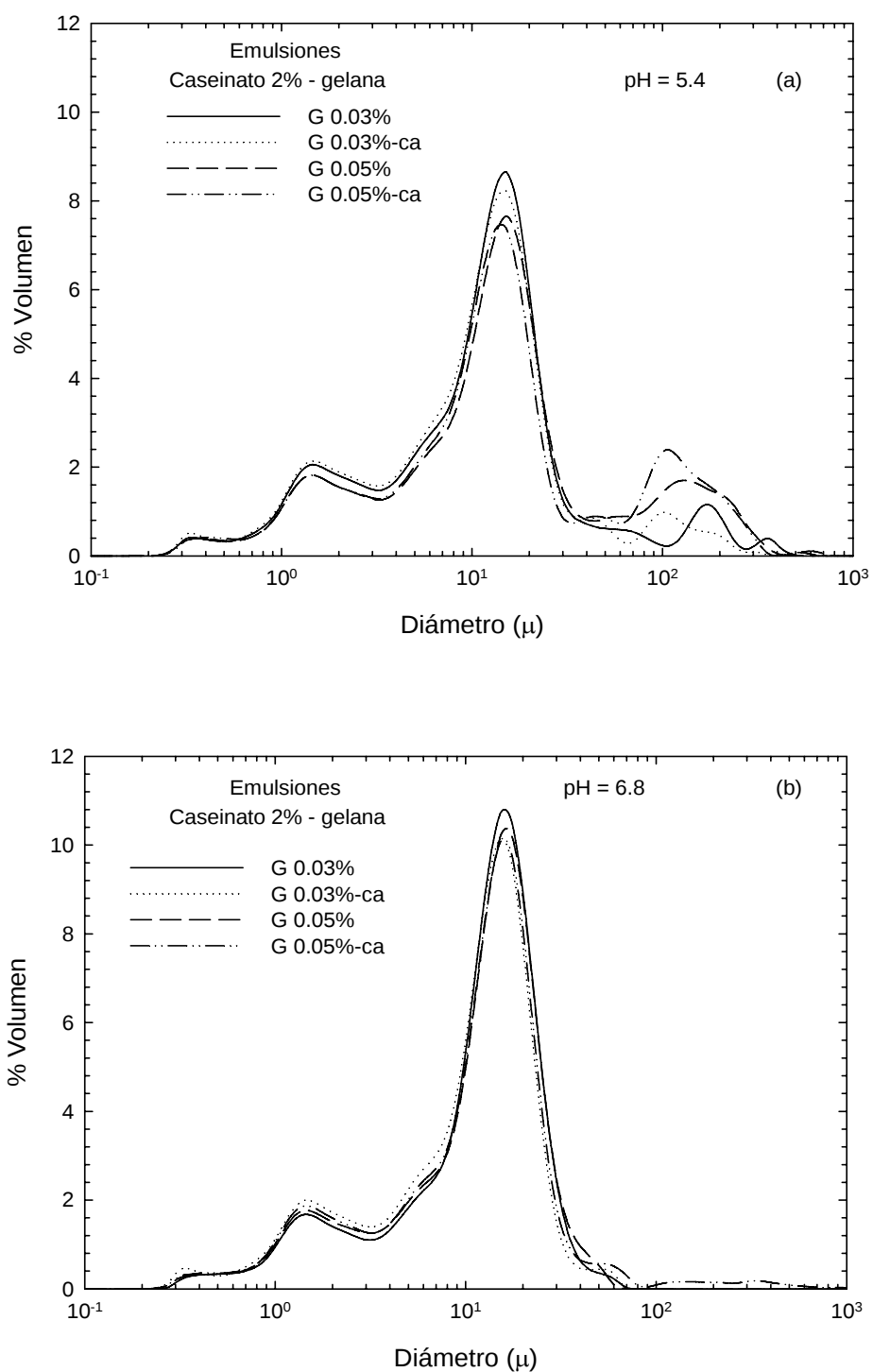


Figura 3.11 Distribución de tamaño de partícula de emulsiones elaboradas con caseinato de sodio 2% en mezcla con gelana, con y sin adición de 5 mM CaCl_2 , a pH 5.4 (a) y 6.8 (b), 25 °C.

3.2.2 Comportamiento reológico

En las Figuras 3.12 a,b y 3.13 a,b se muestran los valores de viscosidad en función de la velocidad de cizalla para emulsiones elaboradas con 30 % de aceite puro de girasol y los diferentes sistemas acuosos mencionados anteriormente. En términos cualitativos, las emulsiones variaron desde, fluidos newtonianos, con apariencia física similar a la leche, hasta líquidos fluidificantes a la cizalla. A pesar de la complejidad de las emulsiones en estudio, se puede considerar que son un sistema multicomponente constituido por partículas coloidales (glóbulos de grasa cubiertos de proteína) dispersas en una fase acuosa de agregados de caseína en mezcla con gelana.

Las emulsiones elaboradas con caseinato de sodio solo, presentaron comportamiento newtoniano con baja viscosidad (Cuadro 3.9), característico de emulsiones semiconcentradas en donde no existe agregación de glóbulos de aceite (Dickinson y Golding, 1997).

Cuadro 3.9 Viscosidad de emulsiones de caseinato de sodio 1 y 2 % a 25 °C.

<i>Emulsión</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad (Pa.s)</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	<i>r</i> ²
E-Caseinato 1% pH 5.4	Newton	3.72 x10 ⁻³	4-500	0.999
E-Caseinato 1% pH 6.8	Newton	4.86 x10 ⁻³	2-350	0.999
E-Caseinato 1% pH 5.4-ca	Newton	5.37 x10 ⁻³	2-400	0.999
E-Caseinato 1% pH 6.8-ca	Newton	5.28 x10 ⁻³	1-200	0.999
E-Caseinato 2% pH 5.4	Newton	5.49 x10 ⁻³	0.07-500	0.999
E-Caseinato 2%pH 6.8	Newton	6.06 x10 ⁻³	0.3-400	0.999
E-Caseinato 2% pH 5.4-ca	Newton	4.65 x10 ⁻³	0.9-500	0.999
E-Caseinato 2% pH 6.8-ca	Newton	3.39 x10 ⁻³	1-600	0.999

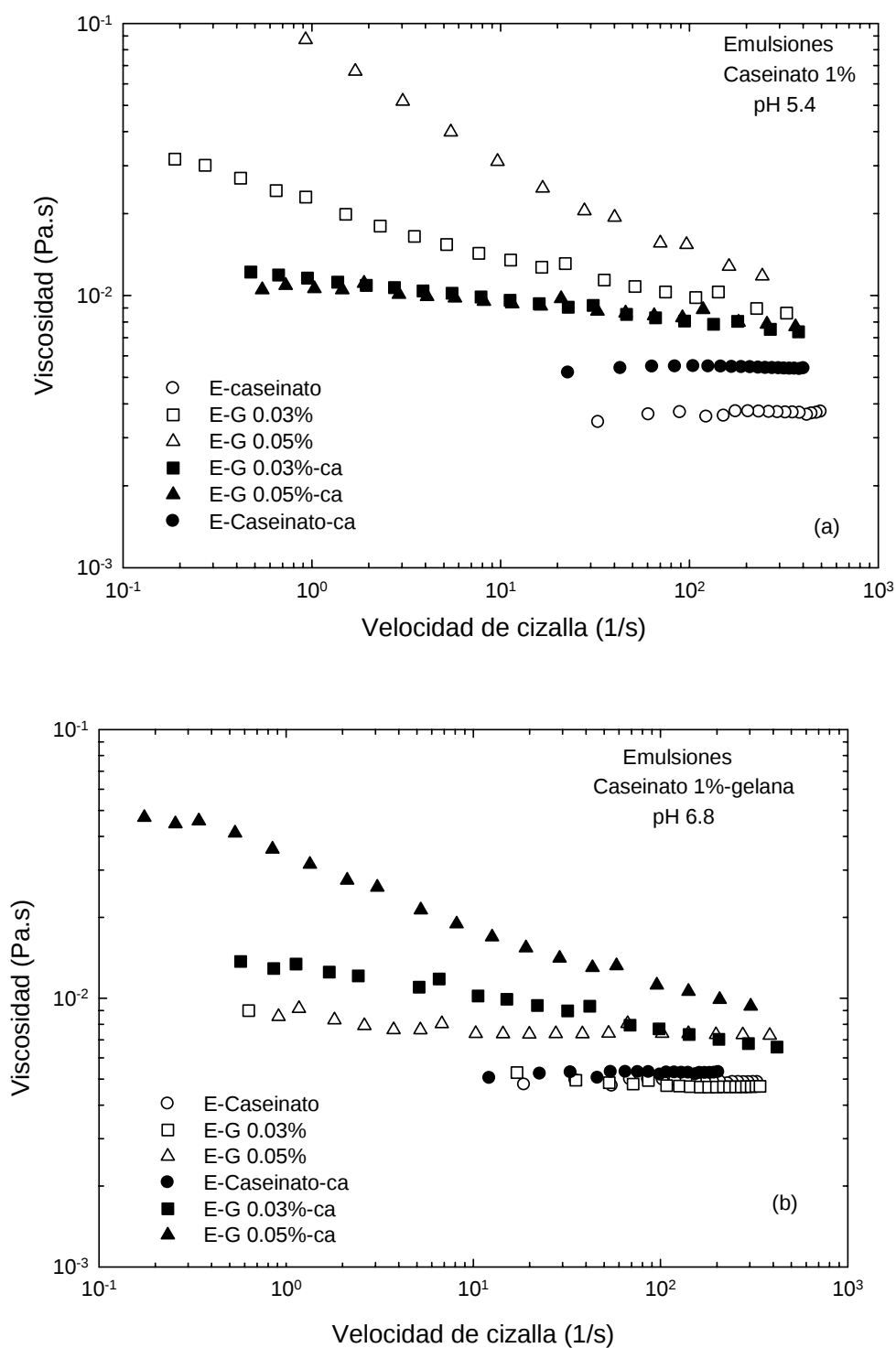


Figura 3.12 Viscosidad de emulsiones aceite-agua con 30% de aceite puro de girasol y disoluciones de caseinato de sodio 1%, en mezcla con gelana, a pH 5,4 (a) y 6.8 (b), 25 °C.

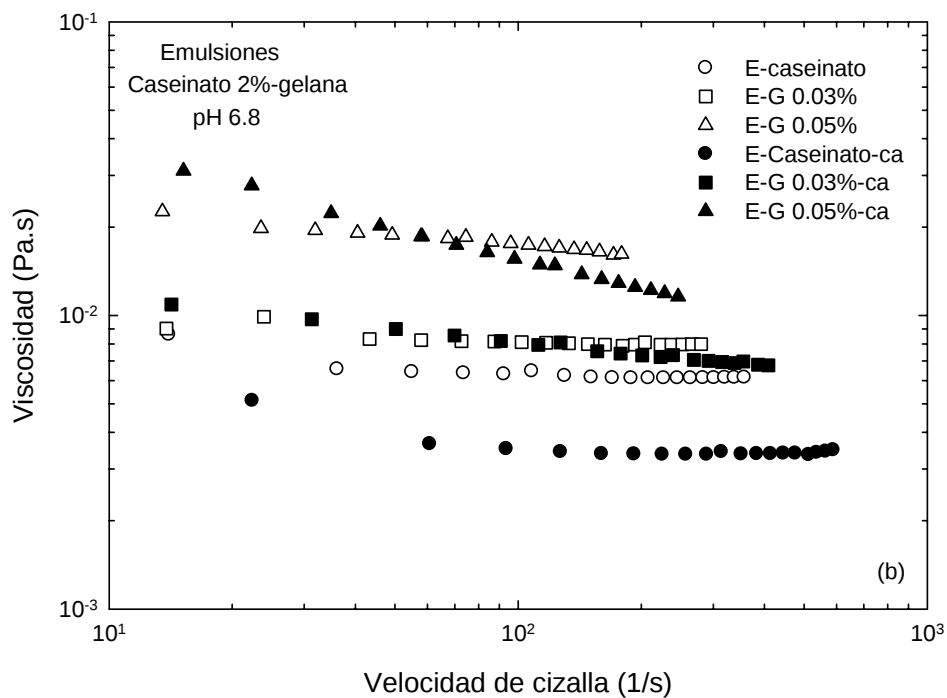
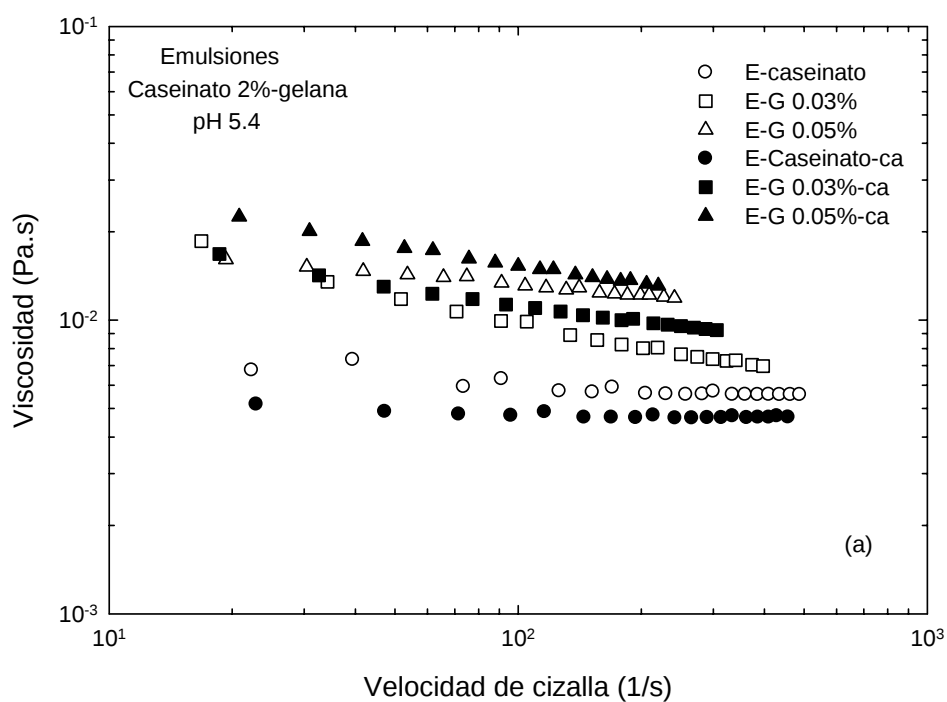


Figura 3.13 Viscosidad de emulsiones aceite-agua con 30% de aceite puro de girasol y disoluciones de caseinato de sodio 2%, en mezcla con gelana, a pH 5,4 (a) y 6.8 (b), 25 °C.

En las Figuras 3.12 y 3.13 es posible observar que el comportamiento reológico de las emulsiones depende de la concentración de gelana. De hecho, las emulsiones correspondientes con los sistemas acuosos en los que no se reportó formación de redes de gelana (pH 6.8), presentaron valores de viscosidad relativamente bajos (Cuadros 3.10 y 3.11).

Cuadro 3.10 η (Pa.s), K (Pa.sⁿ), n (-) de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio 1%, C, con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C.

<i>Emulsión</i>	<i>Modelo</i>	<i>Viscosidad y parámetros</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	r^2
E-C1G03%pH5.4	Ley de la Potencia	$K = 0.022$ $n = 0.83$	0.1-350	0.999
E-C1G03%pH6.8	Newton	$\eta = 5.6 \times 10^{-3}$	1-300	0.999
E-C1G03%pH5.4-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.012$ $n = 0.92$	0.4-400	1
E-C1G03%pH6.8-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.013$ $n = 0.88$	0.5-400	0.999
E-C1G05%pH5.4	Ley de la Potencia	$K = 0.07$ $n = 0.66$	0.06-250	0.996
E-C1G05%pH6.8	Newton	$\eta = 7.28 \times 10^{-3}$	0.8-400	0.999
E-C1G05%pH5.4-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.011$ $n = 0.94$	0.7-350	0.999
E-C1G05%pH6.8-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.03$ $n = 0.77$	0.17-300	0.999

Cuadro 3.11. K (Pa.sⁿ), n (-) de emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio, C, 2% con gelana, G, en sistema acuoso, 25 °C.

<i>Emulsión</i>	<i>Modelo</i>	<i>Parámetros</i>	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	r^2
E-C2G03%pH5.4	Ley de la Potencia	$K = 0.021$ $n = 0.82$	0.3-400	0.999
E-C2G03%pH6.8	Ley de la Potencia	$K = 0.009$ $n = 0.98$	0.7-300	0.999
E-C2G03%pH5.4-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.019$ $n = 0.87$	0.3-300	0.999
E-C2G03%pH6.8-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.013$ $n = 0.88$	0.5-400	0.999
E-C2G05%pH5.4	Ley de la Potencia	$K = 0.02$ $n = 0.91$	0.2-250	0.999
E-C2G05%pH6.8	Ley de la Potencia	$K = 0.03$ $n = 0.88$	0.4-170	0.997
E-C2G05%pH5.4-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.034$ $n = 0.80$	0.1-250	0.998
E-C2G05%pH6.8-ca	Ley de la Potencia	$K = 0.057$ $n = 0.68$	0.1-250	0.997

En las emulsiones donde existen asociaciones de gelana en la fase acuosa (pH 5.4), la viscosidad de la emulsión aumenta y se presenta comportamiento fluidificante, descrito por el modelo de la Ley de la Potencia (Cuadros 3.10 y 3.11), siendo mayor el efecto a mayor concentración de polisacárido. En las emulsiones a 1%, la adición de iones calcio, a pH 5.4, tiene un efecto negativo sobre la viscosidad de la emulsión y sobre el comportamiento fluidificante (Figura 3.12 a), contrario a lo que sucede a pH 6.8. Con base en estos resultados se puede pensar que un posible efecto de los iones es la formación de agregados de glóbulos de aceite, mediante puenteo a través enlaces con Ca^{2+} , tal como sugieren los resultados de distribución de tamaño de partícula en la Figura 3.9 a. A 2 % de caseinato, el efecto de los iones calcio se ve atenuado, probablemente debido a que el caseinato compite de manera efectiva por los iones calcio.

De particular interés fue comparar la viscosidad de las emulsiones con la viscosidad de los sistemas acuosos correspondientes, en presencia de CaCl_2 (Figuras 3.14 a,b y 3.15 a,b). En los sistemas con caseinato de sodio a 1 %, a baja velocidad de cizalla, es decir, cuando ésta tiende a cero, la viscosidad de las emulsiones es aproximadamente un orden de magnitud menor que la de la fase acuosa. En el otro extremo, a velocidad de cizalla alta, cerca de 10^3 s^{-1} la viscosidad de las emulsiones, η_E , es aproximadamente dos veces mayor que la de fase acuosa, η_{fa} . Consistentemente con estas diferencias, las pendientes de las curvas correspondientes a las emulsiones, son menores que las de las fases acuosas.

Con base en estos resultados es posible decir que los glóbulos de aceite cubiertos de caseína, al igual que los agregados de caseína en la fase acuosa, también actúan como partículas de relleno en la matriz de gelana.

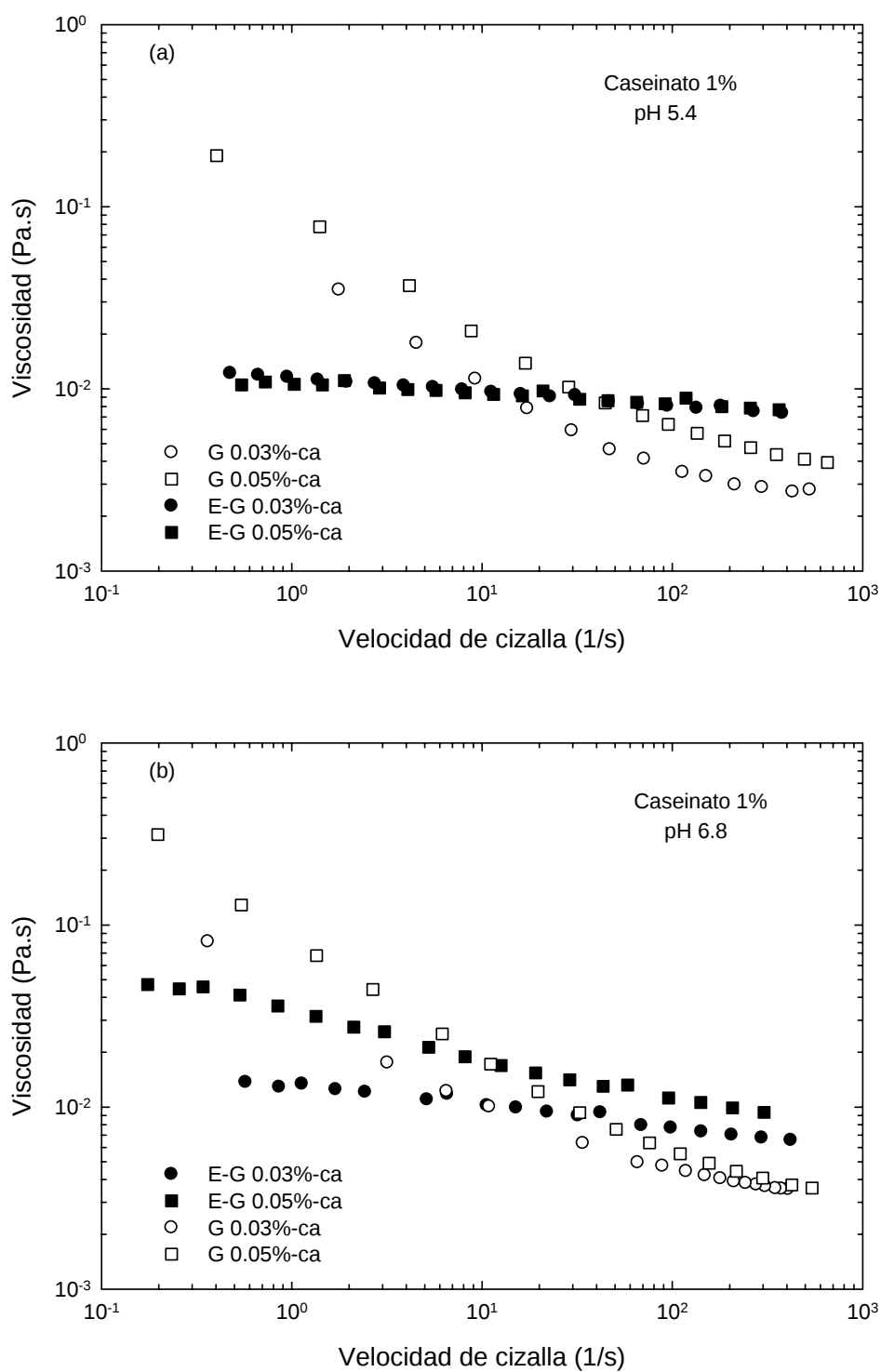


Figura 3.14 Viscosidad de emulsiones elaboradas con mezclas de gelana - caseinato de sodio 1% y de la fase acuosa correspondiente, con adición de 5 mM de CaCl₂. pH 5.4 (a); pH 6.8 (b).

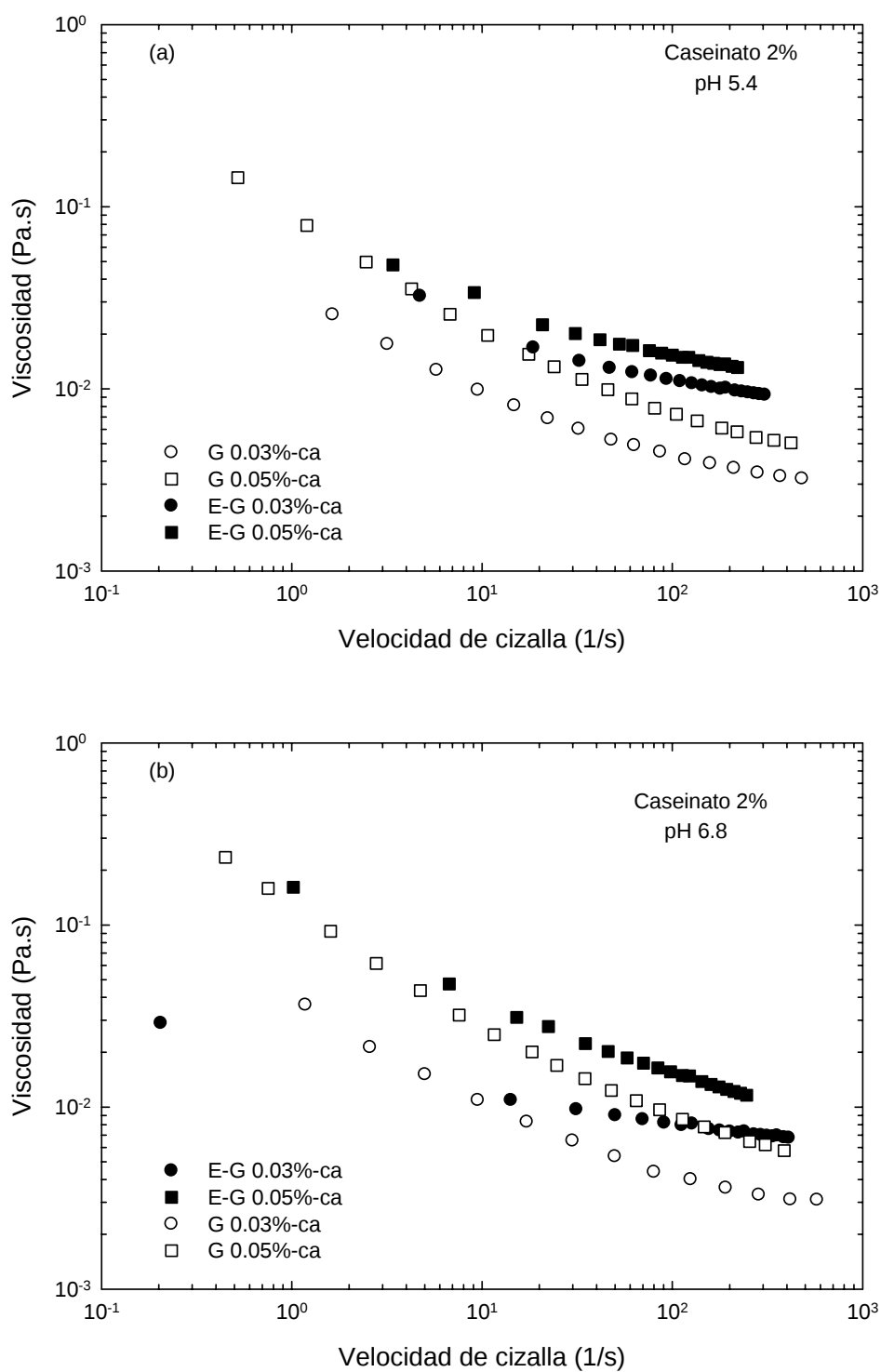


Figura 3.15 Viscosidad de emulsiones elaboradas con mezclas de gelana - caseinato de sodio 2% y de la fase acuosa correspondiente, con adición de 5 mM de CaCl₂. pH 5.4 (a); pH 6.8 (b).

Además, el hecho de que:

$$\eta_E(\dot{\gamma} \rightarrow 0) \ll \eta_{fa}(\dot{\gamma} \rightarrow 0)$$

indica que de alguna forma, los glóbulos de aceite inhiben la formación de la red de polisacárido, la cual es responsable del comportamiento fluidificante mostrado por la fase acuosa. Mientras que a altas velocidades de cizalla, donde la red de gelana se rompe debido a las fuerzas de cizalla, la principal contribución sobre la viscosidad de la emulsión es el efecto hidrodinámico de los glóbulos de aceite actuando como esferas rígidas bajo flujo, de acuerdo con el número capilar estimado con la ecuación 1.4 ($\Omega \ll 1$).

El comportamiento viscoelástico de las emulsiones coincide con las características de la respuesta en flujo rotacional. Las Figuras 3.16 a y b comparan el módulo elástico de las emulsiones con el de la fase acuosa correspondiente. En ésta se observa que mientras la mezcla del sistema acuoso actúa como una red elástica, principalmente con gelana 0.05 % donde los valores de $G'(\omega)$ son casi constantes, la emulsión respectiva actúa más bien como un gel suave sin una meseta definida y con $G'(\omega)$ aproximándose rápidamente a cero a bajas frecuencias. Sin embargo, cabe hacer notar, que excepto a bajas frecuencias, el módulo de almacenamiento de las emulsiones es mayor que el de la fase acuosa. Lo cual se atribuye a la presencia de los glóbulos de grasa suspendidos que idealmente contribuyen con el módulo elástico (Dickinson y Chen, 1999), considerando además que ésta es la principal contribución sobre la elasticidad de la emulsión, con base en que las curvas de $G'(\omega)$ de las emulsiones con diferente concentración de gelana se superponen (Figura 3.16).

.

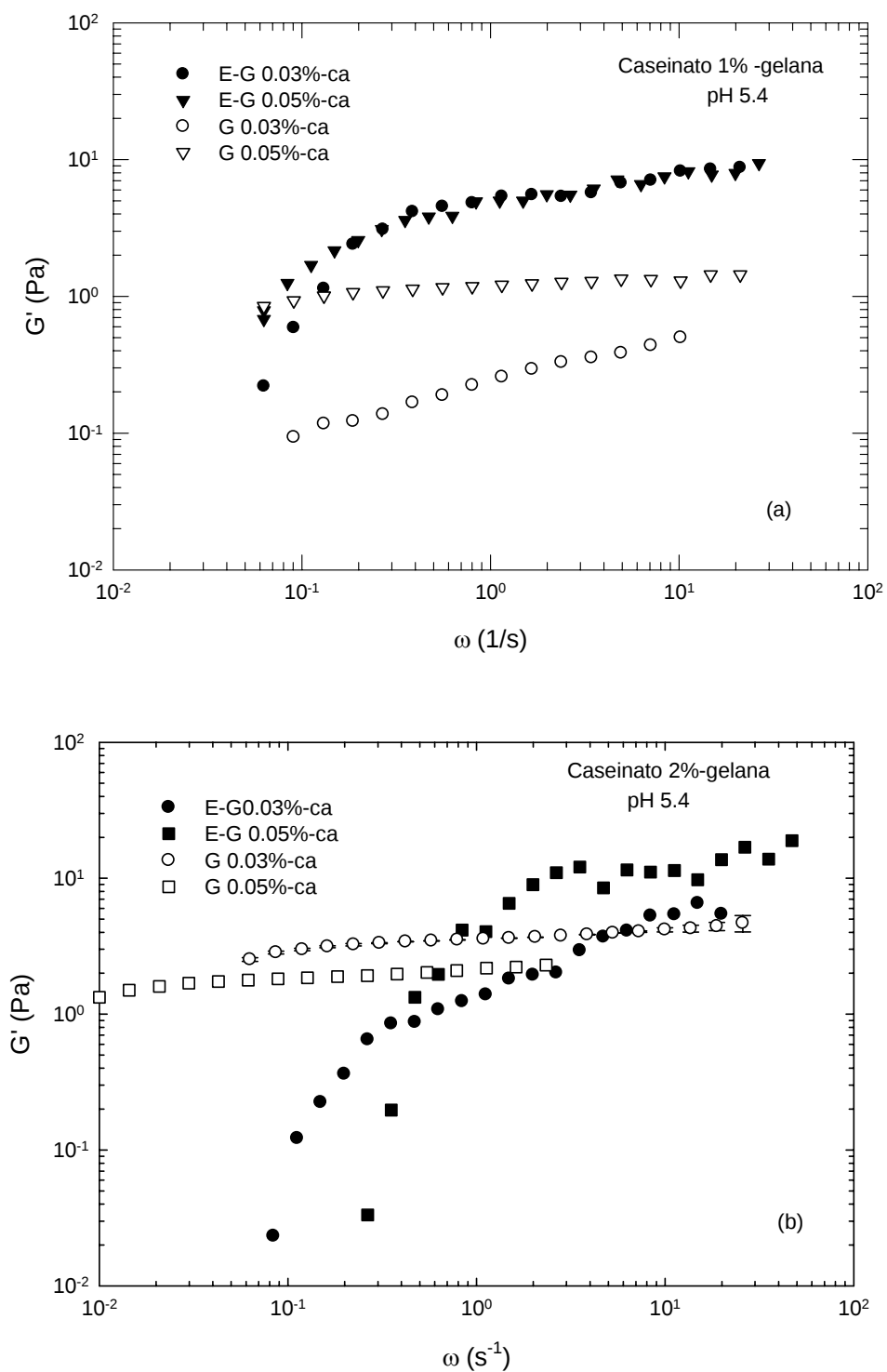


Figura 3.16 Módulo elástico de sistemas acuosos y sus respectivas emulsiones elaboradas con mezclas de gelana y caseinato a 1% (a) y 2% (b), pH 5.4, 25 °C.

3.3 Propiedades de superficie

Las Figuras 3.17 y 3.18 muestran los valores de tensión interfacial en función del tiempo para los sistemas en estudio. A excepción de las muestras de caseinato de sodio a 1% en pH 5.4, en todos los sistemas, la adición de gelana generó aumento de la tensión interfacial, mientras que en todos los casos, la adición de CaCl_2 promovió una disminución en los valores del mismo. La interpretación de estos resultados se complementa al combinar el análisis de las propiedades de tensión superficial con las características viscoelásticas de la interfase. Los valores del módulo elástico dilatacional, ε_d y viscosidad dilatacional, η_d , para los sistemas con caseinato solo se resumen en el Cuadro 3.12.

El incremento en la elasticidad superficial con el aumento en la concentración de proteína (Cuadro 3.12), se puede atribuir a una mayor cantidad de proteína adsorbida. De igual forma, la elasticidad superficial aumenta cuando la caseína se encuentra cerca de su punto isoeléctrico, ya que las proteínas se encuentran en su conformación molecular más compacta resultando en una alta cantidad adsorbida y una menor tensión interfacial (Bos y van Vliet, 2001; Dickinson, 1999a).

Cuando se adiciona 5 mM de CaCl_2 en las muestras, se observa un ligero aumento en los valores de ε_d , lo cual está en relación directa con la disminución de la tensión interfacial. Es bien sabido que cuando el ion Ca^{2+} se adiciona a las disoluciones de caseinato, el enlace del ion Ca^{2+} con la fosfoserina de las caseínas reduce la repulsión electrostática entre las moléculas, resultando en la formación de agregados de caseína en la disolución (Swaisgood, 2003). Esta agregación puede disminuir el número de moléculas de caseína disponibles para la adsorción, dando como resultado que el caseinato no sea capaz de cubrir inmediatamente toda la nueva área superficial de los glóbulos de grasa creada durante la homogenización y alcanzar un estado de mínima energía libre. En consecuencia, puede ocurrir coalescencia de los glóbulos de grasa resultando en

un aumento en el tamaño de glóbulos en la emulsión (Ye y Singh, 2001). Sin embargo, tanto los resultados en tamaño de partícula en sistemas acuosos como en emulsiones, no se aprecian tales efectos.

De acuerdo con la discusión de la sección 3.1.1, a la concentración de calcio empleada en este trabajo, existe un mínimo grado de agregación de caseína, como si la asociación de calcio ocurriera principalmente hacia el interior de las submicelas de caseína, promoviendo probablemente un mayor empacamiento de las moléculas, contribuyendo así con el carácter elástico de la interfase el cual se puede atribuir a una alta densidad de empacamiento y fuertes interacciones intermoleculares (Dickinson, 1999b), en comparación con la estructura ampliamente móvil de la capa de caseína sin la adición de calcio, la cual se caracteriza por presentar una estructura disociada y desplegada naturalmente al azar (Cheftel y col., 1989). La disminución de los valores de la viscosidad interfacial con la adición de iones (Cuadro 3.12) probablemente responda a cambios en la estructura de la molécula en la superficie, la cual suele ser más compacta.

Cuadro 3.12 Módulo elástico interfacial y viscosidad interfacial de disoluciones de caseinato de sodio

Sistema	ε_d (mN/m)	η_d (s mN/m)
Caseinato 1%, pH 5.4	2.01	40.42
Caseinato 1%, pH 5.4-ca	2.31	29.47
Caseinato 1%, pH 6.8	1.10	13.68
Caseinato 1%, pH 6.8-ca	1.81	8.38
Caseinato 2%, pH 5.4	3.05	45.53
Caseinato 2%, pH 5.4-ca	3.12	4.31
Caseinato 2%, pH 6.8	2.31	37.87
Caseinato 2%, pH 6.8-ca	2.82	16.78

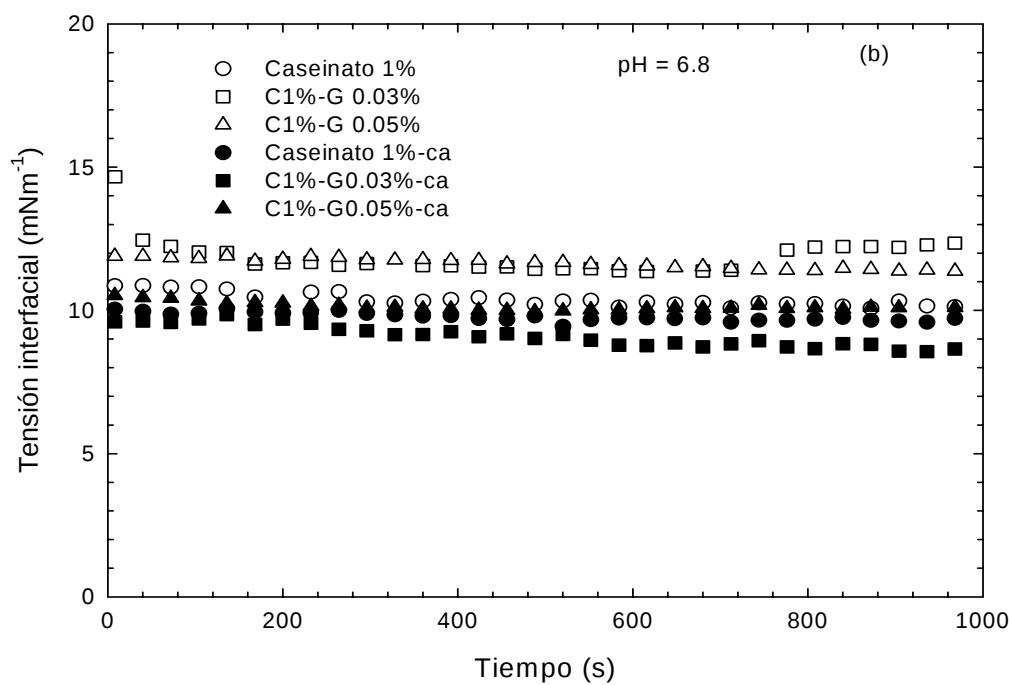
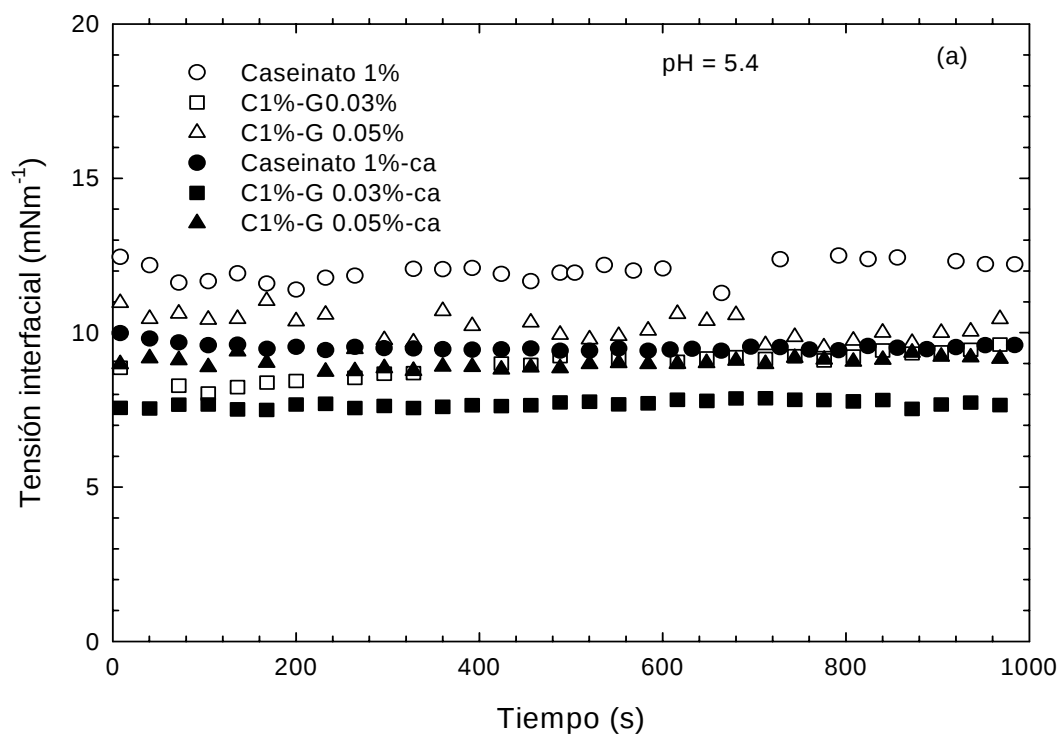


Figura 3.17 Tensión interfacial de disoluciones acuosas de caseinato de sodio 1%, 25 °C.

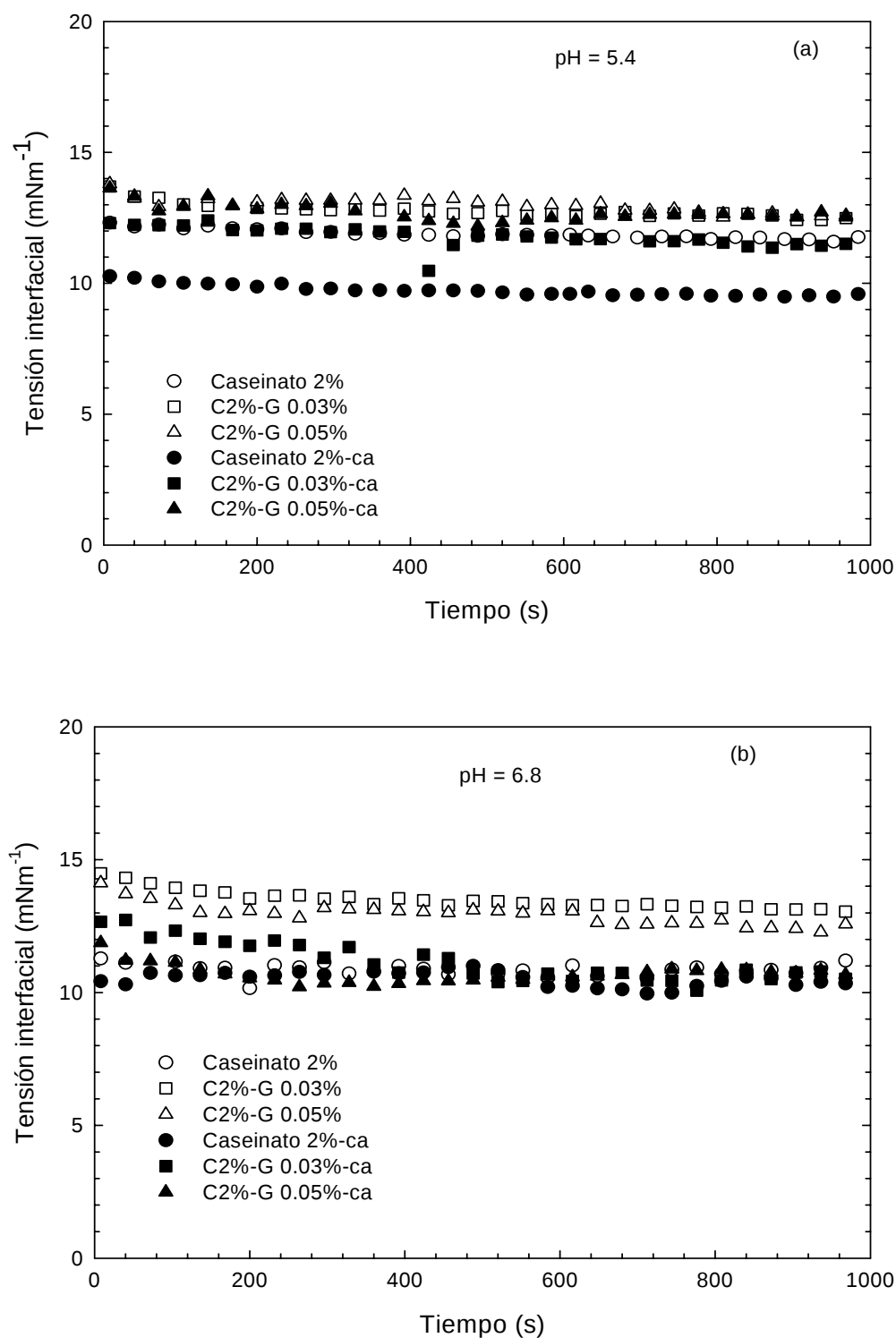


Figura 3.18 Tensión interfacial de disoluciones de caseinato de sodio a 2%, 25 °C.

CONCLUSIONES

Al estudiar el efecto de la presencia de gelana, la adición de iones y la modificación del pH sobre las propiedades reológicas, tamaño de partícula y potencial zeta de sistemas acuosos de caseinato de sodio a 1 y 2% de concentración se observó que la presencia de iones calcio y sodio influye sobre la agregación o disociación de submicelas, siendo los iones sodio los que ejercen un mayor efecto, dadas las concentraciones molares en que cada catión se encuentra presente.

El comportamiento reológico de mezclas de caseinato de sodio y gelana en medio acuoso está dominado por la gelana, principalmente en los casos en que existe la formación de una red tridimensional, en donde las partículas de caseína quedan atrapadas actuando, al parecer, como rellenos inactivos que inhiben el entrecruzamiento de las cadenas de polisacárido debilitando así la matriz de gelana. La magnitud de su efecto depende de la presencia de iones Ca^{2+} , lo que implica que existe algún tipo de enlace proteína-polisacárido en presencia de los iones, es decir cuando hay adición de 5 mM de CaCl_2 .

Las emulsiones elaboradas con caseinato de sodio al 1 y 2% mostraron baja viscosidad con y sin la adición de iones calcio, en amortiguador acetato o en agua desionizada, las cuales se pueden describir como emulsiones semiconcentradas en donde no existe agregación de los glóbulos de aceite y cuya viscosidad depende de la presencia de iones y el tipo de disolvente.

Las emulsiones elaboradas con mezclas de caseinato de sodio-gelana, muestran comportamiento reológico no newtoniano, de tipo fluidificante que se puede atribuir a la presencia de efectos electrostáticos, formación de enlaces poliméricos entre los hidrocoloides que rodean los glóbulos de aceite y a la formación de una red tridimensional de polisacárido que inmoviliza las gotas cubiertas de proteína.

Al igual que en los sistemas acuosos, en las emulsiones existe un marcado efecto de gelana sobre el comportamiento reológico de los sistemas debido a la formación de la red tridimensional. Sin embargo, en contraste con los sistemas acuosos, los efectos encontrados bajo las diferentes condiciones experimentales (pH, presencia de gelana, adición de iones) se pueden atribuir a diferencias en la estructura de la proteína adsorbida en la interfase aceite/medio acuoso.

Con base en las observaciones anteriores se puede concluir que la adición de iones bajo las condiciones y concentraciones experimentales resulta favorable debido a que modifica las propiedades superficiales del caseinato adsorbido en la interfase aceite agua, promoviendo además, particularmente a pH de 5.4, interacciones cooperativas con la gelana, la cual al formar una red de gel reduce la agregación de los glóbulos de la fase dispersa.

En este trabajo se demostró la potencial aplicación de gelana en emulsiones, como estabilizante, empleando bajas concentraciones de proteína y polisacárido además de que se logró un gran avance al tratar de elucidar el mecanismo por el cual una posible interacción caseinato de sodio - gelana, modifica las propiedades de superficie del caseinato de sodio, favoreciendo las características de las emulsiones creadas.

Trabajo prospectivo

Para tener una mayor evidencia respecto a los fenómenos de asociación de caseinato de sodio - gelana observados, y de cómo los glóbulos de grasa actúan como rellenos inactivos, debilitando la red de gelana, se considera importante realizar estudios de microscopia confocal de barrido de los sistemas. Por otro lado existe una gran motivación para estudiar las propiedades de adsorción de caseinato de sodio, las cuales son modificadas por la presencia de polisacáridos, cuyo efecto depende de la naturaleza de cada uno de ellos, la importancia de este tipo de estudios radica en que las características de la interfase definen en mayor

medida tanto las propiedades de los sistemas formados como las condiciones de proceso. Se considera importante además el poder modificar las relaciones estequiométricas entre los iones adicionados y la cantidad de sitios disponibles para que éstos actúen, modificando las relaciones molares de los componentes.

Dentro de las proyecciones consideradas para este trabajo, se encuentra también la aplicación de los sistemas tanto en emulsiones como en espumas alimenticias.

Logros del trabajo

Con el presente trabajo se publicó un artículo internacional y actualmente se está redactando un segundo artículo con énfasis en las propiedades de superficie de los sistemas. Se presentaron 3 trabajos en congresos internacionales.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS INTERNACIONALES ARBITRADAS

- Sosa-Herrera, M. G., Berli, C. L. A, Martínez-Padilla L. P., 2008. *Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures*. Food Hydrocolloids, 22 (5): 934-942(Science citation).

PUBLICACIÓN DE MEMORIAS - CONGRESOS INTERNACIONALES

- Sosa- Herrera, M. G. Barrientos-García, M.M., Rocandio-Pineda, M., Martínez-Padilla, L. P. 2007. *Viscoelasticidad de emulsiones aceite-agua elaboradas con mezclas de caseinato de sodio-gelana y su relación con la fracción volumen de aceite*. VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, 2-7 noviembre. Ambato, Ecuador.
- Sosa-Herrera M. G., Martínez-Padilla, L. P. 2006. *Steady Shear Flow of Oil in Water Emulsions Containing Sodium Caseinate and Gellan Gum*. Second Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. 13-16 octubre Saltillo, Coahuila, México.
- Sosa-Herrera M. G., Martínez-Padilla, L. P. 2006. *Steady shear behavior of gellan gum and sodium caseinate mixtures*. IUFOST, 13th World congress of food science and technology. 17-21 septiembre, Nantes, Francia.

REFERENCIAS

Alexander, M. & Dalgleish, D. G. 2007. The interaction of casein micelles with *k*-carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, **21**, 128-136.

Antipova, A.S., Dickinson, E., Murray, B.S. & Semenova, M.G. 2002. On the effect of calcium ions on the sticking behaviour of casein-coated particles in shear flow. *Colloids and Surfaces*, **27**, 123-131.

Attwood, P.T., Atkins, E.D.T., Upstill, C., Miles, M.J. & Morris, V.J. 1986. Gellan gum; An x-ray fiber diffraction study. In *Gums and stabilizers for the food industry* 3. G.O. Phillips, D.J. Wedlock and P. Williams (Eds.) Elsevier Applied Science Publishers. USA. Pp. 135-145.

Barnes, H.A. 2004. The rheology of emulsions. En *Emulsions: structure stability and interactions* (D.N. Petsev, ed.) Elsevier Academic Press. London, UK. Pp 721-759.

Barnes, G.T. & Gentle, I.R. 2005. *Interfacial Science. An Introduction*. Oxford University Press, Inc., New York.

Berli, C. L. A., Quemada, D. & Parker, A. 2002. Modeling the viscosity of depletion flocculated emulsions. *Colloids and Surfaces A*, **203**, 11-20.

Belyakova, L.E., Antipova, A.S., Semenova, M.G., Dickinson, E., Merino, L.M. & Tsapkina, E.N. 2003. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids and Surfaces B*, **31**, 31-46.

- Bos, M.A. & van Vliet, T. 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, **91**, 437-471.
- Carr, A.J., Munro, P.A. & Campanella, O.H. 2002. Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions. *International Dairy Journal*. **12**, 487-492.
- Carić, M. 1994. *Concentrated and Dried Dairy Products*. VCH Publishers, Inc. New York.
- Chandrasekaran, R. & Radha, A. 1995. Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 143-148.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. & Lorient, D. 1989. *Proteínas alimentarias*. Acribia. Zaragoza, España.
- Dalgleish, D.G. 2006. Food emulsions-their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*. **20**, 415-422.
- Dalgleish, D.G. 1997. Structure-Function Relationships of Caseins. En *Food Proteins and Their Applications* (Damodaran, S. y Paraf, A. eds). Marcel Dekker, Inc. New York. 199-224.
- De Kruif, C.G. & Holt, C. 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. En *Advanced Dairy Chemistry Vol. 1*. Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. eds. Third edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. pp. 233-276.
- De Kruif, C. G. & Tuinier, R. 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, **15**, 555-563.

- Dickinson, E. 1992. *Introduction to Food Colloids*. Oxford University Press, Oxford.
- Dickinson, E. 1998. Rheology of emulsions-the relationship to structure and stability. En *Modern aspects of emulsion science* (B.P. Binks, ed.) The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. pp.145-174.
- Dickinson, E. 1999a. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, **9**, 305-312.
- Dickinson, E. 1999b. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B*. **15**, 161-176.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids*, **17**, 25-39.
- Dickinson, E. & Chen, J. 1999. Heat-set whey protein emulsion gels: role of active and inactive filler particles. *Journal of Dispersion Science and Technology*. **22** (1-2), 197-213.
- Dickinson, E. & Davies, E. 1999. Influence of ionic calcium on stability of sodium caseinate emulsions. *Colloids and surfaces B*. **12**, 203-212.
- Dickinson, E. & Golding, M. 1997. Rheology of sodium caseinate stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **191**, 166-176.
- Dickinson, E., Radford, S.J. & Golding, M. 2003. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, **17**, 211-220.

Dickinson, E., Semenova, M.G. & Antipova, A.S. 1998. Salt stability of casein emulsions. *Food Hydrocolloids*, **12**, 227-235.

Dickinson, E. Semenova, M.G., Belyakova, L.E., Antipova, A.S., Il'in, M.M., Tsapkina, E.N. & Ritzoulis, C. 2001. Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*. **239**, 87-97.

Dickinson, E. & Stainsby, G. 1982. *Colloids in Foods*. Applied Science Publishers, London.

Gibson, W. & Sanderson, G.R. 1997. Gellan gum. In *Thickening and gelling agents for food* (Imeson, A. ed.) 2n. ed. Blackie Academic and Professional, USA, 119-143.

Goh, K. K. T., Hainsman D. R. & Singh H. 2006. Characterization of a high acyl gellan polysaccharide using light scattering and rheological techniques. *Food Hydrocolloids*, **20**, 176-183.

Goursaud, J. 1991. La leche de vaca: composición y propiedades fisicoquímicas. En *La leche* (Luquet, F.M. ed.) Acribia. Zaragoza, España.

Hill, S.E. 1996. Emulsions. En *Methods of testing protein functionality*. (Hall, G.M. ed.) Blackie Academic and Professional, Londres.

Huang, X., Kakuda, Y. & Cui, W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, **15**, 533-542.

Ikeda, S., Nitta, Y., Temsiripong, T., Pongsawatmanit, R. & Nishinari, K. 2004. Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan. *Food Hydrocolloids*, **18**(5), 727-735.

Ivanov, I.B., Danov, K.D., Ananthapadmanabhan, K.P. & Lips, A. 2005. Interfacial rheology of adsorbed layers with surface reaction: on the origin of the dilatational surface viscosity. *Advances in Colloid and Interface Science*. **114-115**, 61-92.

Jampen, S., Britt, I.J. & Tung, M.A. 2000. Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. *Food Research International*, **33**, 579-586.

Jansson, P., Lindberg, B., & Sandford, P.A. 1983. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, **124**, 135-139.

Lucassen-Reynders, E.H. & Benjamins, J. 2001. Dilational rheology of proteins adsorbed at fluid interfaces. *En Food Colloids. Fundamentals of Formulation* (Dickinson E., Miller, R. eds.) Royal Society of Chemistry. 195-205.

Martínez-Padilla, L.P., López-Araiza, F. & Tecante, A. 2004. Steady and oscillatory shear behavior of fluid gels formed by binary mixtures of xanthan and gellan. *Food Hydrocolloids*, **18**, 471-481.

Mc Clements, D.J. 2005. *Food emulsions. Principles, practice, and techniques*. CRC Press Boca Raton, USA.

Milas, M., Shi, X. & Rinaudo, M. 1990. On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, **30**, 451-464.

Miller, R. & Fainerman, V.B. 2004. Interfacial rheology of adsorbed layers. En *Emulsions: Structure, Stability and Interactions*. (Petsev, D.N., ed.) Elsevier Academic press. London, pp. 61-90.

Miller, R. & Fainerman, V.B. 2005. Thermodynamics and kinetics of protein/surfactant mixtures adsorbed at liquid interfaces. En *Molecular Interfacial Phenomena of Polymers and Biopolymers* (Chen, P., ed.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, pp. 3-47.

Moritaka, H., Kimura, S. & Fukuba, H. 2003. Rheological properties of matrix-particle gellan gum gel: effects of calcium chloride on the matrix. *Food Hydrocolloids*. **17**, 653-660.

Morrison, I.D. & Ross, S. 2002. *Colloidal Dispersions. Suspensions, Emulsions, and Foams*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Murray, B.S., Faergemand, M., Trotereau, M. & Ventura, A. 2001. Comparison of the dynamic behavior of protein films at air-water interfaces. En *Food Colloids. Fundamentals of Formulation* (Dickinson, E., Miller, R. eds.) Royal Society of Chemistry. 223-235.

Petsev, D.N. 1998. Interactions and macroscopic properties of emulsions and microemulsions. En *Modern Aspects of Emulsion Science*. (Binks B.P., ed.) Royal Society of Chemistry, UK, 328-366.

Philippe, M., Le Graët, Y. & Gaucheron, F. 2005. The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry*, **90**, 673-683.

Quemada, D. & Berli, C. 2002. Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*, **98**, 51-85.

Robins, M.M. & Hibberd, D. 1998. Emulsion Flocculation and Creaming. En *Modern Aspects of Emulsion Science* (Binks, B.P., ed) The Royal Society of Chemistry, UK.

- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A. & Doublier, J. L. 2003. Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, **17**, 621-628.
- Rodríguez-Hernández, A. I. & Tecante, A. 1999. Dynamic viscoelastic behavior of gellan-i-carrageenan and gellan-xanthan gels. *Food Hydrocolloids*, **13**, 59-64.
- Roland, I., Piel, G., Delattre, L. & Evrard, B. 2003. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*. **263**, 85-94.
- Ross-Murphy, S.B. 1995. Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, **39**(6), 1451-1463.
- Sanderson, G.R. 1990. Gellan gum. In *Food Gels*. P. Harris (Ed.) pp. 201-232. Elsevier. USA
- Spagnuolo, P. A., Dalgleish, D. G., Goff, H. D. & Morris, E. R. 2005. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **19**, 371-377.
- Swaigood, H.E. 2003. Chemistry of the caseins. En *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. 1 3a ed. (Fox, P.F, McSweeney, P.L.H. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 139-202.
- Tako, M., Sakae, A. & Nakamura, S. 1989. Rheological properties of gellan gum in aqueous media. *Agricultural Biological Chemistry*. **53**(3) 771-776.
- Tang, J., Tung, M.A. & Zeng, Y. 1997. Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations. *Journal of Food Science*, **62**(4), 688-692.

- Tolstoguzov, V.B. 1997. Protein-polysaccharide interactions. En *Food Proteins and their Applications* (Damodaran, S., Paraf, A., eds.) Marcel Dekker, Ink. New York, 171-198.
- Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, **9**, 189-192.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. & Morris, V. 2004. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **108-109**, 63-71.
- Williams, A., Janssen, J.J.M. & Prins, A. 1997. Behaviour of droplets in simple shear flow in the presence of a protein emulsifier. *Colloids and Surfaces A*. **125**, 189-200.
- Ye, A., Flanagan, J., & Singh, H. 2006. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers*, **82**, 121-133.
- Ye, A., & Singh, H. 2001. Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food hydrocolloids*. **15**, 195-207.
- Yeung, A. & Zhang, L. 2006 Shear effects in interfacial rheology and their implications on oscillating pendant drop experiments. *Langmuir*, **22**, 693-701.



Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures

M.G. Sosa-Herrera^a, C.L.A. Berli^{b,c}, L.P. Martínez-Padilla^{a,*}

^aLaboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos, Departamento Ingeniería y Tecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Primero de mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 54740, México

^bINTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina

^cDepartamento de Física, FCB, UNL, El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina

Received 16 December 2006; accepted 8 May 2007

Abstract

This work discusses physicochemical properties (particle size distribution, electrokinetic potential, interfacial tension) and rheological responses of oil-in-water emulsions prepared with 30% sunflower oil and different sodium caseinate/gellan gum mixtures, at pH 5.4 and 25 °C. The characteristics of caseinate, gellan gum, and caseinate/gellan mixture solutions were studied first. They showed low viscosity values and almost Newtonian behavior. Addition of 5 mM CaCl₂ to the gellan solutions induced shear-thinning behavior, as well as the development of viscoelasticity. Both the viscosity and the elastic modulus of polysaccharide solutions were attenuated by the presence of protein. Emulsions without gellan in the aqueous phase were almost Newtonian, with relatively low viscosity values. When gellan concentration was 0.03% or higher, shear-thinning behavior and viscoelasticity were observed; these effects were negatively influenced by the addition of CaCl₂. Casein-covered oil droplets are dispersed in the background matrix formed by the polysaccharide and casein aggregates (filler particles). The emulsion is thus stabilized against both flocculation and creaming, while the rheological behavior strongly depends on the structural state of the polysaccharide. The interaction between caseinate and gellan appears to be the key factor to understand the resulting macroscopic behavior.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Emulsions; Casein; Gellan; Physicochemical characteristics; Rheology

1. Introduction

Protein–polysaccharide mixtures are commonly found in the food industry. In most of the applications, these biopolymers are used to formulate emulsion-based food systems. Products like ice cream, salad dressing, and mayonnaise are just a few examples. On mixing polysaccharides and proteins in water, one may face different situations: (a) miscibility, or co-solubility, occurring in dilute systems; (b) incompatibility, when there is a repulsive interaction between the biopolymers; and (c) coacervation, or complexation, when there is an attractive interaction (De Kruijff & Tuinier, 2001; Dickinson, 2003). Consistently,

the rheological properties of protein–polysaccharide dispersions depend on the characteristics of the constituents and, mainly, on the interaction forces between them, which in turn depend on temperature, pH, ionic strength, and previous treatments. A number of reports have considered the rheological properties of individual caseinate solutions (Carr, Munro, & Campanella, 2002; Dickinson et al., 2001; Farrer & Lips, 1999; Jahaniaval, Kakuda, Abraham, & Marcone, 2000; Konstance & Strange, 1991; Singh, Tamehana, Hemar, & Munro, 2003) or gellan systems (Bosco, Miertus, Dentini, & Segre, 2000; Jampen, Britt, & Tung, 2000; Milas, Shi, & Rinaudo, 1990; Nickerson, Paulson, & Speers, 2003; Rodríguez-Hernández, Durand, Garnier, Tecante, & Doublier, 2003; Sworn, Sanderson, & Gibson, 1995; Tang, Tung, & Zeng, 1997), but little is known about the flow properties of gellan/caseinate mixtures. In this context, the interest of the present work

*Corresponding author. Tel.: +52 55 56 23 20 38;

fax: +52 55 56 23 20 26.

E-mail address: lpmp@servidor.unam.mx (L.P. Martínez-Padilla).

is to better understand the role played by these mixtures in the preparation, stability, and rheology of oil-in-water emulsions. In particular, the rheological properties of food emulsions are among the most important physical attributes in either technical or aesthetic terms (McClements, 1999), and they are determined by many different factors, mainly physicochemical properties of the aqueous phase.

Milk protein ingredients are increasingly used in the food industry because of their specific functional properties. Caseins, which represent 80% of milk proteins and their caseinate derivatives, are now used in dairy as well as in non-dairy products. In foods, the nutritional quality of casein products is an important property. However, caseinates are in particular demand as functional food ingredients, in which their surface properties predominate (Carr, Southward, & Creamer, 2003). These proteins are currently used in a variety of products, including those of low pH such as imitation cheeses and yoghurt. Commercial sodium caseinate is a variable multicomponent mixture containing four major constituents, α_{s1} , α_{s2} , β , and κ -casein, in the proportion 3:0.8:3:1 by weight (Jahaniaval et al., 2000). This dissolves readily in water to give a translucent solution, when the pH of the medium is slightly different from the isoelectric point of the protein, which is $pI \approx 4.6$. These solutions contain no ionic material other than the protein itself and Na^+ . When Ca^{2+} ions are added, casein molecules are expected to form aggregates, which typically have diameters of 100 nm (see, for instance, De Kruif & Holt, 2003).

On the other hand, gellan gum is a bacterial polysaccharide produced by *Sphingomonas elodea* (Sworn et al., 1995). The deacylated form is an anionic polysaccharide composed of a tetrasaccharide repeat unit of β -D-glucose, β -D-glucuronic acid, and α -L-rhamnose in a molar ratio of 2:1:1. X-ray diffraction data conducted on lithium-gellan indicated that the molecular structure is an extended, intertwined, threefold left-handed double helix where the polysaccharide is stabilized by interchain hydrogen bonds (Attwood, Atkins, Upstill, Miles, & Morris, 1986). Gellan forms firm, hard, and brittle gels, with gelation being dependent on the type of cation, ionic strength, temperature, and polymer concentration (Goh, Hainsman, & Singh, 2006; Ikeda, Nitta, Temsiripong, Pongsawatmanit, & Nishinari, 2004; Sanderson, 1990). The gelation mechanism has been explained as a two-step process in which the first step is helix ordering, followed by interaction between double helices (Milas et al., 1990). The aggregation of the double helices follows different mechanisms: in the presence of divalent ions, at a given ionic strength, gellan gels are firmer and harder than those from monovalent ions (Rodríguez-Hernández et al., 2003). Computer modeling based on potassium-gellan data (Chandrasekaran, Lee, Radha, & Thailambal, 1992) showed that carboxylate–cation⁺–water–cation⁺–carboxylate interactions are expected to be replaced by stronger carboxylate–cation²⁺–carboxylate interactions in the presence of bivalent ions, which render higher capacity of

cross-linking for adjacent helices. Thus, the addition of Ca^{2+} can produce substantial effects in both solution viscosity and emulsion properties.

The aim of this work was to investigate the relationship between the rheological properties of oil-in-water emulsions and the physicochemical characteristics of the aqueous phase, which consists of a semi-dilute solution of caseinate/gellan mixtures at pH 5.4. Although sodium caseinate has poor solubility near this pH, their major protein fractions present enhanced functional properties in relation to higher pHs. The increased emulsifying capacity, for example, appears to be related to changes in protein conformation, which results in the exposure of unique hydrophobic domains on protein surfaces (Dickinson, 1999; Dickinson, Semenova, & Antipova, 1998; Jahaniaval et al., 2000).

We firstly studied the properties of protein–polysaccharide solutions, and then the emulsion prepared by using these solutions as aqueous phase. It may be anticipated that the rheology of caseinate/gellan solutions, as well as that of emulsions prepared with these solutions, appears to be dominated by the polysaccharide. In fact, depending on the concentration of gellan, as well as on the presence of Ca^{2+} ions, emulsions ranged from low-viscosity, milk-like liquids, right up to thick, cream-like materials with apparent yield stresses. Results are discussed on the basis of the possible interactions between gellan and caseinate in solution.

2. Materials and methods

2.1. Aqueous systems

Sodium caseinate (Lactonat EN, Lactoprot, Germany), ~96% dry matter, supplied by ADYFARM S.A. de C.V. and food grade gellan gum (Kelcogel F, Kelco, USA), ~90% dry matter, were used without any pretreatment. Analytical grade chemicals included calcium chloride (5mM) and sodium azide (as an antimicrobial agent 0.03%). All concentrations are given as a weight percentage. Aqueous acetate buffer (pH 5.4, 80mM Na^+) was used as solvent, considering that its dissociation constant is in close proximity with the pH selected.

Duplicate aqueous caseinate solutions (2%) were prepared by adding the protein powder to acetate buffer and then, stirring for 60 min at room temperature to ensure complete dispersion, 5mM of calcium chloride was dissolved in the buffer before caseinate was added. Duplicate gellan solutions (0.06% and 0.1%) were prepared by dissolving the powder in buffer at room temperature under magnetic stirring and heating the dispersions at 90 °C for 10 min. Solutions were weighed and acetate buffer was added to make up any weight lost in evaporation. Calcium chloride salt (5mM), previously dissolved in the compensation solvent, was added to the hot gellan solutions.

Blends of protein–polysaccharide were made by mixing equal parts of duplicate aqueous solutions of individual

Table 1

Protein–polysaccharide solutions studied and their main physicochemical characteristics at pH 5.4 and 25 °C: interfacial tension (γ), electrokinetic potential (ζ), and high-shear viscosity ($\eta_{AP}^{\infty} \rightarrow 10^3 \text{ s}^{-1}$) relative to that of water (η_W)

System	Nomenclature	γ (mN/m)	ζ (mV)	$\eta_{AP}^{\infty}/\eta_W$
Caseinate 1%	P	11.62	−12.6	1.14 ^a
Caseinate 1%, 5 mM CaCl_2	P–Ca	9.69	−11.0	1.21 ^a
Gellan 0.03%	G3	12.20	−24.5	~2.5
Gellan 0.03%, 5 mM CaCl_2	G3–Ca	14.22	−21.2	~3.2
Gellan 0.03%, caseinate 1%	G3–P	8.28	−24.0	2.34 ^a
Gellan 0.03%, caseinate 1%, 5 mM CaCl_2	G3–P–Ca	7.67	−18.4	~2.5
Gellan 0.05%	G5	17.05	−22.3	~2.5
Gellan 0.05%, 5 mM CaCl_2	G5–Ca	16.15	−17.8	~8.2
Gellan 0.05%, caseinate 1%	G5–P	10.62	−26.2	1.89 ^a
Gellan 0.05%, caseinate 1%, 5 mM CaCl_2	G5–P–Ca	9.11	−16.8	~3.6

^aNewtonian behavior in the range $1 \leq \dot{\gamma} \leq 10^3 \text{ s}^{-1}$.

components. For blends, calcium chloride was always added in the caseinate system. All samples studied are summarized in Table 1.

2.2. Emulsion preparation

Emulsions were prepared with commercial sunflower oil (Great Value, Wal-Mart México S. A. de C. V.), at 25 °C, monitored with a laser sensor (Raytek, Minitemp, Oakton Instruments, USA). Appropriate quantities of sunflower oil were mixed with the protein–polysaccharide mixture solutions and individual caseinate systems mentioned above to give 30% (w/w) oil in the final emulsion. Sunflower oil was added slowly (2 mL/min) to the aqueous phase containing the hydrocolloids at room temperature, by stirring at 700 rpm (Labo-stirrer 41, Yamato Scientific Co., Ltd., Japan). Lab-scale manufacture of emulsions was carried out using a Silverson L4R mixer (Silverson Machines Ltd., UK). Emulsions were prepared at 8000 rpm for 5 min at room temperature. The final pH of emulsions was measured with a pH meter (Testr3, Oakton Instruments) and the values were between 5.4 and 5.5.

2.3. Physicochemical characterization

Electrokinetic potential and particle size distribution of casein aggregates, in the presence of gellan and Ca^{2+} ions, were measured using a Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcester, UK). Protein solutions yielded satisfactory photon counts without dilution. In the instrument, the size of the particles is measured by observing the scattering of laser light from these particles, determining the diffusion speed and deriving the size from this, using the Stokes–Einstein relationship. This method is called dynamic light scattering (DLS). The measured data in a DLS experiment is the intensity autocorrelation curve. Embodied within the autocorrelation curve is all of the information regarding the size distribution of the ensemble collection of particles in the solution.

Mean droplet size and droplet size distribution of the emulsion were measured with a low-angle laser diffraction system, Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcester, UK). The fundamental size distribution derived by this technique is volume based, which uses the Mie theory. The refractive index was 1.456 for emulsion particle and 1.33 for dispersion medium. The absorbance value of emulsion particle was 0.001.

A pendant drop tensiometer PAT-1 (Sinterface Technologies, Berlin, Germany) was used to measure interfacial tension. Normally, a pendant drop of oil is formed at the tip of a capillary. The silhouette of the drop is cast onto a CCD camera and digitized. The digital images of the drop are recorded over time and fit to the Young–Laplace equation to accurately ($\pm 0.1 \text{ mN/m}$) determine interfacial tension. All experiments were performed at 25 °C.

2.4. Rheology

A stress rheometer (Low stress LS 100, Paar Physica, Spring, TX, USA) with a double-gap concentric cylinder (DG10, 48 and 50 mm internal and external diameter, respectively, 36 mm length and radii ratio of 1.0417, $r_4/r_3 = r_2/r_1$) was used for oscillatory and steady shear measurements. Flow curves were obtained by using two up–down step programs. Different shear stress ranges were applied depending on sample characteristics. The temperature was maintained at 25 ± 1 °C. Measurements of emulsions were made within 10 min of sample preparation. Prior to oscillatory experiments, stress/strain sweeps were carried out to ensure that measurements were always within the linear viscoelastic regime.

3. Results and discussion

3.1. Aqueous phase

Caseinate forms aggregates around 100 nm in size (Fig. 1a). On addition of CaCl_2 , some larger particles were formed, probably because of the binding of Ca^{2+} to free

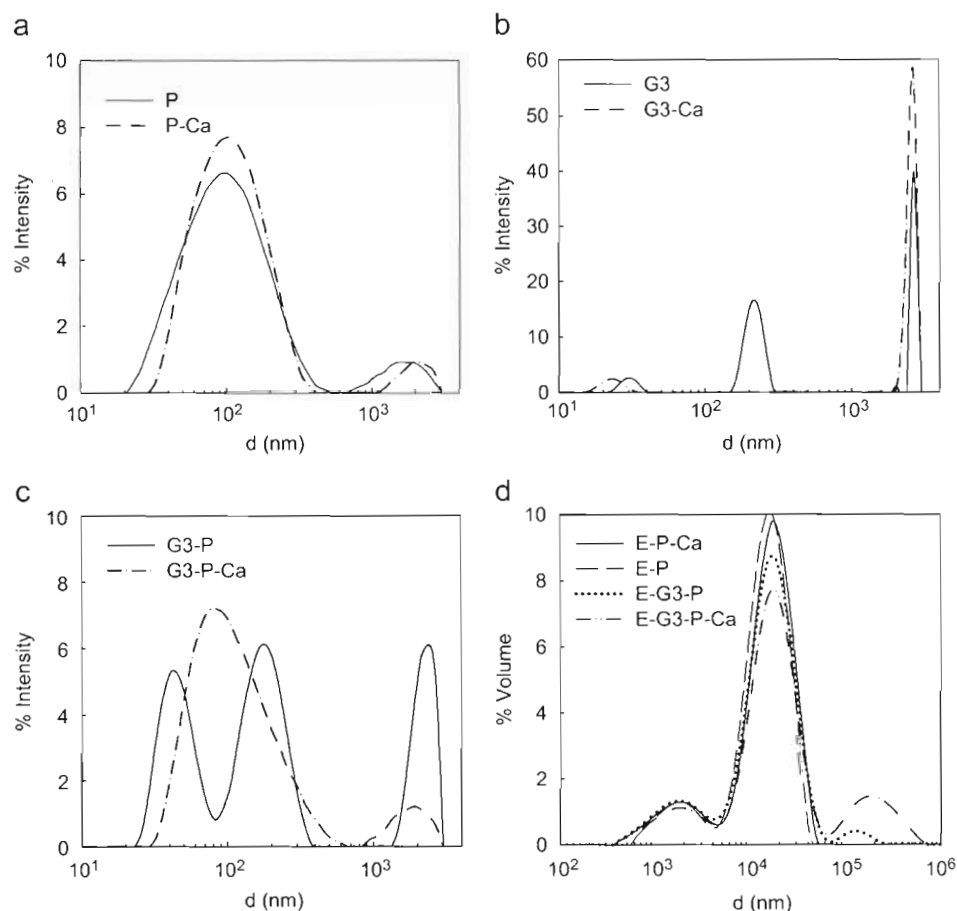


Fig. 1. Particle size distribution: (a) sodium caseinate solution; (b) gellan gum solution; (c) caseinate/gellan mixture solution; (d) emulsions with the previous solutions as the aqueous phase (pH 5.4 and 25 °C) (samples identified as in Table 1; E corresponds to an emulsion).

ends of β -casein or α_{s1} -casein, as suggested by Mellema, Leermakers, and De Kruif (1999). In the case of gellan solutions (Fig. 1b), size distribution can be attributed to molecular associations promoted by cations present in the buffer (Milas et al., 1990), taking into account that the size of an individual gellan molecule is 20–30 nm (Goh et al., 2006). When CaCl_2 is added, an increase in the proportion of very large particles is observed (almost monomodal distribution at ~ 2000 nm). Indeed, it is known that gellan molecules associate more effectively in the presence of bivalent ions, particularly Ca^{2+} (Tako, Sakae, & Nakamura, 1989; Tang et al., 1997). Therefore, based on our results and those reported in the literature (for instance, Ikeda et al., 2004), it may be concluded that gellan solutions form local network structures, similar to hydrogels.

Mixtures of caseinate and gellan exhibited a trimodal distribution in the absence of Ca^{2+} (Fig. 1c). Relatively large (~ 2000 nm) and small (~ 50 nm) aggregates, as well as particles of around 200 nm are observed, indicating that some intermediate ‘complexes’ were formed. As indicated by ζ -potential values in Table 1, both polymers are

negatively charged at pH 5.4; hence coacervation is, in principle, not possible. Nevertheless, casein molecules exhibit positively charged regions on the surface (residues 97–112 of κ -casein; Spagnuolo, Dalgleish, Goff, & Morris, 2005). This is important because the possible complexation between gellan chains and casein particles could be due to electrostatic interaction, as reported for different protein–polyelectrolyte systems (De Kruif & Tuinier, 2001; Dickinson, 2003), and recently for sodium caseinate/gum arabic mixtures (Ye, Flanagan, & Singh, 2006). In this sense, two aspects are worth mentioning here: (i) the pH of the solutions is scarcely higher than the pI of casein and (ii) the ionic strength of solutions is relatively high. Under these circumstances, the repulsive interaction between negatively charged portions of casein and gellan chains is relatively low; hence the complexation seems to be possible. Apart from this ionic interaction, intermolecular hydrogen bonding may also take place, as suggested for casein/gelatin mixtures (Dickinson, 2003). When CaCl_2 was added, however, the size distribution of caseinate/gellan mixtures became similar to that of casein aggregates (Fig. 1c compared to Fig. 1a). These data suggest that

casein molecules are much more effective than gellan in competing for Ca^{2+} ; hence the re-constitution of aggregates is readily attained after adding CaCl_2 .

In order to corroborate that the isolated caseinate/gellan samples are good models for the emulsion matrix, we studied the particle size distribution in the aqueous phase of the emulsions after the emulsification process, and compared the results with those from the original polymer solutions. As shown in Fig. 2, nano-particles other than casein aggregates (100 nm) are present both before and after the treatment at 8000 rpm (emulsification). Of course, there are some minor changes in the size distribution curves, notably the disappearance of the bigger particles (2000 nm) in the case of caseinate/gellan mixtures. In any case, these results show that, even if isolated caseinate/gellan samples have not undergone the shear history of emulsions, the corresponding aqueous phases exhibit rather similar microstructures.

In Fig. 3, the flow properties of caseinate/gellan mixtures are compared with those of individual gellan and caseinate aqueous solutions at pH 5.4 and 25 °C. Under steady shear, sodium caseinate solutions showed low viscosity values and Newtonian behavior, independently of the addition of CaCl_2 . Gellan gum solutions (0.03%) were also Newtonian for $\dot{\gamma} > 1 \text{ s}^{-1}$, but the addition of CaCl_2 induced a substantial increase in viscosity, as well as the appearance of shear-thinning behavior; even a yield stress was observed, as reported previously (Martínez-Padilla, López-Araiza, & Tecante, 2004). Such behavior is due to the fact that, as discussed above, gellan is able to form three-dimensional networks of different densities and degrees of connectivity in the presence of Ca^{2+} ions.

Fig. 3 also shows that caseinate/gellan mixtures in the presence of Ca^{2+} displayed viscosity curves with the overall shape of that of gellan/ Ca^{2+} , but with lower apparent viscosity. To better discuss this result, here we first present typical viscoelastic measurements: Fig. 4 shows

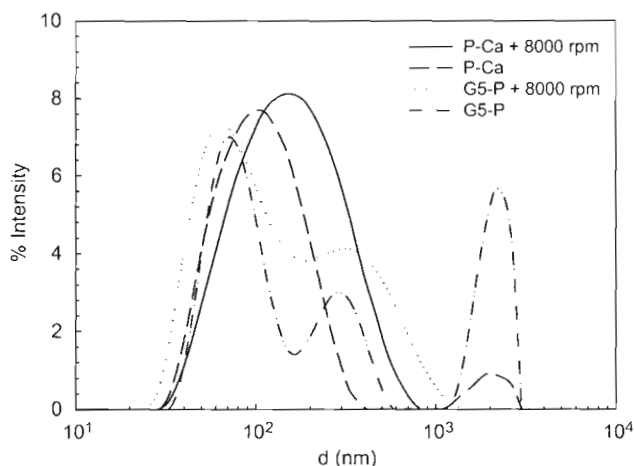


Fig. 2. Particle size distribution of caseinate and caseinate/gellan systems under different shear history of samples at pH 5.4 and 25 °C (samples identified as in Table 1).

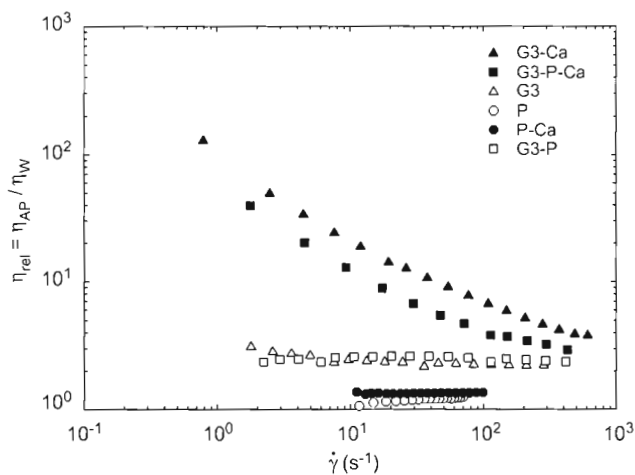


Fig. 3. Suspension viscosity, relative to that of water, as a function of shear rate, for different biopolymer systems at pH 5.4 and 25 °C (samples identified as in Table 1).

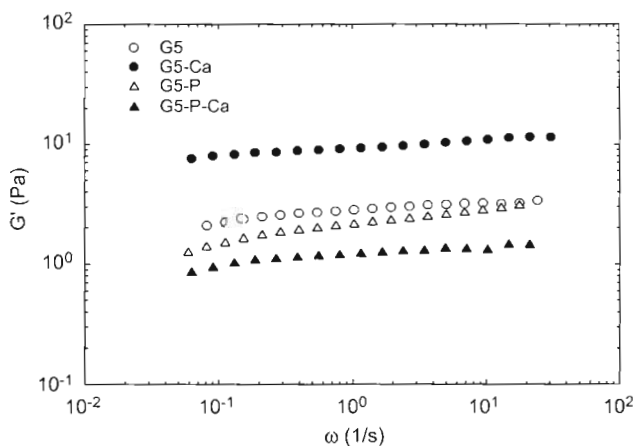


Fig. 4. Suspension storage modulus as a function of frequency, for different biopolymer systems at pH 5.4 and 25 °C (samples identified as in Table 1).

the dynamic modulus of gellan (0.05%) and gellan/caseinate solutions, both as prepared and after the addition of CaCl_2 (5 mM). As expected, the polysaccharide gel is strengthened in the presence of Ca^{2+} , due to intermolecular linkage of the bivalent ions. Nevertheless, the storage modulus of the matrix is attenuated by the presence of casein aggregates, the effect being stronger upon addition of Ca^{2+} . It is then observed that the rheology of these mixtures is governed by the polysaccharide chains, and eventually modified by the presence of casein aggregates and Ca^{2+} .

In order to rationalize these results, it may be thought that the polysaccharide constitutes a matrix, in which casein aggregates would act as filler particles. This speculation is in agreement with the microstructure observed in casein/ κ -carrageenan mixtures, where polysaccharide

chains form a weak matrix in which casein particles are trapped (Alexander & Dalgleish, 2007; Spagnuolo et al., 2005). Moreover, in the framework suggested by Chen and Dickinson (1999), casein particles should be regarded as *inactive* fillers, as they contribute negatively to the viscosity of gellan solution (somehow inhibiting the cross-linking between gellan chains, and hence weakening the polysaccharide matrix). This assumption implies that some kind of protein–polysaccharide binding exists, as mentioned above. Further, the fact that the weakening of the matrix is stronger with CaCl_2 could be associated with the regeneration of casein aggregates induced by Ca^{2+} ions (Fig. 1c). These results are in close agreement with those reported by Moritaka, Kimura, and Fukuba (2003), where filler particles consisted of gellan microgels. In our case, casein particles appear to always act as *inactive* fillers, whereas the magnitude of the effect depends on the presence of Ca^{2+} ions. In addition, it should be taken into account that bivalent ions strongly increase the ionic strength, and decrease the interfacial tension (γ) as well as the electrokinetic potential (ζ) (Table 1), though the effect of this change on the polysaccharide matrix is not clear yet.

3.2. Emulsions

Fig. 1d shows the oil droplet size distributions obtained for emulsions with different aqueous phases. It is observed that the particle size distribution curves do not depend appreciably on the presence of polysaccharide, except for the small particle fraction that appears at highest diameters (100,000 nm). Indeed, particle size distribution curves in Fig. 1d appear rather monomodal, with a well-defined peak, and an average volume-to-surface diameter of $d_{32} \approx 6 \mu\text{m}$ in all cases ($d_{32} = \sum_i n_i d_i^3 / \sum_i n_i d_i^2$, where n_i is the number of droplets with diameter d_i).

With these data and the interfacial tension values (γ) reported in Table 1, the Laplace pressure of oil droplets was estimated as $\Pi_L = 4\gamma/d_{32} \approx 8000 \text{ Pa}$. When the applied shear stress, $\eta_W \dot{\gamma}$ approach Π_L , droplets extend, rupture, and eventually coalesce. For the highest shear rate used in our experiments, the ratio $\eta_W \dot{\gamma} / \Pi_L$ (also known as the capillary number Ca) is in the order of 10^{-4} .

The concentration of caseinate adsorbed at the interface can be calculated as $C_{ad} \approx 6\Gamma\phi_{oil}/d_{32}$, where $\Gamma \approx 3 \text{ mg/m}^2$ is the protein surface coverage (Dickinson & Golding, 1997). Considering a $\phi_{oil} \approx 0.32$ and a $C_{ad} \approx 0.96 \text{ g/L}$, the reduction of caseinate concentration in the bulk aqueous phase of emulsions is negligible (initial protein concentration in the aqueous phase is 10 g/L).

A multi-component system is obtained after emulsification. Despite the complexity, the system may be regarded as a suspension of colloidal particles (casein-covered oil droplets) in a polymer mixture solution (gellan chains and casein aggregate). When polymer chains are present in a suspension of colloidal particles, particle–particle aggregation is generally observed. The mechanism involved is either bridging (polymer chains adsorb onto particle

surfaces) or depletion (polymer chains are excluded from a layer next to the particles). The occurrence of these mechanisms also depends on the concentration and relative size of polymer chains. In the case of the emulsions considered here, the concentration of gellan is high enough to form a weak ‘gel’ in solution. Therefore, instead of being aggregated and phase separated, oil droplets appear to be well dispersed and hold in the background polymer matrix. The emulsion is thus stabilized against both flocculation and creaming, while the rheological behavior strongly depends on the structural state of the polysaccharide matrix, which is influenced by the presence of oil droplets.

For the purposes of our discussions below, here we introduce a scaling relation to distinguish the relative contribution of oil droplets and polymer solution to the viscosity of the whole system. As a first approximation, the emulsion viscosity at high shear rates ($\dot{\gamma} \rightarrow \infty$) can be interpreted as $\eta_E^\infty = \eta_{AP}^\infty (1 - \phi_{eff}/\phi_m)^{-2}$, where $\eta_{AP}^\infty = \eta_{AP}(\dot{\gamma} \rightarrow \infty)$ is the limiting viscosity of the aqueous phase (Table 1) and $(1 - \phi_{eff}/\phi_m)^{-2}$ is a general relationship between viscosity and effective volume fraction for concentrated colloidal dispersions (Quemada, 1982). In this expression, $\phi_m \approx 0.71$ is the maximum packing fraction for $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$. Besides, for the emulsions considered here, $\phi_{eff} \approx \phi_{oil} \approx 0.32$; hence $(1 - \phi_{oil}/\phi_m)^{-2} \approx 3.31$. Here, oil droplets are assumed to behave as rigid spheres, considering that $Ca \ll 1$, which means that droplets are not greatly deformed by shear forces.

Fig. 5 presents steady-state flow curves of oil-in-water emulsions prepared with 30% (w/w) sunflower oil, by employing the different aqueous solutions discussed above. It is clearly seen that the rheological response of emulsions highly depends on polysaccharide concentration. In fact, if there are no gellan chains in the aqueous phase, emulsions are almost Newtonian with relatively low viscosity values, as expected for non-aggregated, moderately concentrated emulsions (Berli, Quemada, & Parker, 2002; Dickinson &

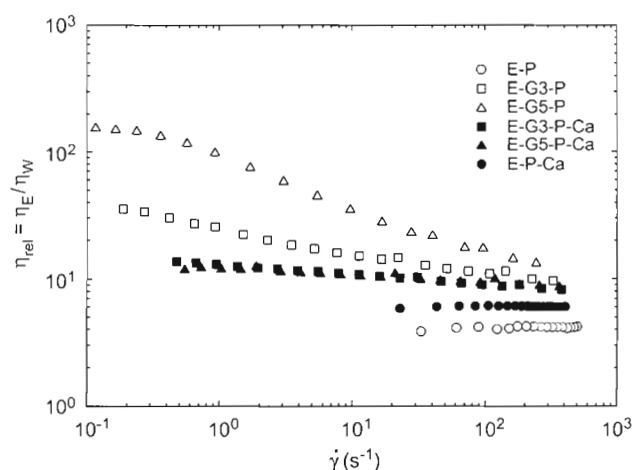


Fig. 5. Emulsion viscosity, relative to that of water, as a function of shear rate, for different biopolymer systems used as aqueous phase (pH 5.4 and 25 °C) (samples identified as in Table 1; E corresponds to an emulsion).

Golding, 1997). If gellan is present, the emulsion viscosity increases and shear-thinning behavior is observed. Both effects are improved with polysaccharide concentration. By analogy to the results discussed above for the aqueous phase (polymer mixtures without oil), the addition of CaCl_2 has a negative effect on both emulsion viscosity and shear-thinning behavior. One of the possible effects of Ca^{2+} ions is the formation of droplet aggregates through some Ca^{2+} -mediated bridging, as suggested by the particle size distribution in Fig. 1d. These aggregates could further disturb the formation of the polysaccharide matrix.

In any case, it is observed that viscosity values at high shear rates (strictly speaking, for $\dot{\gamma} \rightarrow 10^3 \text{ s}^{-1}$ in Fig. 5) are predicted fairly well by multiplying the corresponding η_{AP}^∞ reported in Table 1 by the factor 3.31, which comes from the oil droplets volume fraction. In principle, this implies that $\eta_E(\dot{\gamma}) > \eta_{AP}(\dot{\gamma})$. Nevertheless, one must be careful to extrapolate this prediction to the lowest shear rates. In fact, a rather interesting feature appears when emulsion flow curves are compared with those of the respective aqueous phases in the presence of Ca^{2+} : the low-shear viscosity of emulsions is one order of magnitude lower than that of the aqueous phase (Fig. 6). On the other hand, the high-shear viscosity of emulsions is around three times higher than that of the aqueous phase. Consistently, the slopes of the curves $\eta_E(\dot{\gamma})$ in Fig. 6 are significantly lower than those of $\eta_{AP}(\dot{\gamma})$. These results show that casein-covered oil droplets also act as filler particles in the polysaccharide matrix, as discussed above in relation to casein aggregates (Section 3.1). Further, the fact that $\eta_E(\dot{\gamma} \rightarrow 0) \ll \eta_{AP}(\dot{\gamma} \rightarrow 0)$ indicates that somehow oil droplets inhibit the formation of the polysaccharide matrix, which is responsible for the marked shear thinning displayed by the aqueous solutions without oil. At high shear rates, where the polymer network completely breaks up due to shear forces, the main contribution to emulsion viscosity is the

hydrodynamic effect of oil droplets acting as hard spheres under flow; thus $\eta_E(\dot{\gamma} \rightarrow \infty) \gg \eta_{AP}(\dot{\gamma} \rightarrow \infty)$.

The viscoelastic behavior of emulsions is in agreement with the characteristics of the shear flow response. In fact, Fig. 7 compares the elastic modulus of emulsions with that of polymer solutions used as aqueous phase. It is observed that, while the mixture solution acts like an elastic network (mainly with gellan 0.05%, where $G'(\omega)$ values are nearly constant), the respective emulsion acts rather like a soft 'gel', without a defined plateau and with $G'(\omega)$ steeply approaching zero at low frequencies. It is worth noting, however, that, except at low frequencies, the storage modulus of emulsions is higher than that of the polymer solutions, which is due to the presence of suspended particles (oil droplets) that ideally contribute to the modulus as $G' \sim \Pi_L$ (Chen & Dickinson, 1999). This is the main contribution to emulsion elasticity, taking into account that the curves $G'(\omega)$ of emulsions with different gellan concentrations superimpose in Fig. 7. This independence of $G'(\omega)$ with the gellan concentration (already observed for $\eta(\dot{\gamma})$ in Fig. 5) means that the polysaccharide matrix is strongly debilitated by the presence of oil droplets. Further, the fact that Π_L values are much higher than the G' values measured suggests that the coupling between droplet surfaces and the polysaccharide matrix is weak.

The soft 'gel' behavior of emulsions invoked above is more clearly observed in Fig. 8, where $G'(\omega)$ is higher than $G''(\omega)$, in the range of ω tested, thus indicating a predominantly elastic response, with viscous fluid-like behavior only at low frequencies. It should be remarked, however, that emulsions are less elastic in nature than gellan solutions, as discussed above in relation to Fig. 7.

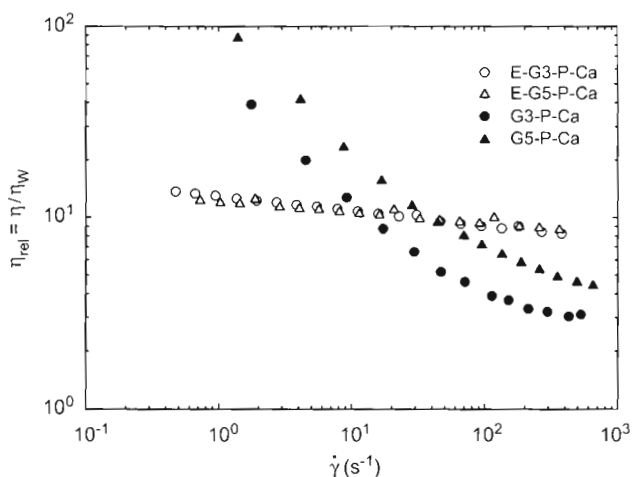


Fig. 6. Viscosity, relative to that of water, of both emulsion and the respective polymer systems, as a function of shear rate (pH 5.4 and 25 °C) (samples identified as in Table 1; E corresponds to an emulsion).

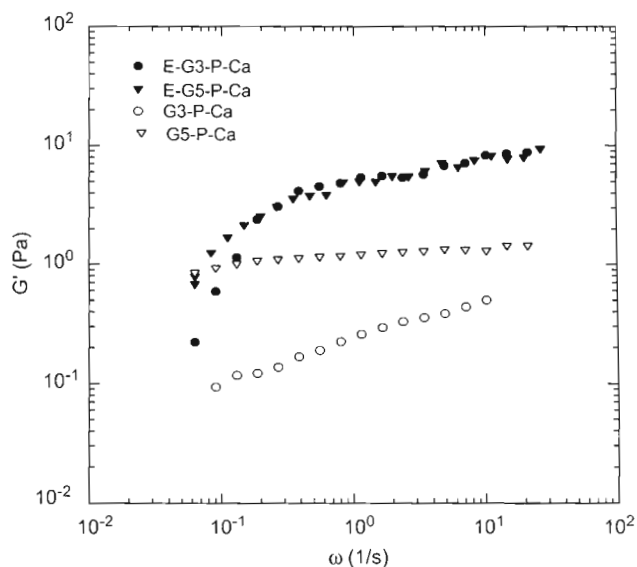


Fig. 7. Storage modulus of emulsions and the respective polymer systems, as a function of the frequency of oscillation (pH 5.4 and 25 °C) (samples identified as in Table 1; E corresponds to an emulsion).

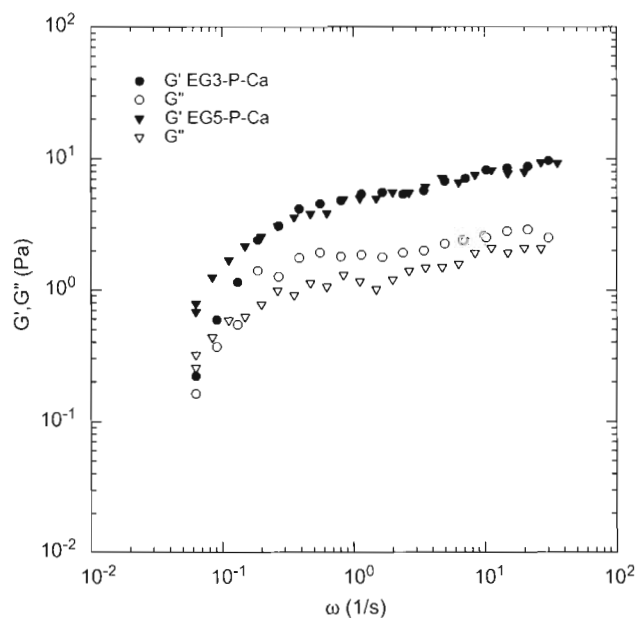


Fig. 8. Storage and loss moduli of emulsions as a function of the frequency of oscillation (pH 5.4 and 25 °C) (samples identified as in Table 1; E corresponds to an emulsion).

4. Conclusions and further research

The present work basically deals with the relationship between rheological properties of caseinate-stabilized oil-in-water emulsions and the physicochemical characteristics of the aqueous phase, which consists of a semi-dilute solution of gellan gum. The concentration of polysaccharide used, in the presence of Ca^{2+} , is above that required for the formation of a continuous network. Thus, oil droplets appear to be well dispersed and held in the background polymer matrix. The emulsion is stabilized against both flocculation and creaming, while the rheological behavior strongly depends on the structural state of the polysaccharide matrix, which is influenced by the presence of oil droplets and casein aggregates acting as filler particles. Therefore, the interaction between casein-covered oil droplets and gellan chains appears to be the crucial aspect to understand. Many inferences can be made from the physicochemical data reported here, like the complexation between casein/gellan particles. Nevertheless, we have to admit that the interaction of caseinate with gellan is not clear yet, and hence the effect of oil droplets on the polysaccharide matrix needs further investigation. In this sense, further studies in our laboratory will consider different oil volume fractions, caseinate concentrations, and pH. Another interesting aspect to investigate is the effect of both pH and ionic strength on the polysaccharide solution, as well as the electron microscopy of emulsions. Finally, although several questions still arise, one may observe that a step towards understanding the role played by caseinate/gellan mixtures in the rheology of oil-in-water emulsions has been made.

Acknowledgments

This study was financed by a grant from DGAPA-UNAM (project IX 110604). M.G. Sosa-Herrera acknowledges receipt of a doctoral fellowship from CONACYT (México) and educational leave of absence from UNAM FES-Cuautitlán (México). C.L.A. Berli wishes to thank the financial aid received from SEPCYT-FONCyT (PICT 09-14732) and CONICET, Argentina.

References

- Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007). The interaction of casein micelles with κ -carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 21, 128–136.
- Attwood, P. T., Atkins, E. D. T., Upstill, C., Miles, M. J., & Morris, V. J. (1986). Gellan gum; an X-ray fiber diffraction study. In G. O. Phillips, D. J. Wedlock, & P. Williams (Eds.), *Gums and stabilizers for the food industry*, Vol. 3 (pp. 135–145). USA: Elsevier.
- Berli, C. L. A., Quemada, D., & Parker, A. (2002). Modelling the viscosity of depletion flocculated emulsions. *Colloids and Surfaces A*, 203, 11–20.
- Bosco, M., Miertus, S., Dentini, M., & Segre, A. L. (2000). The structure of gellan in dilute aqueous solution. *Biopolymers*, 54, 115–126.
- Carr, A. J., Munro, P. A., & Campanella, O. H. (2002). Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions. *International Dairy Journal*, 12, 487–492.
- Carr, A. J., Southward, C. R., & Creamer, L. K. (2003). Protein hydration and viscosity of dairy fluids. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry*, Vol. 1, *Proteins* (3rd ed.) (pp. 1289–1323). USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Chandrasekaran, R., Lee, E. J., Radha, A., & Thailambal, V. G. (1992). Correlation of molecular architectures with physical properties of gellan related polymers. In R. Chandrasekaran (Ed.), *Frontiers in carbohydrate research* (pp. 65–84). London: Elsevier.
- Chen, J., & Dickinson, E. (1999). Effect of surface character of filler particles on rheology of heat-set whey protein emulsion gels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 373–381.
- De Kruij, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry* (Vol. 1, 3rd ed.) (pp. 233–276). USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- De Kruij, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555–563.
- Dickinson, E. (1999). Casein in emulsions: Interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, 9, 305–312.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Dickinson, E., & Golding, M. (1997). Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191, 166–176.
- Dickinson, E., Semenova, M. G., & Antipova, A. S. (1998). Salt stability of casein emulsions. *Food Hydrocolloids*, 12, 227–235.
- Dickinson, E., Semenova, M. G., Belyakova, L. E., Antipova, A. S., Il'in, M. M., Tsapkina, E. N., et al. (2001). Analysis of light scattering data on the calcium ion sensitivity of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 239, 87–97.
- Farrer, D., & Lips, A. (1999). On the self-assembly of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 9, 281–286.
- Goh, K. K. T., Hainsman, D. R., & Singh, H. (2006). Characterization of a high acyl gellan polysaccharide using light scattering and rheological techniques. *Food Hydrocolloids*, 20, 176–183.
- Ikeda, S., Nitta, Y., Temsiripong, T., Pongsawatmanit, R., & Nishinari, K. (2004). Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 727–735.

- Jahaniavai, F., Kakuda, Y., Abraham, V., & Marcone, M. (2000). Soluble protein fractions from pH and heat treated sodium caseinate: Physicochemical and functional properties. *Food Research International*, 33, 637–647.
- Jampen, S., Britt, I. J., & Tung, M. A. (2000). Gellan polymer solution properties: Dilute and concentrated regimes. *Food Research International*, 33, 579–586.
- Konstance, R. P., & Strange, E. D. (1991). Solubility and viscous properties of casein and caseinates. *Journal of Food Science*, 56(2), 556–559.
- Martínez-Padilla, L. P., López-Araiza, F., & Tecante, A. (2004). Steady and oscillatory shear behavior of fluid gels formed by binary mixtures of xanthan and gellan. *Food Hydrocolloids*, 18, 471–481.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions. Principles, practice and techniques*. USA: CRC Press.
- Milas, M., Shi, X., & Rinaudo, M. (1990). On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, 30, 451–464.
- Mellema, M., Leermakers, F. A. M., & De Kruif, C. G. (1999). Molecular mechanism of the renneting process of skim milk examined by viscosity and light scattering experiments and simulated by SCF calculations. *Langmuir*, 15, 6304–6313.
- Moritaka, H., Kimura, S., & Fukuba, H. (2003). Rheological properties of matrix-particle gellan gum gel: Effects of calcium chloride on the matrix. *Food Hydrocolloids*, 17, 653–660.
- Nickerson, M. T., Paulson, A. T., & Speers, R. A. (2003). Rheological properties of gellan solutions: Effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation. *Food Hydrocolloids*, 17, 577–583.
- Quemada, D. (1982). Unstable flows of concentrated suspensions. *Lecture Notes in Physics*, 164, 210–247.
- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology–structure properties of gellan systems: Evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17, 621–628.
- Sanderson, G. R. (1990). Gellan gum. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 201–232). USA: Elsevier.
- Singh, H., Tamehaja, M., Hemar, Y., & Munro, P. A. (2003). Interfacial compositions, microstructures and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ -carrageenan: I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 17, 539–548.
- Spagnuolo, P. A., Dalgleish, D. G., Goff, H. D., & Morris, E. R. (2005). Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 19, 371–377.
- Sworn, G., Sanderson, G. R., & Gibson, W. (1995). Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocolloids*, 9, 265–271.
- Tako, M., Sakae, A., & Nakamura, S. (1989). Rheological properties of gellan gum in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), 771–776.
- Tang, J., Tung, M. A., & Zeng, Y. (1997). Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations. *Journal of Food Science*, 62(4), 688–692.
- Ye, A., Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers*, 82, 121–133.