



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE EMULSIONES EN
GEL DE κ -CARRAGENINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

PABLO ALEJANDRO FUENTES BARRÓN



MÉXICO, D.F.

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: Dra. Josefina Viades Trejo

VOCAL: Dr. Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Dr. Alberto Tecante Coronel

1er SUPLENTE: M. en C. María de los Ángeles Martínez Olmedo

2do SUPLENTE: M. en C. Ma. Lourdes Osnaya Suárez

SITIO DONDE SE DESARROLÓ EL TEMA

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
LABORATORIO 313 CONJUNTO "E", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. ALBERTO TECANTE CORONEL

SUSTENTANTE

PABLO ALEJANDRO FUENTES BARRÓN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y sobre todo a mi *alma mater* la Facultad de Química, por ser mi segunda casa y en ocasiones la primera durante esta etapa de mi vida, todos los momentos que viví en sus brazos estarán conmigo para siempre.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel, por su gran paciencia, dedicación, atenciones e instrucción para la realización de este trabajo.

A la I.A. Mariana Ramírez Gilly por el apoyo técnico en la realización de las pruebas reológicas para esta tesis.

A la Dra. Josefina Viádes Trejo y al Dr. Francisco Ruiz Terán por su amable tiempo para la revisión de este trabajo de tesis.

Al Sr. Ricardo Alonso por salvarnos de lavar el interminable material de vidrio que se utilizó día con día.

A todos mis profesores por los conocimientos transmitidos.

A las industrias alimenticias FABP, SA y Kelcogel, S.A. de C.V. por su amable contribución a este trabajo mediante las muestras de proteína otorgadas.

Muchas Gracias...

DEDICATORIAS

A mi mamá, mi universo entero, mi ejemplo de amor, compasión y dedicación, mi amiga, mi confidente y la persona que más admiro en este mundo. Con el ejemplo me enseñaste a sembrar, y hoy juntos estamos cosechando, esto es para ti y también todo lo que viene, gracias por haberme permitido venir a conocer todo lo maravilloso que ofrece esta vida, Te amo.

A mis abuelos, por demostrarme que cuando hay amor entre dos personas no importan las circunstancias ni el tiempo, no puedo sentirme mas afortunado por contar con dos personas tan maravillosas como ustedes en mi vida, gracias por el amor que me han hecho sentir siempre y en cada momento.

A mis tíos Mireya y Enrique y a mis primos Rodri, Beba y Enri, por ser el eslabón que completa a la familia, gracias primos por ser mis primeros amigos y por ser para siempre mis hermanos.

A Itza, por ser mi hermana mayor, por las pláticas de vino, los consejos, y sobre todo, por el cariño que siempre me has dado.

A los Fuentes Ramos, en especial a Yael y Airam, por renovar a la familia y recordarnos a todos que alguna vez fuimos niños, les deseo lo mejor en esta vida que apenas comienza para ustedes.

A Leslie, mi shimia, por haberme hecho tan feliz y ser una de las partes más importantes de mi vida, te agradezco de verdad por haberme enseñado a amar y como se siente el amor en todas sus facetas, siempre tendrás tu lugar intacto en mi corazón... Im glad I didn't die before I met you.

A mis mucho mas que amigos del alma y a sus familias por hacerme sentir siempre parte de la suya, David, Enrique, Iguana, Coque, Poncho, Julio, Ariel, Cesar, y Toño, por que a su lado he pasado los mejores momentos de mi vida. “El valor de los amigos es igual al de la familia, la única diferencia es que a la familia no se le escoge y a los amigos si”, no me queda duda alguna de que no pude haber escogido mejor. Gracias por haberme escogido también, y dejarme crecer a su lado, sigamos creciendo y acumulando más experiencias juntos alrededor de esta amistad que es para toda la vida.

A una de las personas mas extraordinarias y admirables que he conocido, al Dr. Alberto Tecante Coronel, por su gran paciencia, dedicación e instrucción para la realización de este trabajo, pero sobre todo a él ,por ser mucho más que mi profesor y tutor de tesis, por ser esa persona que a través de sus historias de vida y experiencias me transportó hacia momentos felices que nunca olvidaré aun cuando no los haya vivido, gracias por todas esas platicas, le aseguro que me dejarán para siempre una sonrisa marcada.

Al Dr. Eduardo Barzana, por ser un gran amigo y un excelente director, por que gracias a usted, la estadía en mí querida Facultad es hoy mucho mejor que cuando llegué,

gracias por trabajar para todos, le aseguro que el compromiso que en repetidas ocasiones nos ha pedido con la facultad está asumido.

A Mariana, por hacer que el tiempo dedicado para que este trabajo fuera posible, se convirtiera en risas y ratos inolvidables, por todo lo que me enseñaste de música, libros y productos gringos jajajaaja, espero sepas que en mi tienes mas que un amigo.

A Gari, mí querido cuñado y "Lic. En el juego del calentamiento", por que desde el momento en que te conocí me regalaste un abrazo, nunca lo olvidare, gracias por ser una de las personas más hermosas que conozco y hacerme sentir como un hermano, te aseguro que en mi también tienes a uno.

A Cinthia, por que gracias a tu locura y ocurrencias puedo guardar muchos momentos felices en mi mente.

A Cruela, por haber traído al mundo a dos seres maravillosos y fascinantes, gracias por todo el cariño, espero sepas cuanto te quiero persona. Shalom!

A los abuelos Manterola, a ustedes nada mas que gracias por su cariño, los buenos momentos y por hacerme sentir como en casa cada vez que lo visité.

A mis más que amigos de la Facultad, Lorena, Romina, Chenco, Ernesto, Daniel, Olga, Fernanda, Tania, Melissa, Dafne, Carmen, Mitzi, Sandra, Jaime, David, Angelito, Memo, Iván, Alejandro, Pelón y también a los que nos son de la facultad, Nidya, Jorge, Vicky, Bunmi, Catrín, Ram, Lalo, Richard, Leo, Pepe, Efiates, Ninel y Mike, gracias por su cariño.

A Roberto, por el tiempo dedicado para que mi formación en la facultad no solo se centrara en lo académico, gracias chaparrito.

A Doña Rafa, por ser parte de la familia y su valiosa ayuda en la casa.

Finalmente, a todas las personas que han cruzado por mi vida hasta esta etapa y que por alguna distracción no estén mencionadas arriba, gracias.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	1
Capítulo 1	
ASPECTOS GENERALES.....	3
Capítulo 2	
ESTUDIOS PREVIOS.....	12
2.1 κ -carragenina.....	12
2.2 Proteínas.....	13
2.3 Lecitina.....	17
Capítulo 3	
DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
3.1 Materiales	20
3.2 Métodos.....	20
Capítulo 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Temperatura de transición gel-sol de los geles individuales de κ -carragenina	27
4.2. Propiedades viscoelásticas de los geles individuales de κ -carragenina	29
4.3 Determinación del contenido proteínico real y de proteína neta soluble	32
4.4 Características de las emulsiones	33
4.5 Emulsiones en gel	42
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXOS	
ANEXO A, Curva estándar de Albúmina Sérica Bovina.....	55
ANEXO B, Tablas completas de determinaciones de CPR y PNS.....	56
ANEXO C, Perfil de aminoácidos para las proteínas empleadas.....	57

RESUMEN

En este trabajo se examinó la factibilidad de preparar emulsiones aceite en agua en geles de κ -carragenina con una temperatura de transición gel-sol de 37 °C. Se seleccionó esta temperatura porque es la temperatura fisiológica del cuerpo humano y porque los geles que “funden en la boca” tienen gran potencial de uso para liberar sustancias o materiales atrapados en ellos, en este caso la emulsión. Para el estudio, la estrategia consistió en determinar primero la proporción de carragenina y iones potasio que permite tener geles que fundan a 37 °C. Para ello se fijó la concentración de carragenina en 0.5% en peso y se varió la concentración de cloruro de potasio para tener diferentes concentraciones iónicas totales. Se examinaron sus propiedades viscoelásticas y se determinó su temperatura de transición usando técnicas reológicas. En los geles individuales de κ -carragenina la transición ocurrió a 37° C, para una concentración iónica total de 0.0125 eq /L la cual corresponde a una mezcla con 0.5% p/p de κ -carragenina y 6 mM KCl.

Una vez determinada la proporción de componentes, se prepararon emulsiones aceite en agua (o/w) usando agua desionizada (pH 7 ajustado con KOH) y aceite de maíz (o/w) con una proporción en peso de 80:20, respectivamente y empleando como emulsionantes, separadamente, lecitina de soya, concentrado de proteína de suero, proteína de soya hidrolizada, albúmina de huevo y proteína de soya nativa a una concentración neta en solución (CNS) de 2% (p/p). El tamaño de gota y su distribución fue examinado por difracción láser. El tamaño de partícula promedio fue de 60 μm para la fase dispersa. Con base en este criterio, principalmente, se seleccionaron los mejores emulsionantes.

Finalmente se prepararon las emulsiones para incluirlas posteriormente en el gel, y se examinó el efecto de su inclusión sobre la temperatura de transición gel-sol y las propiedades reológicas de los geles de k-caragenina solos, así como dichas propiedades para los geles resultantes ya con emulsión. Después de realizar las modificaciones necesarias a la concentración iónica total de las emulsiones fue posible mantener la temperatura de transición gel-sol deseada sin modificar sustancialmente las propiedades viscoelásticas de los geles en relación con aquellos de κ -carragenina sin la emulsión.

Capítulo 1

ASPECTOS GENERALES

Se cree que el nombre “carragenina” fue tomado del pueblo de Carrageen, ubicado en la costa sur de Irlanda, muy conocido en esa región del mundo por el famoso “mousse” de algas marinas hervidas con leche que sus mujeres preparaban alrededor de los años 20 del siglo XX. Posteriormente, y como la mayoría de los descubrimientos, algún aldeano tuvo la idea de hervir las algas en agua y descubrió una bebida que se tornaba muy espesa una vez enfriada, a la cual decidió llamar “carragenina”.

Las emulsiones en geles de polisacáridos de distinta naturaleza, representan uno de los campos más estudiados en los últimos años, siendo las industrias de cosméticos, alimentos y farmacia, donde este tipo de matrices encuentran su mayor aplicación al ser empleadas como vehículos para la liberación de sabores, olores, colores y fármacos.

Los polisacáridos son ampliamente utilizados en la industria de alimentos debido a las propiedades funcionales que poseen en solución. Entre las más importantes están el incrementar la viscosidad del disolvente y formar geles. Con frecuencia se emplean también para estabilizar productos alimenticios durante su transporte y almacenamiento.

Los distintos tipos de carragenina se diferencian entre si por el número de grupos sulfato presentes en su unidad estructural básica. La κ -carragenina tiene un solo grupo sulfato, mientras que las formas iota y lambda tienen dos y tres, respectivamente.

La κ -carragenina, pertenece a un grupo de polisacáridos lineales solubles en agua, que son extraídos de diferentes especies de algas rojas y está formada por una estructura compuesta de n subunidades alternadas de α -(1-3)-D-galactosa-4-sulfato y β -(1-4)-D-galactosa (Fig. 1.1) (Knutsen et al. 1994).

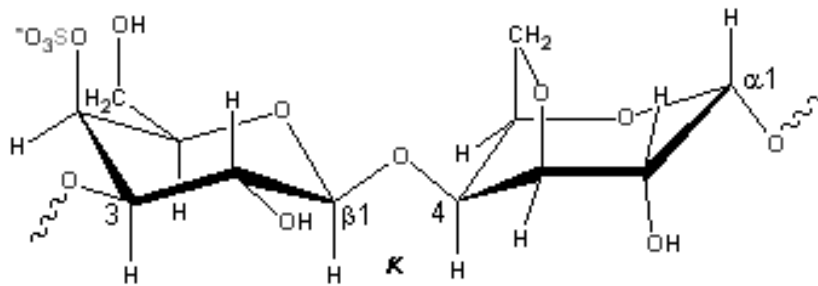


Fig. 1.1. Unidad estructural básica de la κ -carragenina.

En solución acuosa y en presencia de cationes, como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , la κ -carragenina en solución forma geles termorreversibles durante su enfriamiento (Manggione et al. 2007). La estructura del gel, así como sus propiedades físicas y mecánicas, pueden ser reguladas al variar el tipo y concentración de cationes presentes en solución. Tal es el caso de los iones Na^+ y K^+ , a los cuales se les atribuye un papel fundamental en el mecanismo de gelificación, e incluso sobre las propiedades viscoelásticas de los geles resultantes (Tecante y Doublier, 1999).

Es su estado de sol, la κ -carragenina mantiene una estructura interna desordenada en forma de “espiral” (coil), sin embargo en presencia de iones K^+ , esta estructura de espiral es inducida a un cambio conformacional que trae como resultado la formación de una doble hélice (Fig. 1.2) por efecto de las fuertes interacciones electrostáticas entre el ión potasio presente y los grupos SO_3^- del polisacárido, completando el mecanismo de gelificación la agregación

de estas dobles hélices, dando como resultado geles muy estables como lo demuestran los estudios realizados por Mangione et al. 2004; Núñez y Tecante 2007).

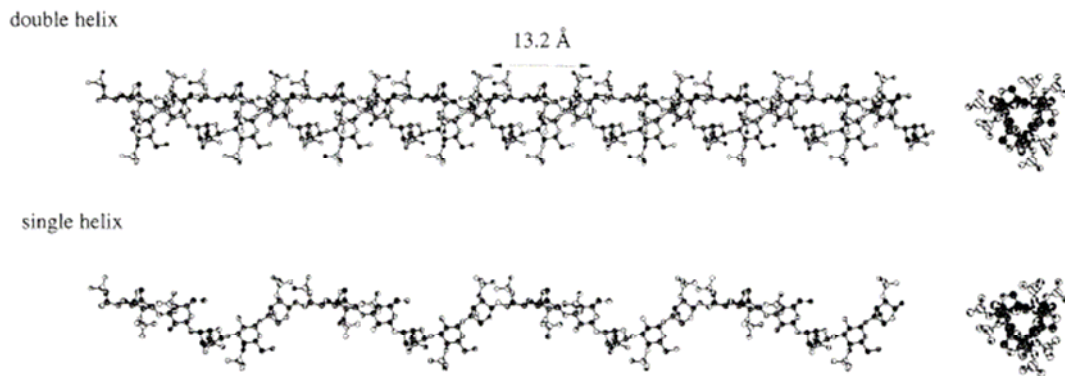


Fig. 1.2. Estructura de la doble hélice de κ -carragenina (Yuguchi et al. 2002).

La concentración iónica total, C_T , está dada por la siguiente ecuación:

$$C_T = \gamma C_P + C_S \quad [1]$$

donde C_P es la concentración de polímero (eq/L), C_S es la concentración total de iones potasio (eq/L) y γ es el coeficiente de actividad iónica promedio (0.55) para la sal de potasio de la κ -carragenina (Rochas & Rinaudo, 1984). El cambio conformacional ha sido representado en el diagrama de transición sol-gel mostrado en la Fig. 1.3 (Rochas & Rinaudo, 1980). Se ha propuesto que el mecanismo de gelificación involucra la formación y asociación de dobles hélices (Anderson et al. 1969). Sin embargo, se ha postulado también que la asociación ocurre entre hélices sencillas (Paoletti et al. 1984). No obstante, la evidencia experimental actual parece favorecer la formación de dímeros helicoidales o dobles hélices en lugar de hélices simples a partir de cadenas simples.

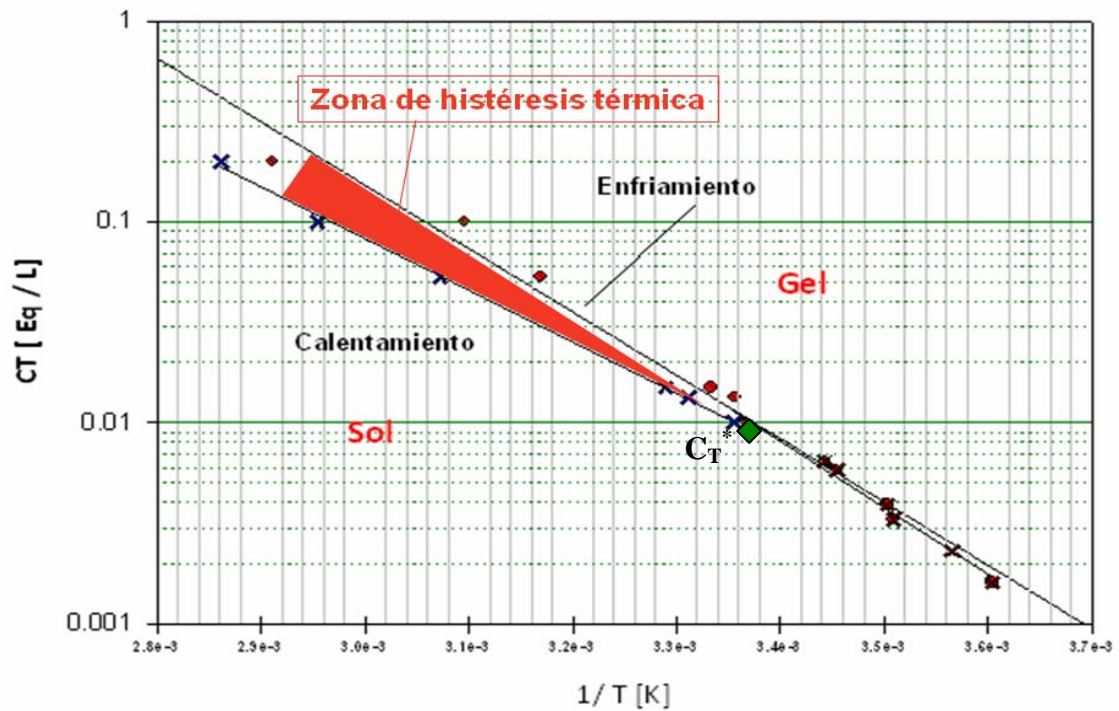


Fig.1.3. Diagrama de transición sol-gel de la sal de potasio de la κ -carragenina (Rochas & Rinaudo, 1980). En este diagrama se muestra la relación entre la concentración iónica total C_T y el inverso de la temperatura absoluta ($1/T$). En rojo se muestra la zona de histéresis térmica y en el rombo verde C_T crítica (C_T^*).

La temperatura es el factor más determinante en la transición sol-gel de matrices formadas a partir de polisacáridos. Las bajas temperaturas son un factor muy importante en el mecanismo de gelificación, ya que promueven la rotación y enroscamiento de la anhidro galactosa, fenómeno que sirve de iniciador para la gelificación; mientras que las altas temperaturas desestabilizan los puentes de hidrógeno formados entre los grupos sulfato e hidroxilo de la κ -carragenina, promoviendo en mecanismo de fusión del gel. De acuerdo con Cernikova et al. (2007), mientras los grupos sulfato de la κ -carragenina en solución se encuentren separados entre sí a una distancia mayor a 0.5 nm, esta se mantendrá en su estado desordenado de espiral, mientras que al reducir estos grupos la distancia entre si hasta 0.4 nm por efecto de las

interacciones electrostáticas del grupo sulfato con el ión K^+ , la doble hélice comenzará a existir.

Las emulsiones son definidas como la mezcla de al menos dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales está disperso en el otro en forma de pequeñas gotas (Das & Kinsella 1990). El agua y el aceite son dos de los componentes primordiales de los alimentos en conjunto con las proteínas, carbohidratos, vitaminas y sales. El agua y el aceite son insolubles mutuamente, sin embargo ambos pueden ser dispersados uno en el otro. Debido a que el contacto entre el agua y el aceite es energética, y termodinámicamente desfavorable, la presencia de un agente emulsionante adecuado es necesaria. Con respecto a lo anterior existe una clasificación muy general de los emulsionantes empleados en alimentos de acuerdo con su peso molecular en dos categorías: (1) Moléculas pequeñas y (2) Macromoléculas. En el primero encontramos a los Tweens y Spans así como a sus sales, y dentro del segundo a las proteínas básicamente. El término “emulsionante” debe ser usado para describir aquellos compuestos que facilitan la formación de una emulsión al disminuir la tensión interfacial y proporcionar estabilidad parcial a corto plazo entre las fases al formar una película alrededor de la fase dispersa. Por otra parte, el término “estabilizante” debe ser empleado para denotar compuestos que no teniendo necesariamente actividad superficial producen estabilidad a largo plazo, restringiendo las interacciones interfaciales en mayor medida que un emulsionante. Debido a lo anterior, las proteínas, las cuales forman películas interfaciales al ser añadidas a sistemas aceite en agua, o/w, o agua en aceite, w/o, deben ser consideradas como emulsionantes, mientras que los

polisacáridos deben ser considerados como agentes estabilizantes (Das & Kinsella 1990).

Las emulsiones, en general son clasificadas de acuerdo con el tamaño de gota de la fase dispersa en tres categorías: Macroemulsiones (0.2 a 100 μm), miniemulsiones (0.1 a 0.4 μm) y microemulsiones (10 a 100 nm), siendo las últimas las más estables y las primeras las menos estables desde un punto de vista termodinámico. Las emulsiones alimenticias en su gran mayoría se encuentran dentro de la primera categoría debido a que la suma de energías libres de sus componentes individuales, es menor que la energía libre que expresan como sistema, por lo que como se ha mencionado, son termodinámicamente inestables y tienden a formar dos fases separadas.

La presencia de polisacáridos en la fase continua puede promover fuerzas tanto atractivas como repulsivas entre las partículas de la fase dispersa dependiendo de las condiciones del sistema. Este efecto, conocido como “efecto de polímero libre”, ocurre debido al cambio en la presión osmótica en diferentes regiones del sistema. Cuando dos gotas de la fase dispersa se aproximan para coalescer, se genera una disminución de la densidad en el del segmento rodeado de polímero en la región de la fase continua entre las gotas que se aproximan, lo cual causa una reacción de origen osmótico a esta acción debida a la presencia de dicho polímero, que no permite que las gotas de la fase dispersa se aproximen lo suficiente como para que ocurra la coalescencia. Sin embargo, cuando el fenómeno anterior ocurre, en alguna otra región del sistema igualmente por efectos osmóticos, existirá desplazamiento del agua entre otras dos gotas de la fase dispersa, por lo que la presencia del polímetro

favorecerá la interacción entre esas gotas, que *per se* ya ocurría al interior del sistema (Das & Kinsella 1990).

La caracterización reológica de materiales viscoelásticos como las emulsiones en gel, se hace usando pruebas mecánicas dinámicas de baja amplitud, las cuales consisten en la aplicación de una deformación oscilatoria sobre un intervalo de frecuencias. Se determina el esfuerzo ondulatorio resultante y se correlaciona con la deformación ondulatoria aplicada, al mismo tiempo que se miden las componentes viscosas y elásticas del material. Si éste se comporta como un sólido elástico ideal (sólido de Hooke), el esfuerzo resultante será proporcional a la deformación y las señales ondulatorias de esfuerzo y deformación estarán empalmadas o en fase. Por otro lado, si el material se comporta como un fluido ideal puramente viscoso (fluido Newtoniano), el esfuerzo será proporcional a la rapidez de deformación, es decir, a la primera derivada de la deformación con respecto al tiempo y las señales ondulatorias de esfuerzo y deformación estarán desfasadas entre sí $+90^\circ$. Para los materiales viscoelásticos, el desfase angular (δ) entre el esfuerzo y la deformación ocurre entre los dos extremos de comportamiento ideal. La señal ondulatoria de esfuerzo generado por un material viscoelástico puede ser separada en dos componentes: uno elástico y otro viscoso. A partir de ambos se pueden deducir los módulos correspondientes que dan cuenta del carácter dual del material. El módulo de almacenamiento de energía, G' , representa la capacidad de un material para almacenar energía de manera elástica. El módulo de pérdida de energía, G'' , representa la habilidad de un material para disipar energía. La tangente de δ , (desfase angular) definida como el cociente G''/G' expresa la contribución entre la energía disipada

y la energía almacenada, es decir, la contribución viscosa debida al flujo y la contribución elástica debida a la deformación. Mientras más pequeño sea el valor de $\tan \delta$, mayor será el carácter elástico del material. Tanto G' como G'' dependen de la frecuencia y de la temperatura; por ende $\tan \delta$ también. Cuando $G' = G''$ ($\tan \delta = 1$) no existe un predominio del carácter elástico y del viscoso. Con frecuencia esta condición es usada para determinar el punto de ocurrencia de la transición gel-sol o sol-gel (Steffe 1996) ya que se supone que hay una coexistencia de cadenas poliméricas desordenadas que muestran flujo, es decir disipan energía, con cadenas poliméricas ordenadas que sólo muestran deformación elástica, es decir almacenan energía. En muchos casos la transición ha sido corroborada por otras técnicas como la calorimetría y se ha observado que los resultados de ambas técnicas son congruentes (Núñez-Santiago & Tecante 2007).

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar el comportamiento viscoelástico de geles individuales de κ -carragenina en presencia de iones potasio, así como de geles de la misma naturaleza, pero con la inclusión de una emulsión de tipo aceite en agua, (o/w). Los propósitos asociados con este objetivo fueron: 1) estabilizar la emulsión en presencia de κ -carragenina para retardar su separación, 2) crear una matriz o gel que soporte la emulsión y que pueda liberarla al ocurrir una transición gel-sol a 37 °C ofreciendo la posibilidad de liberar a la temperatura corporal cualquier otro componente o aditivo que pudiera estar presente en la emulsión y 3) producir emulsiones en gel estables a temperatura ambiente, i.e. 20 a 25 °C. El trabajo se realizó bajo la hipótesis

de que un gel de κ -carragenina preparado en presencia de iones potasio a una C_T que corresponda con una transición gel-sol a 37 °C, podrá atrapar y por lo tanto estabilizar una emulsión de tipo o/w, sin que la inclusión de dicha emulsión afecte la temperatura de transición al no modificar la C_T del sistema.

Capítulo 2

ESTUDIOS PREVIOS

2.1 κ -carragenina

Se han usado mezclas de iones Na^+ y K^+ para preparar geles de κ -carragenina y se ha demostrado que en presencia de ambos cationes, existe una competencia entre los mecanismos de gelificación promovidos por cada uno de ellos e incluso se ha demostrado que el ión que logra establecer su mecanismo propio al inicio, lo mantiene hasta el final de la gelificación (Mangione et al. 2004). La combinación de ambos cationes, es un método muy utilizado en la industria farmacéutica para la liberación de principios activos de matrices de gel (e.g geles antiinflamatorios deportivos). En los estudios hechos por Mangione et al. (2007), se demostró que un gel formado con κ -carragenina en presencia de la proporción correcta de Na^+ / K^+ tiene una mayor eficiencia de liberación de principio activo comparada con dos productos comerciales diseñados para tal efecto. Además, se demostró que el principio activo no afecta el mecanismo de gelificación del gel formado con κ -carragenina, lo que indica el excelente carácter de agente transportador que en principio muestra la κ -carragenina para las emulsiones preparadas en este trabajo. La cantidad mínima necesaria de κ -carragenina para estabilizar una emulsión dentro de su red de gel, tal y como lo muestran los estudios hechos por Cernikova et al. (2007), va desde 0.01 a 0.05%.

El pH es un factor determinante en las interacciones electrostáticas entre las cargas netas de superficie de la emulsión y el polisacárido. Por lo tanto conocer el “punto isoeléctrico” del agente que se use como emulsionante es de gran

importancia. Suk Gu et al. (2004), demostraron que la interacción electrostática polisacárido – emulsionante (coacervación) es posible a cualquier valor de pH por arriba o abajo del “punto isoeléctrico” del compuesto proteínico seleccionado como agente emulsionante. Sin embargo, en dicho estudio se establecieron valores de pH para los cuales la interacción es más fuerte. Estos autores determinaron también experimentalmente el pKa de los grupos sulfato de la κ -carragenina obteniendo un valor de aproximadamente 2, con lo que se concluye que las interacciones electrostáticas de superficie son mínimas a pH menores que 5, ya que los grupos sulfato de la κ -carragenina se encuentran protonados, y por otra parte a pH mayores que 6, la carga neta de la membrana de la emulsión indicó que las interacciones eran bajas o en algunos casos nulas.

2.2 Proteínas

Las proteínas cumplen con funciones de tensioactivo en muchas emulsiones alimentarias. En dicha formación de emulsiones, las moléculas de proteína difunden y son adsorbidas hacia la interfase aceite/agua. La migración de las proteínas de su estado en solución hacia alguna interfase es termodinámicamente favorable (Das & Kinsella, 1999), ya que algunas de las energías libres de la proteína, tales como la conformacional y la de hidratación se pierden en la interfase. Una vez en la interfase, la mayoría, si no es que todas, las proteínas se desdobl原因, orientan y reorganizan para formar una película cohesiva y continua en la superficie. Las zonas hidrofóbicas de la cadena peptídica se orientan hacia la zona apolar constituida por el aceite, mientras que los dominios polares con carga se orientan hacia la fase acuosa. Sin embargo, la mayor parte de la molécula de proteína se encuentra en la

interfase interaccionando con moléculas vecinas y en consecuencia impartiendo fuerza y viscosidad a la película formada alrededor de la fase dispersa (Phillips, 1984), que para este caso es el aceite.

Los principales factores que afectan el desempeño de una proteína como emulsionante son variados y de distinta naturaleza, entre los más determinantes se encuentran, en primer lugar, el medio en el que se encuentren las proteínas (proporción agua/aceite), la cinética de adsorción hacia la interfase que es específica para cada una de las proteínas, el abatimiento que la proteína pueda causar en la tensión interfacial agua/aceite, la reología de la película que forma la proteína alrededor de la fase dispersa y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la superficie de la proteína, la cual estará determinada primordialmente por la secuencia primaria de aminoácidos en la proteína (Fig. 2.1), la cual indudablemente tendrá efectos sobre las demás estructuras que pueda presentar la proteína, la estructura secundaria que se forme a partir de la secuencia específica de la mencionada estructura primaria, e incluso, dicho desempeño puede considerarse a las estructuras terciaria y cuaternaria que presente cada una de las proteínas.

Desde hace ya muchos años se han hecho estudios tratando de establecer valores de hidrofobicidad confiables que muestren una buena correlación con la funcionalidad final que expresa una proteína, no solo como agente emulsionante sino también como agente espumante y gelificante. Pearce & Kinsella (1978) desarrollaron una

técnica para evaluar vía mediciones de turbidez la capacidad emulsionante de diferentes tipos de proteínas.

At pH 2 ^a		At pH 7 ^a	
Very Hydrophobic			
Leu	100	Phe	100
Ile	100	Ile	99
Phe	92	Trp	97
Trp	84	Leu	97
Val	79	Val	76
Met	74	Met	74
Hydrophobic			
Cys	52	Tyr	63
Tyr	49	Cys	49
Ala	47	Ala	41
Neutral			
Thr	13	Thr	13
Glu	8	His	8
Gly	0	Gly	0
Ser	-7	Ser	-5
Gln	-18	Gln	-10
Asp	-18		
Hydrophilic			
Arg	-26	Arg	-14
Lys	-37	Lys	-23
Asn	-41	Asn	-28
His	-42	Glu	-31
Pro	-46	Pro	-46 (used pH 2)
		Asp	-55

Fig. 2.1. Carácter hidrofílico/hidrofóbico de los aminoácidos a pH 2 (Serenda et al. 1994) y pH 7 (Monera et al. 1995).

Aunque es bien conocido el hecho de que la mayoría de los residuos hidrofóbicos de las proteínas permanecen en el interior de su estructura nativa en solución acuosa, algunos residuos hidrofóbicos pueden estar expuestos en la superficie de la proteína, especialmente en el caso de las proteínas de membrana y en las encargadas de transporte

de material lipídico como las albúminas (Kato & Nakai, 1980).

No es estrictamente necesario desnaturalizar a las proteínas para lograr que expresen funcionalidad como emulsionantes. Sin embargo, al desnaturalizarlas ya sea por métodos térmicos, mecánicos o químicos, la eficiencia emulsionante aumenta al ser expuestos los dominios hidrofóbicos que se encontraban en el interior de la proteína nativa (Kato & Nakai, 1980). Sin embargo, se corre el riesgo de llegar hasta un punto donde la proteína “coagule” y forme geles debido a una sobreexposición de dominios hidrófobos, los cuales pueden interactuar entre sí causando agregación de las moléculas de proteína, disminuyendo su solubilidad e incluso promoviendo reacciones de agregación entre los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína que pudieran estar presentes causando floculación de la proteína, no permitiendo así la expresión de funciones emulsionantes (Nakai,1983).

Las interacciones hidrofóbicas de la proteína en la interfase (Fig. 2.2), si bien son determinantes en la funcionalidad deseada, no son las únicas fuerzas involucradas. De hecho la única contribución para que la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) del sistema adquieran valores positivos, está dada por las interacciones iónicas e hidrofóbicas, mientras que los únicos deltas negativos de entalpía y entropía están dados por la existencia de interacciones de tipo van der Waals y la formación de puentes de hidrógeno (Ross & Subramanian, 1981). Se concluye entonces, que los valores resultantes de entropía, entalpía, energía libre del sistema y capacidad calorífica tendrán siempre signo negativo y por lo tanto no puede ser atribuida la funcionalidad de una proteína en la interfase únicamente al carácter hidrofóbico que está presente en la interfase, sino a diferentes factores, además de la hidrofobicidad de la proteína, tales como, el pH del medio, el punto isoeléctrico de las proteínas, la fuerza iónica del

medio, la temperatura, el área y la naturaleza de la interfase.

El Cuadro 2.1 muestra las propiedades fisicoquímicas de albúmina de huevo, proteína de soya y proteína de suero.

Cuadro 2.1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas utilizadas para la preparación de las emulsiones.

Proteína	Punto isoelectrico (pH)	Peso molecular (kDa)	Índice de Hidrofobicidad (Pearce et al. 1978)	% Amino ácidos hidrófobos-hidrófilos	Puentes S-S cisteína (%)
Albúmina de huevo	4.5*	44.5*	49	40	2.39
				60	
Proteína de soya	4-5**	14.7 a 54****	66	28.20	1.06
				71.80	
Proteína de suero	5.2***	17.5*****	101	47.5	2.56
				52.5	

*Purrie et al. (1985); ** Proteína de soya SSP, Texas A&M 2008, ***Walkenström & Hermansson (1994), ****Prot. Soya Ohio State U, 2004, *****Sutton & Alliston-Mills (2001).

2.3 Lecitina

El termino lecitina designa a cualquier grupo de sustancias oleosas existentes en tejidos animales y vegetales, compuestas por ácido fosfórico, colina, ácidos grasos, glicerol, glicolípidos, triglicéridos y fosfolípidos. Los principales fosfolípidos presentes en las lecitinas de soya y de girasol son fosfatidilcolina (Fig.2.3), fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y ácido fosfatidico. Pan et al. (2002), analizaron el perfil de fosfolípidos de una lecitina de soya y determinaron la siguiente composición: Fosfatidilcolina 44.1%, fosfatidilinositol 13.4%, fosfatidiletanolamina 31.9% y fosfatidilserina 10.4%.

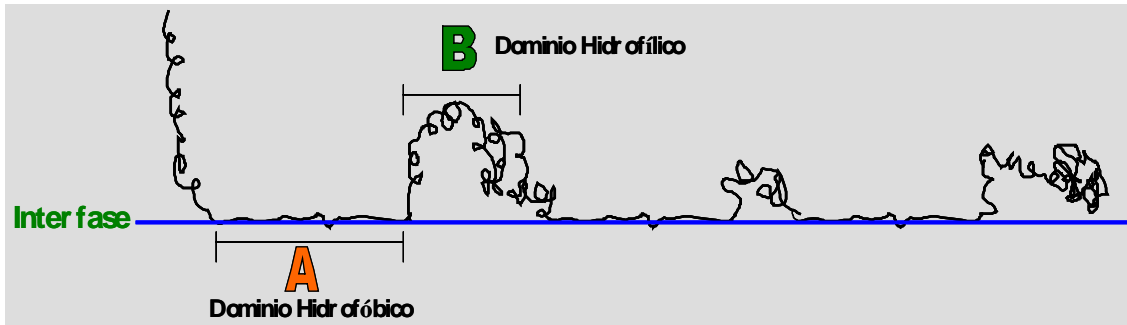


Fig. 2.2. Representación del acomodo de las distintas regiones de la proteína en la interfase de acuerdo con su carácter hidrófilo/hidrófobo. A = Aceite, B = Agua.

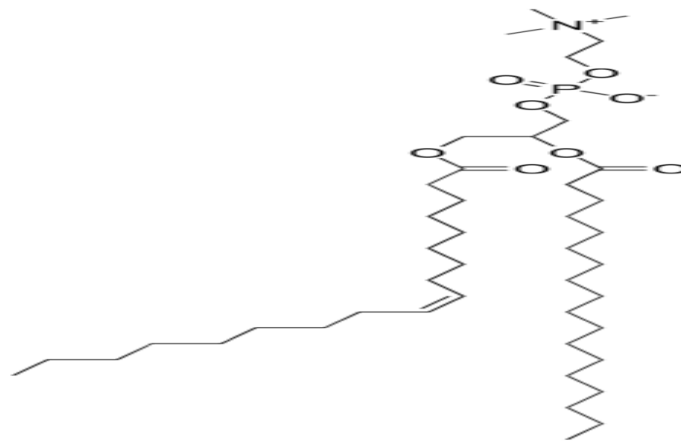


Fig. 2.3. Estructura de la fosfatidilcolina; principal fosfolípido presente en las lecitinas.

En algunas ocasiones, para modificar el desempeño de las lecitinas de acuerdo con los resultados deseados, éstas pueden ser hidrolizadas para eliminar algunas de las unidades conformacionales de fosfolípidos antes mencionadas. Las modificaciones pueden ser vía enzimática o mediante un proceso llamado fraccionamiento, durante el cual la lecitina es mezclada

con etanol. Algunos fosfolípidos presentan una buena solubilidad en etanol así como algunos otros presentan una solubilidad baja, por lo tanto al separar la fracción soluble y evaporar el etanol se obtienen lecitinas fraccionadas y de una mayor especificidad. Las lecitinas naturales o modificadas de soya, han sido incluidas en muchos procesos tecnológicos debido a su papel tan versátil al ser empleadas como emulsionantes, reguladores de viscosidad y agentes dispersantes en productos de panadería, chocolate, productos instantáneos (leche en polvo) margarinas y mayonesas.

Las interacciones entre proteínas y lecitina fueron estudiadas por Comas et al. (2006), quienes describieron las interacciones entre fosfolípidos y proteínas las cuales pueden dar lugar a modificaciones en la carga neta de las proteínas, y por lo tanto en su incorporación a la interfase para formar micelas. Otro estudio (Beckwith 1984), mostró más específicamente que la interacción entre proteínas de soya y lecitina de soya es debida a la desnaturalización de las unidades 7S y 11S de esta proteína. En el estudio se encontró que la interacción entre la lecitina y la proteína tuvo un efecto sinérgico en la capacidad emulsionante después de un tratamiento térmico previo debido a la desnaturalización de la subunidad 11S. Las lecitinas, al igual que la mayoría de las moléculas anfifílicas, presentan valores de pH para los cuales la carga neta de la molécula es cero. En el caso de la lecitina de soya dicho valor es pH 5.5 (Comas et al. 2006).

Capítulo 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

Se usaron productos comerciales de grado alimenticio. κ -carragenina (Degusa Texturant Systems, Baupte, France) con un contenido de iones potasio, determinado por absorción atómica de 192 ppm, proteína de soya (FABPSAPROY[®], Industrias alimenticias FABP S.A. de C.V., México), albúmina de huevo SD (Inova Avibel S.A de C.V, México), lecitina de soya (Yelkin[®], Archer, Daniels & Midlands, EUA), concentrado de proteína de suero (WPC) (Hilmar 8000[®], Hilmar S.A., México), proteína hidrolizada de soya (Sigma-Aldrich, EUA), cloruro de potasio grado analítico (Mallinkrodt, EUA), hidróxido de potasio (J.T. Baker ACS, EUA), aceite de maíz (Mazola[®]), albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma - Aldrich, USA), reactivo de Biuret (hidróxido de potasio y sulfato de cobre pentahidratado (J.T Baker, USA); Tartrato de sodio y potasio,(J.T Baker, USA), reactivos de Kjeldahl, (Acido sulfúrico concentrado, cloruro de potasio, (Mallinkrodt,USA); sulfato de cobre pentahidratado, acido bórico, e hidróxido de sodio, (JT Baker, USA;)) y agua desionizada.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación de humedad

La humedad promedio fue determinada por el método descrito por la AOAC (1990) para "harina". Se pesaron 2 g de cada preparación comercial de proteína y se desecaron dentro de una cápsula de aluminio en un horno a presión atmosférica durante 3 horas a 130 °C. El contenido de humedad se determinó por triplicado determinando la diferencia de peso una vez que las

muestras alcanzaron nuevamente la temperatura ambiente al interior de un desecador de vidrio con tapa. El Cuadro 3.1 muestra las humedades de los materiales.

Cuadro 3.1 Humedad promedio de los materiales usados en este estudio.

Componente	Humedad (%)
κ-carragenina	10.0 ± 0.053
Proteína de soya nativa	6.73 ± 0.040
WPC	6.60 ± 0.100
Proteína hidrolizada de soya	6.30 ± 0.100
Albúmina de huevo	7.83 ± 0.080

3.2.2 Determinación de contenido de proteína real (CPR)

Para determinar el contenido real de proteína en las muestras se usó la técnica de micro Kjeldahl (AOAC, 1990). Para calcular la concentración de proteína final se utilizaron los factores de conversión, N, sugeridos por Pernell et al. (2002) y por la AOAC (1990). Se usó el valor 6.25 para la albúmina de huevo, la proteína de soya hidrolizada y la proteína de soya nativa, y 6.38 para el WPC. Como referencia se utilizó hemoglobina (92% proteína). El contenido de proteína (%) se calculó con la siguiente relación

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times \text{factor N}}{m \times 1000}$$

3.2.3 Determinación de proteína neta soluble

La solubilidad de cada una de las proteínas en agua desionizada pH 7 fue determinada por el método de Biuret (Hall, 1996). Se construyó una curva de referencia con albúmina sérica bovina hasta una concentración máxima de 9

mg/mL. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo, Genesys 10 series) a 540 nm y la concentración real en solución de las proteínas fue determinada por referencia a dicha curva. Los ensayos se hicieron por triplicado. Las soluciones fueron preparadas con una concentración de 5 mg/mL tomando en cuenta la cantidad de proteína real en ellas. Se hidrataron durante 12 h a temperatura ambiente con agitación continua y se filtraron en una membrana Millipore® de 0.67 µm para eliminar la fracción insoluble. Se utilizó la cantidad necesaria de una solución de KOH 0.1 M para ajustar el pH del agua.

3.2.4 Preparación de emulsiones aceite en agua (o/w).

Las emulsiones se prepararon de acuerdo con la técnica propuesta por Saito et al. (2005). La proporción agua/aceite fue de 80:20, respectivamente. Se considero el CPR y la solubilidad de cada una de las proteínas para tener una concentración de 2% p/p de proteína neta en solución después de la eliminación de la fracción insoluble determinada previamente. La fase continua (proteína en agua desionizada pH 7) se colocó junto con la fase dispersa (aceite de maíz) en un tanque enchaquetado de acero inoxidable para producir la emulsión a 1500 rpm durante 3 minutos en un homogeneizador de tipo rotor-estator (Rayneri "Turbo test", Nantes, Francia) y finalmente las emulsiones ya preparadas fueron almacenadas en refrigeración hasta el momento de ser utilizadas.

3.2.5 Análisis de distribución de tamaño de gota en las emulsiones

Para el análisis de distribución de tamaño de gota de la fase dispersa en la fase continua se siguieron dos procedimientos, el primero fue por observación

al microscopio de luz de las emulsiones después de su preparación, y el tamaño de las partículas de aceite fue medido usando el software de análisis de imágenes del microscopio (Olympus, Image Pro-Plus.v 1.1). El segundo procedimiento fue un análisis de distribución de tamaño por difracción láser en una unidad Malvern "Mastersizer 2000" (Malvern, UK) usando una cuba con agua desionizada "Hydro 2000" para dispersar la muestra hasta un nivel de obscuración aproximado de 15% en un intervalo de tamaño entre 0.020 a 2000 μm . En la Figura 3.1 se representa esquemáticamente el fundamento del análisis.

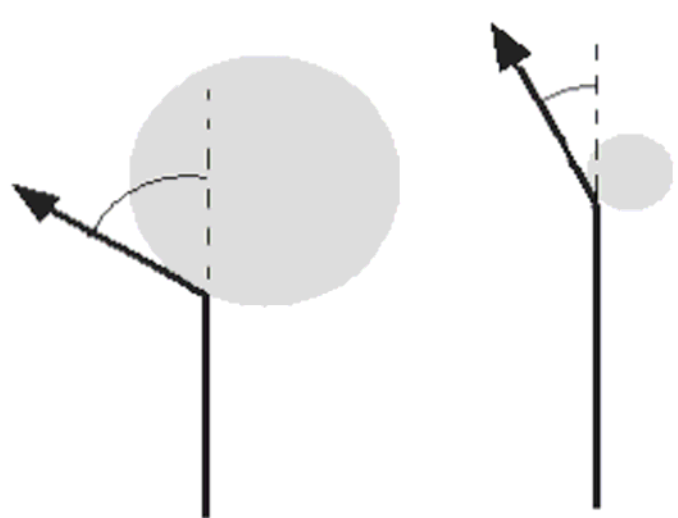


Fig. 3.1. A mayor tamaño de partícula mayor ángulo de difracción del haz de rayo láser incidente sobre las partículas.

3.2.6 Preparación de geles

Los geles fueron preparados de acuerdo con la técnica propuesta por Nuñez y Tecante (2007) la cual se esquematiza en la Figura 3.2. La κ -carragenina (0.5% p/p) fue dispersada con agitación constante a temperatura

ambiente en agua desionizada. Una vez dispersada completamente, se calentó (2 °C/min) hasta 92 °C, se adicionó el KCl necesario y se mantuvo 10 min bajo condiciones isotérmicas. Posteriormente, la solución se colocó en un molde para geles de 25 mm de diámetro y 3 mm de espesor y se enfrió hasta temperatura ambiente. Los geles formados fueron almacenados en refrigeración durante 24 h para su posterior caracterización reológica

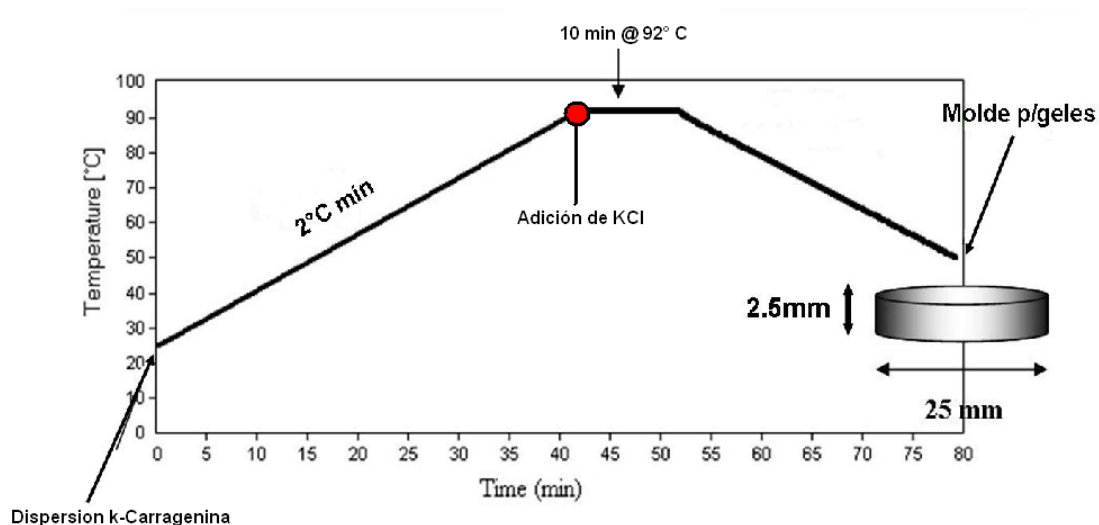


Fig.3.2. Diagrama de preparación de los geles de κ -carragenina y KCl.

3.2.7 Preparación de las emulsiones en gel

Para la preparación de las emulsiones en gel, se siguieron por separado las metodologías anteriormente descritas (3.2.4 y 3.2.6) y posteriormente ambos sistemas fueron homogeneizados a 1500 rpm por 3 minutos. Las cantidades de componentes a mezclar se determinaron por medio de un balance de masa tomando como base la cantidad deseada de mezcla. Al término de la homogeneización (40 °C) las emulsiones en gel fueron moldeadas y refrigeradas durante 24 horas previamente a su caracterización reológica.

3.2.8 Caracterización reológica de los sistemas de gel y de emulsión en gel.

Para la determinación de las características reológicas de los diferentes sistemas se llevaron a cabo pruebas mecánicas dinámicas de baja amplitud a 20 °C y en algunos casos a 40 °C en un reómetro de deformación controlada (ARES RFS III, TA Instruments, EUA) empleando una geometría de placas paralelas estriadas (Fig. 3.3) de 25 mm de diámetro con una separación de aproximadamente 2 mm. Para las determinaciones, que se describen a continuación, las muestras se atemperaron previamente a 20 °C.

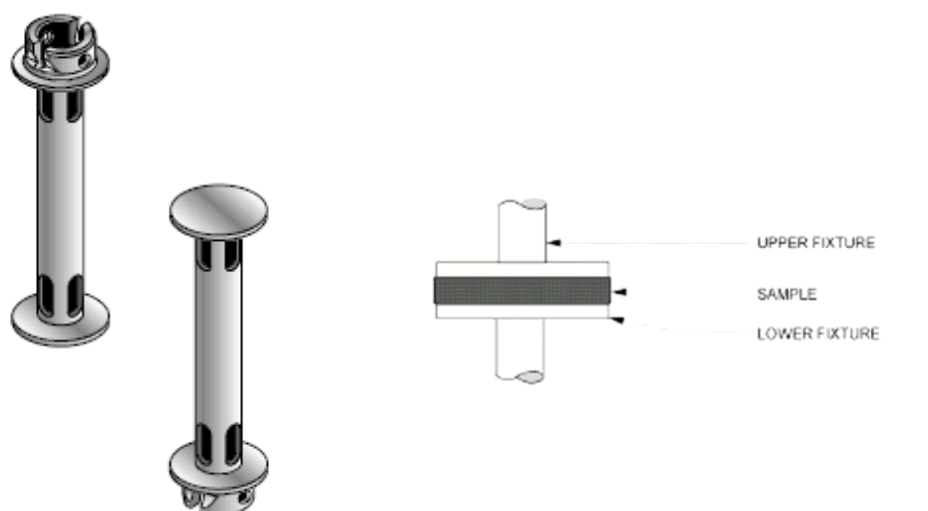


Fig.3.3. Geometría de placas paralelas (izq) y vista transversal de una muestra entre las placas (der).

a) Barrido de temperatura

Mediante esta prueba se determinó la evolución de los módulos dinámicos con la temperatura a frecuencia y deformación constantes. Esta información fue usada para determinar la temperatura de transición gel-sol de los geles y las emulsiones en gel. Para ello se adoptó el criterio de congruencia de los módulos dinámicos, es decir, $G' = G''$ y por lo tanto $\tan \delta = 1$. De esta forma, la temperatura de transición fue aquella para la cual ocurrió esta condición. La validez y aplicación de este procedimiento para geles individuales de κ -

carragenina ha sido discutida previamente (Núñez-Santiago & Tecante 2007). En esta tesis se ha asumido que la presencia de la emulsión en el gel no modifica su temperatura de transición.

b) Barrido de deformación

Por medio de esta prueba se determinó la zona de viscoelasticidad lineal i.e. zona en la cual el esfuerzo es directamente proporcional a la deformación. La prueba se llevó a cabo a temperatura constante (20 °C) y una frecuencia de 6.28 rad/s

c) Barrido de frecuencia

Se determinó la variación de los módulos dinámicos con la frecuencia a temperatura constante (20 °C) dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Temperatura de transición gel-sol de los geles individuales de κ -carragenina

Se buscó que los geles individuales de κ -carragenina con ión potasio, tuvieran una temperatura de transición gel-sol de 37 °C. Con este propósito inicialmente los geles se prepararon tomando como referencia el diagrama de transición sol-gel de la sal de potasio de la κ -carragenina que se muestra en la Fig. 1.3. De acuerdo con este diagrama es posible predecir la temperatura de transición a partir de una concentración iónica total dada que incluye la concentración de polímero y de contraión. En este diagrama se muestra también la concentración iónica total crítica (C_T^*), alrededor de 0.0086 eq/L, por debajo de la cual sólo existe una transición orden-desorden, es decir, no existe la agregación de dobles hélices y por lo tanto no hay gelificación entendiéndose esta como la agregación de las dobles hélices para formar una red tridimensional. Usando este procedimiento la temperatura de transición que se obtuvo experimentalmente no fue la esperada para la concentración iónica total, probablemente porque la carragenina que se usó en este trabajo no fue purificada como la de Rochas & Rinaudo (1980) y porque el valor de C_T de interés fue cercano a C_T^* . Además, fue necesario interpolar los datos experimentales reportados por estos autores usando una regresión lineal lo cual pudo ocasionar errores adicionales debido a las desviaciones propias de dicha regresión.

Se decidió entonces, hacer referencia a los resultados de microcalorimetría de barrido diferencial reportados por Nuñez-Santiago & Tecante (2007) quienes

examinaron la misma preparación comercial de carragenina usada en esta tesis. En la Fig. 4.1 se observa que para el calentamiento, el desdoblamiento de las dobles hélices existentes del gel formado con la sal de potasio, representado por un pico endotérmico, ocurre en un intervalo de concentraciones de 5 mM a 10 mM de dicho ión. Con base en esta información, se prepararon sistemas entre estas concentraciones de potasio y se determinó su correspondiente temperatura de fusión, T_m a partir de los barridos de temperatura en el reómetro. La Fig. 4.2 muestra el cambio de $\tan \delta$ con la temperatura y las correspondientes transiciones cuando $\tan \delta = 1$. Asimismo, para cada una de las concentraciones de potasio se calculó C_T . Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4.1. La mezcla 0.5% κ -carragenina y 6 mM KCl produjo la temperatura de fusión deseada; 37 °C.

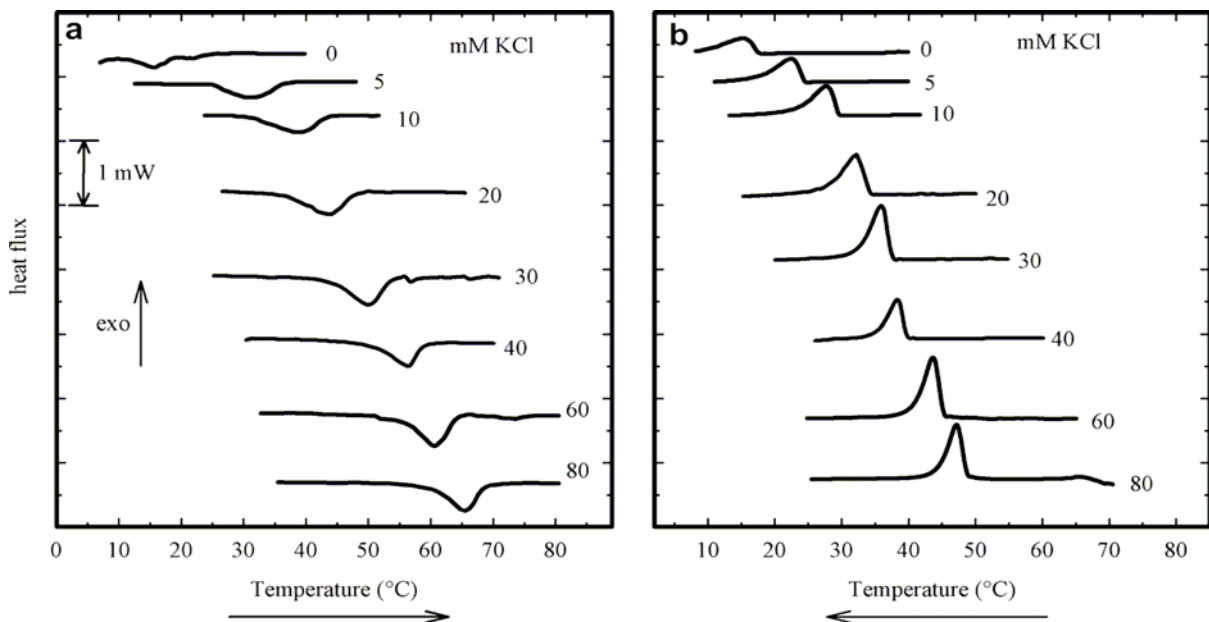
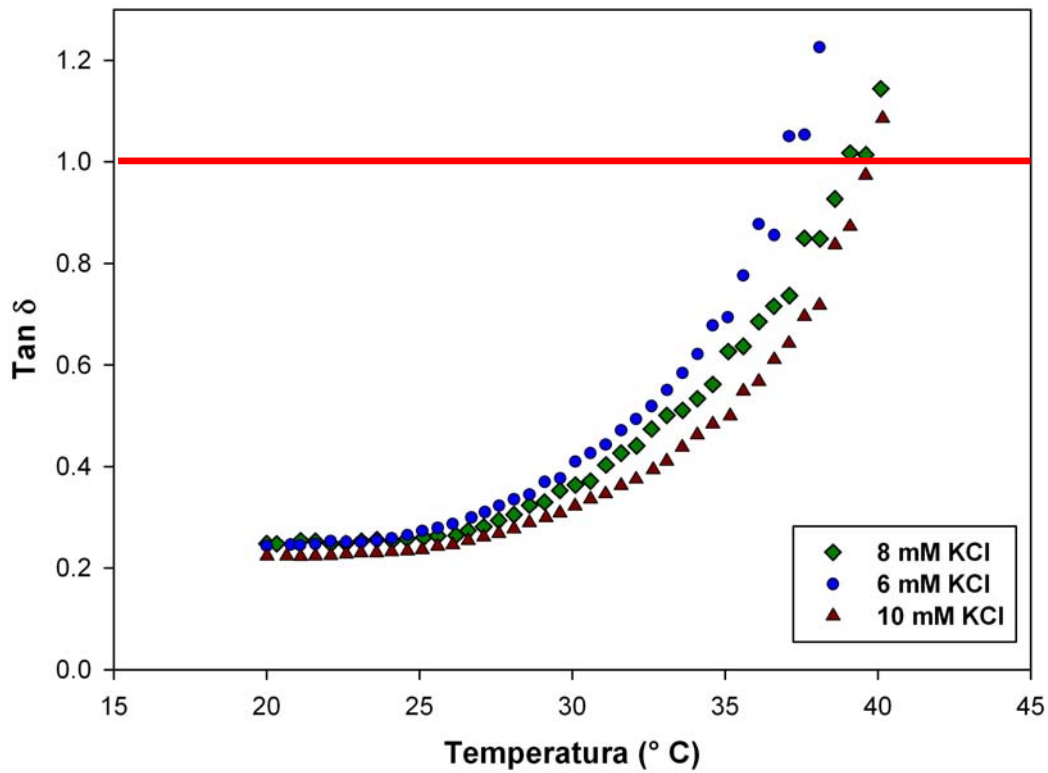


Fig. 4.1. Termograma de calentamiento (a) y enfriamiento (b) para 0.5% de κ -carragenina y diferentes concentraciones de KCl (Núñez-Santiago & Tecante 2007).

Fig. 4.2. Variación de la $\tan \delta$ con la temperatura para geles de κ -carragenina con diferente concentración de ión potasio. Deformación 1%, frecuencia 1 Hz. La línea roja señala la temperatura de transición (T_m) correspondiente.



Cuadro 4.1. C_T y T_m de los geles de κ -carragenina con sal agregada.

κ -carragenina (% p/p)	KCl (mM)	C_T (eq/L)	T_m (°C) Fig. 4.3
0.5	6	0.0125	37.0
0.5	8	0.0145	39.0
0.5	10	0.0165	40.7

4.2. Propiedades viscoelásticas de los geles individuales de κ -carragenina

En la Fig. 4.3 se aprecia la independencia que mostraron los módulos dinámicos con la deformación para deformaciones menores de 1%. En general, el límite de viscoelasticidad lineal, esto es, la zona en donde la relación entre el esfuerzo y la deformación es lineal, fue de 1% de deformación.

La Fig. 4.4. muestra el cambio de los módulos dinámicos con la frecuencia en la zona de viscoelasticidad lineal de los geles cuya proporción polímero-sal se muestra en el Cuadro 4.1. A pesar de tener temperaturas de transición diferentes, los geles con 6 y 8 mM KCl tuvieron un comportamiento viscoelástico similar. Sin embargo, para 10 mM el módulo de almacenamiento

fue mayor, debido a la mayor rigidez de los geles para esta concentración de potasio. La $\tan \delta$ (Fig. 4.2) mostró que el carácter elástico de los geles se acentuó con el aumento de la concentración de KCl, sobretodo a bajas temperaturas (20 a 25 °C). Los geles más elásticos fueron obtenidos con la mayor concentración de sal. La transición gel-sol mostró el comportamiento esperado, es decir, la temperatura de transición aumentó con el aumento de la concentración de sal. De esta forma los geles con 10 mM mostraron la mayor temperatura de transición.

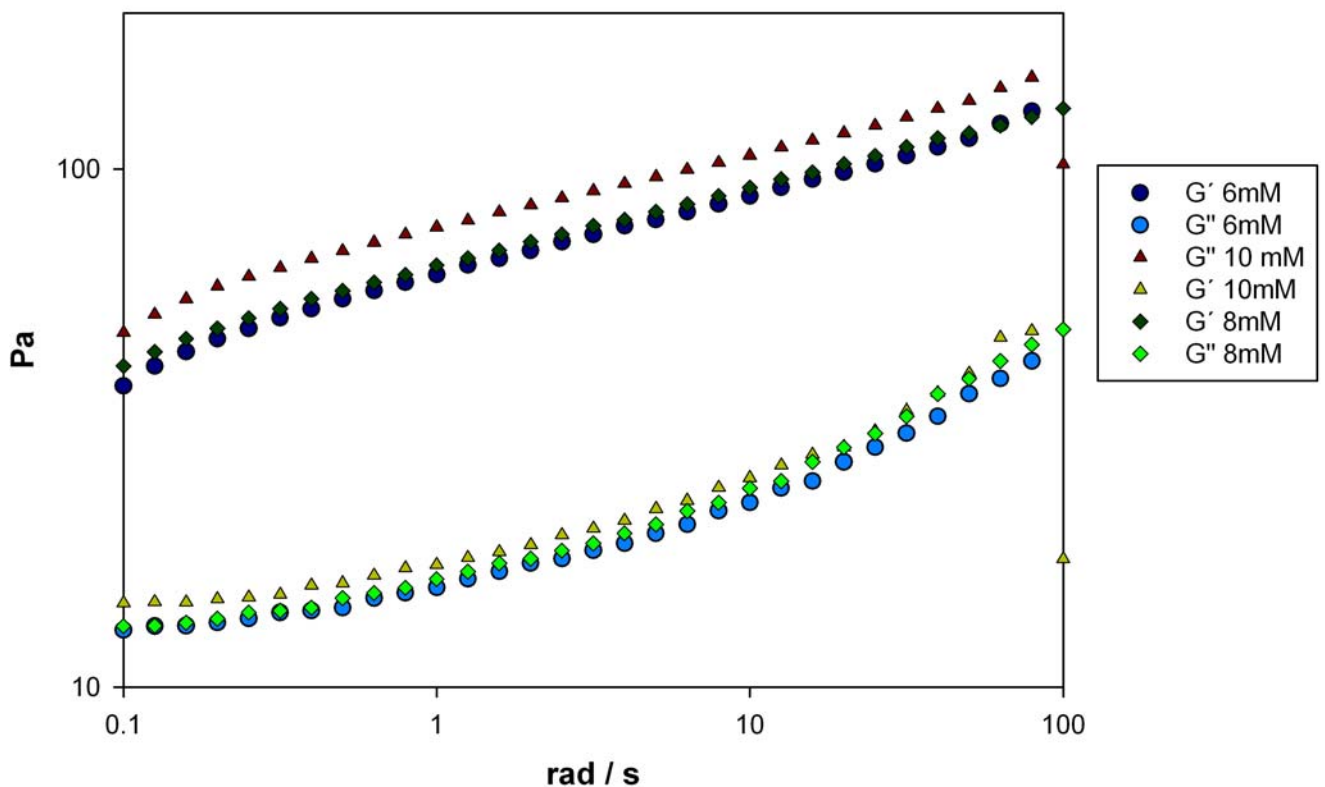


Fig. 4.3 Variación de los módulos dinámicos con la deformación para determinar la zona de viscoelasticidad lineal de los geles preparados con diferente concentración de KCl.

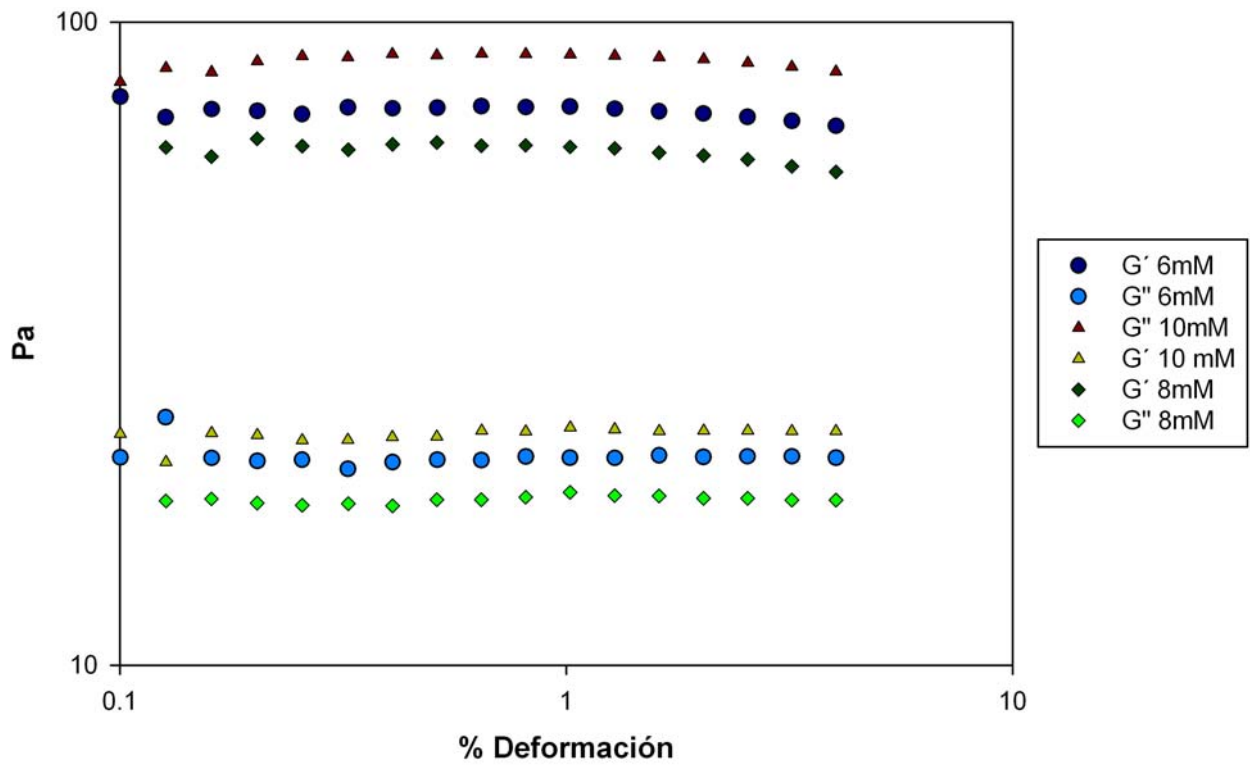


Fig. 4.4. Dependencia de los módulos dinámicos con la frecuencia de los sistemas preparados para una deformación de 1%.

4.3 Determinación del contenido proteínico real y de proteína neta soluble

Las cuatro muestras comerciales de proteína examinadas como emulsionantes tuvieron un contenido real de proteína promedio de 80% (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Contenido proteínico real (CPR) promedio de las proteínas probadas como emulsionantes.

Proteína	CPR (%)	C.V. (%)
Soya FABPSA	85.2 ± 0.85	1.00
Concentrado de suero lácteo	76.0 ± 1.38	1.82
Albúmina de huevo	80.2 ± 2.25	2.81
Hidrolizado de soya	80.5 ± 0.50	0.78

El Cuadro 4.3 muestra la cantidad de proteína soluble de las proteínas probadas como emulsionantes referida a albúmina bovina sérica (Fig. A.1, Anexo A). Las proteínas de soya fueron las menos solubles. De hecho a pesar de haberse dispersado totalmente en el medio acuoso, la proteína hidrolizada de soya mostró la solubilidad más baja de todas las preparaciones examinadas. Las proteínas de origen animal mostraron una solubilidad superior al 90%.

Cuadro 4.3. Concentración de proteína neta soluble (PNS) promedio por el método de Biuret.

Proteína	PNS (%)	C.V. (%)
Soya FABPSA	51.7 ± 3.14	6.06
Concentrado de suero lácteo	94.7 ± 0.12	0.13
Albúmina de huevo	96.4 ± 1.14	1.18
Hidrolizado de soya	27.2 ± 0.41	1.52

La información detallada de cada una estas determinaciones se muestra en la sección de anexos de este trabajo.

4.4 Características de las emulsiones

Se probaron las cuatro preparaciones comerciales de proteína y lecitina de soya. Solamente tres de ellas fueron seleccionadas con base en el examen bajo el microscopio de las emulsiones formadas. Los criterios de selección fueron: 1) la uniformidad de tamaño de las gotas de aceite emulsionadas, 2) el diámetro de las gotas medido con el software de análisis de imágenes y 3) su apariencia después de un tiempo de tres días de almacenamiento en refrigeración, considerado suficiente para observar la coalescencia de las gotas de aceite.

Las Figs. 4.5 a 4.9 resumen las emulsiones observadas. Con excepción a la proteína hidrolizada de soya, en todas ellas se observó una formación de gotas individuales de aceite bajo las condiciones de emulsificación.

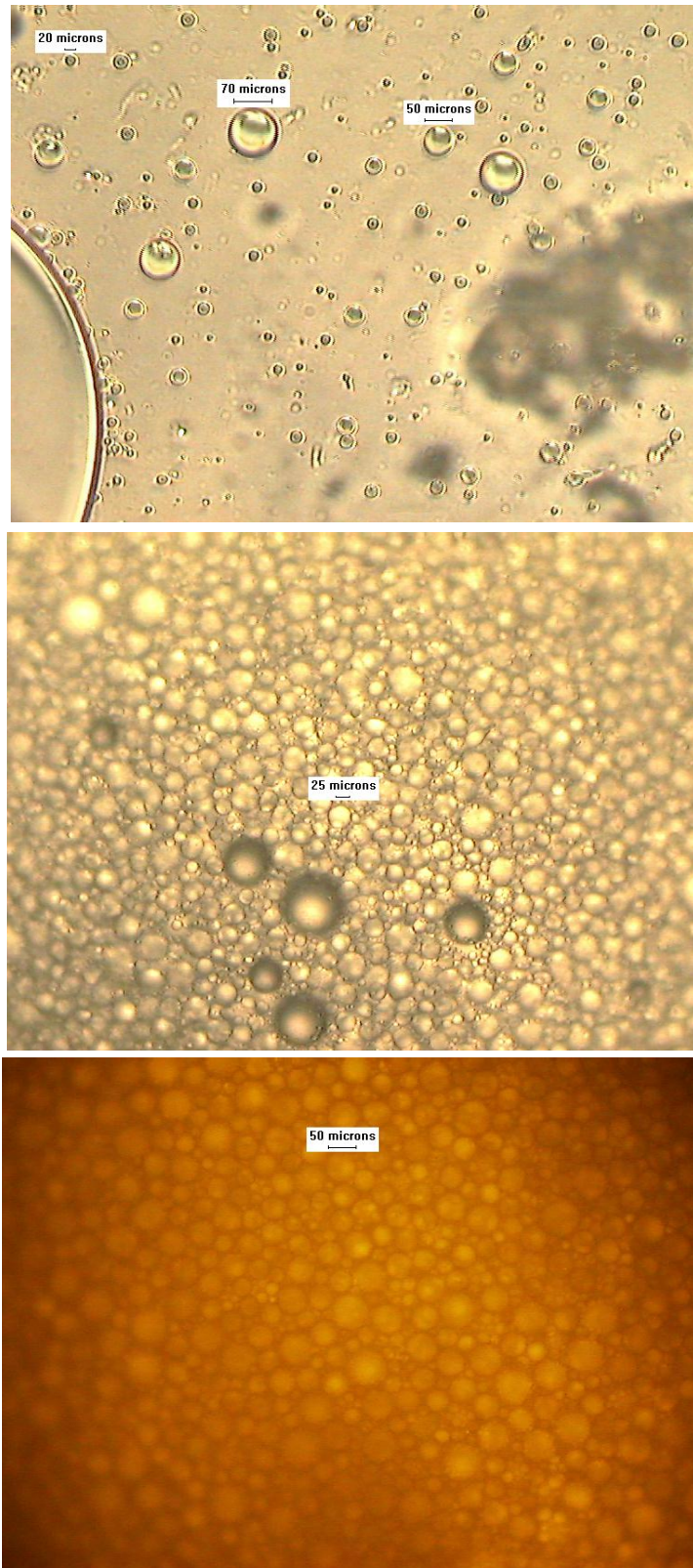


Fig. 4.5 Imágenes (10x) de microscopio de luz, de emulsiones preparadas con albúmina de huevo a 500 rpm por diez minutos (arriba), 1500 rpm por tres minutos (en medio) y después de tres días de almacenamiento refrigerado (abajo).

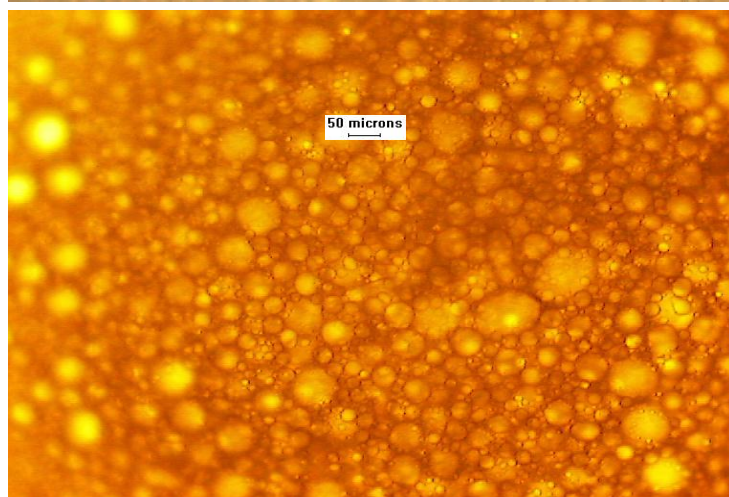
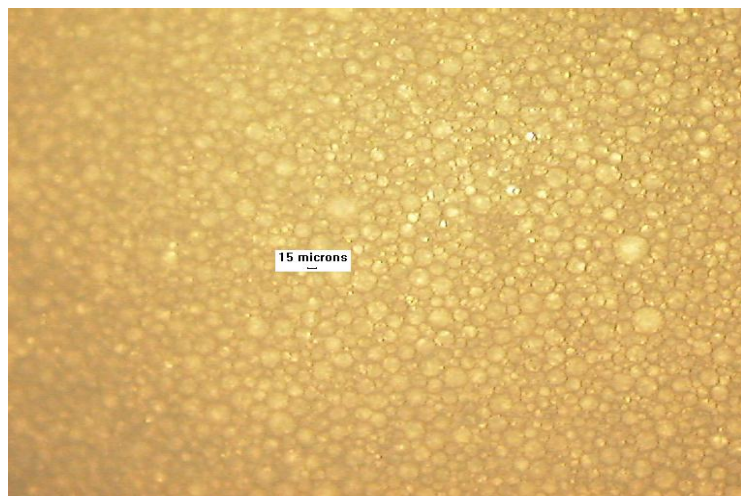
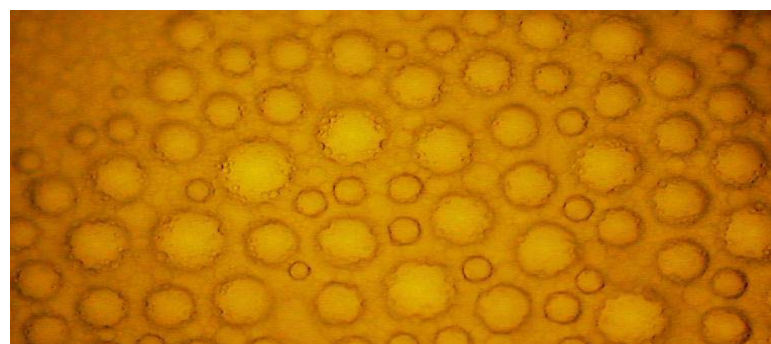


Fig. 4.6 Imágenes (10x) de microscopio de luz, de emulsiones preparadas con proteína no hidrolizada de soja a 500 rpm por diez minutos (arriba), 1500 rpm por tres minutos (en medio) y después de tres días de almacenamiento refrigerado (abajo).





25 microns

Fig. 4.7 Imágenes (10x) de microscopio de luz, de emulsiones preparadas con lecitina de soya a 500 rpm por diez minutos (arriba), 1500 rpm por tres minutos (en medio) y después de tres días de almacenamiento refrigerado (abajo).

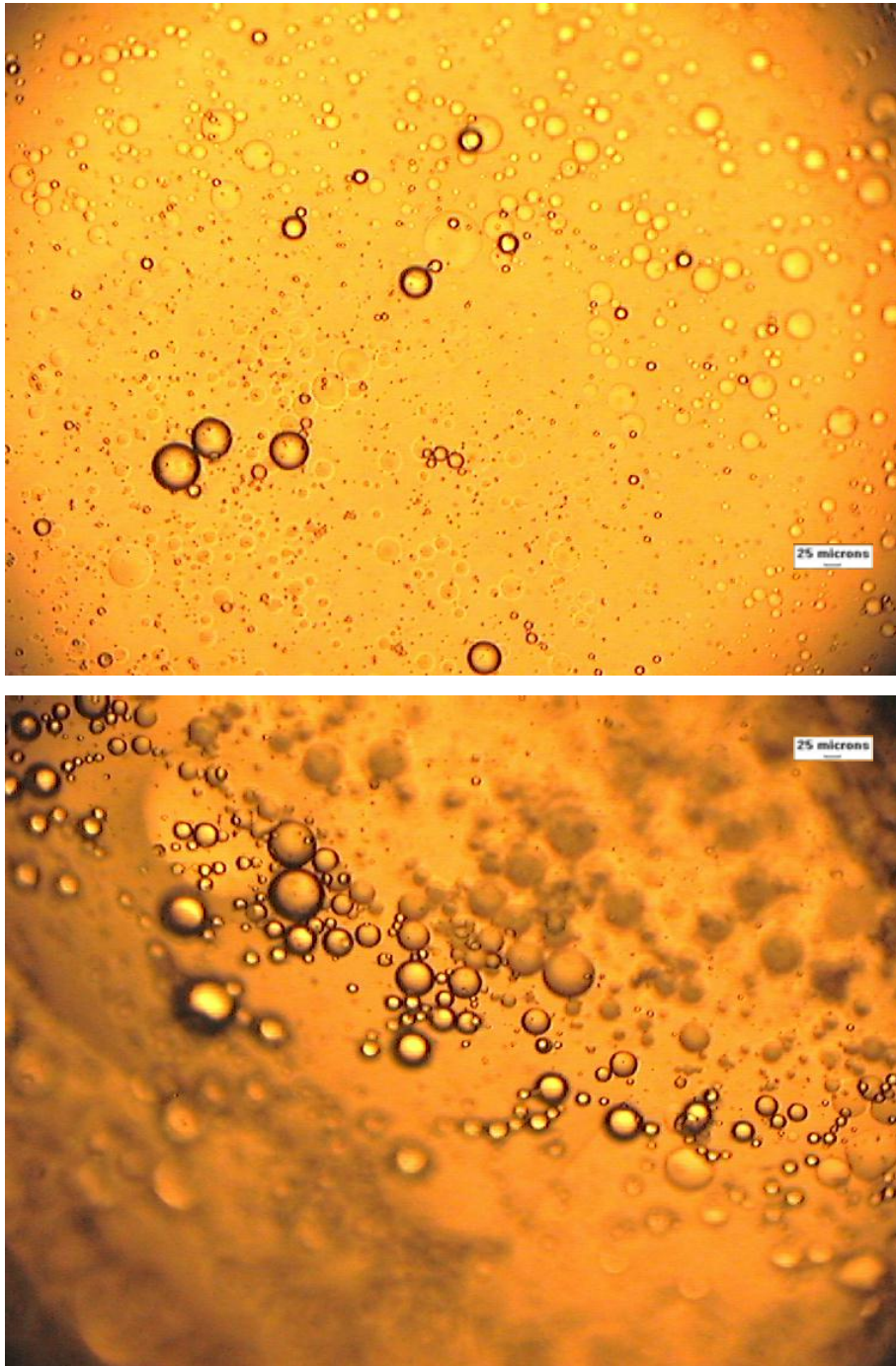


Fig. 4.8 Imágenes (10x) de microscopio de luz de emulsiones preparadas con proteína hidrolizada de soya a 500 rpm por diez minutos (arriba), 1500 rpm por tres minutos (abajo).

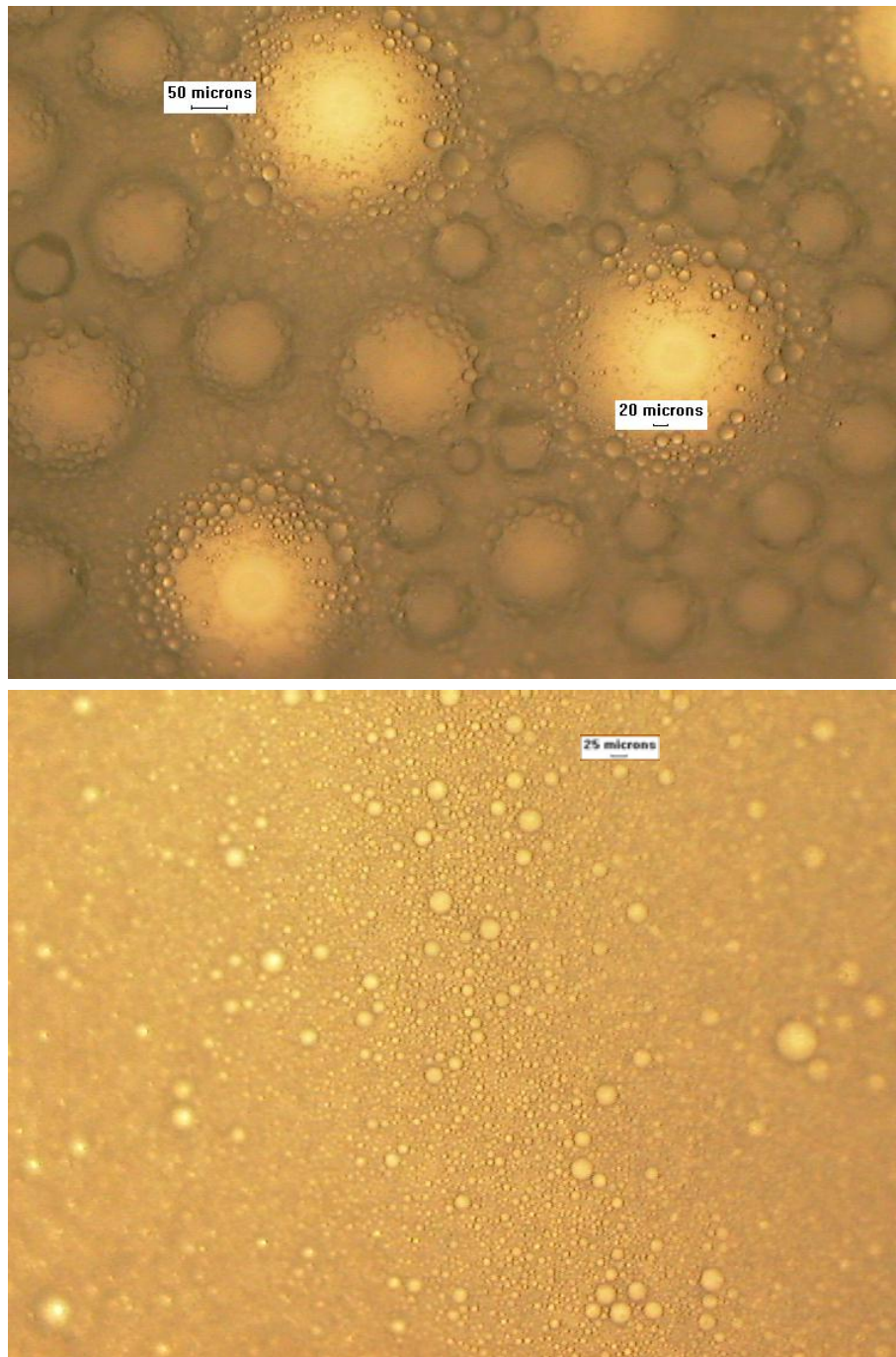


Fig. 4.9 Imágenes (10x) de microscopio de luz de emulsiones preparadas con concentrado de proteína de suero lácteo a 500 rpm por diez minutos (arriba), 1500 rpm por tres minutos (abajo).

Como se muestra en el Cuadro 4.3, la solubilidad de la proteína hidrolizada de soya fue la más baja no obstante el alto contenido de proteína de esta preparación comercial (Cuadro 4.2). Por ello, los fragmentos de proteína presentes en solución no fueron capaces de actuar como agentes emulsionantes, por lo que es posible afirmar que la existencia en solución al menos de la estructura secundaria íntegra de las proteínas es un factor determinante en la expresión de la funcionalidad deseada. Con base en lo anterior fueron seleccionadas las emulsiones que presentaron las mejores características en relación con cada uno de los criterios de selección ya mencionados; albúmina de huevo y proteína no hidrolizada de soya, adicionalmente a la lecitina de soya.

La lecitina de soya fue el mejor emulsionante. Se trata de una molécula de estructura más sencilla que las proteínas, que además no se ve afectada por los numerosos factores intrínsecos que afectan a las proteínas tales como la existencia de dominios hidrófobos no disponibles en estado nativo y las interacciones (electrostáticas, van der Waals, hidrofóbicas) entre las propias cadenas de aminoácidos que pueden disminuir la capacidad emulsionante de una proteína. La funcionalidad de la lecitina en solución es similar a la de un tensioactivo con una cabeza polar y una cola hidrofóbica. Cabe mencionar que el concentrado de proteína de suero lácteo, que tiene un mayor índice de hidrofobicidad (Cuadro 2.1) comparado con las otras dos proteínas utilizadas no fue tomado en cuenta para la preparación de las emulsiones en gel. Sin embargo, al observar su punto isoeléctrico (Cuadro 2.1) y compararlo con las condiciones establecidas para la emulsificación (pH 7) se puede explicar por

qué no presentó la funcionalidad esperada al ser la proteína más cercana a su punto isoeléctrico.

Las emulsiones correspondientes también fueron analizadas por difracción láser (Figs. 4.10 a 4.12). Para la lecitina de soya se observó una distribución de tamaño unimodal (Fig. 4.10), con un diámetro de volumen medio de 21.753 μm y con el 90% en volumen de las gotas de aceite dispersas con un tamaño de 41 μm .

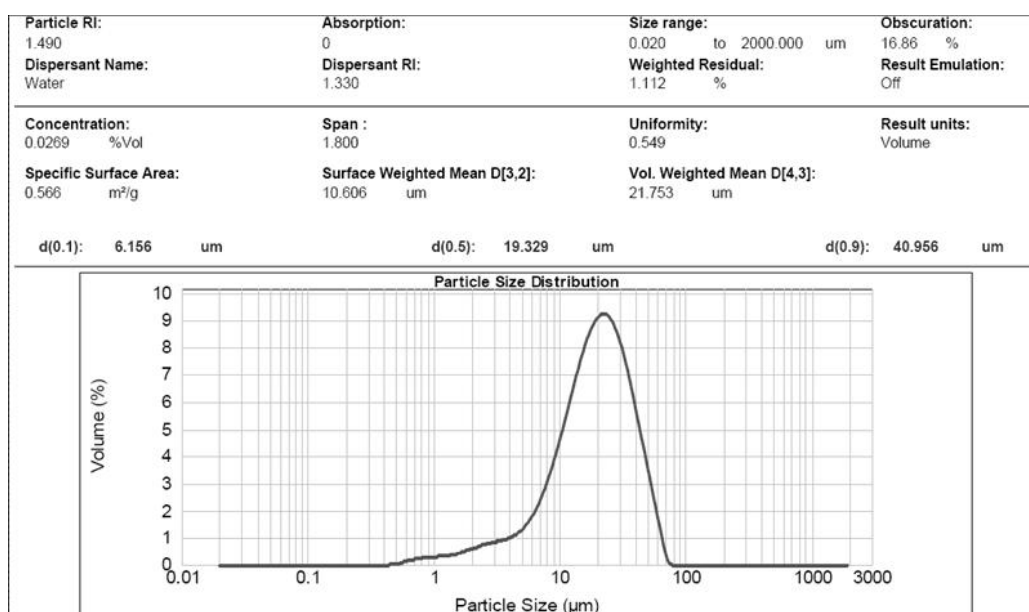


Fig. 4.10. Distribución de tamaño de gota de emulsiones con lecitina de soya.

Con base en propiedades fisicoquímicas de las proteínas, mostradas en la Sección 2.2, y el perfil de aminoácidos para cada una de las proteínas utilizadas como emulsionantes, presentado en el Anexo C, es posible explicar la funcionalidad observada de las proteínas de soya y la albúmina. Con ambas proteínas se observó una distribución de tamaños de gota bimodal. Sin embargo, para la albúmina (Fig. 4.11) se observa un diámetro volumen medio menor, 30.051 μm , que para la proteína de soya, 37.036 μm , (Fig. 4.12). Esto

se interpreta como una mayor estabilidad de la emulsión ante la coalescencia (Fig. 4.5 y 4.6 abajo).

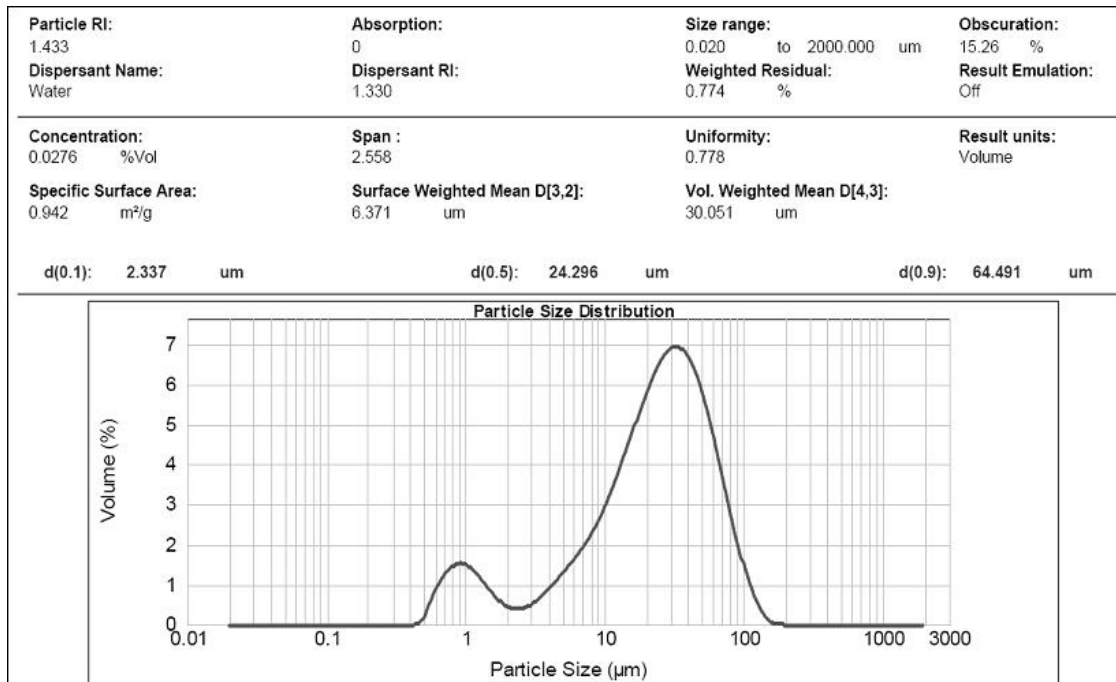


Fig. 4.11 Distribución de tamaño de gota de emulsiones con albúmina de huevo.

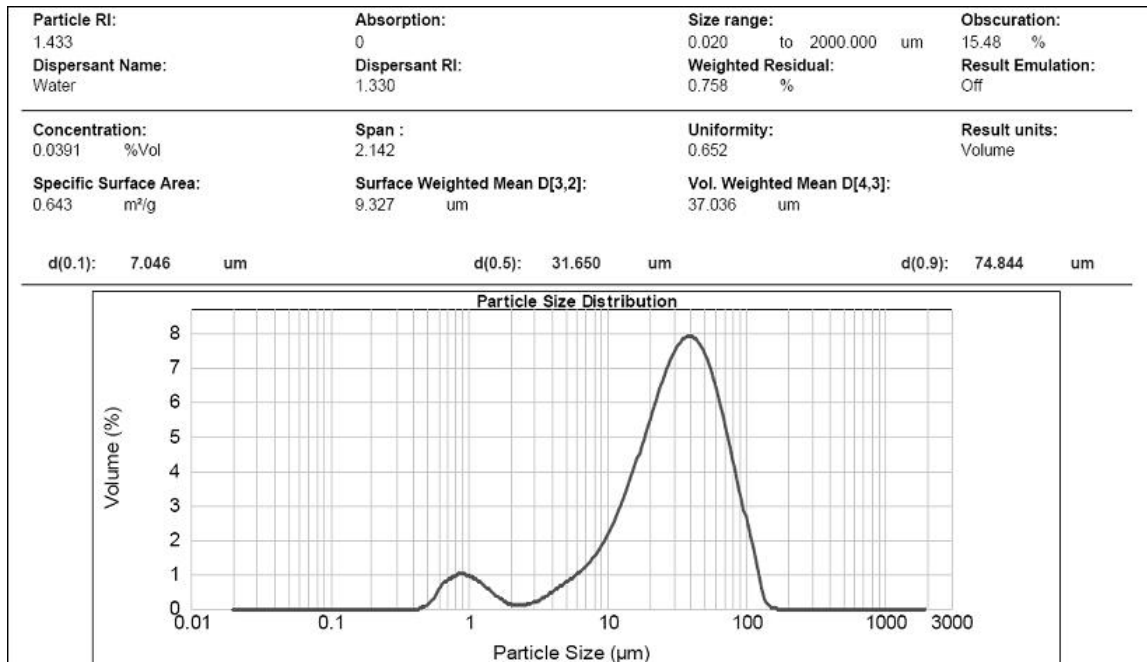


Fig. 4.12 Distribución de tamaño de gota de emulsiones con proteína no hidrolizada de soya.

La bimodalidad de las distribuciones para ambas proteínas se explica por la existencia de regiones hidrofóbicas de las proteínas de soya y albúmina de distinta magnitud, i.e. cantidad de aminoácidos, por lo que la existencia de tamaños variados de gotas de aceite es la esperada. Igualmente, las proteínas se comportan de diferentes maneras al momento de recibir un tratamiento mecánico durante la emulsificación. Es probable que la albúmina, por su mayor contenido de cisteína (puentes disulfuro) sea la más resistente a dicho tratamiento y por lo tanto sufra un menor daño en su estructura. Con ello se podría explicar el hecho de que a pesar de que la proteína de soya presenta un mayor índice de hidrofobicidad (Cuadro 2.1) la albúmina expresa una mejor funcionalidad de acuerdo con los criterios establecidos para seleccionar a los emulsionantes que se utilizaron para la preparación de las emulsiones en gel.

4.5 Emulsiones en gel

Las emulsiones en gel fueron preparadas teniendo los cuidados necesarios para que al momento de mezclar la emulsión aceite en agua con la solución de carragenina precursora del gel, cada una por separado conservara sus propiedades individuales, es decir, que la mezcla no resultara en una separación de fases con un gel de carragenina inmerso en una emulsión aceite en agua.

La emulsificación fue llevada a cabo en un tanque enchaquetado a 40 °C para aumentar la fluidez del aceite de maíz y facilitar la formación de la emulsión. Por otro lado, a esa temperatura al momento de la adición de la solución de κ -carragenina se previene la formación y asociación de las dobles hélices, es decir, que a esa temperatura no existe aún formación de gel.

Asimismo, la emulsión se encuentra a una temperatura estable que evita la transferencia de calor desde la emulsión hacia la carragenina en estado sol, y hace posible que la emulsión quede atrapada en la red del hidrocoloide al momento de enfriar para formar el gel.

En las figuras 4.13, 4.14 y 4.15 se muestra el barrido de deformación, de frecuencia y de temperatura, respectivamente, para las proteínas de soya y albúmina, así como para la lecitina de soya. En este caso fue necesario considerar el contenido de iones potasio ya presentes en las proteínas y con base en él corregir la concentración iónica total reduciendo la cantidad de KCl agregado. Los resultados se muestran en el Cuadro 4.4 donde la C_T real fue estimada de acuerdo con las consideraciones antes mencionadas y la C_T deseada es aquella en el cual T_m es igual a 37 °C.

Se confirmó nuevamente el efecto de la concentración de sal presente en los sistemas en relación directa con la rigidez de los geles formados. Sin embargo, para el caso de las emulsiones en gel se nota cómo los módulos tanto de pérdida como de almacenamiento, aumentan en magnitud, principalmente por la presencia de una mayor concentración de ión potasio proveniente de los emulsionantes, lo cual da lugar a un aumento en la proporción de dobles hélices agregadas en el sistema de gel. Otro posible factor para que haya ocurrido este aumento de los módulos es la cantidad de sólidos presentes debida a la adición de emulsionante la cual es mayor que en los geles individuales. La excepción fue el sistema preparado con lecitina, ya que esta fue dispersada en aceite debido a su naturaleza fosfolipídica y por lo tanto no presenta contribución alguna a la C_T del sistema. Igualmente, se observa cómo la inclusión de la emulsión, para el caso del sistema preparado con lecitina, no

interfiere con el mecanismo de fusión del gel, lo que se explica debido a que la lecitina es una molécula Zwitterionica al pH de trabajo en toda la experimentación. Por ello, las cargas en su superficie son mínimas o nulas, lo cual permite que el mecanismo de gelificación sea independiente de su presencia en el sistema ya que sólo depende de la disgregación de las dobles hélices presentes en el gel y de las interacciones formadas por los puentes de hidrogeno que se forman con su fracción polar (cabeza) y más específicamente con el heteroátomo de nitrógeno y los de oxígeno que forman parte de la estructura de la mayoría de las unidades fosfolipidicas que componen la lecitina y que al aumentar la temperatura para fundir el gel, son desestabilizados disminuyendo la fuerza de los mismos y permitiendo que la fusión ocurra.

Cuadro 4.4. Obtención de la C_T de interés en las emulsiones en gel

Condiciones iniciales							
Emulsionante	Masa de emulsionante (g)	[κcarragenina] % p/p	[K ⁺] (mM) ¹	[K ⁺] (mM) ²	CT deseado (eq/L)	T _m °C	CT real
Prot. de Soya	4.824	0.5	6	4	0.0125	40.2	0.0145
Lecitina	2.000			0		37.0	0.0125
Albúmina	2.706			6		44.0	0.0184
Condiciones después del ajuste de la concentración de ión Potasio (Cs)							
Emulsionante	Cant. de emulsionante (g)	[κcarragenina] % p/p	[K ⁺] (mM) ¹	[K ⁺] (mM) ²	CT deseado (eq/L)	TT °C	CT real
Prot. de Soya	4.824	0.5	2	4	0.0125	37.3	0.0125
Lecitina	2.000		6	0		37.0	
Albúmina	2.706		0	6		34.0	

¹ [K⁺] añadido como KCl; ² [K⁺] estimada presente en los emulsionantes.

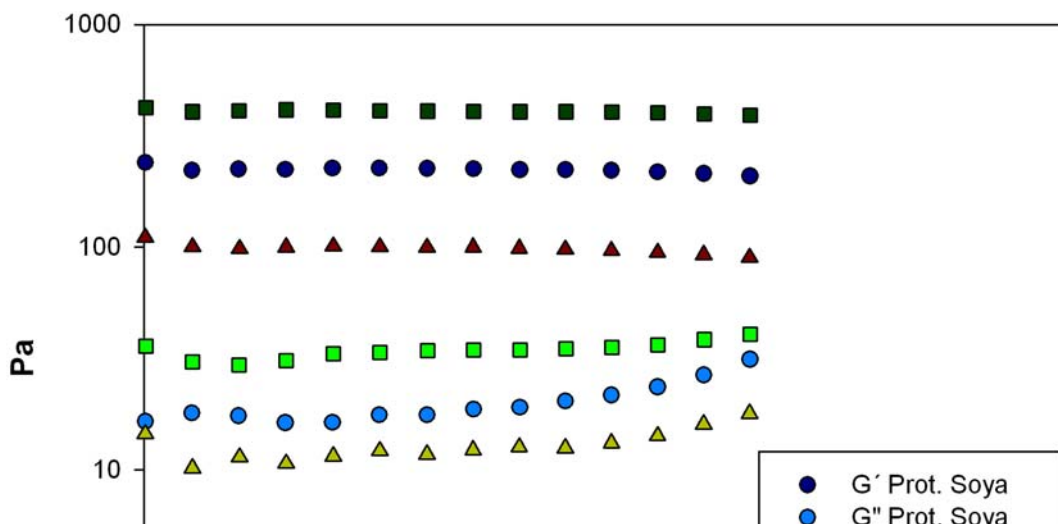


Fig. 4.13. Barridos de deformación para las emulsiones en gel previos a la consideración del aporte de ión potasio por parte de los emulsionantes utilizados.

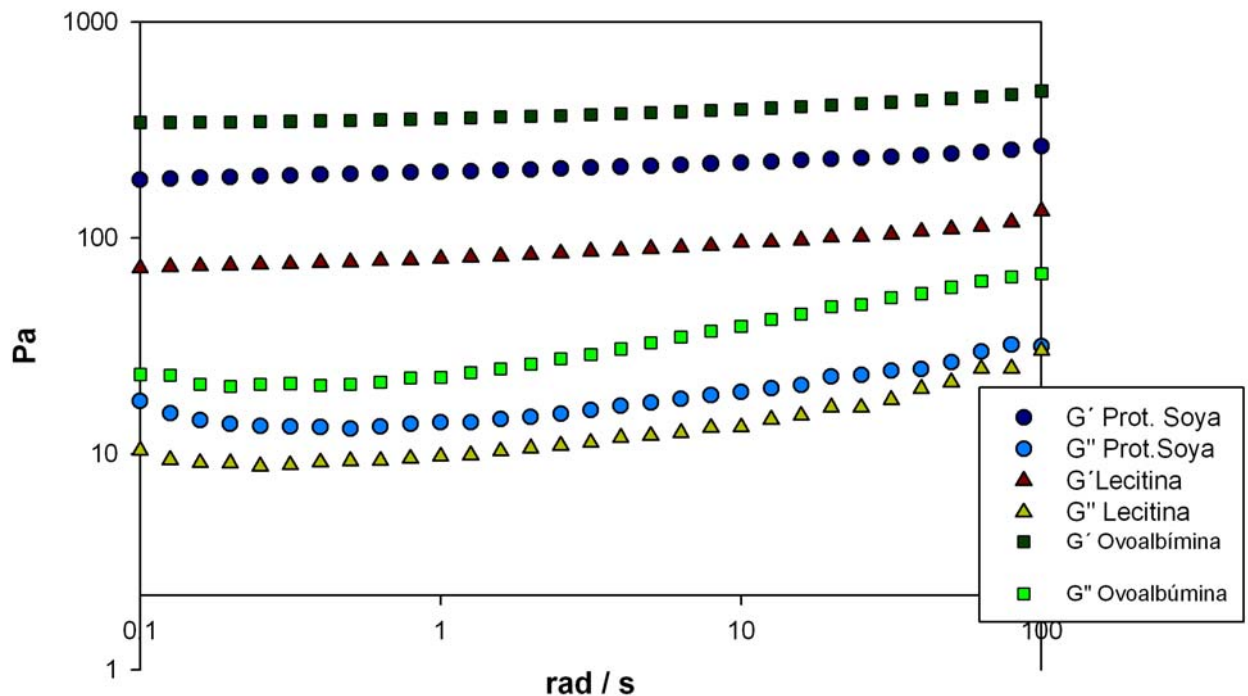


Fig. 4.14. Barridos de frecuencia para los sistemas de emulsión en gel previos a la consideración del aporte de ión potasio por parte de los emulsionantes utilizados.

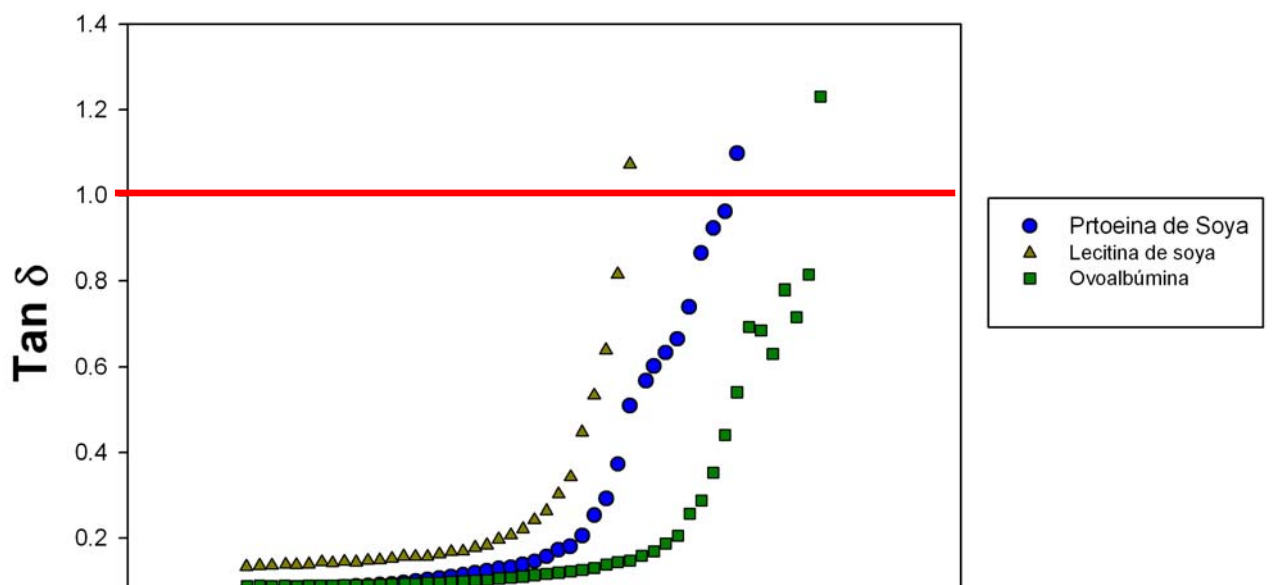


Fig. 4.15. Temperatura de transición para los sistemas de emulsión en gel previo a la consideración del aporte de ión potasio por parte de los emulsionantes utilizados.

Es importante hacer notar que al ser adicionada la emulsión a la solución precursora del gel, los geles resultantes mostraron una mayor independencia de la frecuencia (Fig. 4.14) que los geles individuales (Fig. 4.4), lo cual resulta igualmente de la rigidez proporcionada por el mayor número de dobles hélices agregadas por efecto del aumento de la concentración de ión potasio y el mayor contenido de sólidos. Esto permite plantear la presencia de una sinergia entre los sistemas al formar la emulsión en gel, ya que los geles individuales son menos rígidos y con una mayor dependencia con la frecuencia. Las emulsiones individuales son estables por un tiempo menor y más susceptibles a la coalescencia en ausencia del gel, debido a que la movilidad de las gotas emulsionadas (movimiento Browniano) de aceite se ve considerablemente disminuida por la gelificación, disminuyendo con esto la cantidad de agua libre que se tenía originalmente en la emulsión individual.

Una vez corregida la C_T para las emulsiones en gel en los que se utilizó proteína como emulsionante, se determinó en el reómetro la temperatura de transición gel-sol de estos sistemas. La figura 4.16 muestra que las correcciones hechas fueron adecuadas ya que se observaron transiciones incluso menores de 37 °C, como en el caso de la albúmina, lo cual no es

sorprendente si se considera que la tensión superficial de las emulsiones fue abatida por la presencia de los agentes emulsionantes.

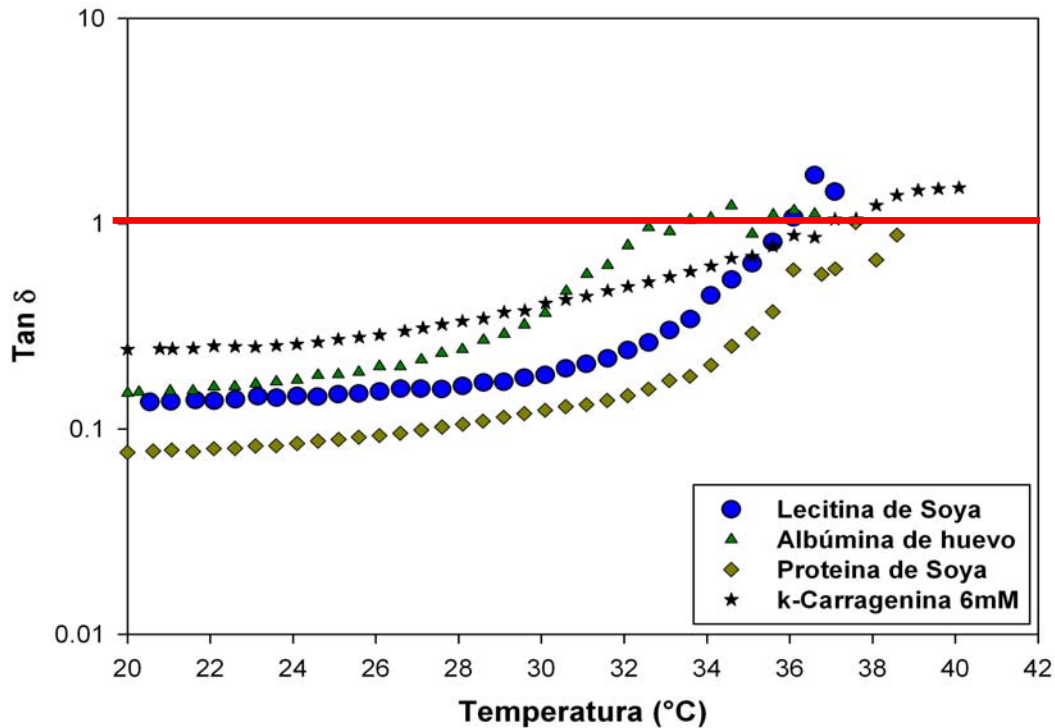


Fig. 4.16. Temperatura de transición para las emulsiones en gel con la concentración iónica total corregida para tomar en cuenta la concentración de ión potasio en las proteínas (C_s).

Además, lo anterior permite afirmar que en las condiciones de trabajo el único factor determinante, aparte de la temperatura, en la transición de las emulsiones es la C_T a la cual se prepara la emulsión en gel, y que si bien es sabido que las proteínas pueden interaccionar con los carbohidratos formando estructuras más complejas, i.e. coacervados, que pudieran intervenir con el mecanismo de gelificación y fusión de los geles, en este caso, las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica del medio fueron las adecuadas para evitar que la coacervación tuviera lugar.

Se observó también que la independencia de los módulos dinámicos con respecto a la frecuencia de las emulsiones en gel que se había logrado en las primeras formulaciones, antes de corregir C_s , disminuye (Fig. 4.17). Sin embargo, sigue observándose una mayor independencia de los módulos con respecto a los geles individuales. De igual manera se observa que los geles formados con la C_T corregida son menos rígidos que los preparados inicialmente sin corrección. Sin embargo, son más rígidos que los geles individuales aun cuando la C_T del sistema es la misma en ambos casos. Esto confirma el hecho de que la rigidez de los geles preparados con la concentración ya corregida es debida también a la presencia de una mayor cantidad de sólidos solubles en el sistema, los cuales no interaccionan con la matriz de gel individual a un nivel que impidan que la transición gel-sol ocurra.

Por otra parte también se observa que la zona de visco-elasticidad lineal se extiende casi hasta 3%, tanto en las emulsiones en gel con la concentración de ión corregida por el aporte de potasio de los emulsionantes, como para las no corregidas (Fig. 4.18).

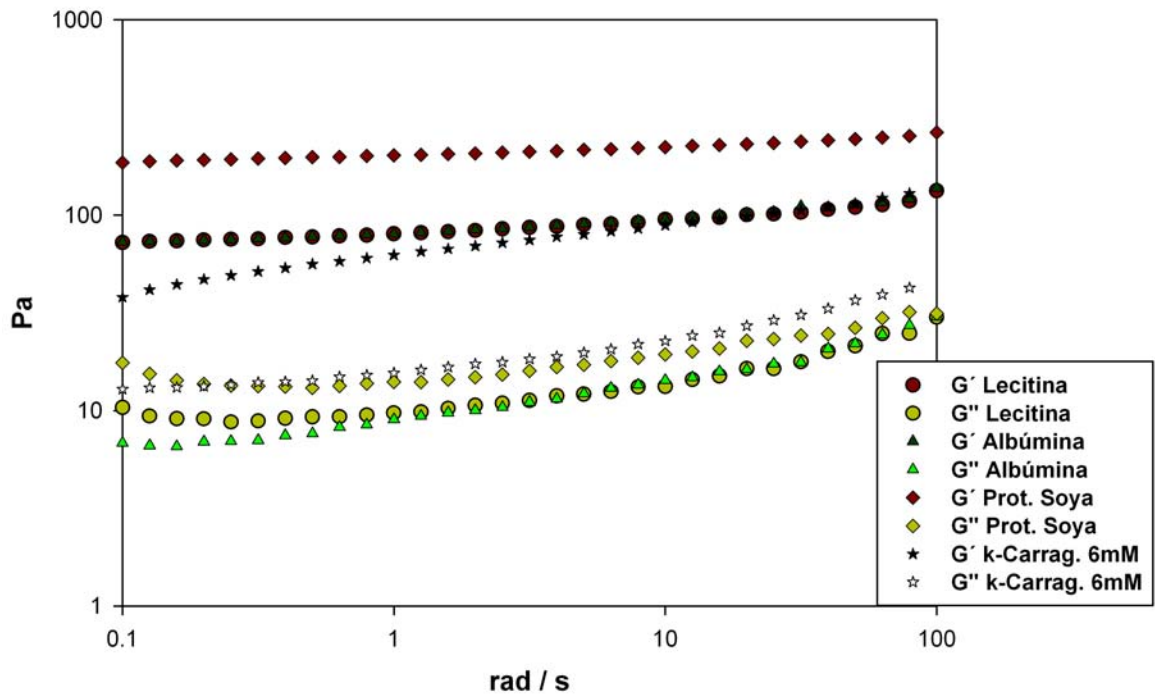


Fig. 4.17. Barridos de frecuencia para las emulsiones en gel con la concentración de potasio corregida.

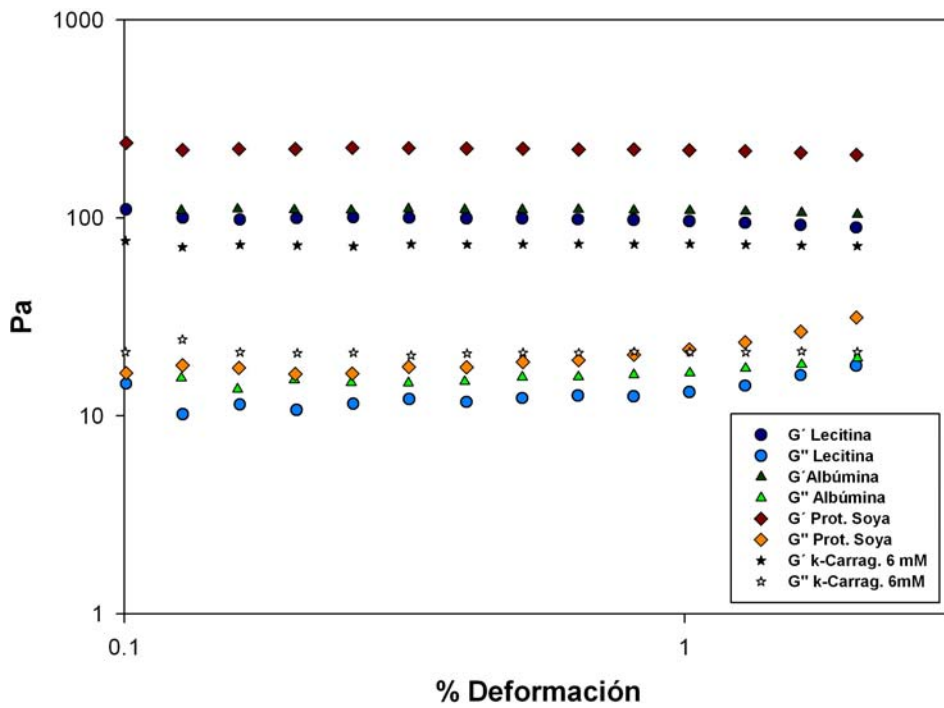


Fig. 4.18. Determinación de la zona de visco-elasticidad lineal para los emulsiones en gel con la concentración de potasio corregida.

CONCLUSIONES

Es factible preparar emulsiones en gel de κ -carragenina a las condiciones de trabajo estudiadas, con una transición gel-sol de 37 °C para una concentración iónica total de 0.0125 eq/L. Las emulsiones en gel preparadas son suficientemente rígidas para su manipulación aun cuando la concentración de κ -carragenina fue relativamente baja i.e. 0.5%.

La κ -carragenina resultó ser un vehículo muy efectivo para retener las emulsiones preparadas y aumentó su estabilidad ante la coalescencia.

La presencia de una mayor cantidad de sólidos al incluir la emulsión en el gel de κ -carragenina produjo geles más rígidos haciéndolos más manipulables para su caracterización reológica.

El factor que más determina la ocurrencia de la transición gel-sol es la concentración iónica total y la transición es independiente de la concentración de sólidos totales presentes.

La transición gel-sol de la κ -carragenina no se ve afectada por la naturaleza química del emulsionante a pH 7. Las interacciones que puedan existir entre la κ -carragenina y los emulsionantes no modifican la transición gel-sol a este pH.

La lecitina es el agente emulsionante que menor tamaño de gota produjo y por lo tanto el que mejor estabilidad confirió a las emulsiones sin carragenina después de 3 días de preparadas. Se demostró la eficacia emulsionante de las proteínas a las condiciones de trabajo, ya que tanto la proteína de soya como la albúmina de huevo emulsionaron las fases aceite/agua con tamaños de gota dentro del intervalo para una emulsión alimenticia. El índice de hidrofobicidad

de las proteínas empleadas no es el único factor que determina su funcionalidad final como emulsionantes.

El contenido de puentes disulfuro en la estructura terciaria de las proteínas afecta directamente la funcionalidad emulsionante que estas expresan bajo las condiciones (ruptura mecánica de la estructura proteica) de trabajo. A mayor contenido de puentes disulfuro mejor la funcionalidad expresada.

ANEXO : A

Curva estandar de Albúmina Sérica Bovina.

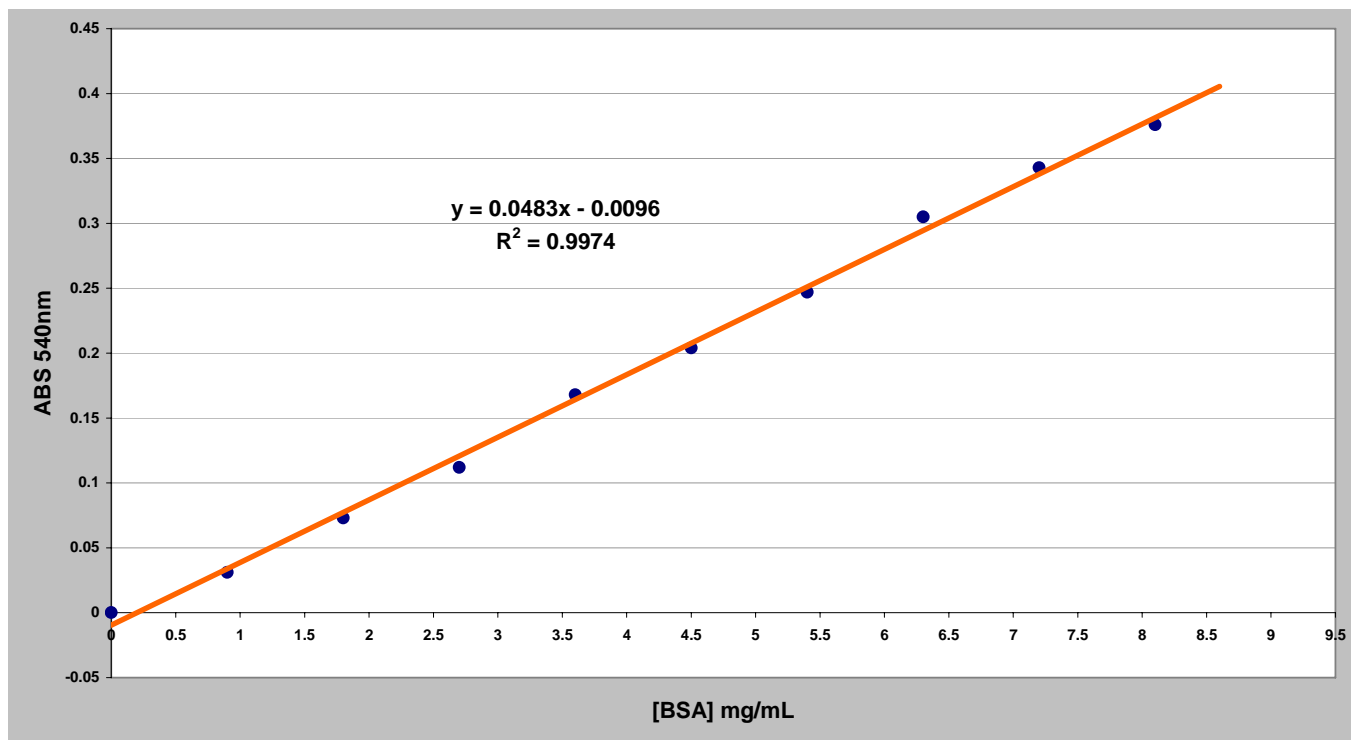


Fig. A.1. Curva padrão de albúmina sérica bovina (BSA), para la cuantificación de PNS a 540 nm, y parámetros de regresión lineal.

ANEXO: B

Determinaciones de CPR y PNS.

Muestra	Cant. de muestra (g)	Blanco Hemo mL	Vol (mL) gastado de HCl 0.1113N	Vol (mL) real de HCl gastado	% de N en muestra	Factor Prot/N	% Proteina
Fabsaproy 1	0.1017	0.50	9.50	9.00	13.79	6.25	86.18
Fabsaproy 2	0.1023	0.50	9.40	8.90	13.56	6.25	84.73
Fabsaproy 3	0.1035	0.50	9.50	9.00	13.55	6.25	84.68
Promedio	0.1025	0.50	9.47	8.97	13.63	6.25	85.20
Desv. Est.	0.0009	0.00	0.06	0.06	0.14	0.00	0.85
C.V	0.8942	0.00	0.61	0.64	1.00	0.00	1.00
WPI 1	0.1010	0.50	8.30	7.80	12.03	6.38	76.77
WPI 2	0.1035	0.50	8.50	8.00	12.04	6.38	76.84
WPI 3	0.1002	0.50	8.00	7.50	11.66	6.38	74.41
Promedio	0.1016	0.50	8.27	7.77	11.91	6.38	76.01
Desv. Est.	0.0017	0.00	0.25	0.25	0.22	0.00	1.38
C.V	1.6949	0.00	3.04	3.24	1.82	0.00	1.82
Alb. de huevo 1	0.1190	0.50	10.00	9.50	12.44	6.25	77.75
Alb. de huevo 2	0.1090	0.50	9.70	9.20	13.15	6.25	82.20
Alb. de huevo 3	0.1148	0.50	10.00	9.50	12.89	6.25	80.59
Promedio	0.1143	0.50	9.90	9.40	12.83	6.25	80.18
Desv. Est.	0.0050	0.00	0.17	0.17	0.36	0.00	2.25
C.V	4.3944	0.00	1.75	1.84	2.81	0.00	2.81
Prot. Hid. Soya 1	0.1036	0.50	9.00	8.50	12.78	6.25	79.90
Prot. Hid. Soya 2	0.1029	0.50	9.00	8.50	12.87	6.25	80.45
Prot. Hid. Soya 3	0.1020	0.50	9.00	8.50	12.99	6.25	81.16
Promedio	0.1028	0.50	9.00	8.50	12.88	6.25	80.50
Desv. Est.	0.0008	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.63
C.V	0.7800	0.00	0.00	0.00	0.78	0.00	0.78

Fig. B1. Datos complementarios de la determinación de CPR.

Muestra	Cant de muestra original mg/mL	Abs 540 nM	[Prot. Solución] mg/mL	% Prot. Soluble
Fabsaproy 1	5.00	0.112	2.52	50.35
Fabsaproy 2	5.00	0.110	2.48	49.52
Fabsaproy 3	5.00	0.124	2.77	55.32
Promedio	5.00	0.115	2.59	51.73
Desv. Est.	0.00	0.008	0.16	3.14
C.V	0.00	6.565	6.06	6.06
WPI 1	5.00	0.219	4.73	94.66
WPI 2	5.00	0.220	4.74	94.87
WPI 3	5.00	0.219	4.73	94.66
Promedio	5.00	0.219	4.74	94.73
Desv. Est.	0.00	0.000	0.01	0.12
C.V	0.00	0.132	0.13	0.13
Alb. de huevo 1	5.00	0.225	4.86	97.14
Alb. de huevo 2	5.00	0.225	4.85	96.94
Alb. de huevo 3	5.00	0.220	4.75	95.07
Promedio	5.00	0.223	4.82	96.38
Desv. Est.	0.00	0.003	0.06	1.14
C.V	0.00	1.234	1.18	1.18
Prot. Hid. Soya 1	5.00	0.057	1.38	27.58
Prot. Hid. Soya 2	5.00	0.056	1.36	27.16
Prot. Hid. Soya 3	5.00	0.055	1.34	26.75
Promedio	5.00	0.056	1.36	27.16
Desv. Est.	0.00	0.001	0.02	0.41
C.V	0.00	1.786	1.52	1.52

Fig. B2. Datos complementarios de la determinación de PNS.

Anexo C

Perfil de aminoácidos para las proteínas empleadas como emulsionantes.

Amino acid	White Leghorn		New Hampshire		Mean value	Coefficient of variation	FAO (1970)
	Group 8	Group 6	Group 7	Group 5			
Lysine	359	394	368	391	378	4.71	415
Histidine	119	137	135	137	132	5.84	147
Arginine	324	334	327	336	330	1.65	357
Aspartic acid	620	623	650	617	628	3.59	687
Threonine	269	275	278	265	272	2.26	299
Serine	456	409	441	410	429	5.08	456
Glutamic acid	874	879	855	871	869	1.55	937
Proline	216	194	207	220	209	7.70	228
Glycine	206	201	205	207	205	1.92	222
Alanine	359	351	358	362	357	1.50	380
Cystine	185	174	186	167	178	7.45	150
Valine	431	438	411	436	429	2.79	301
Methionine	236	240	253	230	240	4.10	248
Isoleucine	332	335	318	338	331	2.58	321
Leucine	517	526	517	525	521	1.56	518
Tyrosine	240	237	277	276	257	8.29	219
Phenylalanine	386	384	342	358	368	4.97	372
Tryptophan	121	117	122	106	116	6.15	—
Protein (mg/g dry matter)	845	852	840	829	841		

Fig. C1. Perfil de aminoácidos de Albúmina de la clara de huevo de dos diferentes razas de gallinas.

Amino acids	Sorghum flour	SPC
Aspartic	517.81	5304.30
Threonine	204.72	1910.50
Serine	231.55	1778.10
Glutamic	995.86	6520.40
Glycine	72.22	2017.16
Alanine	984.00	2392.30
Valine	504.85	2728.20
Methionine	134.95	608.50
Isoleucine	411.73	2402.70
Leucine	1230.76	3896.10
Tyrosine	147.33	1398.50
Phenylalanine	443.47	2620.90
Histidine	219.23	1546.66
Lysine	105.75	3306.50
Ammonia	877.22	2460.57

Fig. C2. Perfil general de aminoácidos para proteínas de soya.

TYPICAL AMINO ACID PROFILE

Amino acids represented as g/100g of product

Alanine	3.6
Arginine	2.5
Aspartic Acid	8.6
Cystine/Cysteine	1.7
Glutamic Acid	13.4
Glycine	1.5
Histidine	1.5
Hydroxyproline	<0.1
Isoleucine*□	4.8
Leucine*□	9.0
Lysine*	7.2
Methionine*	1.7
Phenylalanine*	2.6
Proline	5.7
Serine	4.8
Threonine*	5.0
Tryptophan*	1.3
Tyrosine	2.3
Valine*□	4.5

Fig. C3. Perfil general de aminoácidos del concentrado de proteína de suero

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, N.S., Campbell, J.W. , Harding, M.M. , Rees, D. , Samuel, J.W.B (1969). X ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for ι & κ carrageenans. *Journal of Molecular Biology*. 45, p.85-89.

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.Kjeldahl determination method. PRT-701.02-150.

Beckwith, A. C. (1984). Interaction of phosphatidylcholine vesicles with soybean 7S and 11S globulin. *Journal of American Oil Chemists Society*, 32, 1397-1407.

Comas, D. I., Wagner, J. R., Tomas, M. C. (2006). Influence of the chemical environment on soybean proteins–lecithin interaction and stability of oil in water (O/W) emulsions. *Proceedings of Food Colloids*. B-14.

Cernikova, M., Bunka, F., Pavlinek, V., Brezina P., Hrabe J., Valasek P. (2007). Effect of carrageenan type on viscoelastic properties of processed cheese. *Food Hydrocolloids*. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.05.020

Das, K.P & Kinsella, J.E. (1990). Stability of food emulsions: Physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. *Advances in food and nutrition research*, 34. p 81- 201. Ithaca, N.Y.

Hall, G.M. (1996). Methods for testing protein functionality. London. Blackie Academic & Professional. P. 34-60.

Kato, A., Nakai, N. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 624 p. 13-20.

Knutsen, S.H., Myslabodski, D.E., Larsen, B. and Usov, A.I. (1994). A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* 37, 163-169.

Mangione, M.R, Giacomazza, D., Cavallaro, G., Bullone, D., Martorana. V., San Biagio, P.L. (2004). K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of κ Carrageenan. *Biophysical Chemistry* 113, 129 - 135.

Mangione, M.R, Giacomazza, D., Cavallaro G., Bullone D., Martorana V., San Biagio PL. (2007). Relationship between structural and release properties in a polysaccharide gel system. *Biophysical Chemistry* 129, 18-22.

Monera O.D., Sereda T.J., Zhou N.E., Kay C.M, Hodges R.S(1995). Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the

stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *Journal of Peptide Science*. 5, p. 319–329.

Nakai, S. (1983). Structure-Function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 31, 676-683.

Núñez-Santiago, M.C. & Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of k Carrageenan. *Carbohydrate Polymers* 69, 763 – 773.

Pan, L. G., Tomas, M. C., & Añon, M. C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water in oil (W/O) and oil in water (O/W) emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*. 5(2), 135–143.

Paoletti, S., Smidsrod, O. & Grasdalen, H. (1984). Thermodynamic stability of the ordered conformations of carrageenan polyelectrolytes. *Biopolymers* 23(9), 1771-1794.

Pearce, K.N. & Kinsella J.E.(1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of as a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 26, p.716-723.

Pernell, C.W., Foegeding, E.A., Luck, P.J, Davis, J.P. (2002). Properties of whey and egg white protein foams. *Colloids and surfaces*. 204, 9-21.

Phillips, M.C. (1984). Protein conformation at ligand interfaces and its role in stabilizing emulsion and foams. *Food Technology*. 35, 50-57.

Pourrie, W.D., Nakai, S.(1985). Characteristics of edible and fluids of animal origin: egg. En: Fennema. O. *Food chemistry*. N.Y.Marcell Dekker. P 892-855

Rochas, C. and Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counter-ions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers* 19, 1675-1687.

Ross P.D., Subramanian S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Journal of Biochemistry*. 26, p 3096–3102.

Serenda T. J, Mant C.T, Sönnichsen F.D, Hodges R.S. (1994). Reversed-phase chromatography of synthetic amphipathic α -helical peptides as a model for ligand/receptor interactions Effect of changing hydrophobic environment on the relative hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side-chains. *Journal of Chromatography*. 676P 139-153.

Steffe, J.F. (1996). Rheological methods in food process engineering. USA. Freeman Press. Pag 312-332.

Suk-Gu, Y., Decaer, E., Mc Clemments, D. (2004). "Influence of pH and carrageenan type on properties of β -Lactoglobulin stabilized oil in water emulsions". *Food Hydrocolloids* 19, 83- 91.

Sutton, L.F, Allston-Mills, B. (2001). Influence of WPC on IGG uptake, intestinal DNA and enzymatic activity. *Annual Swine Repport, North Caroline State University*. P.12-18.

Tecante, A. & Doublier, J. L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch- κ -carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers* 40, 221–231.

Texas A&M. (2008). Texas engineering experiment station manual. Separation Science Program

Walkenström, P. & Hermansson, A.M. (1994). Mixed gels of gelatin and whey proteins. *Carbohydrate polymers*. 25, p.220.

www.class.fst.ohio-state.edu/FST822/lecture/soy.htm. Búsqueda en Google.com: "Mollecular weight soy protein". SR. Pag. 1 Link 9. 02/07/2008 8:20 p.m.

Yuguchi, Y., Thuy T.T.T, Urukawa, H. Kajiwra, K. (2002). Structural characteristics of carrageenan gels: Temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*. 16, 515-522.