



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TERMODINÁMICOS Y
CINÉTICOS DE TRES PROTEÍNAS ADSORBIDAS EN LA INTERFASE
(LÍQUIDO-LÍQUIDO)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

JESÚS PÉREZ PÉREZ

ASESORA: IQ. GUADALUPE FRANCO RODRÍGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PARA

HUGO PÉREZ

AGRADECIMIENTOS:

Generador de energía interna para el desarrollo personal y profesional.

Mi familia.

En vista a las malas jugadas que le ocurre a la memoria al momento de mencionar toda aquella persona que contribuyó directa o/e indirectamente a la conclusión de este trabajo profesional, no debo aventurarme a mencionar unos cuantos nombres, por eso me atrevo a agradecer a toda aquella persona que tuve la oportunidad de conocer en un instante de mi vida, intercambiando parte de nuestra esencia y que sin duda alguna, el goce más insignificativo tiene trascendencia en lo siguiente, como lo menciona Dante Alighieri: En realidad la experiencia enseña sistemáticamente y sin embargo su curso de instrucción devora los años del hombre de manera que el valor de sus lecciones disminuye con el tiempo necesario para adquirir su sabiduría especial.

“Por mí raza hablará el espíritu”. José Vasconcelos

Índice

<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción</i>	2
<i>Marco teórico</i>	4
Propiedades generales de los aminoácidos.....	5
Formación de péptidos	6
Propiedades hidrofóbicas de los aminoácidos.....	7
Solubilidad de las proteínas.....	8
Niveles de estructura de una proteína	9
Fuerzas estabilizadoras de los diferentes niveles estructurales de una proteína (Fennema, 1993 y Badui, 2006).	10
Desnaturalización de las proteínas	11
Aspectos energéticos de la desnaturalización de proteínas	14
Características de caseinato de sodio	15
Características de suero lácteo	20
Características de proteína de soya hidroliza	24
Conceptos fundamentales del comportamiento interfacial de proteínas	29
<i>Tensión superficial: Isoterma de Gibbs</i> (Castellan, 1998, Maldonado, 2006 y Malmsten, 2003).	31
Medición de tensión superficial	32
Energía libre en la interfase (Jaycock, 1981)	34
Entropía de superficie.....	36
Adsorción.....	36
Cinética de adsorción	38
Emulsiones y Espumas.....	40
<i>Metodología Experimental</i>	42
Actividad preliminar 1	43
Actividad preliminar 2	44
Actividad preliminar 3	45
Actividad preliminar 4	46
Objetivo particular 1: Determinación de tensión superficial en función de la concentración de soluto y pH del medio.	47
Objetivo particular 2. Determinación de la tensión superficial con respecto al tiempo.	52
RESULTADOS Y DISCUSIONES	52

Determinación de parámetros termodinámicos de caseinato de sodio disperso en medio básico de pH 8 y pH 9.	52
Determinación de parámetros termodinámicos de proteína de suero lácteo disperso en medio básico pH 9 y medio ácido pH 5.	56
Determinación de parámetros termodinámicos de proteína de soya hidrolizada dispersa en medio básico pH 9 y medio ácido pH 5.	61
Estudio cinético de adsorción de caseinato de sodio en medio alcalino.	65
Estudio cinético de adsorción de proteína de suero lácteo en medio ácido (pH 5) y medio básico (pH 9).	67
Estudio cinético de adsorción de proteína de soya hidrolizable (pH 5) y medio básico (pH 9).	70
<i>Conclusiones</i>	72
<i>Recomendaciones</i>	74
<i>Glosario</i>	75
<i>Bibliografía</i>	77
<i>Anexos</i>	81
<i>Anexo 1</i>	81
<i>Anexo 2</i>	83
<i>Anexo 3</i>	85

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de un α -aminoácido.....	5
Figura 2. Formación de un péptido.....	6
Figura 3. Niveles de estructura de las proteínas.....	9
Figura 4. Formas de interacciones que se desarrollan para la formación de una proteína.....	10
Figura 5. Modelo de desnaturalización de proteínas.....	11
Figura 6. Estructura de α - caseína (Dairy Chemistry and Physics).....	17
Figura 7. Estructura de κ -caseína (Dairy Chemistry and Physics).....	17
Figura 8. Diagrama de proceso para la obtención de caseinato de sodio (Vega, 2006).....	18
Figura 9. Estructura terciaria del monómero de β -lactoglobulina.....	22
Figura 10. Diagrama de proceso para la obtención de lactosa suero lácteo y suero lácteo desmineralizado (Morr, 1993).....	23
Figura 11. Estructura cuaternaria de la proteína de soya.....	27
Figura 12. Fuerzas de interacción entre moléculas en el seno de la solución y en la interfase.....	31
Figura 13. Línea de contacto trifásico.....	33
Figura 14. Geometría de anillo de Du Noüy.....	33
Figura 15. Configuración de un polímero tensioactivo en la interfase aceite- agua ó aire –agua.....	37
Figura 16. Etapas del proceso de adsorción dinámico de proteínas en interfases líquido-fluido (Wege, 2002).....	39
Figura 17. Cuadro de metodología experimental.....	42
Figura 18. Gráfica de tensión interfacial en función de la concentración de soluto en estudio disperso en medio ácido o básico.....	49
Figura 19. Gráfica de presión interfacial en función de la concentración de soluto disperso en medio ácido o básico.....	49
Figura 20. Extensión de una sustancia A sobre un líquido B.....	50
Figura 21. Gráfica de trabajo de cohesión en función de la concentración de soluto disperso en medio ácido o básico.....	51
Figura 22. Concentración interfacial en función de la concentración de soluto disperso en medio ácido o básico.....	51
Figura 23. Tensiómetro de Du Noüy.....	81

Índice de tablas

Tabla 1. α -aminoácidos frecuentemente encontrados en las proteínas.....	7
Tabla 2. Las caseínas y características químicas (Ruis, 2007).....	16
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la β -lactoglobulina (Morr & col, 1993).....	21
Tabla 4. Composición promedio de las partes de la soya (Salunkhe, 1992).....	25
Tabla 5. Contenido de aminoácidos del concentrado de soya (Salunkhe, 1992).....	25
Tabla 6. Características de las proteínas de la soya.....	26
Tabla 7. Agentes emulsionantes empleados en distintos sectores de la industria alimentaria.....	43
Tabla 8. Formulaciones de proteína de suero de leche pH 9.....	44
Tabla 9. Formulaciones de proteína de suero de leche pH 5.....	44
Tabla 10. Formulaciones de proteína de soya hidrolizada pH9.....	44
Tabla 11. Formulaciones de proteína de soya hidrolizada pH 5.....	44
Tabla 12. Formulaciones de caseinato de sodio pH 9.....	45
Tabla 13. Formulaciones de caseinato de sodio pH 8.....	45
Tabla 14. Reactivos implementados para la elaboración de las soluciones reguladoras de pH.....	45
Tabla 15. Concentraciones idóneas de caseinato de sodio que presentaron mayor actividad superficial.....	65
Tabla 16. Concentraciones idóneas de proteína de suero lácteo que presentaron mayor actividad superficial.....	67
Tabla 17. Concentraciones idóneas de proteína de soya que presentaron mayor actividad superficial.....	70

Índice de gráficas

Gráfica 1. Abatimiento de la tensión interfacial que provoca el caseinato de sodio disperso en sistemas alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).....	53
Gráfica 2. Presión interfacial en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en sistemas alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).....	54
Gráfica 3. Trabajo de cohesión en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en medios alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).....	54
Gráfica 4. Concentración interfacial en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en medios alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).....	55
Gráfica 5.- Tensión superficial en función de la concentración de proteína de suero de leche, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	56
Gráfica 6.- Presión superficial en función de la concentración de suero de leche, pH 5(rojo) y pH 9 (azul).....	58
Gráfica 7.- Trabajo de cohesión en función de la concentración de proteína de suero de leche, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	59
Gráfica 8.- Concentración superficial en función de la concentración de proteína de suero lácteo, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	59
Gráfica 9.- Tensión superficial en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (azul) y pH 5 (rojo).....	61
Gráfica 10.- Presión superficial en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada pH 9(rojo) y pH 5 (azul).....	62
Gráfica 11.- Trabajo de cohesión en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (rojo) y pH 5 (azul).....	63
Gráfica 12.- Concentración superficial en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (azul) y pH 5 (rojo).....	64
Gráfica 13. Cinética de adsorción de caseinato de sodio en función del pH 9 (rojo) y pH 8 (azul).....	65
Gráfica 14. Cinética del trabajo cohesión que ejerce el caseinato de sodio en la interfase en función de pH 8 (azul) y pH 9 (rojo).....	66
Gráfica 15. Cinética de adsorción de proteína de suero lácteo en función del pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	68
Gráfica 16. Cinética del trabajo cohesión que ejerce la proteína de suero lácteo en la interfase en función de pH 5 (azul) y pH 9 (rojo).....	69
Gráfica 17. Cinética de adsorción de proteína de soya hidrolizada en función del pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	70
Gráfica 18. Cinética del trabajo cohesión que ejerce la proteína de soya hidrolizada en la interfase en función de pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).....	71

Nomenclatura

A= Área superficial medido en centímetros cuadrados

A= Energía libre de Helmholtz

Å= Unidad llamada **ångström**, es una unidad de longitud empleada principalmente para expresar longitudes de onda, distancias moleculares y atómicas ($1 \text{ Å} = 1 \times 10^{-10}$ metros = 0,1 nanómetros)

B= Representa la pendiente de $d\gamma/dC$

C= Concentración de soluto

°C= Grados centígrados

cm= Centímetros

cm²= Centímetros cuadrados

Cl⁻= Anión cloro

Dalton= Es una unidad de masa empleada en física y química, especialmente en la medida de masas atómicas y moleculares. Está definida como la doceava parte (1/12) de la masa de un átomo neutro y no enlazado de carbono-12

Dinas= Unidad de fuerza del sistema cegesimal

dA= Derivada de área superficial

dG= Derivada de la energía libre de Gibbs

dH= Derivada de la entalpia

dn= Derivada del número de moles

dP= Derivada de presión

dS= Derivada de entropía

dU= Derivada de la energía interna

G= Energía libre de Gibbs

g= Gramos

H= Entalpía

K_D= Constante de desnaturalización de proteínas

KDa= Kilodaltons

Log= Logaritmo base diez

N= Normalidad

NaOH= Hidróxido de sodio

Na⁺= Cation de sodio

M= Concentración Molar

mJ= Milijules

P= Presión

pH= Potencial de iones Hidrogeno

pI= Punto isoelectrico de proteínas

P_N= Proteína nativa

P_D= Proteína desnaturalizada

pK_A= Constante de ionización

q_{reversible}= Energía en forma de calor que puede regresar a su estado nativo

R= Constante de los gases ideales

®= Marca registrada

S= Entropía

T= Temperatura

U= Energía interna

V^s= Volumen superficial

W= Trabajo

W_{max}= Trabajo máximo que se ejerce en un sistema

α= Alfa

β= Beta

γ= Tensión superficial

Γ= Exceso de soluto

π= Presión superficial

Θ= Tiempo

Δ = Diferencial

μ = Potencial químico

δ = Derivada paracial

ρ = Densidad

Resumen

El objetivo de esta tesis es conocer las posibles rutas de modificación que sufren dos derivados proteicos de la leche que se utilizan con fines tecnológicos en la industria alimentaria tales como: caseinato de sodio y el remanente -suero lácteo- que se obtiene en la elaboración de quesos así como también de una proteína de origen vegetal (proteína de soya hidrolizada) que se emplea en sopas y cremas como agente emulsificante, por citar algunas aplicaciones industriales donde está inmiscuido el fenómeno de adsorción. Los estudios realizados muestran que estas macromoléculas en solución presentan un comportamiento complejo que se manifiesta en la asociación/autoensamblaje mediado por interacciones hidrofóbicas y modulado por la concentración y el pH.

El caseinato de sodio presenta funcionalidad superficial en medios alcalinos; pH 8 y pH 9, observando que existe afinidad en dichas condiciones presentando actividad superficial positiva, donde a la concentración de 0.7 % en peso en un pH igual a 8 muestra la mayor cantidad de moléculas adsorbidas en la superficie, reflejándose en el abatimiento de la tensión superficial empero la cinética en la que se lleva a cabo la adsorción en la superficie en ambos sistemas no es del todo efectivo.

La β -lactoglobulina, proteína predominante en el suero lácteo presentó actividad superficial en todo el intervalo de concentraciones que se estudió en medio alcalino, siendo la concentración de 0.7 % en peso donde se manifestó marcadamente la adsorción de moléculas en la superficie pero este proceso no es del todo rápido ya que tarda cerca de cuatro horas en acumularse dichas moléculas, mientras que en medio ácido existió un abatimiento de la tensión superficial mayor en los primeros instantes del proceso, pero al continuar el fenómeno de adsorción las moléculas migraban al seno de la solución, formando una película delgada en la superficie proclive a roturas mecánicas o térmicas.

Y por último la proteína de soya, macromolécula que posee β -conglucina como principal responsable de la funcionalidad superficial, presentó un comportamiento superficial peculiar; ya que a la concentración de 0.6 % en peso disperso en medio básico éste es el límite superior que se puede utilizar apropiadamente para fines tecnológicos, sin embargo cuando la proteína se encuentra próximo a su punto isoeléctrico, la actividad superficial inicia desde esta concentración estando en función de la concentración y del proceso de desnaturalización superficial, siendo así un proceso espontáneo empero estas moléculas empezaron a migrar al seno acuoso del sistema siendo los primeros instantes idóneos para emplearla para fines tecnológicos tales como emulsiones y espumas.

Conocer todas las posibles modificaciones que conlleva la adsorción de proteínas mediado por la variación del pH del medio acuoso puede contribuir a aportar información concerniente a: cuál es la cantidad necesaria para que un sistema disperso pueda ser estable o en qué condiciones puede desarrollarse óptimamente o en su defecto conocer el tiempo idóneo para la adición de emulgentes o espumantes en un proceso tecnológico de la industria alimentaria, es decir; minimizar la incertidumbre en la implementación de estas moléculas, por lo tanto, maximizar los beneficios de emplear

proteínas para la estabilidad de sistemas inestables como emulsiones y espumas es el objetivo.

Introducción

La formulación de nuevos productos alimentarios o la optimización de los productos tradicionales, está condicionada al conocimiento de las características fisicoquímicas de sus componentes. Un núcleo importante de los productos alimentarios son dispersiones complejas, tales como emulsiones; sistemas líquido-líquido y espumas; sistemas líquido-gas. Ahora bien, la elaboración de este tipo de dispersiones está supeditada a la presencia de proteínas y/o surfactantes de bajo peso molecular. Estos compuestos abaten la tensión superficial del sistema, es decir, estabilizan dicho sistema debido a su naturaleza **anfipática** que hace que se concentren en la interfase líquido fluido.

Se producen alimentos con bajo contenido en grasas, alimentos instantáneos o para dietas hospitalarias entre otros, ricos en toda clase de nutrimentos que hay que cuidar, almacenar, procesar, etcétera. Por esta razón, es indispensable conocer todas las posibles rutas de modificación tanto positiva como negativa que sufren las proteínas, para obtener mayores beneficios de ellas. Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en los seres vivos y juegan un papel importante en todos los aspectos de la estructura y funciones de las células. Son biopolímeros de α -aminoácidos, denominados así porque el grupo amino está enlazado al átomo de carbono α , átomo más próximo al grupo carbonilo. Las propiedades físicas y químicas de las proteínas se determinan a partir de los aminoácidos que los forman (Wilde, 2004).

En la presente tesis se presenta el estudio de tres proteínas con funcionalidad superficial, que se entiende por propiedades funcionales a las propiedades fisicoquímicas de polisacáridos y proteínas que afectan su comportamiento en los productos alimentarios ya sea durante la preparación, el procesado, almacenamiento o consumo de los mismos, es decir, cualquier propiedad (con excepción de las nutricionales) que afecta su utilización (Hall, 1996).

El objetivo de esta tesis es evaluar la funcionalidad superficial de tres proteínas adsorbidas en sistemas modelo. A partir del conocimiento del comportamiento cinético y propiedades termodinámicas de los sistemas modelos se puede avanzar hacia el estudio de sistemas más complejos y finalmente lograr la formulación de productos que sean viables para su producción industrial, que hoy en día son aditivos usados en la producción de helados, salsas, aderezos, cremas e infinidad de productos en el que se presentan espumas y emulsiones, sistemas coloidales inestables expresado en términos termodinámicos. Es en esta inestabilidad donde radica el principal problema para la caracterización de estos sistemas ya que la fase dispersada sólo lo estará durante un período de tiempo finito. Este tiempo depende de las características que separa ambas fases por lo que el estudio de interfaces fluidas constituye uno de los ámbitos de

investigación más importantes dentro del campo de los coloides alimentarios. Gran parte de los estudios realizados hasta la fecha presentan sin embargo la dificultad de ajustar correctamente los resultados experimentales a los modelos propuestos para emulsiones y espumas. Existen además problemas relacionados con las innovaciones o modificaciones que se tienen que introducir en los distintos dispositivos experimentales para producir la interfaz aceite-agua, así como la mayor complejidad de los estudios planteados en este tipo de interfaz frente a los realizados en la interface aire-agua.

A la dificultad de caracterización de estos sistemas se ha de añadir el hecho de que a gran parte de los productos alimentarios actuales se les exige que posean ciertas propiedades funcionales y que presenten una serie de atributos: una textura adecuada, buen sabor, color, etcétera. En este sentido los retos de la industria alimentaria son muy amplios, ya que no sólo se trata de mejorar las formulaciones tradicionales o existentes (Tejera, 2008).

Los emulsificantes tienen como función estabilizar las mezclas de líquidos inmiscibles, en virtud de que actúan en la interfase de la emulsión, también se les designa con el nombre de surfactantes, proveniente del anglicismo *surfactant*, que a su vez es una contracción de las palabras *surface active agent* (Badui, 2006).

Los Surfactantes de bajo peso molecular como: Estearato de polioxietileno (E-430), Monolaurato de polioxietileno (E-432), Triestearato de polioxietileno (E-436), pertenecen al amplio mundo de surfactantes que se emplean en la industria alimentaria, y del E-432, E-436 se conocen más con el nombre de *Twens*®, una marca registrada de Rohn & Haas. Se utilizan también como detergentes en distintas aplicaciones. En España está autorizado el uso de los *Twens* solamente en confitería, repostería y elaboración de galletas. En determinadas condiciones experimentales estos emulsionantes son capaces de inducir alteraciones en el estómago de ratas con deficiencias nutricionales previas. La autorización de su uso como aditivo alimentario está en reconsideración por parte de la Unión Europea.

Una de las tendencias líderes en este año es la vuelta hacia la "nutrición con comida de verdad", que incluye la mezcla de diferentes alimentos para lograr máximos beneficios para la salud, la elección de los alimentos por su valor nutritivo intrínseco (como frutos secos o frutas) y la integración de suplementos alimenticios, ahora bien, los consumidores están considerando si un producto cuenta con aditivos artificiales o jarabe de maíz alto en fructosa en la evaluación de su valor nutricional, es por lo tanto, la presencia de constituyentes con valor nutritivo elevado y con aptitudes funcionales, son argumentos que abogan en favor de la adición de un emulsificante o espumante de origen "natural".

En la actualidad la tendencia en la cual el consumidor busca una etiqueta de fácil comprensión y entendimiento, sin sacrificar la textura ni funcionalidad de su producto. Esta tendencia ha implicado al productor el reto de buscar nuevos procesos tecnológicos, que con remedios químicos logren dar estabilidad al producto final. La forma en la que se ha atacado esta necesidad ha sido por medio de modificaciones

físicas que hacen que las proteínas permitan aplicarse con la misma funcionalidad y desempeño que surfactantes de bajo peso molecular. Esto es declarando en la etiqueta como “proteínas”. Los beneficios de emplear proteínas son: ahorros en la aplicación, calidad constante, mejor desempeño que algunos otros emulsificantes o espumantes, disminución de tiempos de proceso, mayor estabilidad o vida de anaquel.

Marco teórico

Durante los últimos años, el conocimiento sobre las proteínas, principales constituyentes de las células y tejidos de la materia viva se incrementaron de una manera prodigiosa. En la ciencia de los alimentos los constituyentes proteicos también intervienen bajo formas muy diversas. Representan un papel nutricional esencial, tanto para la alimentación humana como para los animales. Un aspecto de preocupación, lo constituye la insuficiente disponibilidad de alimentos proteicos, a escala mundial o regional, que tanto es de naturaleza agroalimentaria como económica.

Las proteínas también tienen una función muy importante en cuanto a la estructura y cualidades organolépticas de numerosos alimentos que se consumen directamente o se elaboran; así, la consistencia y textura de la carne y diversos productos cárnicos, de la leche y quesos, la masa de panadería y el pan, dependen principalmente de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los constituyentes proteicos. Aún en el caso de alimentos elaborados con bajo contenido en proteína estos constituyentes pueden tener un papel “funcional” o tecnológico básico. En efecto, citando por ejemplo, las propiedades de adsorción y retención de agua de las proteínas de soya, las propiedades gelificantes de las proteínas de la clara de huevo y suero lácteo, así como las propiedades emulsificantes de los caseinatos se utilizan ventajosamente. Hay una completa industria de ingredientes proteicos y son numerosas las empresas que actualmente ofertan una larga gama de productos proteicos líquidos, concentrados, congelados o deshidratados que poseen propiedades funcionales bien definidas (Linden, 1994).

Una aplicación de las proteínas es su uso como surfactantes en alimentos emulsionados o espumados. Las proteínas son muy susceptibles al medio que las rodea produciendo un cambio conformacional o químico repercutiendo en su funcionalidad.

Las propiedades funcionales pueden categorizarse en tres grupos (Cheftel, 1989):

- Propiedades de hidratación: Dependientes de las interacciones de la proteína con el agua. Entre ellas se encuentran la adsorción, retención de agua, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad.

- Propiedades dependientes de las interacciones intermoleculares: Precipitación, floculación y gelificación.
- Propiedades superficiales: Emulsificación y espumado.

Propiedades generales de los aminoácidos

Cada aminoácido tiene una cadena lateral, R, característica que influye en sus propiedades fisicoquímicas y por tanto en las de la proteína de la que forma parte. Según la polaridad de esta cadena lateral, es posible agrupar a los aminoácidos en cuatro clases (Fennema, 1993).

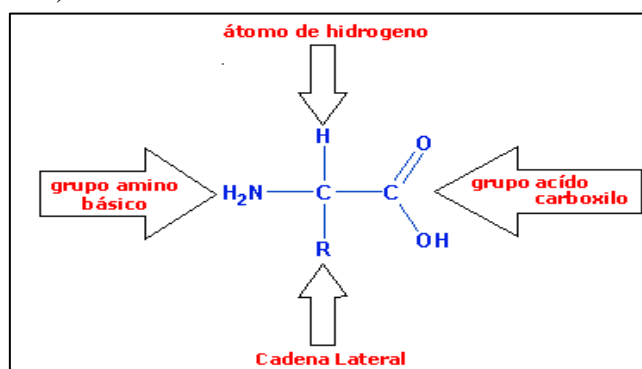


Figura 1.- Estructura general de un α -aminoácido

En la figura uno se muestra la molécula orgánica con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). Todos los aminoácidos componentes de las proteínas son L-alfa-aminoácidos. Esto significa que el grupo amino está unido al carbono contiguo al grupo carboxilo (carbón alfa) o, dicho de otro modo, que tanto el carboxilo como el amino están unidos al mismo carbón; además, a este carbono alfa se unen un hidrógeno (H) y una cadena lateral (habitualmente denominada cadena lateral o radical diferente) (Badui, 2006)

Aminoácidos con cadenas laterales no polares o hidrófobas como: (Alanina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Prolina, Fenilalanina, Valina), son menos solubles en agua que los aminoácidos polares. Su hidrofobia aumenta con la longitud de la cadena lateral **alifática**.

Aminoácidos con cadenas laterales polares no cargados o hidrófilas, poseen grupos funcionales neutros y polares, capaces de establecer puentes de hidrogeno con moléculas adecuadas con el agua. La polaridad de la Serina, Treonina y Tirosina está relacionada con sus grupos hidroxilo ($-\text{OH}$); la de la Asparagina y la Glutamina lo está, en cambio, con su grupo amida ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) y la de la cisteína con su grupo tiol ($-\text{SH}$).

Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de tres proteínas adsorbidas en la interfase (líquido-líquido)

Aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente (a pH próximo a 7). Forman parte de esta clase la Lisina, Arginina e Histidina.

Aminoácidos con cadena lateral negativamente cargada (a pH próximo a 7). Este grupo está formado por los Ácido aspártico y Glutámico.

Formación de péptidos

Los péptidos son cadenas lineales de aminoácidos enlazados covalentemente denominado enlace peptídico de acuerdo a la figura dos. Cada péptido o polipéptido se suele escribir, convencionalmente, de izquierda a derecha, empezando por el extremo N- terminal que posee un grupo amino libre y finalizando por el extremo C- terminal en el que se encuentra un grupo carboxilo libre, de tal manera que el eje o esqueleto del péptido, formado por una unidad de seis átomos (-NH-CH-CO-), es idéntico a todos ellos.

Por otra parte, el carácter parcial de doble enlace del enlace peptídico (-C-N-) determina la disposición espacial de éste en un mismo plano, con distancias y ángulos fijos. Como consecuencia, el enlace peptídico presenta cierta rigidez e inmoviliza en el plano a los átomos que lo forman (Nelson, 2005).

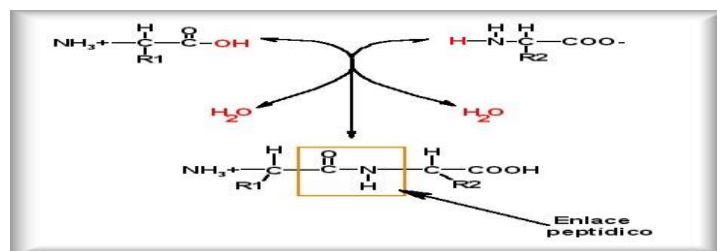
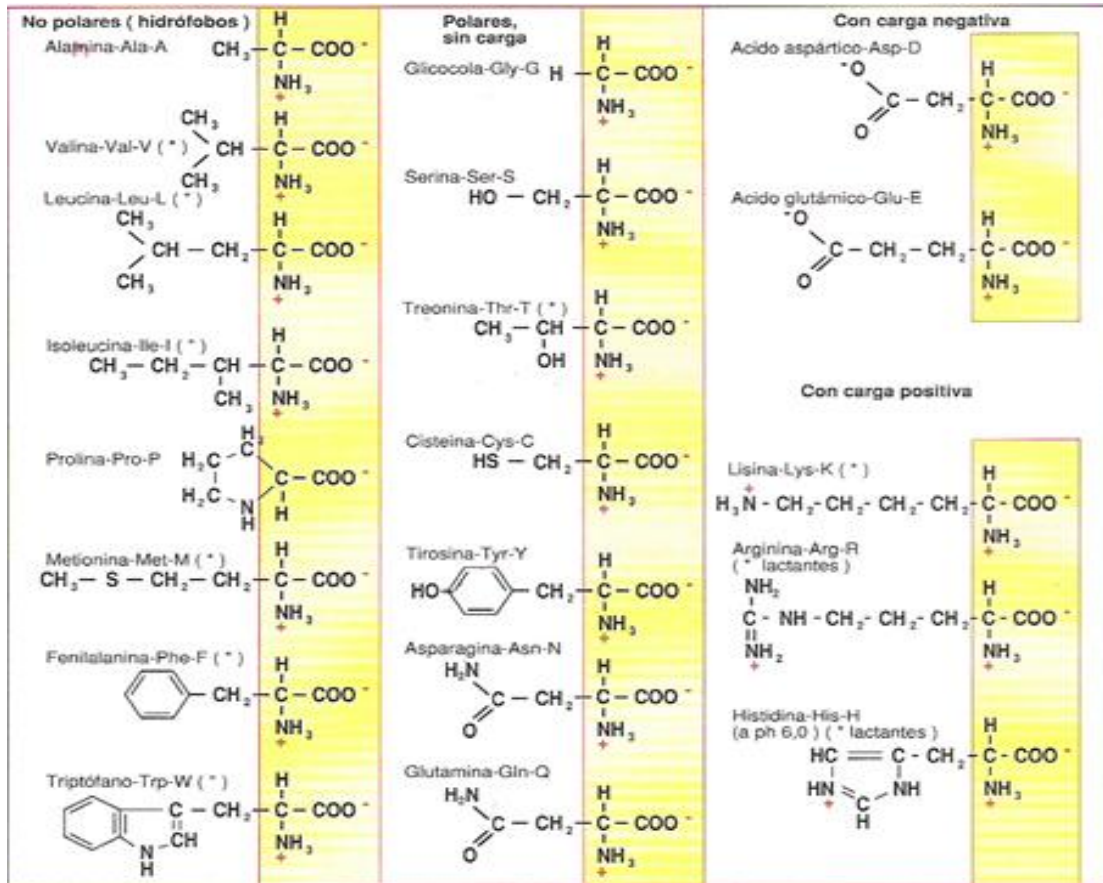


Figura 2. Representación de un enlace peptídico.

Tabla 1. α -aminoácidos frecuentemente encontrados en las proteínas (Wade, 2004).



En la tabla uno se muestra de forma detallada la estructura química de 20 aminoácidos de los cuales diez aminoácidos son **esenciales**: (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Thr, His, Lys) que son aquellos que no pueden ser sintetizados en el organismo y para obtenerlos es necesario tomar alimentos ricos en proteínas que los contengan. Por otro lado los aminoácidos **no esenciales** (Pro, Gly, Ser, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Arg) son aquellos que pueden ser sintetizados en el organismo a partir de otras sustancias (Fennema, 1993).

Propiedades hidrofóbicas de los aminoácidos

A pesar de que generalmente los aminoácidos se escriben con un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH₂), su estructura real es iónica y depende del pH. El grupo carboxílico pierde un protón, dando lugar a un ión carboxilato, y el grupo amino se protona y da lugar a un ión amonio. A esta estructura se le denomina ión dipolar o *zwitterión* (del alemán <<i>ión dipolar>>). Los aminoácidos presentan una carga positiva en soluciones ácidas y carga negativa en soluciones básicas. Hay un punto intermedio donde las dos formas del aminoácido se encuentran en la misma proporción, como el *zwitterión* dipolar con una carga neta de cero. A este pH se le denomina pH isoelectrico o punto isoelectrico (pI) (Wide, 2004).

Uno de los principales factores que afectan a las propiedades fisicoquímicas, como la estructura, la solubilidad, la fijación de la grasa de proteínas y péptidos es la hidrofobia¹ de sus aminoácidos constitutivos. La hidrofobia puede definirse como el exceso de energía libre de un soluto disuelto en agua, comparada con la que ofrece en un disolvente orgánico en condiciones similares.

En las proteínas existe un gran número de grupos no polares; en general, las proteínas están compuestas por treinta a cincuenta por ciento de aminoácidos que poseen cadenas laterales apolares (Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, etcétera). En consecuencia, a lo largo de las cadenas polipeptídicas donde se encuentran estos grupos existe la tendencia a segregarse del contacto con el solvente acuoso, y formar estructuras con características **miscelares**. El solvente acuoso tiende a eliminar de su seno a aquellos grupos no polares con los que su interacción requerirían gran cantidad de energía, forzándolos a un arreglo tal que los sitúe lejos del solvente, en el interior de la molécula proteica, mientras que el resto de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman la proteína, aquellas que tienen características polares queden situados en contacto con el solvente (Camino, 2010).

A valores de pH superiores o inferiores al punto isoeléctrico, la proteína arrastra una carga eléctrica positiva o negativa y las moléculas del agua pueden interactuar con estas cargas, contribuyendo así a la solubilización. Además, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo tienen una tendencia a repelerse y a disociarse o desplegarse (Fennema, 1993).

Solubilidad de las proteínas

La solubilidad de las proteínas en agua es función de numerosos parámetros. Desde un punto de vista termodinámico, la solubilidad supone una separación de moléculas del disolvente, separación de moléculas de proteína y dispersión de las últimas en las primeras con máxima interacción entre proteína y disolvente. Para ser soluble, una proteína debe, por consiguiente, interactuar tanto cuanto sea posible con el disolvente (Fennema, 1993). Depende esencialmente de la distribución de los grupos polares (cargados o no) y apolares (hidrófobos) de la cadena lateral de los aminoácidos que la constituyen. (Cheftel, 1989).

1.-La interacción hidrófoba no es el resultado de repulsiones entre las moléculas de agua y las moléculas apolares, como sugiere el término, de hecho las interacciones entre estas son favorables en amplio intervalo de temperatura, aunque menores que los contactos de Van der Waals en el líquido apolar o los puentes de hidrogeno en el agua. Es el resultado de la tendencia de las moléculas no polares a interactuar preferentemente entre sí en lugar de hacerlo con el agua (Miñones, 2002).

Bigelow ha sugerido que la hidrofobicidad promedio de los residuos de aminoácidos y la carga son los dos más importantes factores que determinan la solubilidad de las proteínas (Harrington, 1961).

Niveles de estructura de una proteína

En la figura tres se bosqueja los niveles de estructuración que pueden tener las proteínas desde una secuencia lineal y ordenada de aminoácidos como es la *estructura primaria* que indica la conectividad covalente que existe entre los átomos y residuos de aminoácidos que existen en la molécula. Muchas de las propiedades de las proteínas derivan directa o indirectamente de la estructura primaria. Cualquier pliegue, enlace de hidrogeno o actividad catalítica depende de la estructura primaria.

Las cadenas peptídicas tienden adoptar ciertos ordenamientos moleculares debido a interacciones de enlaces de hidrógeno. En particular, los átomos de oxígeno del grupo carbonilo forman enlaces de hidrógeno con los hidrógenos del grupo amida (N-H). Existen, en general, dos ordenamientos moleculares de las proteínas gracias a los enlaces de hidrogeno: la hélice α y la lamina β -plegada. Cada uno de estos dos tipos de ordenamientos moleculares debidos a los enlaces de hidrógeno, en el caso de que se produzcan, se conoce como *estructura secundaria* de la proteína. La *estructura terciaria* de una proteína es su conformación tridimensional completa. Esta estructura incluye todas las estructuras secundarias, por último puede existir asociaciones de dos o más cadenas peptídicas de una proteína activa a lo que se le denomina *estructura cuaternaria* de la proteína.



Figura 3. Niveles de estructura de las proteínas

Fuerzas estabilizadoras de los diferentes niveles estructurales de una proteína (Fennema, 1993 y Badui, 2006).

Uniones disulfuro

Cuando en la estructura primaria de un polipeptido existe más de una cisteína, es posible que se formen uniones disulfuro entre diferentes segmentos de una misma cadena polipeptídica o entre diferentes cadenas polipeptídicas. Esto depende de dónde se encuentren colocadas las cisteínas, ya sea en una misma cadena o en cadenas diferentes.

Uniones electrostáticas

Para que se establezcan uniones electrostáticas entre las cadenas laterales de los aminoácidos que componen a una proteína, se requiere también que esta adquiera previamente una conformación en la que las cadenas con cargas opuestas se dispongan en el espacio de una manera tal, que estas puedan atraerse y contribuir así a estabilizar la conformación. Las atracciones electrostáticas contribuyen a la estabilidad de zonas de la proteína que están localizadas en su interior, lejos del alcance del solvente y rodeadas de aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen características apolares.

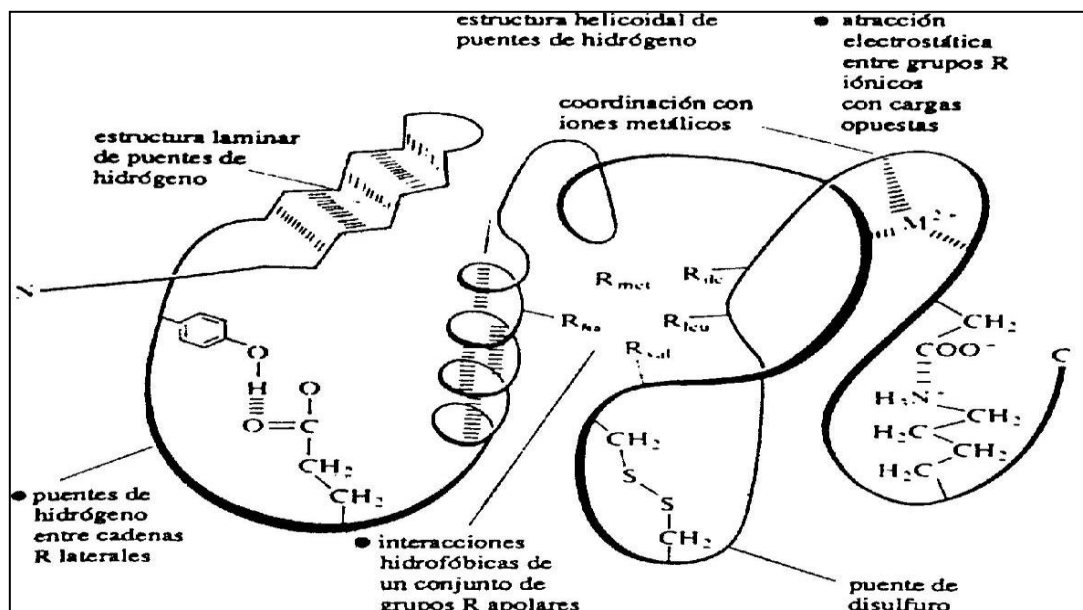


Figura 4. Formas de interacciones que se desarrollan para la formación de una proteína.

Uniones de Van der Waals

Entre cualquier par de átomos existe una fuerza de atracción, que se origina cuando en un momento dado se vuelve asimétrica la distribución de los electrones que giran

alrededor de los núcleos; debido a eso, en los átomos vecinos modifica la distribución de sus propios electrones.

De esta manera un átomo es atraído hacia otro, porque la distribución asimétrica de sus nubes electrónicas produce la aparición de polos en cada átomo, y estos se atraen al interactuar el polo negativo de unos con el polo positivo de otros.

Uniones por puentes de hidrogeno

Con el término de puente de hidrógeno se designa a la interacción de un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo como el nitrógeno, el oxígeno o el azufre, con otro átomo electronegativo.

Desnaturalización de las proteínas

La conformación de una proteína, ligada a su estructura secundaria y terciaria, es lábil. Por ello, el tratamiento de las proteínas con ácidos, álcalis, disoluciones salinas, disolventes, temperaturas elevadas y radiaciones citando algunas formas de alterar la estructura de las proteínas, pueden modificarla produciendo movimientos de los diferentes dominios de la proteína, que conlleva un aumento en la entropía de las moléculas, adoptando diferentes configuraciones.

La susceptibilidad de una proteína a la desnaturalización depende de la tendencia a que los agentes desnaturalizantes rompan las interacciones o enlaces que estabilizan las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. Como estas estructuras son distintas en las diferentes proteínas, los efectos de los agentes desnaturalizantes varían según de que se trate (Fennema, 1993).

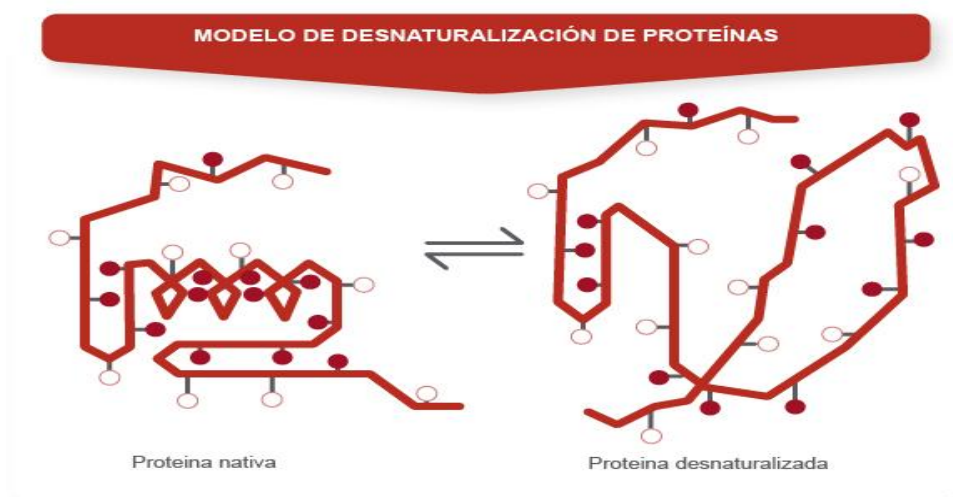


Figura 5. Modelo de desnaturalización de proteínas

Temperatura

Esta desnaturalización va muy frecuentemente acompañada de un descenso de la solubilidad de la proteína, debido a la exposición de los grupos hidrófobos y a la agregación de las moléculas proteicas desplegadas y de un incremento en la capacidad de absorción de agua de las proteínas.

Tratamientos mecánicos

Los repetidos estiramientos modifican la red proteica, principalmente por interrupción de la α -hélice.

Irradiación

Los efectos de las radiaciones electromagnéticas sobre las proteínas son variables, dependiendo de la longitud de onda y de la energía. Las radiaciones ultravioletas son absorbidas por los restos de aminoácidos aromáticos (Triptófano, Tirosina y fenilalanina), lo que puede provocar una modificación conformacional y, si el nivel energético es suficientemente elevado provocará la ruptura de enlaces cruzados disulfuro, las radiaciones gamma y otras radiaciones ionizantes pueden producir también cambios conformacionales junto con oxidación de restos aminoácidos y ruptura de enlaces covalentes.

Ácidos y álcalis

Un cambio en el pH del ambiente natural o fisiológico de las proteínas puede acarrear modificaciones importantes en su conformación debido a cambios en la ionización de las cadenas laterales cargadas porque se afecta el número de los puentes salinos que estabilizan la estructura nativa. La desnaturalización alcalina implica la neutralización de la carga positiva de las cadenas laterales de Lisina, Histidina y Argenina, una desnaturalización ácida implica la protonación de cargas de Asparagenina, Glutamina; ambos casos impiden la formación de una interacción electrostática (Fennema 1993).

Los pH ácidos y alcalinos favorecen el que las proteínas fijen aniones y cationes respectivamente. Esto puede afectar a las propiedades funcionales y en particular a la solubilidad. A pH apropiados, la presencia de iones polivalentes o de determinados polielectrólitos aumenta la formación de puentes iónicos entre moléculas proteicas. Los Ca^{++} pueden reticular las proteínas por sus grupos carboxilo o fosfoseril a pH neutro o alcalino (Cheftel, 1989).

Además en esos valores de pH los grupos ionizables que adquieren cargas negativas traen como consecuencia una expansión de las moléculas causadas por repulsión intramoleculares debido a sus cargas iguales (Badui, 2006).

Interfaces

Las moléculas proteicas que se adsorben en las interfaces de agua y aire o agua y fases sólidas o líquidas no acuosas suelen quedar irreversiblemente desnaturalizadas.

La velocidad de adsorción, que se detiene cuando la interfase se encuentra saturada (unos 2 mg/m^2) con proteína desnaturalizada (P_D) se ve controlada por la velocidad a que se difunde hacia la interfase la proteína nativa (P_N). Algunos investigadores han sugerido, para interpretar este fenómeno, que las moléculas de agua pueden existir en dos niveles energéticos:

a) Las situadas lejos de la interfase, que se encuentran en el nivel energético inferior, y pueden interaccionar con las zonas polares e iónicas de las proteínas y con otras moléculas de agua, y

b) Las situadas en la proximidad de la interfase, que se encuentran en un nivel energético superior y reaccionan fundamentalmente con otras moléculas de agua.

La desnaturalización proteica comienza con la difusión de la macromolécula hacia la interfase. En esta etapa, la proteína interacciona con las moléculas de agua de la interfase, de alto nivel energético y se producen microdesplegamientos de la estructura.

En la siguiente etapa la proteína parcialmente desplegada se hidrata, se activa y se inestabiliza (P^*), ya que existen muchos grupos hidrófobos expuestos a la fase acuosa. Los restos hidrófilos e hidrófobos intentan orientarse hacia sus respectivas fases, acuosa y no acuosa, a través de nuevos desplegamientos y de la extensión de la proteína en la interfase. La proteína, así adsorbida en la interfase, se desnaturaliza.

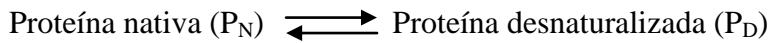
Algunas proteínas desprovistas de regiones fundamentalmente hidrófilas o hidrófobas, o que poseen estructuras estabilizadas por puentes disulfuro, no se adsorben con facilidad en la interfase (Fennema, 1993).

Cualquier sustancia tensoactiva tiende a acumularse en la interfase aire/agua o aceite/agua formando películas monomoleculares que se denominan *monocapas*. Si la concentración del tensoactivo es elevada, estas películas son fuertemente condensadas. El comportamiento de las moléculas de proteína en la interfase es diferente al de moléculas simples y pequeñas de otros surfactantes. Las sustancias de alto peso molecular con actividad interfacial, como proteínas, pueden acumularse en la interfase gracias a que presentan en su estructura cantidades significativas de grupos polares y no polares (Dickinson, 1992; Damodaran, 1996). Sin embargo a altas concentraciones pueden agregarse. Ello dependerá de la solubilidad que presente la molécula, lo cual estará en función de las interacciones existentes con el agua.

Además dichas interacciones estarán influenciadas por el pH, fuerza iónica, temperatura y composición de la subfase acuosa. La habilidad de las moléculas de un tensoactivo en evitar las interacciones directas entre los líquidos inmiscibles está gobernada por el empaquetamiento óptimo en la interfase, que dependerá de la geometría molecular, composición de aminoácidos presentes en las cadenas laterales que son más propensas a la repulsión electrostática.

Aspectos energéticos de la desnaturalización de proteínas

La termodinámica del proceso de desnaturalización es complicada. Se puede, sin embargo, considerar en forma simplificada de la siguiente manera:



La constante de equilibrio es:

$$K_D = \frac{[P_D]}{[P_N]} \quad (\text{Ec.1})$$

Los parámetros termodinámicos; ΔG° , ΔH° , ΔS° y ΔC_p° pueden obtenerse haciendo uso de las ecuaciones habituales.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad (\text{Ec.2})$$

$$\Delta H = -R \left[\frac{\delta(\ln K_D)}{\delta(1/T)} \right]_P \quad (\text{Ec.3})$$

Y de la ley de Van't Hoff

$$\frac{\delta(\ln K_D)}{\delta T} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (\text{Ec.4})$$

$$\begin{aligned} \Delta C_p^\circ &= \left(\frac{\delta \Delta H^\circ}{\delta T} \right)_P \\ &= T \left(\frac{\delta \Delta S^\circ}{\delta T} \right)_P \end{aligned}$$

y

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad (\text{Ec.5})$$

El incremento de la entalpía que acompaña al desplegamiento de una proteína indica que la forma nativa posee una energía libre menor que la desnaturalizada. El incremento de la entropía corresponde al desorden que acompaña al desplegamiento y el aumento del ΔC_p° está relacionado con la transferencia durante la desnaturalización de grupos apolares alifáticos o aromáticos a un ambiente acuoso, con la consiguiente desorganización de la estructura del agua (Fennema, 1993).

Características de caseinato de sodio

El papel de la leche en la naturaleza consiste básicamente en nutrir y proporcionar inmunología al neonato (Maldonado, 2006). La composición de la leche es extremadamente compleja, contiene aproximadamente (NEM, 2001): 87.3 % de agua, 3.9 % de grasa láctea y 8.8 % de sólidos no grasos. De estos últimos: 3.25 % de proteínas, 4.6 % de lactosa, 0.65 % de minerales, 0.18 % de ácidos, enzimas y vitaminas.

Las proteínas de la leche son de dos tipos, proteínas del suero lácteo y caseínas. Estas últimas constituyen más del 80 por ciento de las proteínas totales de la leche. Son proteínas flexibles que no presentan estructura cuaternaria (Dickinson, 2001). Las caseínas de la leche se pueden subdividir básicamente en cinco tipos; caseínas α_{s1} , α_{s2} , β , γ e κ .

Composición química

Todas las proteínas de la caseína son extremadamente flexibles y esencialmente desplegadas debido a que tienen un carácter anfifílico que surge de una separación entre grupos hidrófobos y distintas regiones hidrófilas a lo largo de la cadena peptídica. Debido a sus características, las diferentes caseínas exhiben una fuerte tendencia a asociarse a través de fuerzas hidrofóbicas e interacciones electrostáticas (Ruis, 2007)

Tienen un contenido de aminoácidos similar entre los distintos tipos, aunque la cisteína sólo está presente en pequeñas cantidades en las caseínas α_{s2} y κ . Los residuos de fosfoserina se encuentran en grupos y son responsables de la existencia de áreas hidrofílicas de fuerte carga negativa. Las moléculas también contienen bloques de residuos hidrofóbicos. La caseína β contiene la mayoría de los componentes hidrofóbicos y forman agregados con el grupo terminal hidrofílico N-terminal expuesto al solvente y la parte hidrofóbica hacia el interior (Stryer, 1998).

Tabla 2.- Las caseínas y características químicas (Ruis, 2007).

Fracción	Porcentaje presente en el caseinato	Peso molecular	Residuos fosforina	Punto isoelectrico	Estructura
Alfa_{s1}	38.5	23000	7-9	4.93	α hélice y β plegada
Alfa_{s2}	6	25000	10-13	5.34	α hélice y β plegada, puentes disulfuro
Beta	35.8	24000	5	5.24	α hélice y β plegada
Gamma	7	11600-20500	0 ó 1	5.24	α hélice y β plegada
Kappa	12.7	1980	1	5.76	α hélice y β plegada, puentes disulfuro

Estructura química

Recientemente, investigadores de la (USDA) Eastern Research Center of Philadelphia Reagional han estudiado las caseínas mediante espectroscopia de rayos x. Ellos han sido capaces de hacer estimaciones de la cantidad de estructura secundaria en las diversas caseínas.

Estos investigadores describen la estructura como un corto segmento hidrófilo de la derecha de la molécula conectado a un hidrófobo β -plegada en esta región.

Este está conectado a la región que contiene los grupos fosfato que está conectado a un corto tramo de α -helicoidal del segmento. Este está conectado a la muy hidrófoba carboxi-terminal de dominio que contiene cadenas β extendidas. Este modo sugiere que una α -caseína contiene aproximadamente 15 por ciento de alfa estructura helicoidal, 22 por ciento de estructura beta, giros 45 por ciento y 18 por ciento que no se puede especificar. Está es probablemente una aproximación razonable de la conformación de la molécula en solución y es razonablemente de acuerdo con las estimaciones hechas por otros métodos.

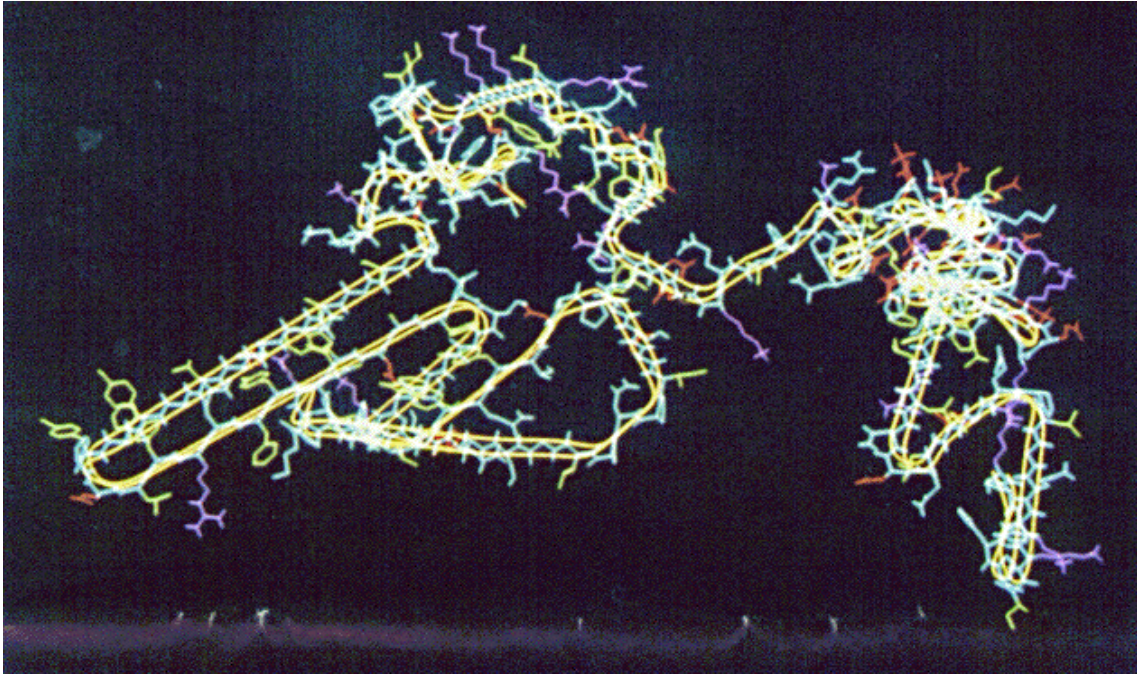


Figura 6. Estructura de α -caseína (Dairy Chemistry and Physics)

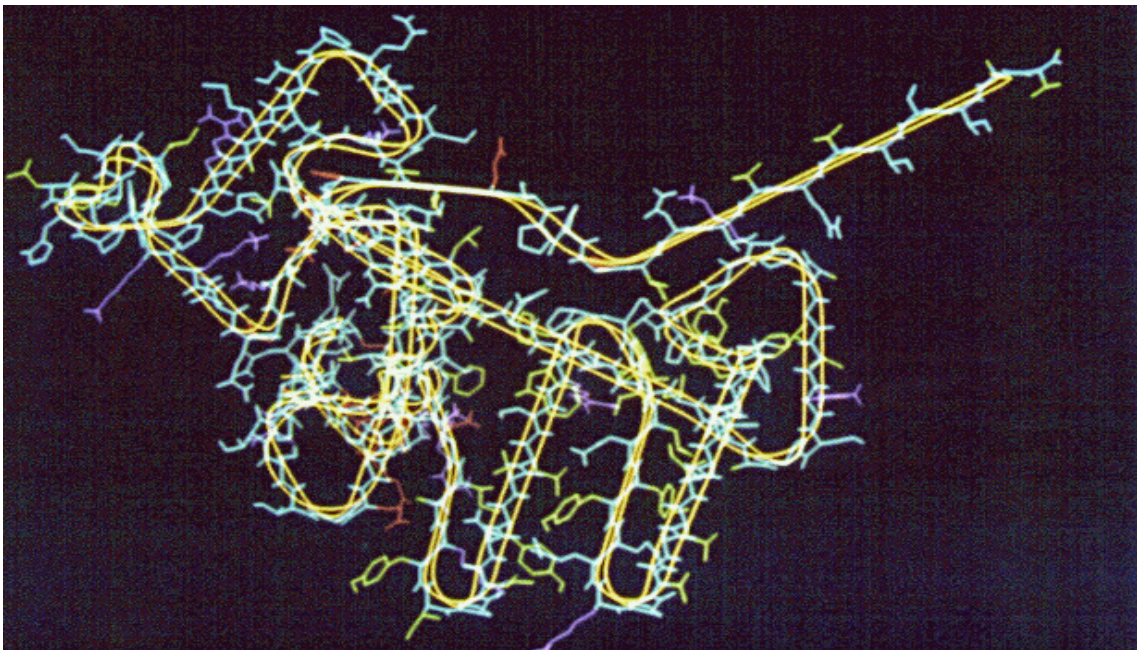


Figura 7. Estructura de κ -caseína (Dairy Chemistry and Physics)

En la conformación κ -caseína, estos científicos describen esta estructura como “caballo y piloto”. La sección del terminal amino de la molécula constituye el "caballo" y la sección Carbo-terminal el "piloto". Las dos patas del caballo se componen de β -estructura. Esto sugiere que el modo de κ -caseína contiene aproximadamente 16 por ciento de alfa estructura helicoidal, 27 por ciento de estructura beta, giros 37 por ciento y 20 por ciento que no se puede especificar. La sección de las “patas” son hidrófobos y los autores han postulado que esa puede ser el área de la interacción con otras caseínas (Se encuentra en: Base de datos de proteínas).

Obtención del caseinato de sodio

Los **caseinatos** pueden obtenerse a partir de la cuajada fresca de caseína ácida o a partir de la cuajada fresca de caseína ácida desecada, mediante la reacción en medio acuoso con uno o varios álcalis diluidos. La solución de caseinato que se obtiene se deshidrata hasta que queda una humedad del 3- 8 por ciento.

El caseinato de sodio que se empleó para este estudio contenía 92 por ciento de proteína, 6 por ciento de agua, 0.3 por ciento de lactosa, 0.45 por ciento de minerales y 1.25 por ciento de grasa de acuerdo con la ficha técnica brindada por LACTOPROT México S. de R.L. de C.V.

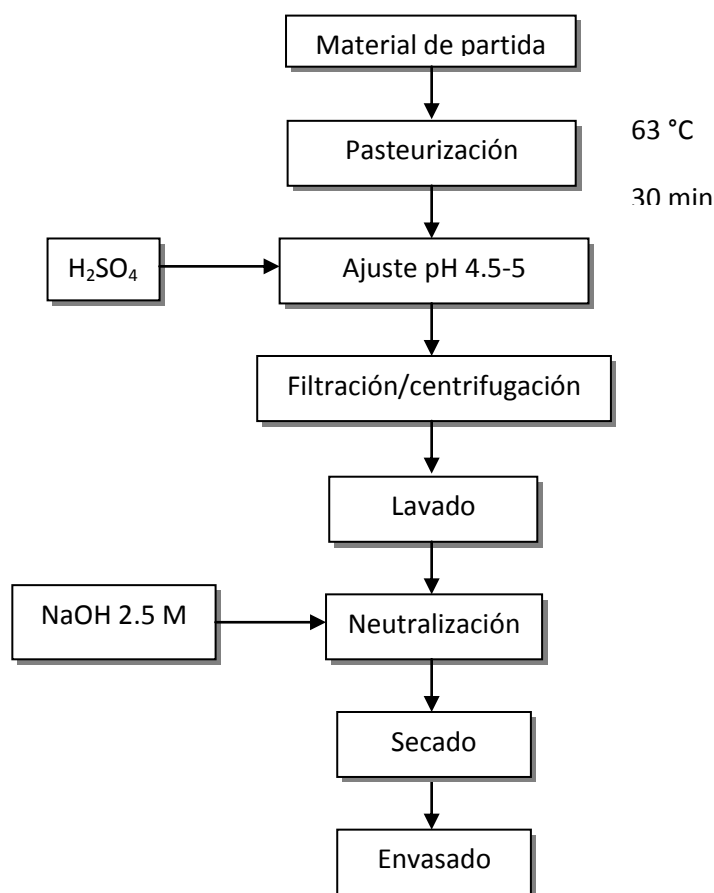


Figura 8. Diagrama de proceso para la obtención de caseinato de sodio (Vega, 2006).

La neutralización de los precipitados de caseína ácida y láctica insoluble, transformándolas en sales de sodio, potasio, amonio o calcio permite obtener un producto soluble más comúnmente denominado *caseinato*. En forma de subunidades monoméricas o en forma de agregados, los caseinatos pueden migrar rápidamente a la interfase aceite-agua de las emulsiones o de las espumas y estabilizarlas contra la coalescencia o el hundimiento. Los caseinatos muestran igualmente buenas propiedades emulsificantes cualquiera que sea el pH y la fuerza iónica, con un máximo de pH 10.4 (Linden, 1996).

El caseinato de sodio² es utilizado corrientemente en los productos alimentarios por su solubilidad, su absorción de agua, su estabilidad al calor, sus propiedades tensoactivas (emulsificación, formación de espuma) debidas a su conformación, así como por su viscosidad que puede generar.

Antecedentes de uso en la industria alimentaria.

El caseinato de sodio es uno de los ingredientes más versátiles en la industria láctea debido a su buena solubilidad (dependiendo del pH, temperatura, etcétera), naturaleza surfactante, resistencia al calor y capacidad de retención de agua. Es frecuentemente usado como agente estabilizante en emulsiones tales como: mezclas para helado, substitutos de crema para café, cremas al licor y cremas batidas. Como ejemplo, el helado es una espuma congelada que es estabilizada por un par de mecanismos simultáneos: la formación de hielo y subsiguiente concentración de los solutos en la fase no-congelada (en especial la proteína) y la desestabilización de la grasa debido al batido e incorporación de aire. El segundo mecanismo está directamente ligado a la incorporación de polisorbatos y/o mono y diglicéridos los cuales desplazan a la proteína de la superficie de la superficie del glóbulo graso y crean una muy delgada membrana alrededor del mismo que es extremadamente sensible a la acción mecánica, lo que permite que a medida que el aire es incorporado, los glóbulos de grasa parcialmente coalescan y crean una especie de collar de perlas alrededor de las burbujas de aire para estabilizarlas. Si el surfactante no desplaza a la proteína, dicha estructura no puede ser creada y el helado será de baja calidad lo que se manifestará en encogimiento durante el almacenado y muy rápido derretimiento (independientemente del contenido de gomas en la formulación) (Vega, 2006).

El caseinato de sodio es muy resistente a ser desplazado por otros surfactantes. (Wilde, 2004). Debido a la tolerancia al alcohol, caseinato de sodio es un emulsificante para estabilizar licores en crema.

2- La caseína es una proteína de la leche del tipo fosfoproteína que se separa de la leche por acidificación y forma una masa blanca. Las fosfoproteínas son un grupo de proteínas que están químicamente unidas a una sustancia que contiene ácido fosfórico, por lo tanto su molécula contiene un elemento fósforo. La caseína representa cerca del 77 al 82 por ciento de las proteínas presentes en la leche y el 2.7 por ciento en la composición de la leche líquida. Cuando coagula con renina, es llamada paracaseína, y cuando coagula a través de la reducción del pH es llamada caseína ácida. Cuando no está coagulada se le llama caseinógeno. La caseína es un sólido blanco-amarillento, sin sabor ni olor, insoluble en agua. Se dispersa bien en un medio alcalino, como una solución acuosa de hidróxido de sodio: NaOH, formando caseinatos de sodio (Ruis, 2007).

Características de suero lácteo

Durante el proceso de elaboración de los quesos, el remanente era vertido en el sistema de drenaje, vislumbrándose modificaciones drásticas en el medio ambiente, se ha investigado y sugerido maximizar la utilidad del suero lácteo modificando su funcionalidad y aprovechar la versatilidad de esta proteína ya que es usado como sustrato para fermentaciones industriales o destinada a alimentación animal, por diferentes técnicas (membranas de ultrafiltración, secado spray, nanofiltración) se obtienen sueros en polvo por medio de secado spray; concentrados de proteínas y aislados de proteína. Estos productos encuentran gran aplicación en la industria de los alimentos. Este suero es rico en proteínas especialmente **lactoalbuminas** y **lactoglobulinas**.

Composición química

La lactosa es el componente mayoritario del suero lácteo después del agua, azúcar único en la leche de los mamíferos, azúcar indispensable en los primeros estados de la vida. Es un disacárido, formado por glucosa y galactosa. La galactosa es esencial para el desarrollo del sistema nervioso; la glándula mamaria la sintetiza a partir de la glucosa sanguínea en el ser humano, y a partir de los ácidos volátiles en los rumiantes. Se presenta bajo las formas alfa y beta, en un perfecto equilibrio estereoquímico y en la proporción de un 37 por ciento para la forma alfa y en un 63 por ciento en la forma beta (Caric, 2010).

El ácido láctico en su utilización de ácidos orgánicos en raciones de lechones es una práctica profiláctica para evitar las diarreas por entero-bacterias. Si se produce una acidificación del aparato digestivo, tendrá como consecuencia el freno de la población de entero-bacterias, con un aumento espectacular de los lacto-bacilos. Si esta acidificación procede de la presencia de ácido láctico es más favorable que si la acidificación procede de la presencia de ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico), que dan lugar a sales no siempre deseables, como son los cloruros. La concentración de ácido láctico en los sueros lácteos es del 1-2 %, en 100 gramos de extracto seco. El valor nutritivo es de 3.500 calorías de energía metabolizable por kilogramo (Caric, 2010).

El contenido en minerales del lactosuero que es relativamente elevado en relación al extracto seco. El lactosuero contiene la mayor parte de las vitaminas hidrosolubles presentes en la leche; es particularmente rico en riboflavina, ácido pantoténico y piridoxina (Linden, 1994).

Si todas las fracciones, anteriormente consideradas y someramente descritas, tienen un valor importante dentro de la nutrición, todavía cobra mayor importancia cuando se hace referencia a esta fracción que queda por analizar.

Estructura química

Las proteínas del suero lácteo están compuestas por un 50 por ciento aproximadamente de β -lactoglobulina, un 30 % de α -lactoalbúmina, un 10 por ciento de globulina y un 10 por ciento de proteosomas-peptonas en las que se engloban lactoferritinas (proteína roja), glicoproteínas y enzimas; nucleasas, lactoperoxidasas, xantina oxidasa, lipasa estearasa, amilasa, fosfatasas ácidas y alcalinas, lisozima, aldolasa, catalasa, inhibidor de la tripsina, lactosa sintetasa, ceruloplasmina, sulfidriloxidasa y otras (Camino, 2010).

La β -lactoglobulina es el componente dominante entre las proteínas del concentrado de suero lácteo y tiende a gobernar sus propiedades funcionales (Mulvihill & Donovan, 1987; Apenten Khokhar y Galani, 2002). El poliformismo genético es una característica de la β -lactoglobulina, pudiéndose identificar siete variantes denominadas A, B, C, D, E, F y G, siendo las mayoritarias las formas A y B (Eigel y col, 1984). Todas las variantes de la β -lactoglobulina poseen 162 residuos de aminoácidos, sin embargo cada variante puede diferir en una a tres posiciones de los residuos, causadas por mutaciones en el código genético de la proteína.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la β -lactoglobulina (Morr y col, 1993)

Propiedad	β -lactoglobulina (β -Ig)
Peso molecular(Daltons)	18000
Estructura	Ramificada
Punto isoelectrico	5.2
Hidrofobicidad promedio (Kcal/residuo)	1075
Residuos apolares/mol	54
Residuos cisteína/mol	5
Residuos disulfuro/mol	2
Residuos sulfihidrido/mol	2
Residuos lisina/mol	15
Residuos ácido glutámico/mol	16
Residuos ácido aspártico/mol	10

En la tabla anterior se muestran las características químicas de la fracción proteica que constituye el suero lácteo (β -lactoglobulina), observando que poseen en mayores proporciones aminoácidos con carácter apolar, factor determinante en la adsorción en una superficie.

Estructura de la β -lactoglobulina

Una reciente comparación de las secuencias de aminoácidos en la familia de la β -lactoglobulina ha revelado un promedio de homología en 33 aminoácidos lo que indica que esos residuos son decisivos en la estructura y conformación de la proteína. El más alto grado de homología entre las proteínas ocurre en la región amino-terminal de cada molécula de proteína, siendo consistente las posiciones de las uniones disulfuro formadas entre Cis160-Cis 66 y Cis119-Cis106 y un grupo tiol en Cis121.

Se describe la estructura secundaria de la β -lg como monómero esférico (diámetro aproximado 36 Å) (Verheul y col, 1999) y conteniendo una región de estructura plana β . Se ha reportado que la molécula contiene un 10-15 por ciento de estructura α -hélice, 43 por ciento de regiones planas β y un 47 por ciento de estructura desordenada (Timasheff y col, 1966).

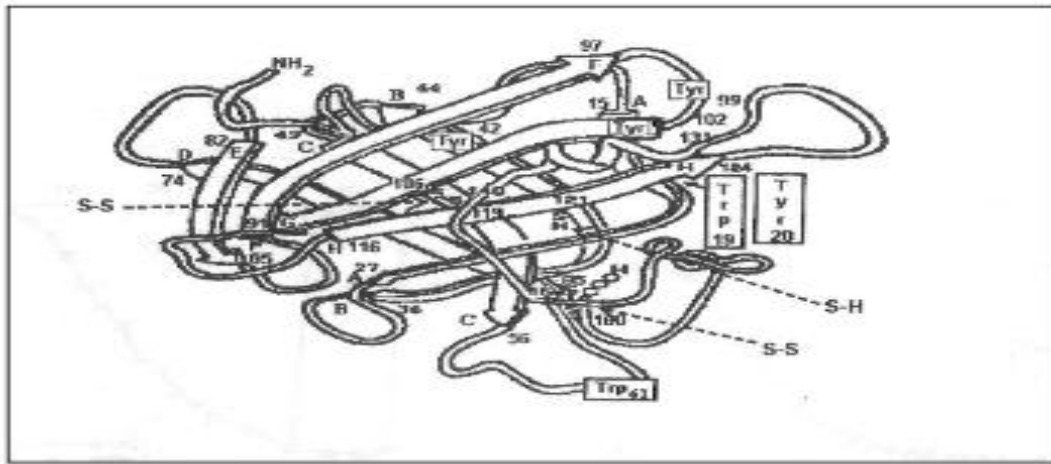


Figura 9. Estructura terciaria del monómero de β -lactoglobulina. Las flechas indican las zonas planas β , nominadas con letras A-1. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro y el grupo tiol libre (Philips y col, 1994).

Obtención de concentrados de suero lácteo

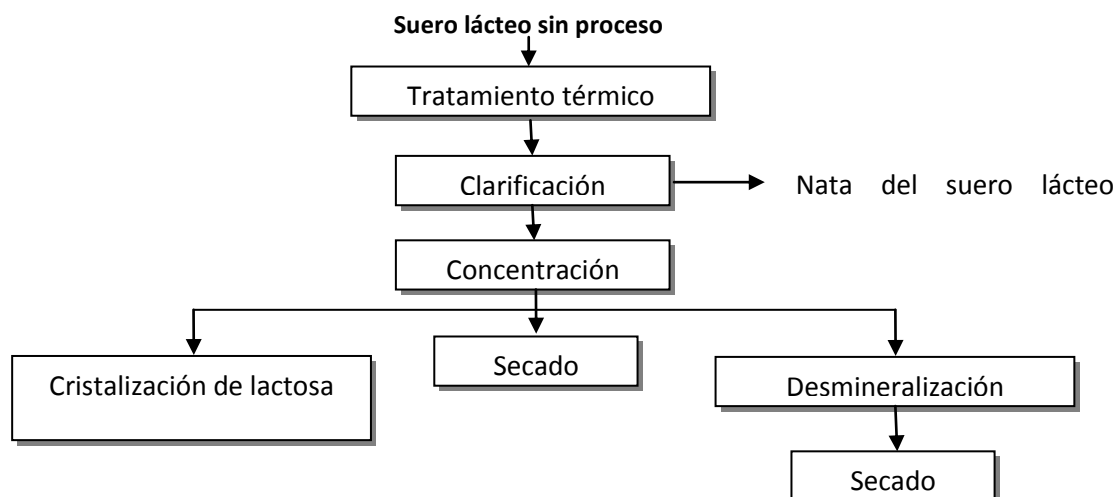


Figura 10. Diagrama de proceso para la obtención de lactosa, suero lácteo y suero lácteo desmineralizado (Morr, 1993).

El suero lácteo presentó: 79.6 por ciento de proteína, 6.8 por ciento de agua, 5.3 por ciento de grasa y minerales 3.1 y sólidos solubles 5.2 por ciento de acuerdo a la ficha técnica de LACTOPROT México S. de R.L. de C.V.

Antecedentes de uso en la industria alimentaria.

Los sueros y concentrados de proteínas de suero lácteo tienen muchas aplicaciones de valor funcional como ingrediente alimentario. Pueden modificar algunos o todas las propiedades de los alimentos: organolépticas, de hidratación, surfactantes, estructurales, de textura y reológicas resultando una mejora en la aceptación por el consumidor del producto acabado. Las proteínas de suero ofrecen un amplio abanico de potenciales aplicaciones. Un número importante de factores influyen en la funcionalidad de las proteínas de suero e incluyen la fuente de suero, el contenido de proteína, el tratamiento de calor aplicado al suero o al retenido durante la manufactura y el contenido en lípidos y sales.

Las proteínas de suero lácteo poseen la capacidad de ligar agua, por ejemplo esta agua mantenida en un gel tridimensional puede reducir los costos en la producción de alimentos y mejorar la percepción sensorial, la capacidad de ligar agua es importante cuando se usan proteínas de suero para productos viscosos como bebidas, sopas, salchichas y flanes. La capacidad de retener agua de las proteínas y sus consecuencias: hinchazón, gelificación y viscosidad son los mayores determinantes de la textura en muchos alimentos como queso, yogurt y productos ligeros en grasa. Dependiendo de su estado, las proteínas contribuyen a obtener la viscosidad deseada en sopas, salsas para ensaladas, rebozados. La formación de emulsiones, generalmente aceite en agua, es un proceso dinámico y energético en el cual se crea una interfase aceite-agua. Esa interfase está protegida por la adsorción de surfactantes y puede perderse por re-coalescencia cuando las gotas de grasa no están protegidas por surfactantes. La re-coalescencia es un

fenómeno importante en las emulsiones estabilizadas con proteínas debido al lento desarrollo de la película de proteína en las gotas de grasa de la nueva emulsión. Las proteínas de suero lácteo pueden actuar rápidamente sobre las interfaces aceite-agua y estabilizar las emulsiones, pueden aumentarse con la desnaturalización controlada de la proteína.

En particular la difusión y despliegado de la nueva interfase aceite-agua va aumentando la estabilización de las gotas de emulsión. El despliegado de las proteínas de suero expone a los residuos hidrófobos de los aminoácidos y facilita la habilidad de la proteína de orientarse en la interfase aceite-agua (Villalta y Monferrer, 2001).

En teoría, si se alteran las estructuras de la proteína, sería posible crear un impacto en la percepción del sabor, de tal forma que se puedan elaborar alimentos modificados, tales como productos bajos en grasa que sean comparables a productos similares con grasa.

Es decir, si se manipula la estructura de la gelatinización se afectarían las condiciones físicas que afectan la retención o liberación del sabor. También se está investigando la habilidad que las proteínas derivadas del suero pueden tener para estabilizar los alimentos congelados. La teoría es que debido a la forma en que las proteínas derivadas del suero estructuran el agua, es factible de alguna manera alterar la estructura del agua en postres lácteos congelados, retardando el crecimiento de los cristales de hielo. En el proceso de investigación se encontró que el impacto de las proteínas en el tamaño de los cristales de hielo, depende del tipo de proteína, y que las proteínas no retardaron el crecimiento de los cristales de hielo, pero los produjeron de menor tamaño inicial. Por lo que se está investigando la relación entre el crecimiento de los cristales de hielo y la influencia de varias fracciones de suero y tipos de azúcar.

La proteína de suero lácteo mejora la estructura cremosa y el sabor a leche en yogurt, leche recombinada y en otras aplicaciones lácteas. Usando concentrados de proteína de suero en combinación con otros ingredientes lácteos, se obtiene una palatabilidad y una cremosidad excelente en el yogurt final, de igual forma reduce la **sinéresis** y en productos recombinados se usa proteína de suero lácteo debido a su alto valor nutritivo y a su alto contenido en proteína (Gunasekaran y col., 2006).

En espumas vegetales o crema chantilly la proteína de suero lácteo mejora el volumen y también la textura de la espuma, además funciona como estabilizante en sistemas de tres fases, especialmente en toppings con un bajo valor de pH.

Características de proteína de soya hidroliza

La soya *Glycinemax*, es una importante semilla perteneciente a la familia de las leguminosas, existen tres especies principales: *Glycyneussuriensis*- en estado natural, *Glycinemax*- cultivada y *Glycinegracilis-intermedi*. Siendo *Glycinemax* la más desarrollada en el todo el mundo (Salunkhe, 1992).

La soya contiene pequeñas cantidades de péptidos y aminoácidos con dimensiones moleculares variables, lo cual puede deberse al residuo de una síntesis proteica incompleta o a la posibilidad de una degradación proteica. El contenido de lípidos de la soya y la composición de sus ácidos grasos es influenciado por genética así como también por factores ambientales (Salunkhe, 1992).

Composición química

Tabla 4. Composición promedio de las partes de la soya (Salunkhe, 1992)

Constituyente	Semilla entera (%)	Cotiledones (%)	Hipocotiledones (%)	Casco (%)
Soya americana				
Proteína cruda	40.4	43.4	40.8	9.0
Grasa cruda	22.3	24.3	12	0.9
N-libre + fibra	31.9	27.4	42.7	86.2
Cenizas	4.9	5.0	4.5	4.0
Soya Japonesa				
Proteína cruda	39.2	41.7	40.7	8.6
Grasa cruda	18.4	20.0	11.2	1.3
N-libre + fibra	37.4	33.3	44.0	86.6
Cenizas	5.0	5.0	4.2	4.5

Tabla 5. Contenido de aminoácidos del concentrado de soya (Salunkhe, 1992)

Aminoácidos	Contenido (g/16 g Nitrógeno)
Lisina	6.4
Metionina	1.1
Cistina	1.4
Triptófano	1.4
Isoleucina	4.6
Leucina	7.8
Fenilalanina	5.0
Valina	4.6
Arginina	7.3
Histidina	2.6
Tirosina	3.8
Serina	5.5
Ácido glutámico	11.8
Glicina	4.3
Alanina	4.3
Prolina	5.5

Las proteínas de soya y de otras oleaginosas son una mezcla heterogénea de globulinas (60 a 75 por ciento del total) y de albuminas, con pesos moleculares muy variados, solubles en disoluciones salinas y en agua, y precipitan en su punto isoelectrico en el intervalo de 4.2 a 4.8. Estos polímeros se caracterizan por tener una estructura cuaternaria muy compleja que se disocia en subunidades cuando se tratan con ácidos, álcalis y otros agentes químicos (Badui, 2006).

Tabla 6. Características de las proteínas de la soya (Salunkhe, 1992)

Fracción	Total (%)	Punto Isoeléctrico	Peso molecular
2S	22	4.5	
Inhibidores de tripsina			8000- 21500
Citocromo C			12000
Globulina 2.3 S			18200
Globulina 2.8 S			32000
Alantoinasa			50000
7S	36		
Hemaglutinina		6.1	11000
Lipoxigenasa		5.4	10800
β-Amilasa		5.8	61700
Globulina 7S			(186-210) X 10 ³
11 S	31	4.8	350000
Globulina 11 S			
15 S	11	4.8	600000

Estructura química

La fracción 2S está compuesta por polímeros de peso molecular bajo, solubles en su punto isoelectrico y contiene inhibidores de tripsina de Bowman y de Kunitz.

La fracción 7S está básicamente integrada por cuatro proteínas, dos de las cuales son enzimas (β-amilasa y lipoxigenasa), una es hemaglutinina y la otra, la globulina 7S. Esta última, la más abundante, es baja en metionina, contiene hidratos de carbono y presenta nueve grupos amino terminales: dos serinas, ácido aspártico y glutámico, alanina, glicina, valina, leucina y tirosina, lo que indica que su estructura cuaternaria consta de nueve cadenas polipeptídicas que integran un complejo altamente organizado; a un pH de 7.6 y una fuerza iónica de 0.5, tiene un peso molecular de 186000 a 210000 daltons mientras que a una fuerza iónica de 0.1, la proteína se disocia y alcanza un peso molecular de 37000 daltons.

La globulina 7S de soya posee tres fracciones con diferentes propiedades fisicoquímicas designadas: β- Conglicinina, γ- conglicinina y la básica 7S globulina. La β- conglicinina es la más prevaleciente de esas tres fracciones constituyendo 30-50 por ciento total de

proteína del grano. Tiene un peso molecular 150-200 kDa y tiene sub unidades α' (72 KDa), α (68 kDa) y β (52 kDa). La β - Conglicinina es una glicoproteína. Thanh y Shibasaki analizaron que contienen carbohidratos como sub unidades y propusieron que las sub unidades α y α' contienen dos fracciones de carbohidratos. Yamauchi analizó la secuencia de aminoácidos de los glicopéptidos: Asn, Gly, Thr y Asn-Ala Thr (Damodaran y Paraf, 1997).

En la fracción 11S sólo se ha encontrado un tipo de proteína llamada globulina 11 S o glicinina, de alto peso molecular y que de manera individual es el polipéptido más abundante en la soya, pues esto representa el 31 por ciento del total. Al ponerse en una disolución con un pH de 7.6 y una fuerza iónica de 0.5 se demuestra su estructura cuaternaria compleja integrada por doce aminoácidos terminales: ocho glicinas, dos fenilalaninas y dos leucinas o dos isoleucinas. Parece ser un dímero de dos monómeros iguales, los que a su vez están constituidos por seis subunidades o verdaderos monómeros cada uno de éstos, algunos tienen puntos isoeléctricos en el lado ácido y otros en el alcalino. Los pesos moleculares de las subunidades son de 37200 y 22300 daltons para las ácidas y las básicas, respectivamente. Las propiedades funcionales de esta fracción, a su vez tienen una gran influencia en las propiedades funcionales de los derivados comerciales de la soya (Badui, 2005).

Por su parte, la 15S no se ha estudiado tanto como las anteriores, pero se supone que puede ser un polímero de la 11S; esta es la fracción de mayor peso molecular (Badui, 2006).

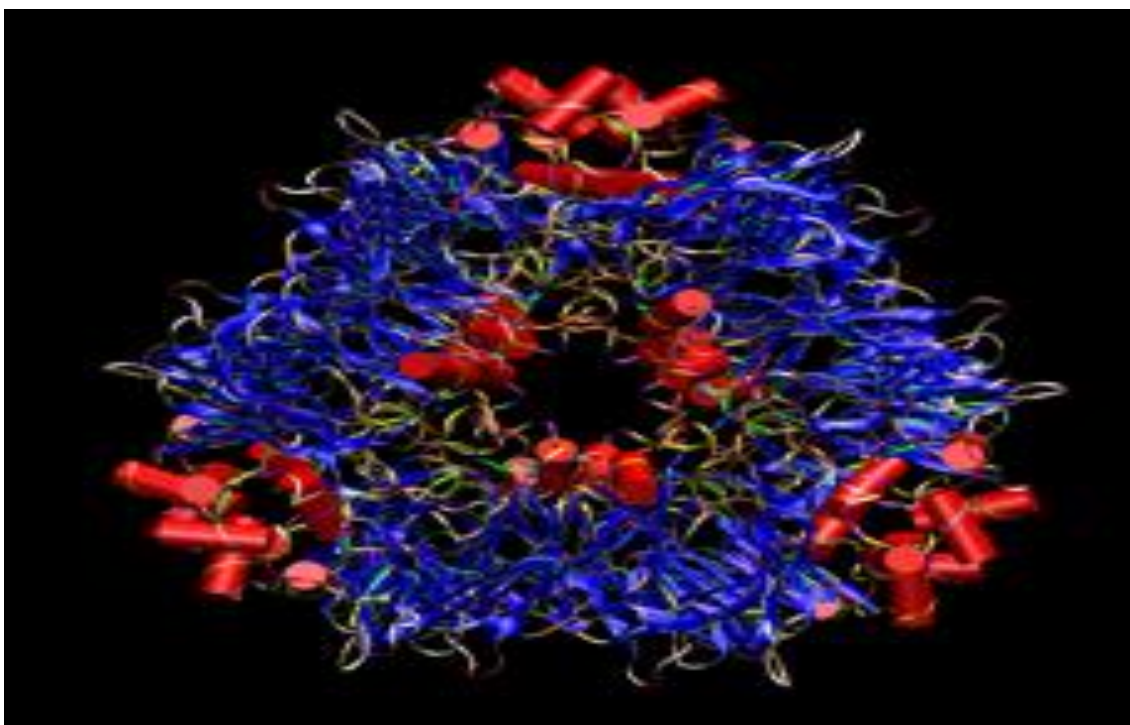


Figura 11. Estructura cuaternaria de la proteína de soya (Dairy Chemistry and Physics)

Obtención de proteína de soya

Los concentrados de soya son productos más refinados que las harinas y contienen un mínimo de 65 por ciento de proteína; en su manufactura se elimina la mitad de los hidratos de carbono de las harinas, además de otros componentes de menos importancia. Los aislados son la forma comercial más purificada de las proteínas de soya, ya que contienen 90 por ciento o más de ellas; se logra eliminando de los concentrados los polisacáridos, los oligosacáridos residuales y algunos otros componentes. El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidad de las fracciones globulínicas con respecto al pH; para su obtención se parte de harinas desgrasadas que han recibido un tratamiento térmico, y la extracción se efectúa con una disolución acuosa de hidróxido de sodio a 60 °C y pH 9-11, el residuo insoluble contiene principalmente polisacáridos que se eliminan por centrifugación. El extracto se acidifica a pH 4.5, lo que hace precipitar la mayor parte de la proteína en forma de crema, que se separa del suero (fracción soluble) por centrifugación; posteriormente se lava y se neutraliza con hidróxido de sodio para resolubilizarla, y por último, se seca por aspersion, así se obtiene un proteinato de sodio que es más soluble en agua que la proteína en su punto isoeléctrico. Los aislados todavía contienen ciertos compuestos de bajo peso molecular como saponinas, fosfolípidos, isoflavonas y algunos glucósidos (Badui, 2006).

Antecedentes de uso en la industria alimentaria.

La soya es una excelente fuente de proteínas. Una variación significativa en el contenido de proteína existe de un cultivo a otro. El contenido de proteína esta en un rango de 35 a 44 por ciento. Hay una consideración negativa entre el contenido de proteína y el rendimiento de la semilla. También existe una relación inversa entre el contenido de proteína y el contenido de aceite (Salunkhe, 1992). La mayoría de las proteínas en la soya son de alto peso molecular, cerca de un 80 por ciento de las proteínas tienen pesos moleculares de 100,000 ó más Daltons. Las proteínas de soya son a menudo añadidas a los alimentos en bajos niveles para utilizar sus propiedades funcionales tales como emulsificación, absorción de agua y adhesividad que impartan características deseables al alimento. A estos niveles, su contribución nutricional es menor. A niveles más altos, estas proteínas son una importante fuente de proteína y contribuyen con los efectos funcionales deseados.

Por problemas de disponibilidad de alimentos de origen animal y por razones de salud, en los últimos años han surgido diversas tecnologías que permiten la incorporación de proteínas vegetales, hasta llegar a la total sustitución de las de carne, huevo y leche. Las propiedades funcionales incluyen su capacidad como emulsionante, espesante, hidrantante, gelificante, espumante, formador de películas, promotor de viscosidad, termoplásticos, etcétera. Se emplean ampliamente en la elaboración de diversos derivados cárnicos (salchichas, mortadelas, albóndigas, hamburguesas entre otros), ya que contribuyen a formar emulsiones estables, pues cuando gelifican producen una estructura firme; en la panificación (pasteles, galletas, donas, harinas preparadas,

etcétera) y en pastas tipo macarrones, en la industria láctea (sustitutos de leche de vaca, quesos procesados y frescos, etcétera); en sustitutos de leche humana; en complementos alimenticios, en dulces y confitería, en líquidos viscosos (cremas, sopas, *graviers*), debido a que producen espumas estables se usan como sustituto de clara de huevo en helados y merengues (Badui, 2006). Las proteínas de soya refuerzan las películas en la interfase aceite-agua, así pues limitan la coalescencia de los glóbulos grasos y la rotura de las emulsiones. Esta propiedad de estabilización asociada a las propiedades de gelificación de las proteínas es ventajosa para los productos basados en una emulsión que deban sufrir una cocción o una esterilización (salsas, cremas, rellenos, etcétera) (Linden y Lorient, 1994).

Conceptos fundamentales del comportamiento interfacial de proteínas

Se le llama fase a cada una de las partes homogéneas que componen un sistema heterogéneo. Por lo tanto, una solución pura se puede considerar como homogénea de una fase del sistema, mientras tanto una dispersión de partículas como la leche, es un sistema de múltiples fases heterogéneas. La dispersión es un sistema constituido por partículas discretas situadas en el seno de una fase fluida continua (Fennema, 1993).

La interfase es la región entre dos fases diferentes y se compone de moléculas de los dos. Si estas fases son inmiscibles y la interfase se puede aproximar a un espacio bidimensional de la interfaz, término que se emplea en su lugar. La Interfaz se refiere a la región estrecha a través del cual las propiedades de una fase están cambiando continuamente en la otra fase. Con el fin de aplicar el formalismo termodinámico a estos sistemas hay diferentes modelos, pero uno de los más empleados es deteniéndose especialmente en la interfaz como una superficie de Gibbs. Una superficie de Gibbs es la superficie geométrica con cero espesor, que mantiene la forma de la interfase y se coloca en la zona de la interfaz donde las densidades de las dos fases es igual (Tejera, 2008).

El estudio del comportamiento de solutos con actividad superficial (descenso de la tensión superficial del disolvente) o tensoactivos, permite conocer la relación entre las propiedades de la superficie y las propiedades del disolvente. La ecuación de adsorción de Gibbs es la expresión termodinámica fundamental en el estudio de tensoactivos, que cuantifica la adsorción o concentración de solutos en la superficie de contacto entre fases (interfase líquido/gas o líquido/líquido), mediante la variación de la tensión superficial con respecto a la concentración de soluto (Novelo y Tejera, 2003). La intensidad de las fuerzas atractivas varía con el disolvente y los solutos presentes, la especie molecular que sea la menos atraída hacia el centro de la solución será menos

eliminada que las otras de la superficie y se encontrará preferencialmente adsorbida en la interfase (Linden, 2003).

En el seno de una solución, las moléculas están rodeadas de otras de su misma especie, y las fuerzas de interacción entre éstas son iguales en todas las orientaciones (Castellan, 1998). Sin embargo, las moléculas en la superficie del líquido (o en una interfase entre dos líquidos inmiscibles) están sujetas a una fuerza neta, porque las fuerzas de atracción ejercidas por las moléculas en el seno de la solución son diferentes a las ejercidas por las de la fase vapor (o la otra fase líquida). El desbalance de fuerzas se traduce en una energía libre de interface (o superficie) o energía libre de Gibbs (Malmsten, 2003).

Como la energía libre de las moléculas en la interfase es mayor que en el seno de la solución, el líquido tiende a contraerse para minimizar la superficie expuesta. Una expansión de dicha superficie (ΔA) de contacto requiere de un trabajo proporcional a dicha expansión (w) según:

$$w = \gamma \Delta A \quad (\text{Ec.6})$$

Donde: γ es la tensión superficial si la interfase es aire – líquido o la tensión interfacial para interfases líquido/líquido y tiene unidades de [fuerza]/[longitud] (ejemplo: Din/cm). Cuanto menor sea γ , menor es el trabajo necesario para aumentar la superficie (Malmsten, 2003).

Debido a su naturaleza **anfifílica**, las proteínas pueden concentrarse en la superficie formando películas mono o multimoleculares disminuyendo la tensión superficial y generando una presión superficial (π), que se define como $\gamma_0 - \gamma$ donde γ_0 e γ son la tensión superficial del solvente y la solución respectivamente. Aunque en algunos casos dicha expresión proporciona una estimación razonablemente buena, la evidencia experimental de la ecuación no está demostrada y por el contrario son numerosas las desviaciones de la misma (Maldonado, 2006). La evaluación de estas fuerzas en términos fundamentales resulta sumamente complicada y en su lugar, se estima el valor de la tensión interfacial a partir de los valores de las tensiones superficiales de los líquidos puros.

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - W_{12} \quad (\text{Ec.7})$$

Dónde γ_1 , γ_2 son las tensiones de los líquidos puros y W_{12} es un término de trabajo que depende del grado de interacciones heteromoleculares en la interfaz entre las moléculas de tipo uno y dos. En esta ecuación se observa como la tensión interfacial es tanto mayor, cuanto menor sea la interacción entre las moléculas de las fases adyacentes. Existen muchos modelos en la bibliografía en los que teniendo en cuenta diversos tipos de interacciones, se obtienen expresiones para W_{12} , así como estudios experimentales en los que se trata de buscar una tendencia en las tensiones interfaciales de líquidos de una misma familia como los alcanos (Maldonado, 2006); pero hasta ahora, no se ha encontrado una ecuación de estado sencilla entre las tensiones interfaciales de un sistema binario líquido-líquido (Israelachvili, 1991).

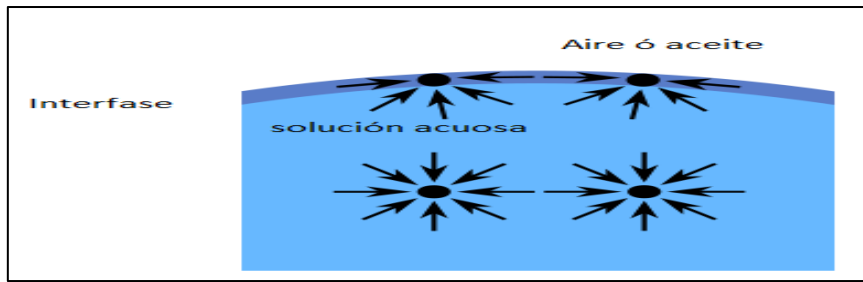


Figura 12. Fuerzas de interacción entre moléculas en el seno de la solución y en la interfase.

Tensión superficial: Isoterma de Gibbs (Castellan, 1998, Maldonado, 2006 y Malmsten, 2003).

Para dos componentes, la ecuación de Gibbs-Duhem con contribución de la energía superficial, puede escribirse de la forma siguiente:

$$dG = VdP - SdT + \gamma dA + \mu_1 dn_1 + \mu_2 dn_2 \quad (\text{Ec.8})$$

$$\{dG = \gamma dA + \mu_1 dn_1 + \mu_2 dn_2\}_{P,T} = cte \quad (\text{Ec.9})$$

$$0 = Ad\gamma + n_1 d\mu_1 + n_2 d\mu_2 \quad (\text{Ec.10})$$

$$0 = Ad\gamma + n_2^S d\mu_2 \quad (\text{Ec.11})$$

Representando el exceso de moles del componente dos que se acumula en la superficie:

$$\Gamma_i = \frac{n_2^S}{A} = -\frac{d\gamma}{d\mu_2} \quad (\text{Ec.12})$$

En este momento se define una nueva cantidad, Γ_i , (moles/cm²) que corresponde a la concentración de superficie de las especies participantes en el proceso de adsorción o

concentración superficial del soluto. $\Gamma = \frac{n_i}{A}$

El inverso de esta cantidad es el área superficial “A” (cm²/mol)

$$d\mu_2 = RT \ln c_2 \text{ se transforma en:} \quad (\text{Ec.13})$$

$$\Gamma_2 = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln c_2} \quad (\text{Ec.14})$$

Ecuación que recibe el nombre de isoterma de adsorción de Gibbs.

Puede verse que en virtud del comportamiento de la tensión superficial de la disolución de una sustancia frente a la concentración, el soluto puede clasificarse como tensoactivo

cuando la tensión superficial disminuye, lo cual se produce por la acumulación de un exceso de soluto (Γ_2) en la superficie, y no como un activo superficialmente, cuando se presente un comportamiento contrario. Cuando la concentración no es demasiado elevada, la tensión superficial de disoluciones de agentes tensioactivos puede expresarse mediante una relación lineal del tipo:

$$\gamma = \gamma_0 - Bc_2$$

Dónde el parámetro B representa la pendiente, es decir; $B = \frac{d\gamma}{dc_2}$

En estos casos, la ecuación catorce puede escribirse de la forma siguiente:

$$\gamma_0 - \gamma = \Gamma_2 RT$$

Asimilando el descenso en la tensión interfacial de la dispersión a una presión superficial, $\pi = \gamma_0 - \gamma$ (Ec. 18) y teniendo en cuenta que $\Gamma_2 = \frac{n_2^s}{A}$ (Ec. 19), la ecuación catorce pone de manifiesto que el comportamiento de las moléculas del tensoactivo en la superficie de la disolución equivale al de un gas ideal bidimensional, con ecuación de estado:

$$\pi A = n_2^s RT$$

Medición de tensión superficial

Existen numerosos métodos de medición de la tensión superficial, los cuales se clasifican de acuerdo al principio que usan:

- Métodos basados sobre la medición de una fuerza.
 - Método de la placa (Whihelmy)
 - Método del anillo (DuNoüy)

- Métodos basados sobre la medición de una presión.
 - Ascenso capilar
 - Presión de burbuja

-
-
-
-
-

- Métodos basados sobre una propiedad geométrica.
 - Gota pendiente

- Gota colocada
- Gota giratoria
- Extensiones del método de la gota giratoria
- Método del volumen de gota

En el presente trabajo se hicieron las mediciones de la tensión superficial mediante un tensiómetro de anillo Fisher Scientific Surface Tensionar *21, por lo que se explica el fundamento y funcionamiento del dispositivo en el anexo uno, para el lector interesado en los otros métodos de medición ver la referencia Salager y Santon, 2005.

Se sabe que la tensión es una fuerza por unidad de longitud de línea de contacto trifásico. Tal método se aplica por tanto al caso en que hay tres fases: un fluido (gas o líquido), un líquido y un sólido. La tensión superficial o interfacial entre los dos fluidos se mide como una fuerza aplicada sobre una cierta longitud de la línea de contacto trifásico.

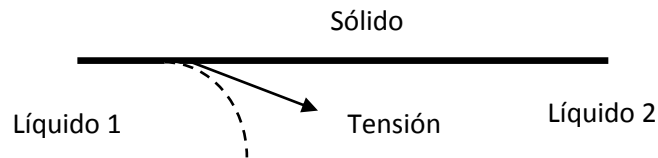


Figura 13.- Línea de contacto trifásico.

El tensiometro de DuNoüy emplea un anillo tórico suspendido horizontalmente, en forma perfectamente paralela con la superficie o interfase. El anillo tiene un radio (R) y esta hecho con un alambre de radio (r), resultando en un perímetro total de $L = 4\pi R$. Nótese que este perímetro es una aproximación, ya que no toma en cuenta la posición exacta de la línea de contacto trifásico respecto al anillo. En todo caso es válido si $r \ll R$.

Para medir la tensión superficial, se procede mojando (completamente) el anillo y luego levantarlo hasta el arranque.

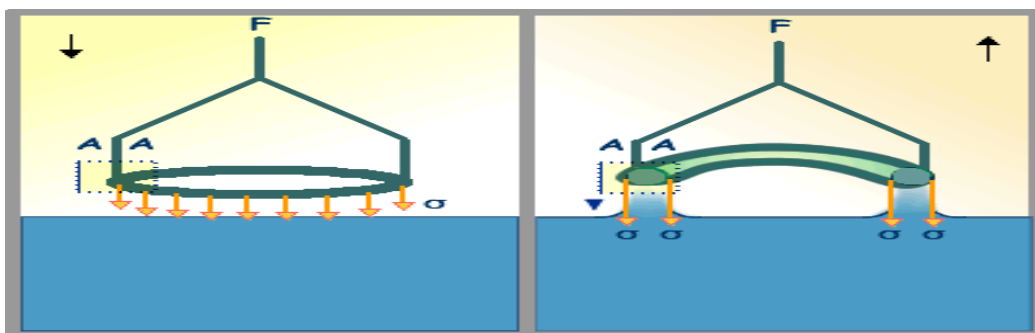


Figura 14. Geometría de anillo de DuNoüy

El anillo está fabricado en una aleación de platino con iridio. Las dimensiones típicas son radio del toro $R = 9.545$ mm, radio del alambre $r = 0.185$ mm, la longitud de la línea de contacto $L = 120$ mm. Desde el punto de vista práctico, mientras más grande (R) y más pequeño (r), mejor la precisión; sin embargo más grande (R), más difícil asegurar la posición perfectamente horizontal y mayor el volumen de líquido requerido. Nótese sin

embargo que se puede usar un recipiente de tipo anular para reducir la cantidad de líquido requerido (Salager y Santon, 2005).

Cuando se forma una película en la superficie de un líquido, por ejemplo, del agua con la parte polar, (-COOH ó -OH) orientada hacia el agua y la cola hacia la otra fase, si hay bastante superficie disponible, todas las moléculas se encuentran en una capa monomolecular formándose lo que se llama una **monocapa**.

Las monocapas son películas monomoleculares de sustancias de carácter anfifílico que se disponen en interfaces. Las monocapas de macromoléculas presentan algunas diferencias con respecto a las monocapas de surfactante. En primer lugar, las proteínas son en general solubles en la fase acuosa. Esto introduce una complicación añadida al método de formación de monocapas puesto que al depositarlas en la superficie se disuelven en la fase acuosa en lugar de quedarse ancladas en la misma. Para superar esta dificultad se suele utilizar el denominado “*Método de Trurnit*” (Trurnit, 1960).

Cuando una proteína alcanza una interfaz, sufre un cambio conformacional mediante el cual expone preferentemente sus residuos **hidrófobos** a la fase no polar mientras que los residuos **hidrófilos** se disponen preferentemente en contacto con la fase acuosa. Este proceso se denomina desnaturalización interfacial y constituye una diferencia básica entre proteínas y surfactantes.

Energía libre en la interfase (Jaycock, 1981)

Considerando un plano cerrado en la interfase, con una composición fija, la tensión superficial (γ), esfuerzo tangencial, como variable intensiva, es decir, que evaluado para todo el sistema como un todo y no la suma de los valores de varios puntos en el sistema.

$$\text{Sustituyendo la ecuación: } q_{reversible} = TdS \quad (\text{Ec.21})$$

De la ecuación de la primera ley de la termodinámica:

$$dU = q + w \quad (\text{Ec.22})$$

Y empleando la ecuación $W = -PdV^s + \gamma dA$ (Ec. 23) se obtiene:

$$dU = TdS - PdV + \gamma dA \quad (\text{Ec.24})$$

Las usuales funciones termodinámicas se definen:

$$\text{Entalpia } H = U + PV \quad (\text{Ec.25})$$

$$\text{Energía disponible } A = U - TS \quad (\text{Ec.26})$$

$$\text{Energía libre de Gibbs } G = H - TS = U + PV - TS \quad (\text{Ec.27})$$

Considerando la energía disponible A y diferenciando la ecuación:

$$dA = dU - TdS - SdT \quad (\text{Ec.28})$$

Sustituyendo:

$$dA = -SdT - PdV + \gamma dA \quad (\text{Ec.29})$$

Y consecuentemente:

$$\left[\frac{\partial A}{\partial A} \right]_{T,V} = \gamma \quad (\text{Ec.30})$$

$$\left[\frac{\partial A}{\partial T} \right]_{V,A} = -S \quad (\text{Ec.31})$$

$$\left[\frac{\partial A}{\partial V} \right]_{T,A} = -P \quad (\text{Ec.32})$$

A temperatura constante

$$\begin{aligned} dA &= dU - TdS \\ &= -W_{\max} \\ &= -PdV + \gamma dA \end{aligned} \quad (\text{Ec.33})$$

En otras palabras la energía superficial está en asociación con el volumen y el área, estarán cambiando.

La función de Gibbs para un sistema en la interfase para un volumen de fase en el sistema es normal considerar que el cambio en la función de Gibbs representa el trabajo neto en el sistema.

$$dG = dU + PdV + VdP - TdS - SdT \quad (\text{Ec.34})$$

Sustituyendo:

$$dG = -SdT + VdP + \gamma dA \quad (\text{Ec.35})$$

Por lo tanto:

$$\left[\frac{\partial G}{\partial A} \right]_{T,P} = \gamma \quad (\text{Ec.36})$$

$$\left[\frac{\partial G}{\partial T} \right]_{P,A} = -S \quad (\text{Ec.37})$$

$$\left[\frac{\partial G}{\partial P} \right]_{T,A} = V \quad (\text{Ec.38})$$

Trabajando a temperatura y presión constante

$$\begin{aligned}dG &= dU + PdV - TdS \\ &= -W_{\max} + PdV\end{aligned}\tag{Ec.39}$$

≠ trabajo neto

Entropía de superficie

En el seno de un líquido, las moléculas están rodeadas por todos lados por moléculas vecinas, cuando se forma una superficie, las moléculas que se encuentran en ella tienen un ambiente distinto por uno de sus lados, por lo que, comparadas con las demás moléculas tienen una posibilidad de azar.

$$\Delta S = \left(\frac{\delta \gamma_0}{\delta T} \right)_{n,V}\tag{Ec.40}$$

Adsorción

La naturaleza dual hidrófoba-hidrófila de los surfactantes y de las proteínas es responsable de que este tipo de moléculas tengan habilidad para situarse en interfaces. La ocupación de un área interfacial con alta energía libre (72.5-73 mJ/m² en el caso de la interfaz aire-agua) produce una reducción considerable de la energía libre del sistema y esto se traduce en una reducción de la tensión superficial de la disolución (Maldonado, 2006).

El proceso mediante el cual este tipo de moléculas anfífilas se dirigen desde el seno de la disolución a la interfaz y se concentran allí, se denomina adsorción y el análisis de la evaluación de la tensión superficial del sistema a lo largo del proceso de adsorción proporciona información estructural de la película interfacial formada. La actividad superficial de una molécula es una medida de su habilidad para acumularse en una interfase. Esta tiende a acumularse cuando la energía libre del estado adsorbido es significativamente menor que la del estado de disolución. La diferencia energética entre ambos estados está determinada por las variaciones en las energías de las interacciones de las moléculas involucradas, como también por efectos entrópicos. (Miñones, 2002).

Los cambios en las energías de las interacciones que ocurren como consecuencia de la adsorción, tienen su origen en dos puntos, uno asociado con la interfase y otro con las moléculas del tensoactivo en sí mismas. Con respecto al primer punto, al adsorberse una molécula del tensoactivo en una interfase es capaz de disminuir el contacto entre las moléculas de ambas fases. El contacto directo de ambas es remplazado por contactos entre segmentos no polares del tensoactivo y moléculas de la fase no-polar y entre segmentos polares y moléculas de agua. Estas interacciones disminuyen la energía libre generada en la interfase. Con respecto al segundo punto, los polímeros tensoactivos

tienen en sus moléculas segmentos polares y no-polares; cuando la molécula se disuelve en agua estos últimos manifiestan un **efecto hidrofóbico**, energéticamente desfavorable, la consecuencia es entonces su adsorción a la interfase. Las moléculas del tensoactivo son capaces de maximizar el número de interacciones favorables entre los segmentos polares y el agua mientras minimizan el número de interacciones desfavorables entre segmentos no-polares y el agua. La fuerza impulsora que gobierna la adsorción de las moléculas anfífilas en una interfase es la **hidrofobicidad** (Camino, 2010).

Cuando se trata de grandes macromoléculas, como los polipéptidos y las proteínas, conteniendo un gran número de residuos, que deberían estar todos situados en la superficie para alcanzar el estado energéticamente más favorable, es posible que esto no suceda por varias causas:

- a) Porque la superficie disponible para el desplegamiento completo de las cadenas polipeptídicas sea insuficiente.
- b) Porque no se haya esperado el tiempo suficiente para completar el proceso anterior.
- c) La barrera de energía correspondiente al proceso de desplegamiento es tan elevado que no se llega a alcanzar la completa extensión de la proteína.

En estas situaciones no todos los residuos están en contacto con la superficie adoptando las cadenas polipeptídicas diferentes conformaciones en la interfaz, tal como se muestra en la figura 15. Los segmentos en contacto con la misma constituyen una *fila*, mientras que los situados entre las filas, suspendidos en el interior del agua, reciben el nombre de *lazos*, siendo las *colas* los segmentos terminales de la cadena, que suelen estar cargados y, por lo tanto, inmersos en el seno de la fase acuosa (Camino, 2010).

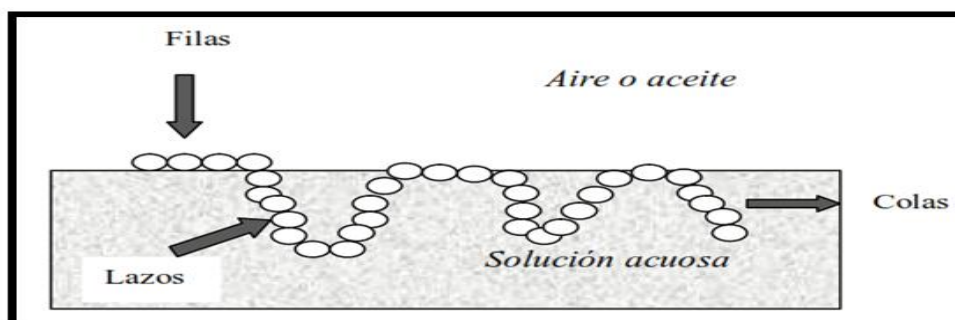


Figura 15. Configuración de un polímero tensoactivo en la interfase aceite- agua o aire –agua.

La distribución de *filas*, *lazos* y *colas* en una proteína extendida en la interfase depende de su flexibilidad, de la naturaleza de la subfase, del tipo de disolvente de extensión, del área de la superficie, del tiempo de espera después de esparcir la proteína (Malmsten, 2003).

En el caso específico de proteínas globulares, éstas adoptan en solución una conformación tridimensional en la cual los aminoácidos no-polares se disponen preferentemente en el interior de la molécula, de forma que se mantienen ocultos al agua (Camino, 2010). Cuando una proteína se adsorbe en la interfase se encuentra menos rodeada de moléculas de agua, de forma que puede reducir su energía libre alterando su conformación, orientando sus aminoácidos hidrofóbicos hacia la fase aire o aceite y los hidrofílicos hacia la acuosa (Dalglish, 1996).

Cinética de adsorción

Las proteínas en disolución acuosa, tienden a adoptar una configuración en la cual los grupos no-polares se congregan en el centro de la molécula y los grupos polares se disponen en la superficie. De esta manera la energía del sistema se minimiza reduciendo la interacción entre grupos no-polares y moléculas de agua. En la práctica ésta es una estructura ideal y existen evidencias de que debido a restricciones de tipo **estérico**, la periferia de la molécula contiene grupos no-polares que interaccionan con el agua y conducen a la proteína a la interfaz. Además, una vez que la proteína se ha situado en la interfaz puede adoptar una nueva configuración estructural en la cual los grupos polares interaccionen predominantemente con el agua y los no-polares con la fase no-polar. Este proceso se ha mencionado anteriormente como *desnaturalización interfacial* y constituye la diferencia básica con el proceso de adsorción de surfactantes, puesto que debido a este proceso, el área interfacial de la proteína no es constante a lo largo de todo el proceso. A continuación se describe en la figura 16 cada una de las etapas que caracterizan el proceso de adsorción de proteínas en interfases líquido-fluido. Muestra las etapas del proceso de adsorción en términos de la disminución de la tensión interfacial de la disolución en función del tiempo. En esta figura se distinguen tres regiones: Período de inducción (a), período de penetración (b-c) y período de saturación (c-d).

- Período de inducción. Durante los primeros instantes del proceso de adsorción se produce un aumento de la densidad interfacial, que no va acompañado de una disminución de la tensión interfacial. La tensión interfacial comienza a disminuir a partir de un valor mínimo de la densidad interfacial que se suele encontrar entre un 10-20 por ciento de recubrimiento interfacial (Miller, 2000). El tiempo necesario para alcanzar este grado de recubrimiento interfacial es lo que se denomina período de inducción y es característico del proceso de adsorción de proteínas en interfases líquido-fluido. Su existencia se puede explicar debido a la pequeña contribución de la entropía de la cara interfacial a la presión interfacial (Miller, 2000). Así pues, la existencia de este período es un rasgo característico de las disoluciones de proteína en el seno de la disolución. Sobre la existencia

de este periodo de las disoluciones de proteína, siendo tanto mayor cuanto menor sea la concentración de proteína en el seno de la disolución.

- Período de penetración. Una vez que se ha alcanzado un cierto recubrimiento interfacial, se produce bruscamente una rápida disminución de la tensión interfacial. Esto se debe tanto a la difusión de moléculas que llegan a la interfaz desde el seno de la disolución, como a la reorganización estructural que sufren estas últimas en contacto con la fase no polar (Tripp, 1995; Boverung, 1999; Miller, 2000).

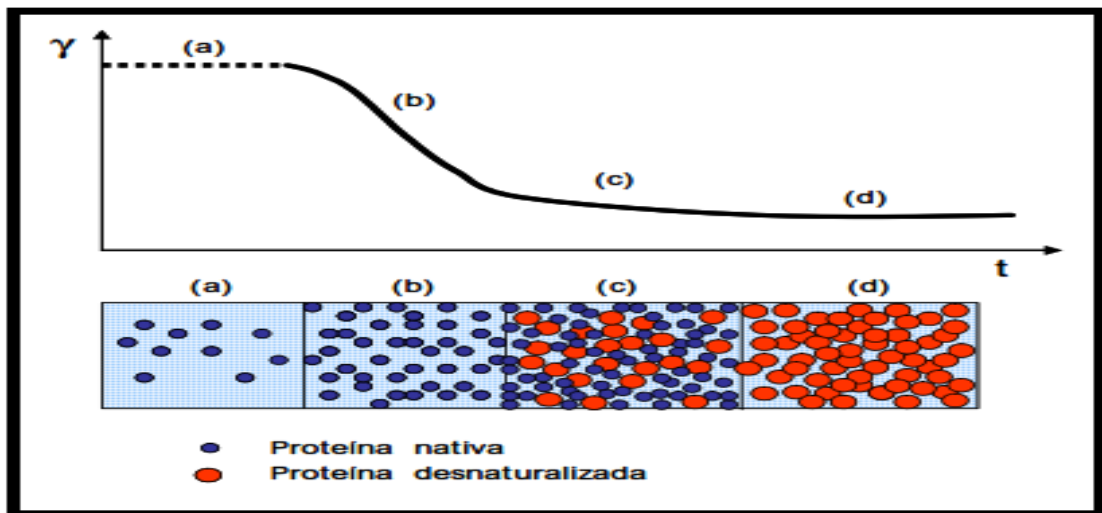


Figura 16. Etapas del proceso de adsorción dinámica de proteínas en interfaces líquido-fluido (Wege, 2002).

-
- Período de saturación de la interfase. Parece claro que una vez que la capa interfacial se encuentre saturada de proteína se alcanzará un valor constante de la tensión interfacial del sistema. Experimentalmente, se observa sin embargo que la tensión interfacial no se mantiene constante sino que entra en una fase de disminución muy lenta. Este hecho se justifica debido a la existencia de varios fenómenos en la capa interfacial. Para disoluciones muy diluidas, la progresiva disminución de la tensión interfacial se deberá fundamentalmente a la gradual desnaturalización interfacial de la proteína, que podría estar acompañada de una condensación bidimensional (agregación) o a tiempo suficientemente largos de una gelificación interfacial (Beverung, 1999).

Para el caso de disoluciones concentradas, la llegada de nuevas moléculas a una capa interfacial ya saturada, implica un aumento de la densidad interfacial que no va acompañado de la correspondiente disminución de la tensión interfacial. En este caso, la formación de multicapas bajo la capa interfacial justifica éste fenómeno y la pequeña disminución de la tensión interfacial se debe a la aparición de los tres procesos citados

anteriormente. Es más, esta última fase de disminución lenta de la tensión interfacial continúa durante semanas.

Además de conocer la disponibilidad de un tensoactivo para adsorberse, sobre lo cual informa la termodinámica, es muy importante también conocer la velocidad a la que este proceso ocurre. Dicha velocidad debe ser suficientemente alta para que las moléculas puedan adsorberse en la interfase de gotas o burbujas creadas durante la formación de la emulsión o la espuma respectivamente. Esta característica, junto con la disminución de la tensión superficial y la de poder crear una película interfacial son las tres propiedades más importante que debe presentar cualquier tensoactivo en la estabilización de emulsiones o espumas. La velocidad de adsorción depende de las características moleculares del emulsionante (tamaño, conformación e interacciones electrostáticas), la viscosidad de la fase continua y de las condiciones ambientales (temperatura, pH, agitación mecánica, etcétera) (Camino, 2010).

Emulsiones y Espumas

En términos generales, las emulsiones y las espumas son dispersiones que presentan numerosas analogías entre ellas; una de ellas es la disminución de la tensión superficial. En cualquier caso, se va a realizar una descripción general.

Características de una emulsión

Se ha hecho mención que una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, normalmente de naturaleza apolar y polar, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño (de 0.1 a 100 micras) que se denomina fase dispersa o interna y el otro, fase continua o externa. En la práctica debe contener un tercer componente, un emulsionante, sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase polar (acuosa) y la apolar (oleosa) y además aporta al menos una cierta estabilidad física durante un tiempo finito, que puede ser más o menos largo, dependiendo de la composición, características de procesado y condiciones externas durante el envejecimiento (Camino, 2010).

Estabilidad de emulsiones

Depende principalmente de los dos siguientes factores:

- 1) Espesor y compactibilidad de la película protectora (capa de la interfase) y
- 2) Carga eléctrica de las gotas o de la película. Además la estabilidad depende de la viscosidad del medio de dispersión y de la diferencia de densidad entre los dos líquidos.

El poder emulsificante de los polvos finamente divididos depende de cómo sean humedecidos por los líquidos. En las condiciones humidificantes más adecuadas, las gotas son rodeadas por una capa de las partículas del sólido el cual previene la coalescencia (Jirgensons, 1965).

Características de una espuma

Las dispersiones de gases en líquidos se forman cuando un gas, el cual debe ser completamente insoluble en el líquido, se fuerza hacia adentro del líquido a través de una boquilla conteniendo canales u orificios finos. Así, el aire se puede hacer pasar forzosamente dentro del agua para formar soles de aire turbio y opalescente (Jirgensons, 1965).

Debido a la gran cantidad de superficie libre que presentan las espumas, la energía superficial del sistema es muy alta, la presencia de un agente tensoactivo en la disolución acuosa, promueve la formación de una capa de moléculas anfifílicas adsorbidas en las superficies de las burbujas de tal manera que la energía superficial del sistema disminuye (Maldonado, 2006).

Formación de una espuma

Cuando se forma una espuma a partir de una disolución de moléculas superficialmente activas, en términos generales lo que está sucediendo es la creación de un área superficial que debe ser ocupada rápidamente por moléculas. Así pues, tres factores fundamentales afectan a este fenómeno: la cantidad de moléculas en el medio, la velocidad de adsorción de las moléculas sobre la superficie y las propiedades dilatacionales de la capa de moléculas adsorbidas (Maldonado, 2006).

Metodología Experimental

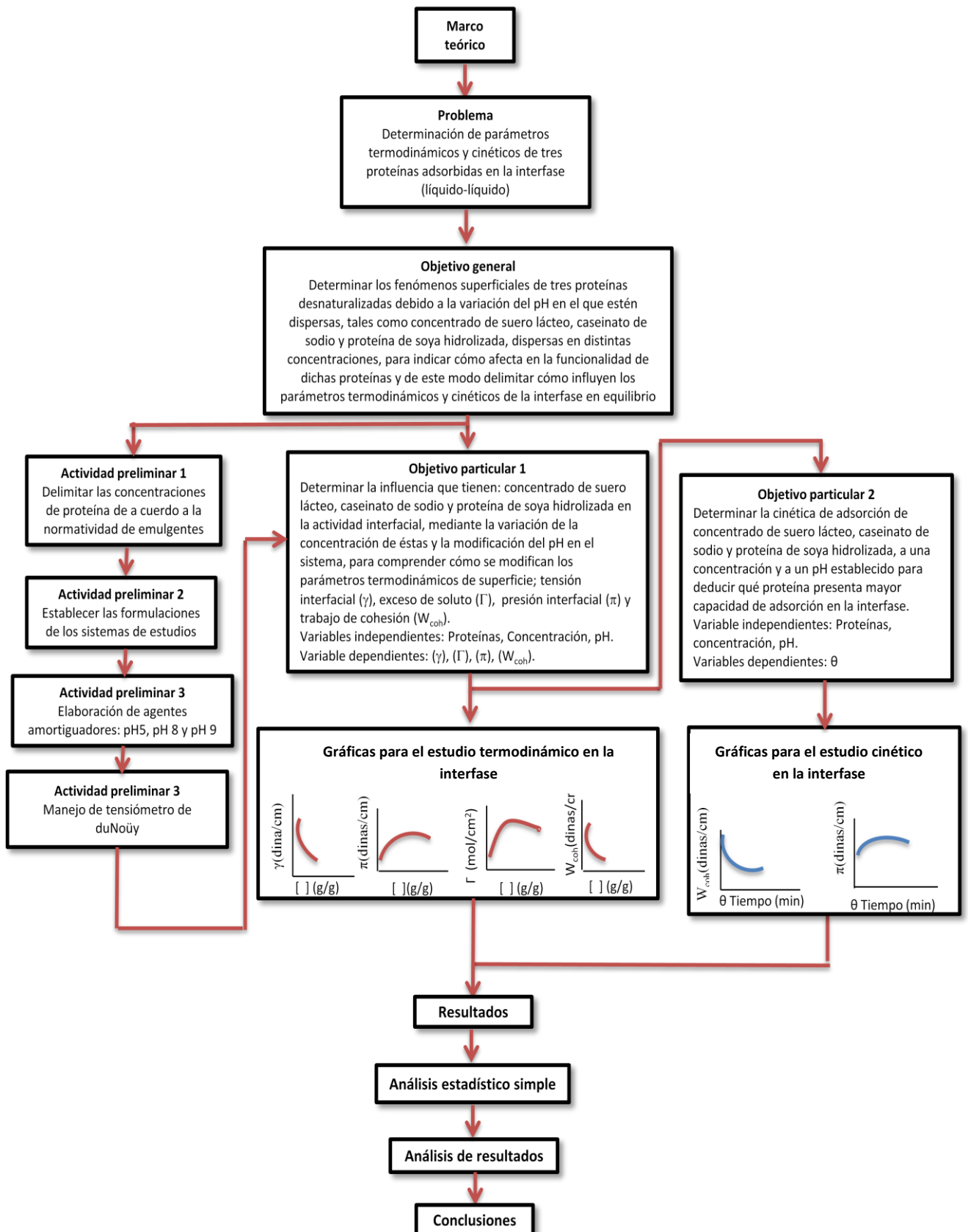


Figura 17. Cuadro de metodología experimental

Actividad preliminar 1

Establecimiento de concentraciones de soluto con actividad superficial en convenio a la reglamentación en alimentos en el uso de agentes emulgentes y espumantes.

Se ha mencionado que el uso de emulgentes y espumantes en alimentos tiene un amplio campo de uso en la industria alimentaria, como el uso de caseinatos en el mercado de los lácteos (Wilde, 2004) o bien el uso de proteínas de suero lácteo que tiene aplicaciones en el sector lácteo, mejorando la estructura cremosa de yogurt o en el sector de la panadería haciéndolos más esponjosos, es decir; disminuyen la tensión interfacial de la fase discontinua y la fase continua estabilizando sistemas superficiales como emulsiones y espumas.

Se revisaron reglamentaciones oficiales de México, de diferentes productos alimenticios que dentro su formulación usaran agentes emulgentes y espumantes.

Tabla 7. Agentes emulsionantes empleados en distintos sectores de la industria alimentaria.

Norma	Agente emulgente	Uso
NOM -036-SSA1-1993	Caseinato de sodio, alginatos de amonio, gomas, esterres de acido deacetil tártarico entre otros (máximo 10 g/Kg)	Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados.
NMX-F-341-S-1979	Goma arábica, goma guar, goma karaya, goma traganto, pectina y otros autorizados. (De uno solo o su mezcla 0.75% máximo)	Aderezos y mayonesas
NMX-F-065-1984	Polifosfato de sodio	Salchichas
NOM-147-SSA1-1996	Monogliceridos acetilados, Fosfato de sodio, metilcelulosa entre otros (Buenas prácticas de manufactura)	Pan

En función de las normas consultadas se tomó para el estudio las concentraciones de agentes emulsionantes y espumantes llamándoles así a las proteínas por poseer características anfífilas; como límite superior máximo uno por ciento en peso de proteína y límite inferior mínimo 0.1 por ciento, haciendo un barrido de concentraciones de múltiplos de dos en la cual se midió la tensión superficial. Las proteínas de estudio fueron: caseinato de sodio presentando como mínimo 92 por ciento de proteína (LACTONAT EN) y proteína de suero lácteo con 79.6 por ciento (LACTOMIN) proveídos amablemente por Lactoprot México filial de Lactoprot international y

proteína de soya hidrolizada con 82 por ciento de proteína facilitada por Safe Iberoamericana S.A.

Actividad preliminar 2

Establecer las formulaciones de los sistemas en estudio.

En función a las limitaciones de concentraciones de uso de surfactantes en la industria alimentaria, se precisan las formulaciones de los sistemas de la siguiente forma:

Tabla 8. Formulaciones de proteína de suero de leche pH 9

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	81	81.1	81.2	81.3	81.4	81.45
Buffer	18	18.1	18.2	18.3	18.4	18.45
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Tabla 9. Formulaciones de proteína de suero de leche pH 5

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	89.9	90	90.1	90.2	90.3	90.4
Buffer	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5	9.5
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Tabla 10. Formulaciones de proteína de soya hidrolizada pH 9

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	81	81.1	81.2	81.3	81.4	81.45
Buffer	18	18.1	18.2	18.3	18.4	18.45
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Tabla 11. Formulaciones de proteína de soya hidrolizada pH 5

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	89.9	90	90.1	90.2	90.3	90.4
Buffer	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5	9.5
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Tabla 12. Formulaciones de caseinato de sodio pH 9

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	81	81.1	81.2	81.3	81.4	81.45
Buffer	18	18.1	18.2	18.3	18.4	18.45
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Tabla 13. Formulaciones de caseinato de sodio pH 8

(%)	A	B	C	D	E	F
H₂O desionizada	93.2	93.3	93.4	93.5	93.6	93.65
Buffer	5.8	5.9	6.0	6.1	6.2	6.25
Proteína	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1

Actividad preliminar 3

Elaboración agentes amortiguadores de pH

En este estudio fue imprescindible mantener el potencial de iones hidrogeno (pH) estable, a pesar de que se agreguen ácidos y bases. Muchas de las reacciones químicas que se producen en solución acuosa necesitan que el pH del sistema se mantenga constante, para evitar que ocurran otras reacciones no deseadas. Las soluciones reguladoras son capaces de mantener la acidez o basicidad de un sistema dentro de un intervalo de pH, así poder determinar la influencia del pH en la actividad superficial de las proteínas en estudio. Estas soluciones contienen especies predominantes; ácido y su base conjugada en concentraciones apreciables (mayores a 10^{-2} Molar).

Para la elaboración de las soluciones amortiguadoras se usaron los siguientes reactivos de grado analítico:

Tabla 14. Reactivos implementados para la elaboración de las soluciones reguladoras de pH.

Solución reguladora pH 5	Solución reguladora pH 9
Ácido acético(CH ₃ COOH)/ Acetato de sodio (CH ₃ COONa)	Amoniaco(NH ₃ ⁺)/Cloruro de amonio(NH ₃ Cl)

Para la elaboración de estas soluciones fue necesario hacer cálculos de estequiometria por medio de la ecuación de Henderson Hasselback que se muestra detalladamente el procedimiento en el anexo dos.

Actividad preliminar 4

Manejo del Tensiómetro de Du Noüy

Para la determinación de la tensión superficial se usó un tensiómetro Fisher Scientific Surface Tensionar *21, este equipo mide la fuerza máxima, sin importar el ángulo de contacto y la dirección de aplicación de la fuerza de tensión, varía a medida que se extrae el anillo del líquido. En esta posición la proyección vertical de la fuerza de tensión es máxima.

Es necesario calibrar el equipo antes de usarlo para establecer las posibles causas de variación y no caer en el error de que las evaluaciones de parámetros sean debidas a errores de medición y no a cambios requeridos por el proceso. Las técnicas estadísticas de validación sirvieron para la formación de juicios que permitieron interpretar de forma confiable la información experimental.

En la práctica los instrumentos de medición determinan en general algunos valores inexactos en la variable de salida, estos se apartan en mayor o menor grado el valor verdadero de la variable de entrada, lo cual constituye errores de medida (López, 1995).

Precisión

En esta prueba se observa la variación de los datos respecto a su medida por la cual se hacen mediciones en un medio constante en este caso etanol que tiene 22.3 dinas/cm de tensión superficial y con acetona que presenta una tensión superficial de 23.3 dinas/cm a veinte grados centígrados respectivamente (Torral, 1973). Es necesario comentar que esto se realizaba al día de experimentación ya que el equipo se operaba manualmente habiendo más probabilidad de cometer un **error de paralaje** (Lopez, 1995).

Repetibilidad

Para conocer que tan repetitivos son las lecturas obtenidas por los sensores, se hacen mediciones del parámetro a diferentes tiempos con dos o tres replicas en un medio constante. Al utilizar un instrumento para medir ciertos parámetros muchas veces por un tiempo definido o indeterminado, la respuesta no es lo mismo, presentando una dispersión o desviación en los datos obtenidos, a esta desviación se le conoce como error de repetibilidad. Para determinar si existe o no el error de repetibilidad, el análisis de varianza es el mejor apoyo para dar a conocer las posibles variaciones (López, 1995).

Objetivo particular 1: Determinación de tensión superficial en función de la concentración de soluto y pH del medio.

Al elaborar los sistemas que se presentaron anteriormente en la actividad preliminar dos, se empleo un dispersor de propela a una velocidad de 100 revoluciones por minuto durante veinte minutos a temperatura ambiente.

Se disperso primeramente la proteína con agua desionizada, siendo en este momento el mezclado un tratamiento mecánico que probablemente cause una ligera desnaturalización debido a los repetidos estiramientos que modifican la red proteica, principalmente por disrupción de la α -hélice. Después se agrego el agente amortiguador de acuerdo al sistema en estudio y ya que estas moléculas son un foco rico de nutrientes para la proliferación de microorganismos fue necesario agregar benzoato de sodio como conservador a una concentración de 0.01 por ciento en peso.

Los sistemas se dejaban reposar durante veinte y cuatro horas. Esto se hizo con la finalidad de que una vez adsorbidas en la interfase, las moléculas poliméricas interactúan en la misma, para lograr un estado de menor energía libre. Con el incremento de la cantidad del biopolímero adsorbido el ordenamiento de las moléculas en forma extendida disminuye y la película interfacial cambia su estructura de expandida a comprimida. El proceso de desnaturalización de una proteína puede comenzar en segundos u horas luego de la adsorción, dependiendo de la flexibilidad y de la estructura de la misma y puede continuar en un grado más bajo durante días, reteniéndose la estructura terciaria en algunas películas (Camino, 2010).

Previamente se calibra el potenciómetro 209 HANNA INSTRUMENTS en el anexo tres se describe detalladamente la metodología de calibración del equipo, destacando que esto se hacía al día de experimentación.

Cabe mencionar que la selección del pH del sistema se tomó en consideración el punto isoeléctrico de las distintas proteínas; Primeramente el comportamiento interfacial de caseinato de sodio a pH de ocho y nueve, tomando estos pH lo suficientemente alejados del punto isoeléctrico de las fracciones mayoritarias del caseinato de sodio; kappa y alfa uno, en este caso 5.24 y 4.93 respectivamente, que en estos rangos de pH las moléculas proteicas son insolubles, provocando sedimentación de los biopolímeros, fenómeno que se observo en primeras instancias de experimentación.

La proteína de suero lácteo de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores posee alta solubilidad en un amplio rango de pH, en este caso a pH 4.5- 5.5 se han observado dos efectos macroscópicos: inicialmente la solubilidad de las proteínas aumenta y, después de llegar a un máximo, decrece. Esto se considera a partir de una red con la base de interacciones electrostáticas no especificas entre la molécula de proteína cargada y su medio (Villalta y Monferrer, 2001), por lo que se consideró hacer el estudio termodinámico y cinético de superficie de la proteína de suero lácteo en medio

ácido (pH $5 \approx pI$) y en medio alcalino distante del punto isoeléctrico de la proteína (pH 9).

Por último la proteína de soya hidrolizada presenta una estructura cuaternaria, poseyendo en mayor proporción (60-75 por ciento) de una mezcla heterogénea de globulinas, precipitando en su punto isoeléctrico de 4.2 y 4.8. Dado que la formación de una monocapa estable depende del balance existente entre la atracción por la superficie de la subfase y las fuerzas de cohesión del biopolímero a extender, aunque en estos casos no se requiere un alto grado de insolubilidad del mismo. En macromoléculas con grupos ionizables, la presencia de cargas eléctricas en las mismas conduce a pérdidas de la monocapa por disolución, las cuales son las responsables de que las áreas ocupadas por la película varíen con el pH. En estas circunstancias, la extensión es más completa cuando el pH de la subfase es próximo al del punto isoeléctrico de la proteína, en donde su carga neta alcanza el mínimo valor y la macromolécula es menos soluble (Miñones, 2002), por lo tanto se propuso dispersar la proteína de soya hidrolizada en medio ácido (pH 5) para observar el comportamiento interfacial y a su vez dispersarla en medio básico para determinar la influencia que presenta la proteína frente a un pH lejano al punto isoeléctrico.

Para la determinación del comportamiento interfacial de las proteínas adsorbidas en la interfase fue necesario medir la tensión superficial de una proteína dispersa en un medio ácido o básico, a las diferentes concentraciones de soluto establecidas en la actividad preliminar uno, destacando que al medir la tensión interfacial de soluciones que contienen surfactantes de alto peso molecular se presenta un problema: saber el tiempo de equilibrio. En efecto en este método, se modifica la superficie al arrancar el anillo, en particular en la zona donde se ejerce la fuerza de tensión. En consecuencia fue necesario proceder de la siguiente manera:

- Primeramente levantar el anillo hasta sobrepasar la fuerza máxima, pero sin producir el arranque del anillo.
- Luego volver a bajar el anillo un poco y esperar algunos segundos.
- Volver a levantar el anillo hasta sobrepasar la fuerza máxima sin arrancar el anillo y así sucesivamente.

Se obtendrá una serie de fuerzas que después de cierto tiempo se logra un valor estable que se puede considerar como el equilibrio. El tiempo requerido puede ser mayor que lo que se pueda pensar. Por lo tanto se realizaba la medición de la fuerza después de haber transcurrido diez minutos, este procedimiento se efectuó por triplicado con muestras independientes.

Una vez obtenidas las diferentes fuerzas interfaciales a diferentes concentraciones de soluto de proteína en un determinado sistema, se construye una grafica de tensión superficial en función de la concentración de la proteína dispersa en un medio ácido o alcalino.

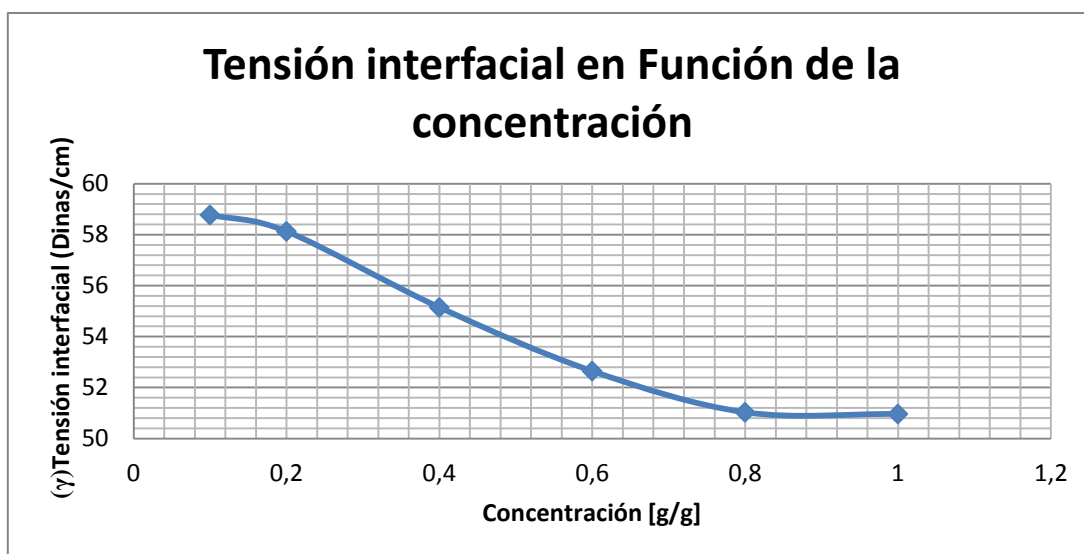


Figura 18. Gráfica de tensión interfacial en función de la concentración de un soluto en estudio disperso en medio ácido o básico.

Para conocer lo que ocurre con la fuerza neta que va dirigida hacia la derecha es decir: la presión interfacial expresándose de la siguiente manera: $[(\gamma_{H_2O} \cdot x) - (\gamma_m \cdot x)]$, en función de la concentración. Tomando como referencia la tensión superficial del agua a veinte grados centígrados (72.75 dinas/cm) (Torral, 1973).

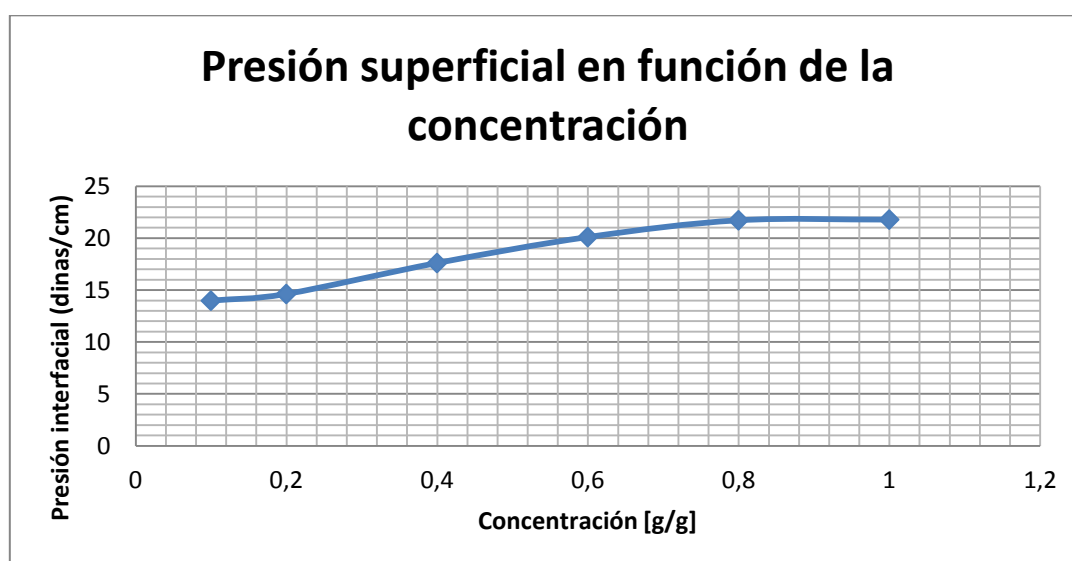


Figura 19. Gráfica de presión interfacial en función de la concentración de un soluto disperso en medio ácido o básico.

Tal como se observó anteriormente, un soluto tensoactivo se concentra o adsorbe en las interfases líquido/gas o líquido/líquido formando una capa de mayor concentración en la que las moléculas se empaquetan en una película de espesor de una sola molécula; en tal caso se dice que se ha formado una película monomolecular de adsorción o monocapa de adsorción.

Esta monocapa se encuentra en equilibrio reversible con la disolución, ya que en cada instante un cierto número de moléculas se disuelven en la subfase y, simultáneamente, igual número de aquellas pasan a la película, de modo que estadísticamente el número de las que constituyen la monocapa permanece invariable.

Termodinámicamente, el proceso espontáneo de extensión de una sustancia A sobre un líquido B deberá ir acompañado de una disminución de la energía libre (γ), por lo que teniendo en cuenta que en dicho proceso desaparece la interfase entre el líquido B y su vapor, sustituyéndose por otras dos nuevas (la del líquido A y su vapor y la que se forma entre A y B, se debe cumplir que:

$$(dG)_{P,T} = G_{final} - G_{inicial} = (\gamma_A dA + \gamma_B dA) - \gamma_B dA < 0 \quad (\text{Ec.41})$$

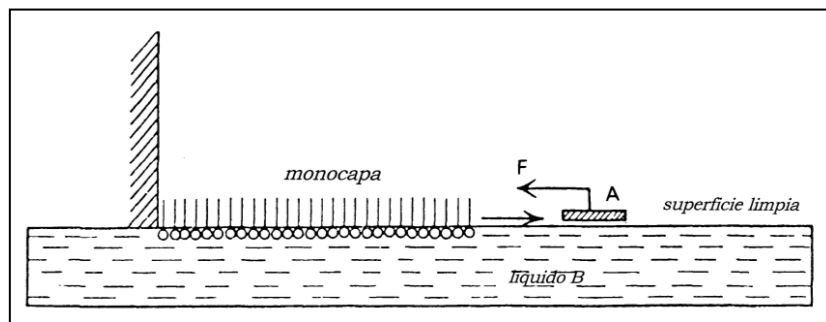


Figura 20. Extensión de una sustancia A sobre un líquido B.

La condición de extensión se suele expresar también en función de los trabajos de **adhesión** y **cohesión**, definiéndose el primero como el trabajo necesario para disminuir en un centímetro cuadrado la interfase entre dos líquidos A y B y aumentar en esta misma cantidad las superficies de A y su vapor y la de B y su vapor, es decir:

$$W_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB} \quad (\text{Ec.42})$$

Expresión conocida como ecuación de Dupré (Miñones, 2002).

Combinando las ecuaciones 41 y 42, y considerando $dA = 1 \text{ cm}^2$, se obtiene que la condición para la extensión es:

$$W_{AB} > 2\gamma_A \quad (\text{Ec.43})$$

Es decir, el trabajo de adhesión entre el líquido A y el líquido B debe ser superior a $2\gamma_A$, el cual representa el trabajo de cohesión de la sustancia A (trabajo necesario para separar en dos partes una columna de 1 cm^2 de sección del líquido A) (Miñones, 2002). De esta manera se elaboran graficas sobre el comportamiento de cohesión de las proteínas en función de la concentración dispersas en un medio ácido o alcalino.

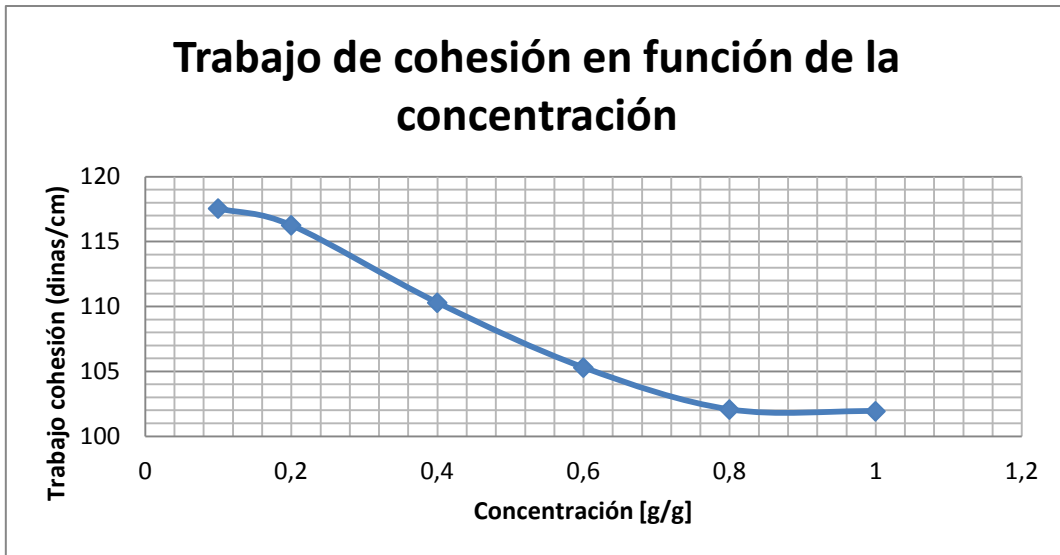


Figura 21. Gráfica de trabajo de cohesión en función de la concentración de soluto disperso en medio ácido ó básico.

Por medio de la isoterma de adsorción de Gibbs se puede conocer la concentración superficial de una película (o más exactamente, su exceso de concentración con respecto a la masa de la disolución) o en su defecto el inverso, es decir, su área molecular.

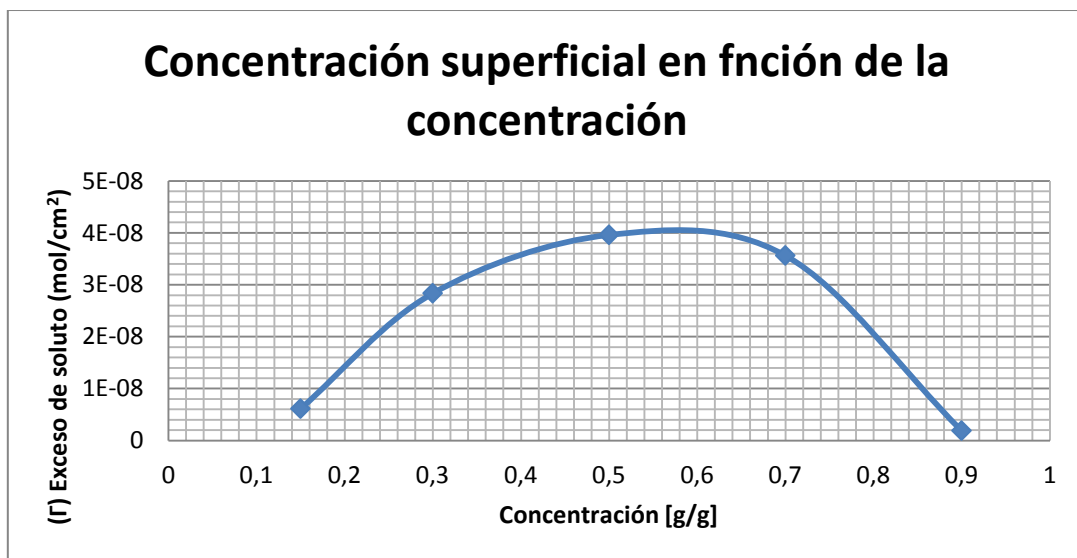


Figura 22. Concentración interfacial en función de la concentración de soluto disperso en medio ácido o básico.

Implementando la ecuación de Gibbs (ecuación 14), se puede conocer la cantidad de moléculas de las proteínas adsorbidas en la interfase a diferentes concentraciones de estas.

Objetivo particular 2. Determinación de la tensión superficial con respecto al tiempo.

Con la información obtenida del objetivo particular 1; parámetros termodinámicos (γ , Γ , π , y W_{coh}) de las tres proteínas adsorbidas en la interfase en medio ácido o básico, se consideraron para el estudio de la cinética de adsorción, los puntos máximos de saturación de soluto en la interfase -información adquirida mediante la isoterma de adsorción de Gibbs.

Se emplea la misma metodología de preparación de los sistemas de estudio que se realizó en el objetivo particular uno, salvo con una excepción; la cual transcurrido el tiempo de mezclado del sistema, en seguida se toma lectura del pH del sistema e inmediatamente se hace la medición de la tensión superficial por triplicado considerando ese momento como el tiempo cero de la cinética de adsorción. La medición de la tensión superficial se realizó cada hora.

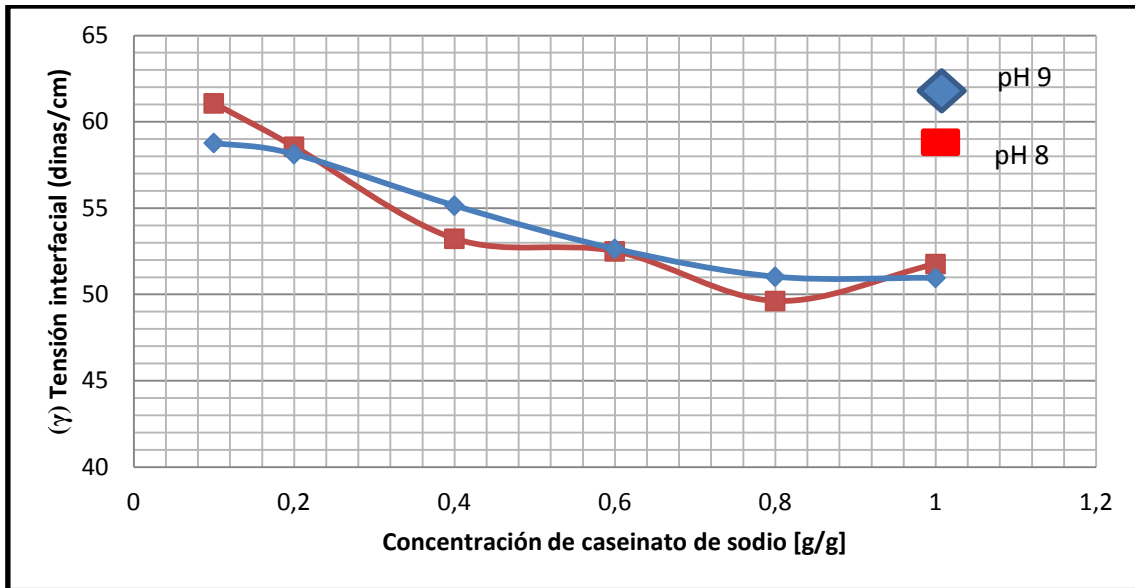
Para el estudio de la cinética de adsorción se emplearon los parámetros termodinámicos de presión interfacial y trabajo de cohesión en función del tiempo para delimitar que proteínas presentan mayor facilidad para adsorberse en la interfase y de este modo minimizar la incertidumbre del conocimiento del comportamiento superficial de las proteínas en este caso en fenómenos superficiales que tienen repercusión en sistemas termodinámicos inestables como lo son emulsiones y espumas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Determinación de parámetros termodinámicos de caseinato de sodio disperso en medio básico de pH 8 y pH 9.

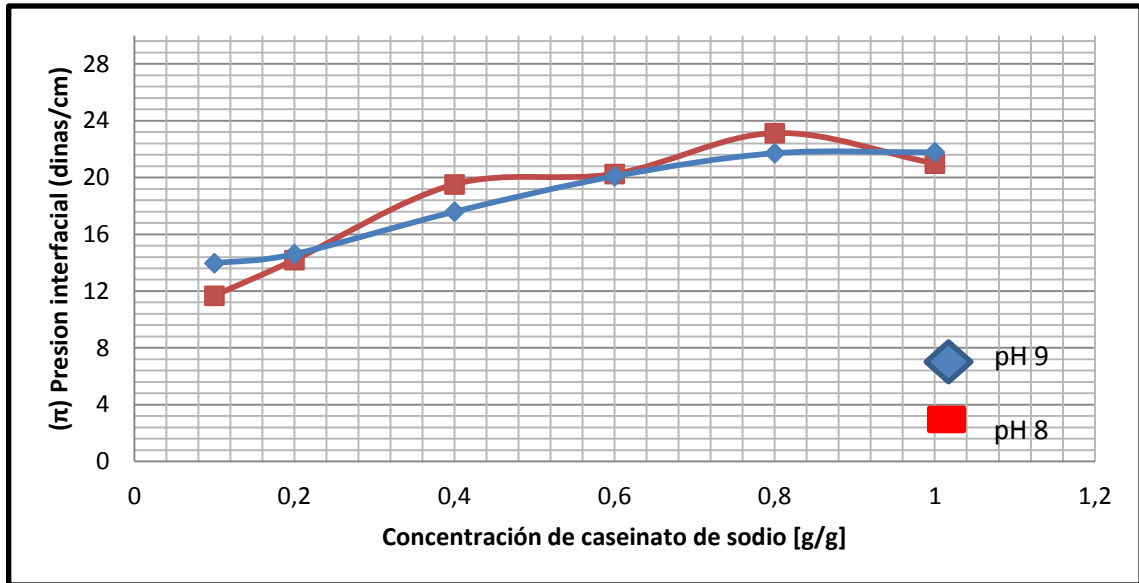
Esta proteína se dispersó en la experimentación en medio ácido pero esta fue insoluble en dichas condiciones e inclusive precipita, las partículas exhiben en una dispersión una carga eléctrica debido a los iones adsorbidos, por lo que al presentarse iones de la misma carga, estas serán repelidas, aumentando la entropía en la interface ocasionando que existan más probabilidades de un acomodo tal que se sitúen las moléculas en la interfase y de este modo disminuyendo la tensión superficial (Camino, 2010).

La gráfica 1 muestra el abatimiento de la tensión superficial que provoca el caseinato de sodio al dispersarse en sistemas alcalinos diferentes, cumpliéndose la actividad superficial $(\delta\gamma/\delta c)_{P,T} < 0$, de igual manera hay similitudes en las concentraciones 0.2 y 0.6 % en peso de caseinato de sodio confirmando la cualidad anfótera que presenta el caseinato de sodio en estas concentraciones, que indica que independientemente del pH al que esté sometida dicha proteína se comportará análogamente en la actividad superficial.



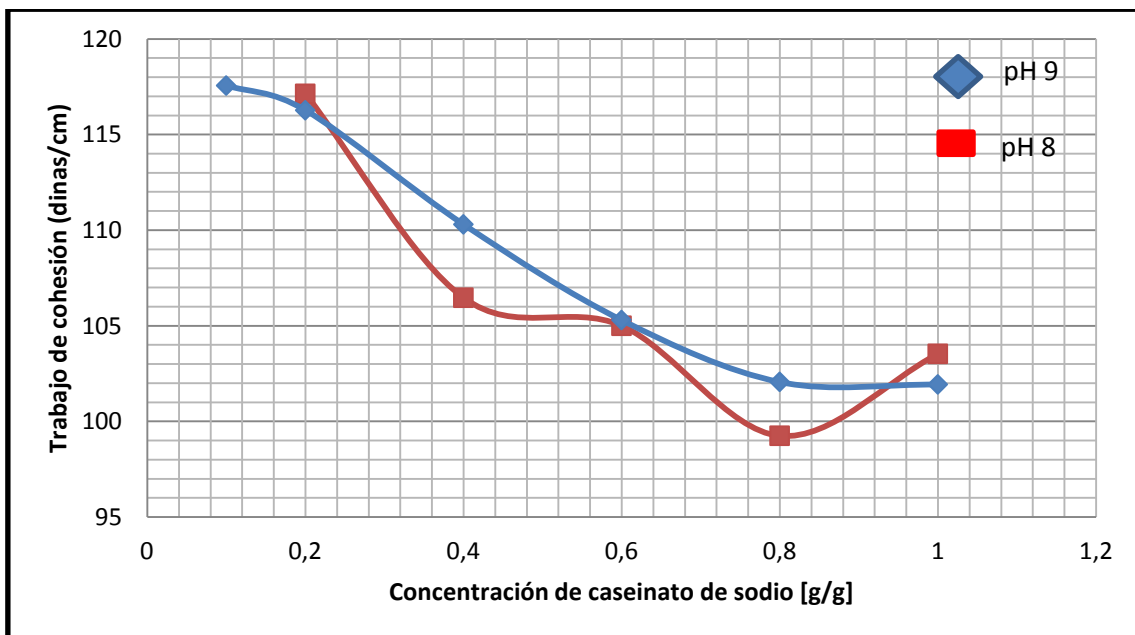
Gráfica 1. Abatimiento de la tensión interfacial que provoca el caseinato de sodio disperso en sistemas alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).

Ahora es momento de mostrar el descenso de la tensión interfacial en función de la concentración mostrando compatibilidad las moléculas proteicas en un sistema alcalino; distante de su punto isoelectrico, acarreado modificaciones en la conformación de la estructura secundaria de la proteína debido a la ionización de las cadenas laterales de dominio que contienen cadenas beta (β) extendidas (Ruis, 2007), aumentando la probabilidad de acumulación de moléculas proteicas en la interfase pensando que las moléculas adoptarán en la superficie **filas** de moléculas, exponiendo así la parte hidrofóbica de la caseína beta que contiene la mayor parte de elementos hidrofóbicos orientados hacia la fase discontinua y los agregados con el grupo terminal hidrofílico expuestos hacia el solvente. El caseinato de sodio a una concentración de 0.8 % en peso disperso en un pH de ocho muestra el mayor abatimiento de la tensión interfacial.



Gráfica 2. Presión interfacial en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en sistemas alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul).

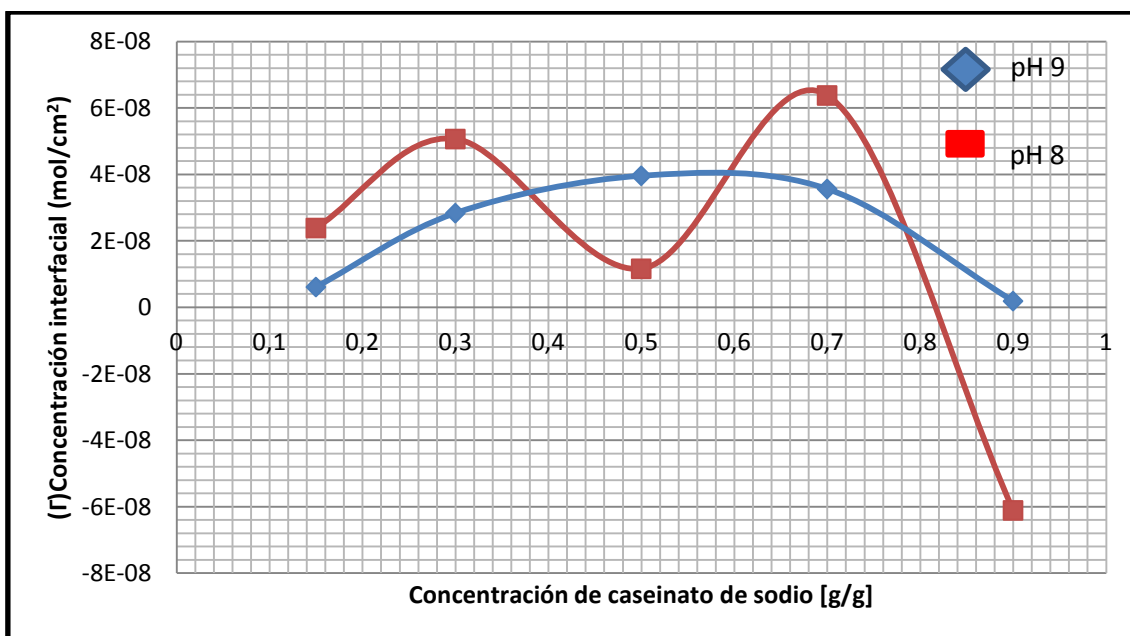
La alta flexibilidad estructural que presenta el caseinato de sodio hace que sea resistente a cambios estructurales drásticos ya que se adopta fácilmente sin romperse su estructura (Vega, 2006), cosa que sucedió al dispersarse en medio básico, ya que al aumentar la concentración de caseinato de sodio aumenta la presión interfacial, presentándose ligeramente una mayor presión interfacial en medio básico de pH igual a 8 en las concentraciones de 0,4 y 0,8 % en peso, de modo que se acumulan más moléculas en la interfase, traduciéndose en una disminución de la tensión interfacial.



Gráfica 3. Trabajo de cohesión en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en medios alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul)

En el gráfico 3 se muestra la disminución de la energía necesaria para separar en dos partes una columna de un centímetro cuadrado de sección de líquido conforme aumenta la concentración de caseinato de sodio, resaltando que cuando se dispersan cantidades mayores del 0.8 % en peso tiende a aumentar el trabajo de cohesión en las moléculas que están dispersas en medio de pH 8 o en su defecto no hay un descenso de la tensión superficial después de estas concentraciones atribuyéndolo a una sobresaturación en la interfase que provocará que muchas moléculas migren al seno de la dispersión. Al tener menor cantidad de energía cohesiva en la superficie, facilita la repulsión de las moléculas, de este modo se realiza el reacomodo de las moléculas de la proteína en la interfase para exponer sus grupos no polares con la fase discontinua y polares con el disolvente, formando una película en la interfase.

Ahora bien la variación del pH en una unidad condujo modificaciones significativas en la actividad superficial debido a que los cambios en la ionización de la cadena lateral cargados negativamente como alanina, isoleucina entre otros aminoácidos no polares provoca una repulsión entre las moléculas existiendo mayor energía entrópica en la interfase, de esta manera la proteína se distribuye al azar, provocando que se sitúen los grupos hidrófobos en la interfase y los grupos polares se orienten con el solvente, mostrándose en la gráfica tres que a partir de la concentración de 0.8 % en peso la superficie está saturada.



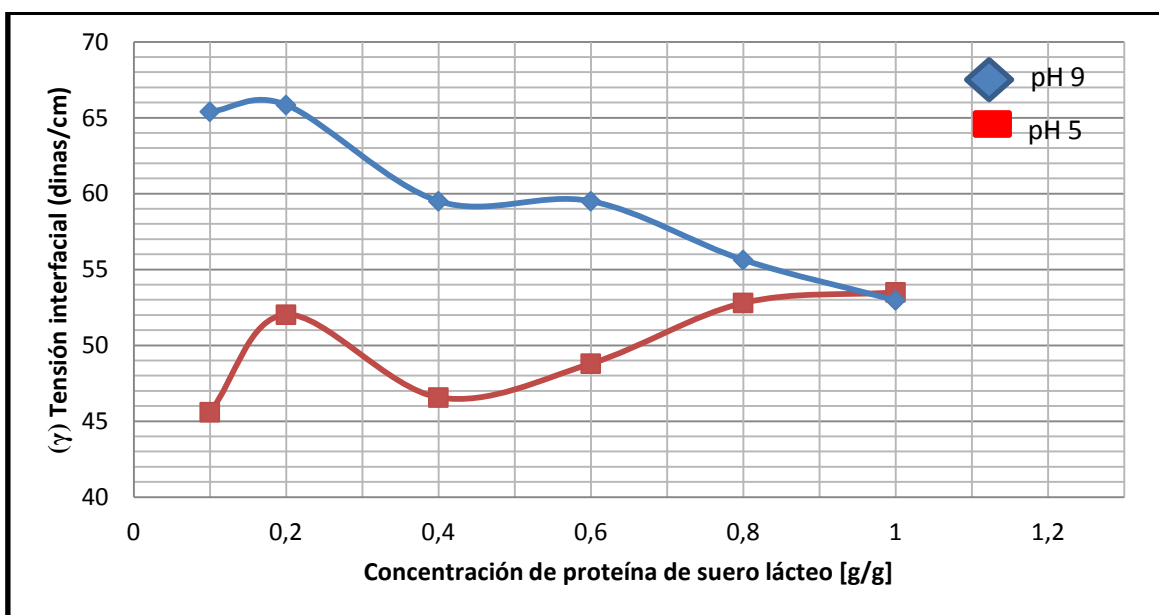
Gráfica 4. Concentración interfacial en función de la concentración de caseinato de sodio disperso en medios alcalinos pH 8 (rojo) y pH 9 (azul)

El caseinato de sodio posee una estructura plegada que al ser adsorbidas en la interfase, puede penetrar más o menos acusadamente en la interfase. Está confirmada la existencia de varias capas de proteína en una interfase (Maldonado, 2006). Cabe admitir, que el desplegado de la proteína, más o menos acusado, las regiones hidrófobas desplazan el agua de la interfase con el medio discontinuo del sistema, trae consigo una reducción de

la tensión interfacial tan considerablemente que facilita las energías necesarias para desplegar la proteína y acumularla sobre la interfase, fenómeno que se observa en la gráfica uno.

Los cambios conformaciones que provocó el pH del sistema sobre la estructura del caseinato de sodio es presumible que esa nueva configuración de la molécula sea más extendida ocupando mayor área superficial ejemplificada en la gráfica cuatro, se muestran las dos posibles alteraciones visibles en la cantidad de moléculas adsorbidas en la interfase presentándose dos máximos en el exceso de moléculas concentradas en la interfase de caseinato de sodio a pH de ocho, a concentraciones de 0.3 y 0.7 % en peso, predominando en mayor cantidad de moléculas adsorbidas a la concentración de 0.7 % en peso, límite el cual puede informar de una posible condensación de las moléculas de caseinato de sodio en la interfase, exhibiendo $6.3787 \text{ E}^{-8} \text{ mol/cm}^2$ que sí se convierte a unidades de moléculas/cm², con el uso del número de Avogadro - $N_A = 6.02214 \text{ E}^{23}$ moléculas/mol-, se tiene $3.8413 \text{ E}^{16} \text{ moléculas/cm}^2$, fenómeno que se bosqueja en la misma grafica, el descenso de la cantidad de moléculas adsorbidas en la interfase, dependiente ese fenómeno de la solubilidad que presenta el caseinato de sodio, lo cual estará en función de las interacciones existentes con el agua, influenciada directamente por la presencia de un agente alcalino (pH 8). Caso contrario en la dispersión de la misma proteína a un pH 9 el cual presenta un máximo a una concentración de 0.6 % en peso de caseinato de sodio disperso en dicho sistema.

Determinación de parámetros termodinámicos de proteína de suero lácteo disperso en medio básico pH 9 y medio ácido pH 5.

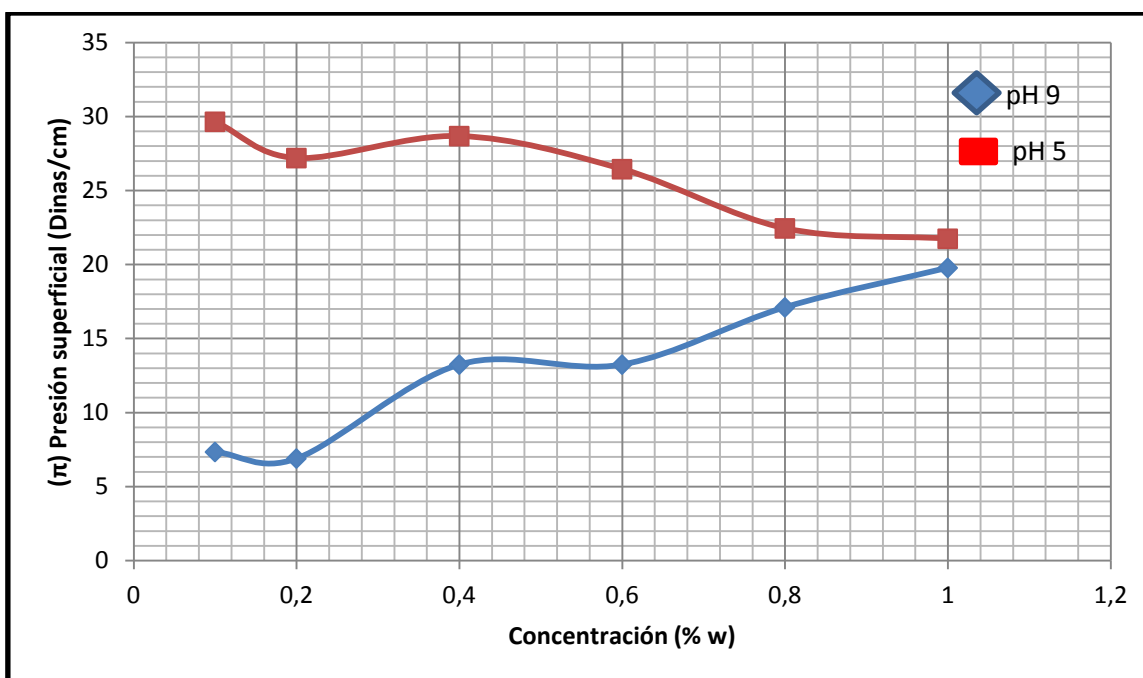


Gráfica 5.- Tensión superficial en función de la concentración de proteína de suero de leche, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul)

En la gráfica 5 se observa como la proteína de suero de leche en condiciones alcalinas presenta una actividad superficial positiva, $(\delta\gamma/\delta c)_{p,T} < 0$ (Mackie, Gunning, Wilde y Morris, 1998 - Vernon, Colaboradores, 2000), para todo el intervalo de concentraciones de pH alcalino.

Sin embargo en las dispersiones ácidas se tienen bajas tensiones interfaciales en contraste con el medio básico pero conforme aumenta la concentración de soluto aumenta gradualmente la tensión interfacial, atribuyéndolo a que empieza existir menor cantidad de moléculas proteicas en la interfase, implicado por la protonación de cargas de Aspartato, glutamina, impidiendo la formación de interacciones electrostáticas provocando así que la β -lactoglobulina no logre desplegarse y así no oriente los grupos hidrófobos a la fase discontinua provocando que precipite por estar próxima a su punto isoeléctrico, por otra parte se pueden observar dos efectos macroscópicos: inicialmente la solubilidad de las proteínas aumenta (salting-in) decreciendo la tensión interfacial y después de llegar a un máximo, decrece (salting-out) precipitando. El salting-in se considera a partir de una red con base de interacciones electrostáticas no específicas entre moléculas de proteína cargada y su medio (Villalta y Monferrer, 2001). Salvo el valor de la tensión interfacial en las concentraciones de 0.1- 0.4 % en peso que presenta la actividad superficial positiva, siendo las concentraciones adecuadas para aprovechar la desnaturalización del suero de leche y así fructificar la funcionalidad interfacial de la proteína, ya que protona las cargas de los aminoácidos asparagina (Asp), ácido glutámico (Glu) y lisina (Lis), estos aminoácidos impiden la formación de una interacción electrostática. El desplegamiento de las proteínas de suero de leche expone los residuos hidrófobos de los aminoácidos y facilita la habilidad de la proteína de orientarse en la interfase aire/agua.

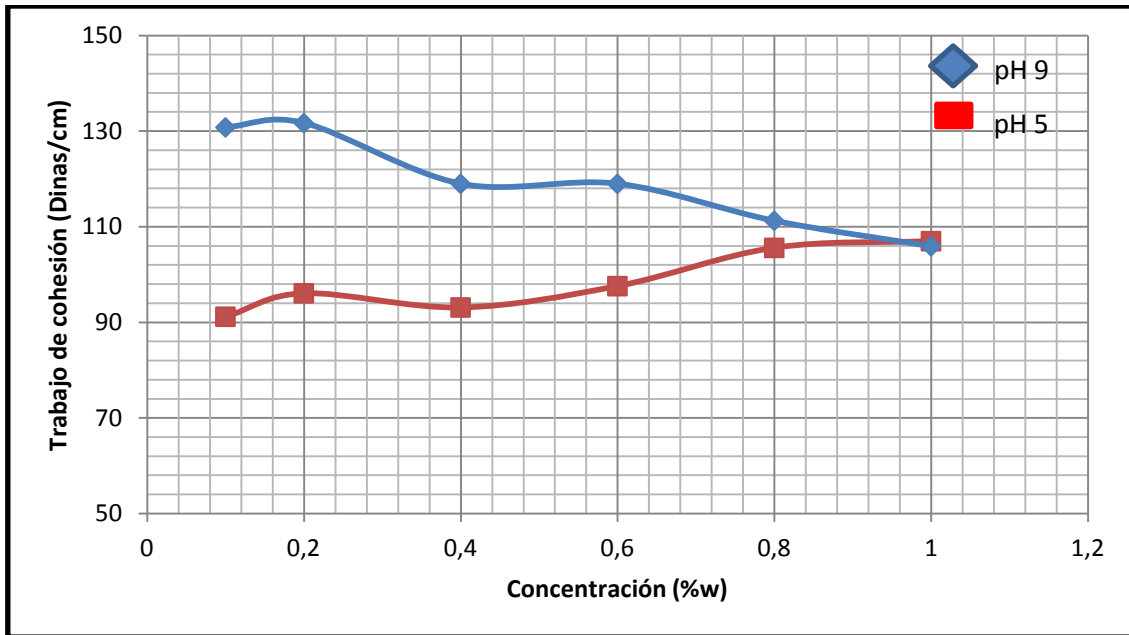
Si el solvente acuoso tiende a eliminar de su seno a aquellos grupos no polares con los que su interacción requeriría gran cantidad de energía, forzándolos a un arreglo tal que los sitúe lejos del solvente en el interior de la molécula proteica, el pH ácido provoca ese desenvolvimiento de la proteína causando que los grupos no polares se orienten a la fase discontinua y los aminoácidos polares se reorienten hacia la fase continua.



Gráfica 6.- Presión superficial en función de la concentración de suero de leche, pH 5(rojo) y pH 9 (azul)

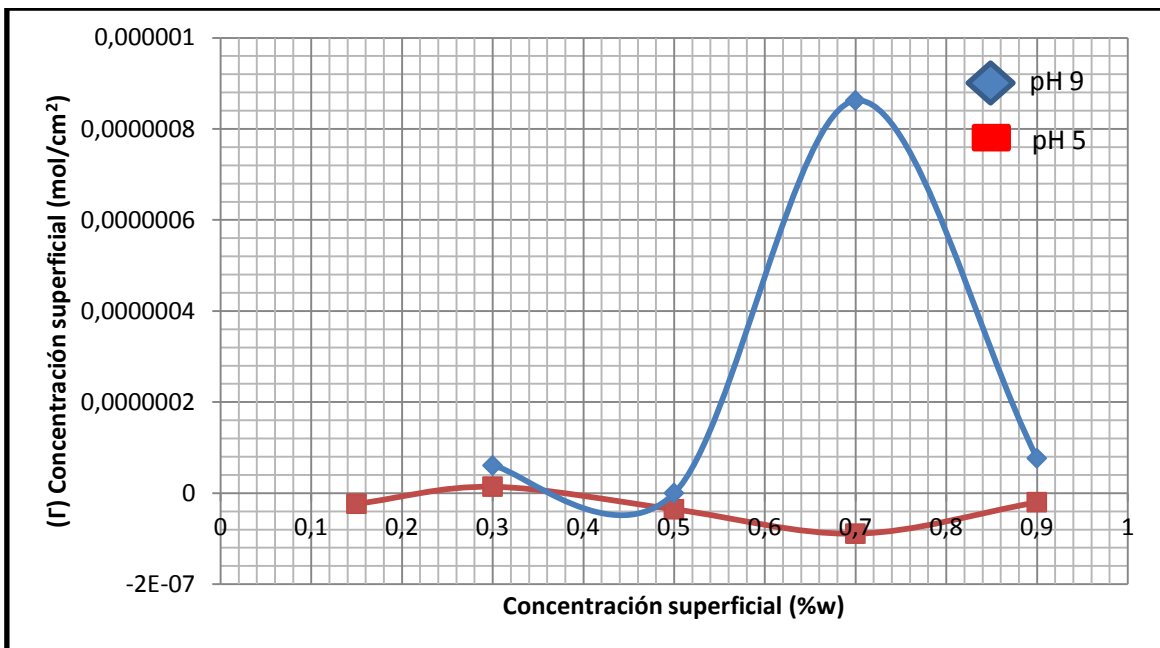
En la gráfica 6 se muestra la presión interfacial de suero de leche a dos distintos valores de pH en función de la concentración, a pH ácido se tienen presiones interfaciales mayores en contraste que a pH 9, en concentraciones ≤ 0.4 % en peso, la proteína de suero de leche presenta grupos que se pueden protonar minimizando las interacciones entre sí desplegándose la estructura terciaria que tiene la beta β -lactoglobulina existiendo mayores posibilidades de ocupar un área superficial. Se reporta que los aminoácidos de que está compuesta la proteína de concentrado de suero de leche adoptan una conformación de lazo en la interfase y esto ocasiona que haya una condensación en la superficie, y a presiones grandes se desplacen a la fase de bulto y que se colapse en un punto, que es la saturación de la monocapa o presión de superficial crítica, (Cornec, Kim, Narsimhan, 2001) y (Mackie y colaboradores, 1999). Por otra parte el comportamiento del suero de leche dispersas en pH alcalino presenta bajas presiones superficiales y va ascendiendo conforme aumenta la concentración.

Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de tres proteínas adsorbidas en la interfase (líquido-líquido)



Gráfica 7.- Trabajo de cohesión en función de la concentración de proteína de suero de leche, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).

En la gráfica 7 se muestran mayores trabajos cohesivos en la interfase aire-agua de la proteína de suero de leche dispersa en pH alcalino es decir se necesita mayor trabajo para separar las moléculas del líquido que se está extendiendo en la superficie y ese trabajo se verá reflejado en la suma de energía libre de Gibbs siendo más elevado, y por ende no cumplirá su función superficial la cual es el abatimiento de la tensión superficial. Esta variable podría reflejar la interacción con la fase acuosa en la interfase (Aire/Agua), la interacción cohesiva con las moléculas de agua (Gunasekaran, 2006).

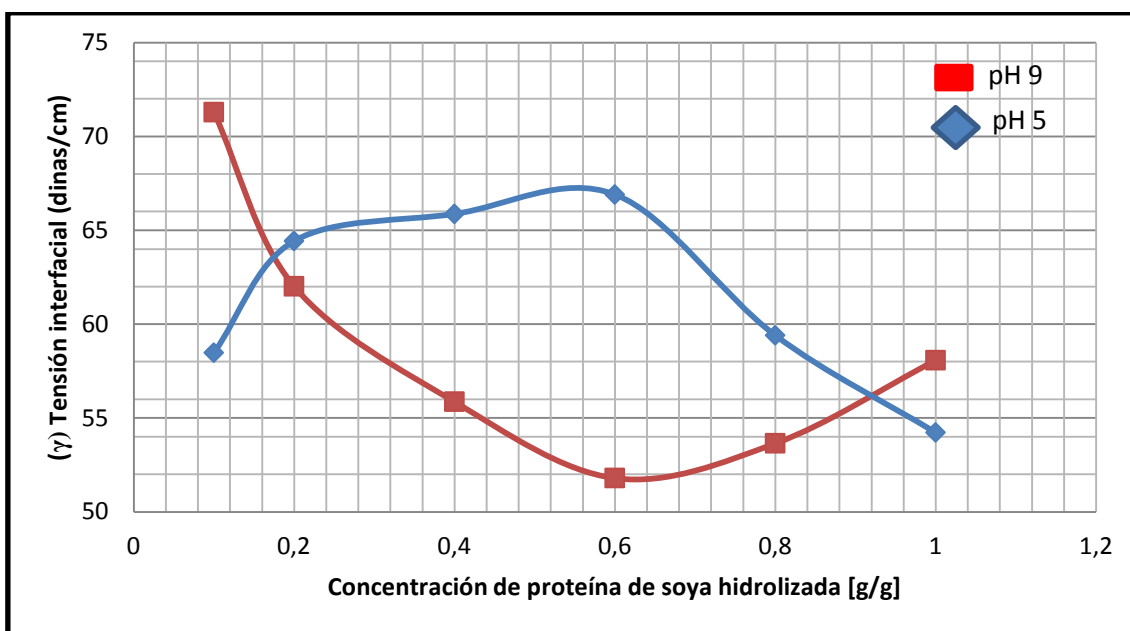


Gráfica 8.- Concentración superficial en función de la concentración de proteína de suero lácteo, pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).

En la gráfica 8 se muestra que la máxima concentración en la disolución de un soluto adsorbible es a una concentración de 0.7 % en peso de concentrado de suero lácteo, de acuerdo a las curvas de valoración ácido-base de la β -lactoglobulina, parece que las tres variantes tienen dos grupos β e γ COOH donde el pK_A de ionización está modificado (Camino, 2010). Es decir, presenta la máxima acumulación de moléculas en la interfase aire/agua ya que solubiliza cuando está distante de su punto isoeléctrico. Considerando un hipotético equilibrio entre soluto-disolvente, ya que está influenciado por la acumulación de las moléculas del soluto que depende a su vez de la concentración, del estado de desplegamiento y su estado de asociación (microestructural).

Por otra parte en condiciones ácidas el concentrado de suero lácteo presenta 3.6499 E^{16} moléculas/cm², cantidad quizá insignificante en comparación de la concentración superficial en medio básico, pero cabe recordar que a ésta concentración superficial muestra un abatimiento de la tensión superficial de 10 dinas/cm menos que la dispersión en medio alcalino.

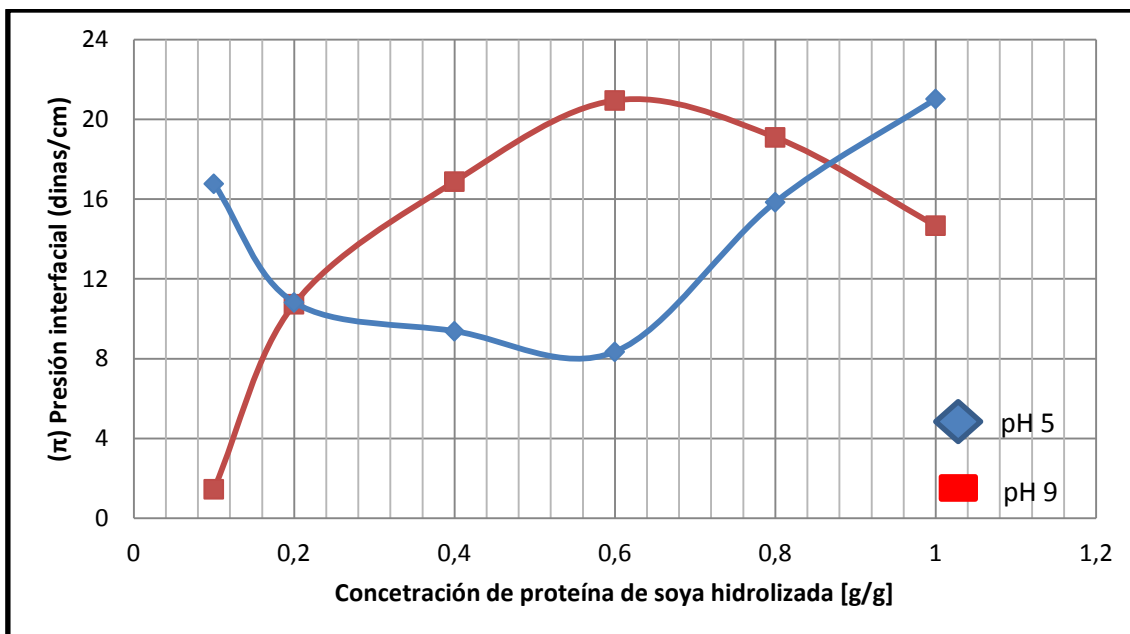
Determinación de parámetros termodinámicos de proteína de soya hidrolizada dispersa en medio básico pH 9 y medio ácido pH 5.



Gráfica 9.- Tensión interfacial en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (rojo) y pH 5 (azul)

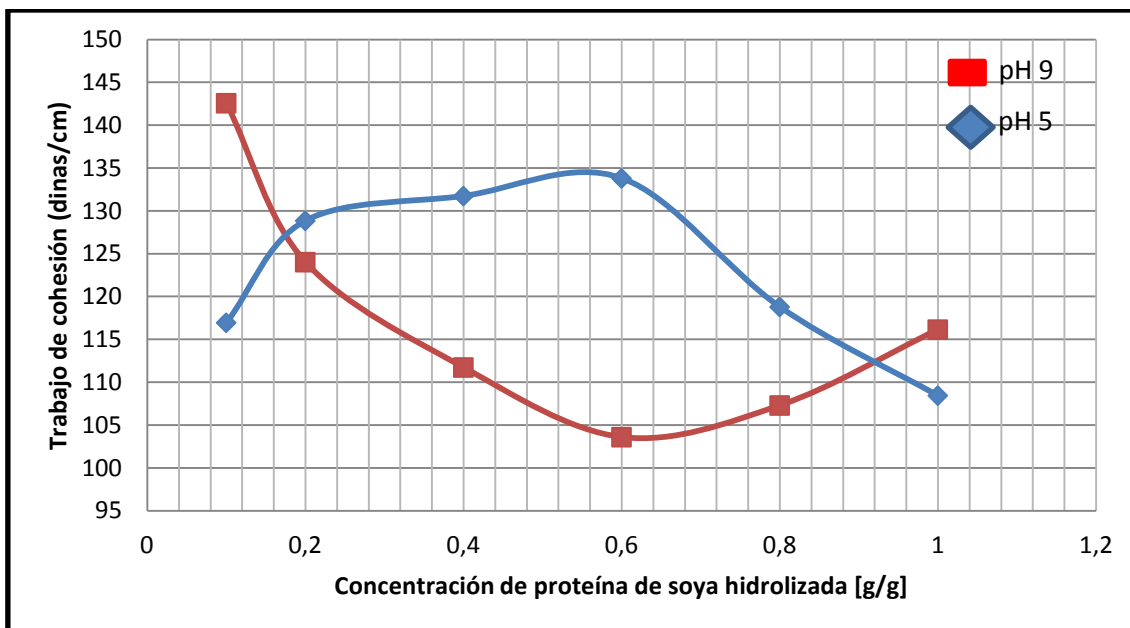
En la gráfica 9 se muestra que a pH alcalino presenta la proteína de soya una actividad superficial positiva hasta la concentración de 0.6 % en peso, en estas concentraciones empieza a existir una acumulación de moléculas en la interfase ocasionando el aumento de la tensión interfacial, caso contrario, en medio ácido la dispersión de proteína de soya hidrolizada, donde a la misma concentración inicia la actividad positiva interfacial.

En primera estancia la desnaturalización de la β -conglucina en medio ácido provocado por la protonación de las cargas de leucina, asparagina que impiden la formación de una interacción electrostática, ocasionando la repulsión de estos compuestos y originando que la estructura cuaternaria se desdoble mostrando los grupos hidrófobos terminales tales como; leucina, fenilalanina y leucina orientados a la fase discontinua del sistema y produciendo el descenso de la energía interfacial aunado a su bajo peso molecular - 140000-175000 Da- existe más probabilidad de desenvolvimiento facilitando la exposición de dichos grupos de aminoácidos. Por otra parte se muestra en la gráfica, dos puntos de intersección en ambos sistemas, esto es atribuible a la glicinina que se disocia fácilmente en sus subunidades, con baja fuerza iónica (0.01) a pH ácido ó alcalino, esta destabilización se logra por un aumento de la **hidrofobicidad** superficial de las subunidades (Euston y col, 2009), que favorecen así las interacciones hidrófobas entre subunidades ó bien por una neutralización de los grupos cargados por los iones salinos (Na^+ y Cl^-), por ejemplo, con descenso de las repulsiones electrostáticas entre subunidades. (Cheftel, 1989).



Gráfica 10.- Presión superficial en función de la concentración de proteína de soja hidrolizada pH 9(rojo) y pH 5 (azúl).

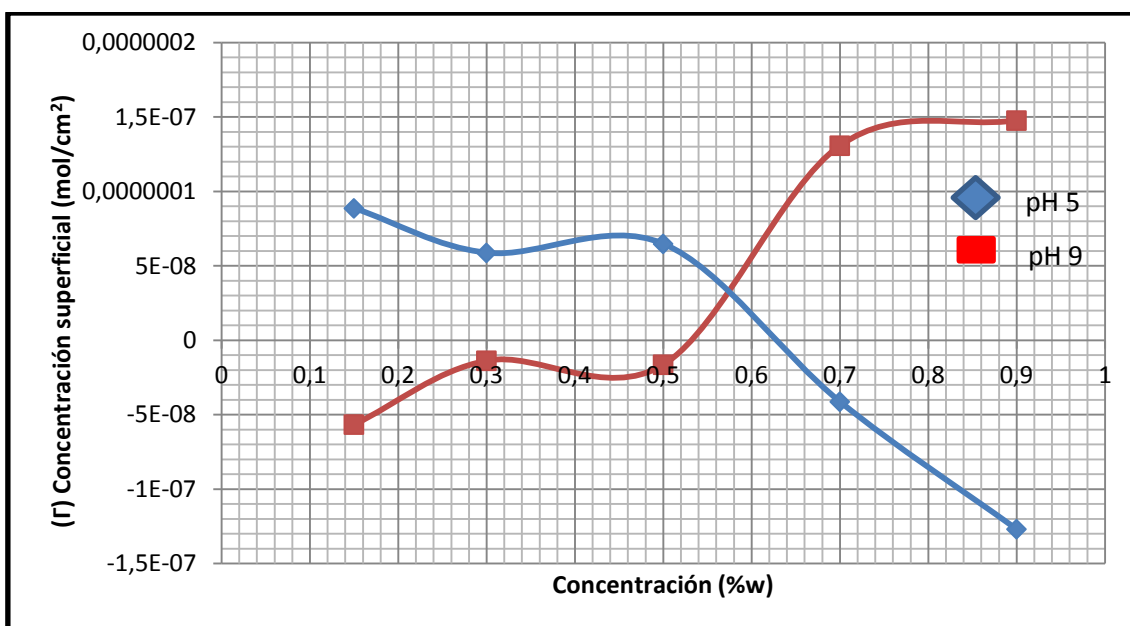
El establecimiento de uniones covalentes entre residuos de cisteína limita el número de estructuras posibles y contribuye a su estabilización, así las moléculas proteicas que contengan de cinco a siete uniones disulfuro, son acusadamente estables, características que no posee esta proteína ya que cuenta con 23 uniones disulfuro presentando más sensibilidad frente a una desnaturalización irreversible que está en función del pH del sistema ya que rompe las interacciones o enlaces que establecen las estructuras terciaria y cuaternaria, ahora bien la presión interfacial es definida como una medida directa del cambio de la actividad termodinámica de las moléculas en la interfase, pudiendo afirmar que existe la mayor actividad interfacial de la proteína de soja en un medio básico a una concentración del 0,6 % en peso, lo mismo que ocurre a la máxima concentración de proteína empero disperso en medio ácido. Debido a la naturaleza anfífilica de la proteína ésta quedara en la interfaz una vez haya expuesto los grupos hidrófobos hacia la fase discontinua y los grupos polares hacia la fase acuosa formando lo que se denomina una monocapa, una vez hecho esto, se trata de comprimir lentamente la superficie, de manera que la concentración superficial aumenta paulatinamente, la ocupación de una área superficial, se traduce en un aumento en la presión interfacial.



Gráfica 11.- Trabajo de cohesión en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (rojo) y pH 5 (azul)

Si el solvente acuoso tiende a eliminar de su seno a aquellos grupos no polares con los que su interacción requeriría gran cantidad de energía, forzándolos a un arreglo tal que los sitúe lejos del solvente en el interior de la molécula proteica con estructura cuaternaria o terciaria, el pH acarrea modificaciones importantes en la conformación bosquejados en la gráfica 10, por cambios en la ionización de las cadenas laterales cargadas negativamente porque se afecta el número de los puentes salinos que estabilizan la estructura nativa, iniciando una reacción en cadena de destabilización de la macromolécula, esto se puede traducir en el descenso del trabajo de cohesión que ejercen aminoácidos como leucina, alanina y valina se exponen hacia la fase discontinua y aminoácidos con carácter polar orientados hacia la fase continua formando la monocapa en la interfase.

La proteína de soya posee características anfífilas que muestra que a bajas concentraciones las moléculas tienen una afinidad con el disolvente en condiciones ácidas, pero al aumentar la concentración, particularmente a la concentración de 0,6 % en peso, muestra que se haya mayor probabilidad de existencia de aminoácidos laterales terminales no polares que migrarán hacia la interfase como lo son glicininas, fenilalaninas, leucinas e isoleucinas formándose una monocapa más rígida en la interfase y por consecuencia se tiene menor energía de cohesión que ejerce en la interfase.



Gráfica 12.- Concentración superficial en función de la concentración de proteína de soya hidrolizada, pH 9 (rojo) y pH 5 (azul).

En la gráfica 12 se muestra una confluencia de actividades superficiales –concentración superficial – en la concentración de 0.56 % en peso, la cantidad de moles de proteína de soya hidrolizado concentrados en la interfase es de $7.8744E^{16}$ moléculas/cm², confirmando que a estas concentraciones posee la proteína una cualidad anfótera. Al aumentar la concentración a partir de la confluencia que existió en los distintos medios de pH, se observa que existe en medio ácido los monómeros de la proteína pueden apreciablemente crear mayores contactos con la interfase, ya que las fuerzas son lo suficientemente fuertes para que estas migren a la superficie, con el consecuente recubrimiento en la interfase, en otras palabras existe adsorción con alta afinidad. Cuando las macromoléculas que se adsorben de forma irreversible en la superficie, las partículas coloidales afectan fuertemente la estabilidad, a altos recubrimientos superficiales forman películas viscosas, que los efectos estéricos impiden **floculación** y confieren resistencia a la **coalescencia** por lo tanto conducen a un incremento en la estabilidad de un sistema superficial – emulsiones y espumas (Camino, 2010).

La ecuación de Gibbs muestra que la tensión superficial será menor cuando mayor sea la concentración en la disolución de un soluto adsorbible, pero no indica la relación que existe entre la tensión superficial, presión superficial y la concentración superficial con la concentración de la solución, ya que las proteínas al estar presentes en medios alcalinos o ácidos muestran demasiadas diferencias.

La habilidad de las moléculas de un tensioactivo en evitar las interacciones directas entre los líquidos inmiscibles está gobernada por el empaquetamiento óptimo en la interfase, que dependerá de la estructura de la proteína, al igual que la conformación que adoptan cuando ocurre en la desnaturalización información que se obtiene a partir del estudio termodinámico de fenómenos superficiales.

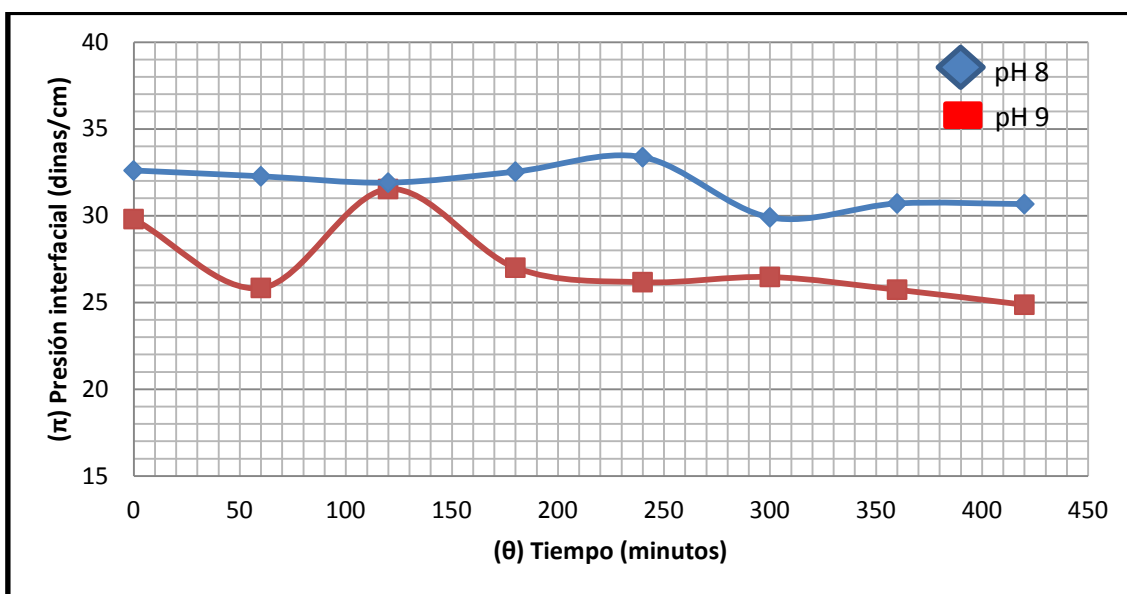
Estudio cinético de adsorción de caseinato de sodio en medio alcalino.

Las condiciones idóneas donde se presentó mayor actividad superficial del caseinato de sodio fueron:

Tabla 15. Concentraciones idóneas de caseinato de sodio que presentaron mayor actividad superficial.

Concentración de caseinato de sodio (%)	pH
0.7	8
0.6	9

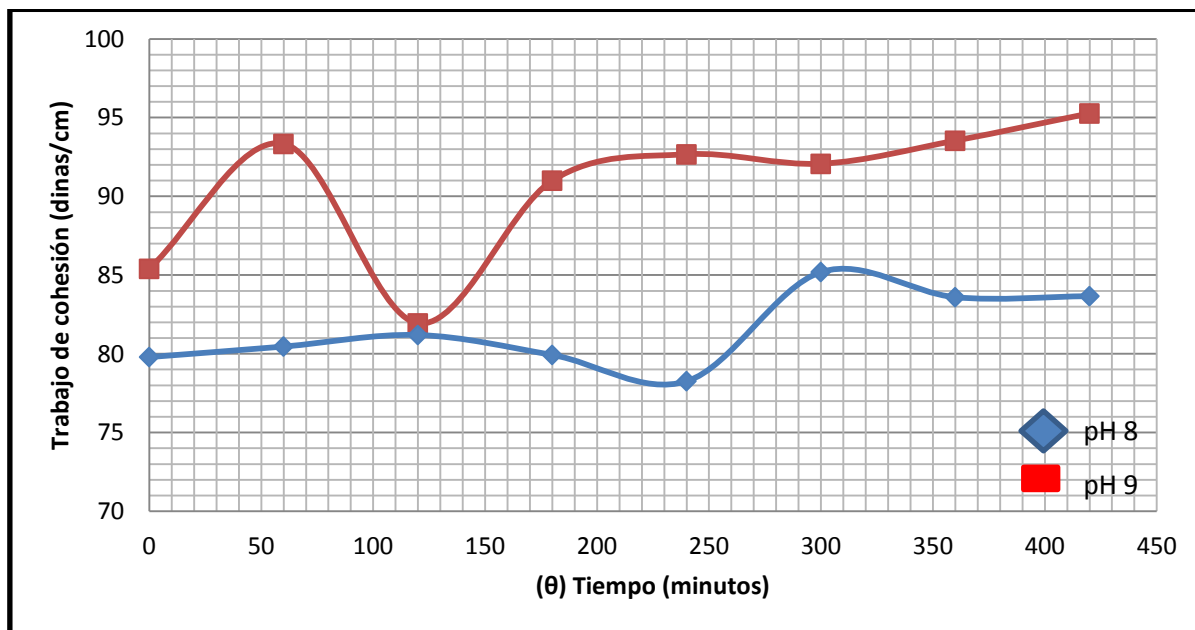
Primeramente se muestra el comportamiento cinético de adsorción de caseinato de sodio graficando las variaciones de la presión interfacial en función del tiempo, hasta llegar a un punto de equilibrio o pseudo-equilibrio.



Gráfica 13. Cinética de adsorción de caseinato de sodio en función del pH 9 (rojo) y pH 8 (azul).

En la interfase aire/agua, las isothermas π - θ no fueron sigmoideas y no se observa ninguna inflexión aparente en la presión interfacial hasta haber transcurrido cuatro horas del proceso de adsorción, sugiriendo que no ocurre cambio estructural aparente en la estructura en ese lapso de tiempo, sin embargo en condiciones donde hay más $[\text{OH}^-]$, existe más posibilidad de neutralizar las cargas positivas de los aminoácidos de la cadena lateral y por lo tanto un reacomodo rápido de las moléculas formando *filas* de moléculas adsorbidas en la interfase con el consiguiente abatimiento de la tensión interfacial ocupando una mayor área superficial en un lapso de dos horas de haber

transcurrido el proceso de adsorción, cuando a condiciones menos básicas el descenso de la tensión superficial ocurre en cuatro horas.



Gráfica 14. Cinética del trabajo cohesión que ejerce el caseinato de sodio en la interfase en función de pH 8 (azul) y pH 9 (rojo).

Las moléculas proteínicas de caseinato de sodio migran más rápidamente del seno de la dispersión hacia la interfase en un medio más básico -pH 9-, atribuyéndolo a su bajo peso molecular y a la estructura secundaria, aunado que al haber más cantidad de iones hidróxido que ionizan rápidamente las cadenas laterales cargadas negativamente como alanina, isoleusina entre otros aminoácidos no polares, provocando así una repulsión, con el respectivo aumento en la entropía superficial y de esta manera la proteína se distribuye al azar, provocando que se sitúen los grupos hidrófobos en la interfase y los grupos polares se orienten con el solvente más rápidamente, transcurridas tres horas las moléculas acumuladas en la interfase migran hacia el seno de la dispersión acumulándose en esta zona que provoca la disminución de la cantidad de moléculas en la interfase con el consecuente aumento de energía cohesiva en la interfase, por lo que aumenta la tensión superficial perdiendo así la actividad superficial el caseinato de sodio.

Por otro lado en condiciones menos básicas -pH 8-, el descenso de la energía cohesiva en la interfase ocurre después de cuatro horas del proceso cinético de adsorción, debido a que existen menos fuerzas ionizadoras en las cadenas laterales de los aminoácidos no polares, por lo tanto el proceso cinético de adsorción se rige por la difusión de moléculas de caseinato de sodio a la interfase seguido por una etapa más lenta y controlada por la penetración, desplegamiento y reordenamiento de las moléculas adsorbidas y de esta manera provoca una mayor disminución de la energía cohesiva, reflejándose en el descenso de la tensión superficial.

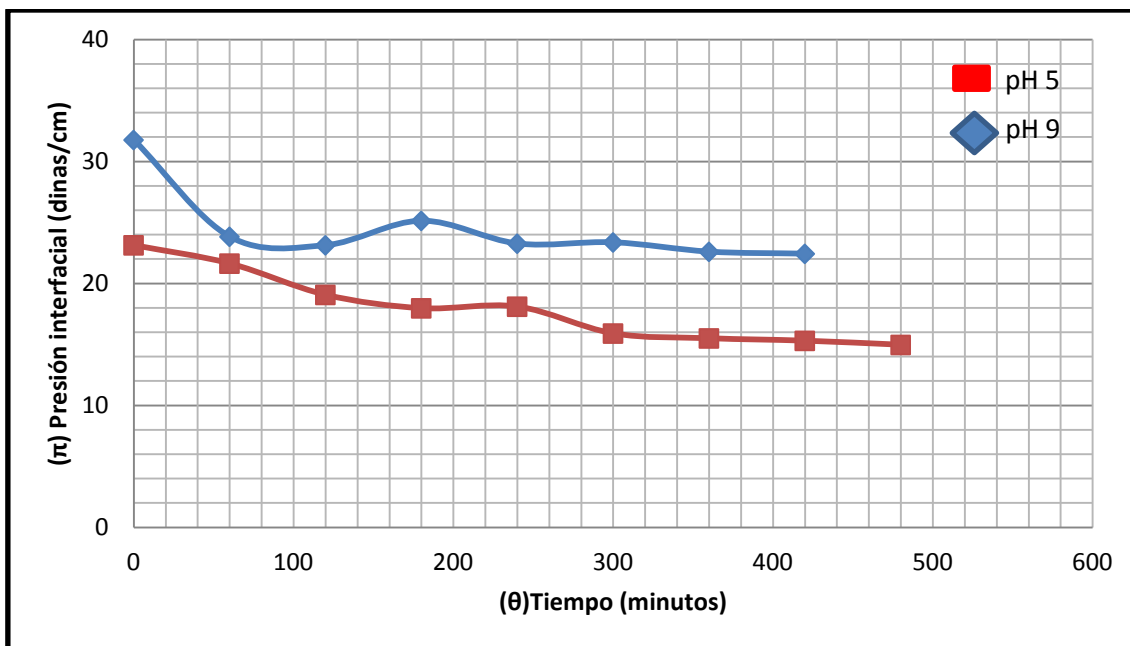
Ahora bien, para observar cómo influye el pH en el abatimiento de la tensión superficial, se dispersó el caseinato de sodio en agua desionizada en condiciones neutras de pH, la disminución máxima de la tensión superficial fue de 47 dinas/cm transcurridas veinticuatro horas del proceso de adsorción, cuando en condiciones básicas -pH 8- fue de 39 dinas/cm en un lapso de cuatro horas, posteriormente una cantidad de moléculas migraron al seno de la dispersión llegando a un pseudo-equilibrio después de seis horas presentando una tensión superficial de 42 dinas/cm.

Estudio cinético de adsorción de proteína de suero lácteo en medio ácido (pH 5) y medio básico (pH 9).

En el estudio dinámico de adsorción de proteína de suero lácteo se implementaron las concentraciones donde se mostró mayor cantidad de moléculas acumuladas en la interfase, actividad que se desarrolló en el objetivo particular uno.

Tabla 16. Concentraciones idóneas de proteína de suero lácteo que presentaron mayor actividad superficial.

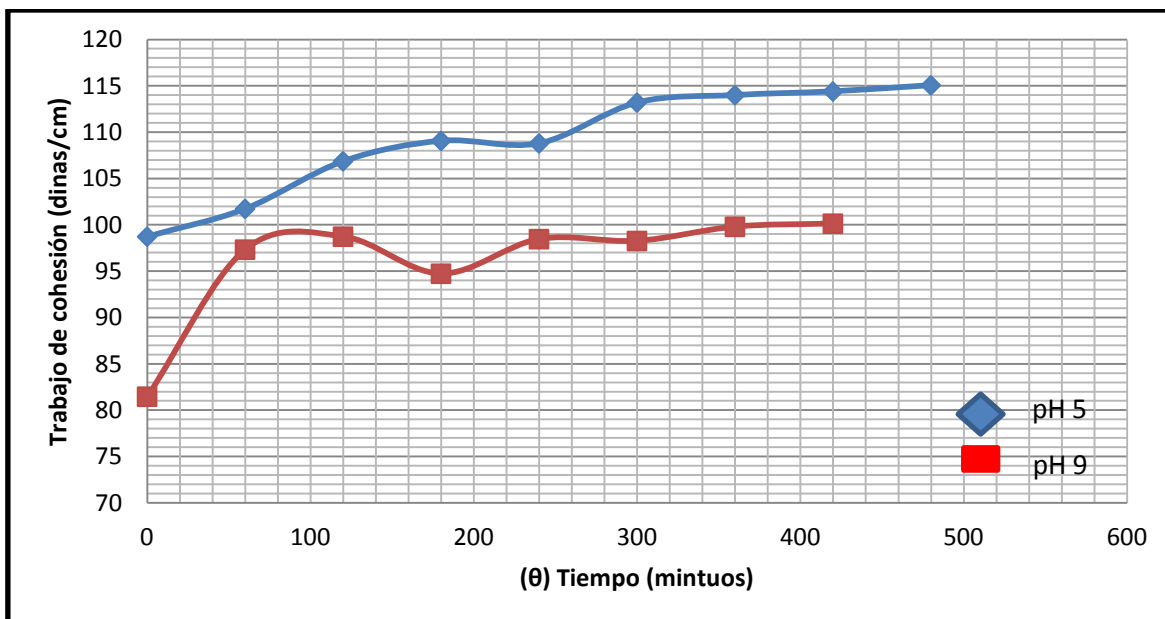
Concentración de proteína de suero lácteo (%)	pH
0.3	5
0.7	9



Gráfica 15. Cinética de adsorción de proteína de suero lácteo en función del pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).

Cuando el pH es mayor a siete, ocurren cambios conformacionales caracterizados por un aumento en la reactividad del grupo carbonilo oculto, el grupo tiol libre en Cisteína 121 y en el residuo de Tirosina. Por lo tanto la disociación del dímero en monómeros de β -lactoglobulina podría reducir la actividad del grupo tiol libre al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas, según la conformación, el grupo tiol estaría más o menos accesible y podría participar en los intercambios de uniones disulfuro, que condicionan numerosas características y en particular la solubilidad (Philips y col, 1994), entonces en la gráfica 15 se bosqueja que las moléculas de suero lácteo se van acumulando en la superficie más rápidamente presentando mayores presiones interfaciales, es apreciable que el proceso es espontáneo ya que ocurre en el intervalo en que se inicia el proceso de dispersión de la proteína en medio básico, después de transcurrir una hora del proceso de adsorción, una fracción de las moléculas proteicas descienden al seno de la dispersión, debido a la solubilidad que presenta en este sistema, trayendo como consecuencia una disminución en la presión interfacial.

Por otro lado en medio ácido las moléculas de suero lácteo están presentes como dímeros, entonces tiene un peso molecular mayor en comparación de sí las moléculas estuvieran dispersas en medio básico, siendo el proceso de difusión más lento, así como también la penetración y reorganización de las moléculas en la interfase, manifestándose en bajas presiones superficiales y así perder su actividad superficial conforme transcurre el tiempo.



Gráfica 16. Cinética del trabajo cohesión que ejerce la proteína de suero lácteo en la interfase en función de pH 5 (azul) y pH 9 (rojo).

La β -lactoglobulina bovina existe generalmente como dímero a 25 °C entre pH 5 y 7.5 (Mckenzie, 1971). Esta asociación entre monómeros de β -lg se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp 130 y Glu 134 con los residuos de lisina en la molécula vecina. A pH cercanos a cinco se producen una transición mediante la cual la proteína se asocia en octámeros, en esta forma está presente en un rango de pH de tres a cinco aproximadamente (Relkin, 1996). Esta asociación que se da entre las moléculas de proteína en diferentes condiciones del medio afecta la estabilidad de la misma frente a la desnaturalización ya que limita la exposición de grupos ocultos (disulfuro y tiol) en las zonas de unión de las moléculas y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre las moléculas parcialmente desplegadas, el reordenamiento de las moléculas adsorbidas en la superficie puede ser retardado por los lentos reordenamientos moleculares, formación de complejos y formación de una estructura tridimensional (Lucassen-Reynders, 1993), como consecuencia traerá que en la acopio de las moléculas en la interfase provocara mayores energías cohesivas, expulsando una parte de las moléculas hacia el seno de la dispersión.

Por otro lado en la dispersión de la proteína de suero lácteo en medio básico las energías cohesivas son mínimas en el instante que inicia la adsorción, ya que la difusión de las moléculas es más rápida porque se están transportando moléculas de menor peso molecular y una configuración más sencillas que facilita la penetración y el reacomodamiento molecular en la superficie, por lo tanto la máxima cantidad de moléculas adsorbidas indica que probablemente el área mínima a la cual pueden llegar con la compresión sin que la película se rompa, este fenómeno se observa en la grafica dieciséis que al transcurrir una hora del proceso la superficie se condensa por lo que el resto de las moléculas se sitúan en el seno de la dispersión provocando un aumento en el

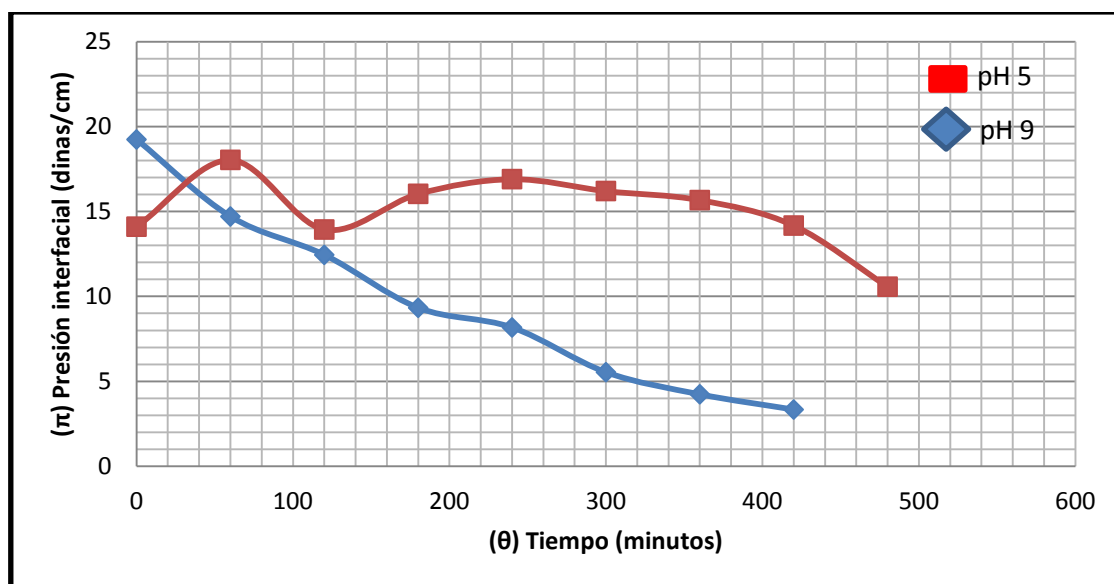
trabajo de cohesión, fenómeno desfavorable para la adsorción de moléculas perdiendo así la funcionalidad superficial las proteínas de de suero lácteo.

Estudio cinético de adsorción de proteína de soya hidrolizable (pH 5) y medio básico (pH 9).

Y por último y no menos importante, se muestran los resultados del proceso cinético de adsorción de moléculas de proteína de soya hidrolizada datos obtenidos en el objetivo particular uno, donde se obtienen las concentraciones adecuadas para ser empleadas como agente reductor de la tensión superficial, estas concentraciones dispersadas en distintos pH son:

Tabla 17. Concentraciones idóneas de proteína de soya que presentaron mayor actividad superficial.

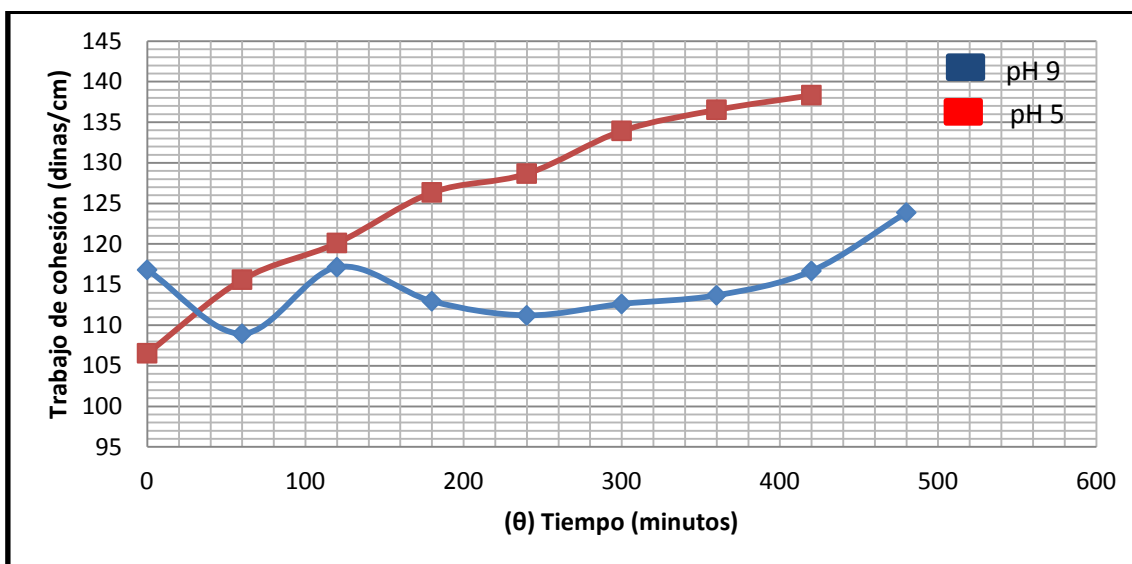
Concentración de proteína de soya hidrolizada (%)	pH
0.74	5
0.5	9



Gráfica 17. Cinética de adsorción de proteína de soya hidrolizada en función del pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).

En la adsorción de proteína de soya hidrolizada, los serpentines tridimensionales se desdobl原因, causando un apreciable aumento de presión interfacial en la superficie al comienzo del proceso en condiciones básicas -pH 9-, pero al continuar la adsorción de las moléculas proteicas éstas migrarán hacia el seno de la dispersión, habiendo menos

moléculas localizadas en la superficie con la consiguiente aumento de la tensión superficial. Por otro lado en condiciones ácidas las moléculas proteicas de soya, el proceso de inducción es bosquejado en la gráfica 17, donde transcurrida una hora del proceso la proteína empieza a desorganizarse, desplegarse para que acusadamente penetre en la interface, fenómeno que ocurre en dos horas después del inicio del proceso de adsorción, pero estas moléculas empiezan a descender al seno de la dispersión, minimizando el contenido de moléculas acumuladas en la superficie perdiendo toda actividad superficial.



Gráfica 18. Cinética del trabajo cohesión que ejerce la proteína de soya hidrolizada en la interfase en función de pH 5 (rojo) y pH 9 (azul).

La estructura cuaternaria que presenta la β -conglucina es factor imperante en la cinética de adsorción, como se puede apreciar en la grafica 18, donde al principio de la adsorción las moléculas no se desdoblaron del todo, suponiendo que cuando las moléculas de la proteína de soya migrarán hacia la interfase por medio de difusión estas adoptan formas de *lazos* y *colas* en dicha área superficial no ocupándola en su totalidad por lo que se traduce en bajas energías cohesivas en los primeros instantes del proceso cinético de adsorción en medio ácido, mientras tanto al transcurrir el tiempo estas moléculas no se desdoblaron en su totalidad ocasionando que la mayoría se sitúen en el seno de la dispersión, y las pocas moléculas que se encuentran en la interfase interactúen ocasionando fuerzas cohesivas mayores.

Por otro lado en medio básico las moléculas proteicas se difunden hacia la interfase, situándose estas partículas en la interfase empiezan a desplegarse no en su totalidad ya que se minimiza el trabajo cohesivo de las moléculas que ejercen en la interfase en un lapso de dos horas después de haber iniciado el proceso considerando que se siguen adoptando formas de *lazo*, *colas* y también de *filas* en la superficie, pero no es suficiente para que siga abatiendo la energía cohesiva existente, sugiriendo que las moléculas anfífilas están situadas en el seno de la dispersión, provocando que conforme pasa el tiempo las fuerzas cohesivas sean más grandes y por lo tanto la proteína de soya carecerá de funcionalidad superficial.

Conclusiones

Se ha demostrado que las proteínas con una actividad de superficie apropiada para fines tecnológicos deberán poseer tres atributos:

- Adsorberse rápidamente en la interfase.
- Conocer la disponibilidad de un tensoactivo para adsorberse.
- Capacidad, una vez situadas y orientadas en la interfase, de interactuar con las moléculas vecinas y formar una película viscoelástica fuerte, que soporte los movimientos mecánicos y térmicos.

El estudio termodinámico y cinético de adsorción de proteínas en la interfase; muestran que las diferencias en actividad superficial están primordialmente relacionadas con las que se dan en la conformación proteica.

El caseinato de sodio presenta una alta flexibilidad estructural que hace que sea resistente a cambios estructurales, observando; que adopta conformaciones estructurales para que pueda situarse en la superficie, predominando en mayor cantidad de moléculas adsorbidas ($3.8413 \text{ E}^{16} \text{ moléculas/cm}^2$) a la concentración de 0.7 % en peso, límite el cual puede informar de una posible condensación de las moléculas de caseinato de sodio en la superficie de un medio alcalino (pH 8), también se puede uno percatar que a esta concentración de soluto la energía cohesiva existente en esa interfase es mínima, favoreciendo una tensión superficial menor, pero no hay suficientes cargas negativas para que puedan ocasionar una reorganización rápida para que la estructura secundaria que tiene el caseinato de sodio se adsorba en la interfase ya que tienen que transcurrir cuatro horas para que se sitúen las moléculas necesarias que provoquen un abatimiento marcado de la tensión superficial, fenómeno contrario que se observó cuando se tiene un potencial de iones hidróxido $[\text{OH}^-]$ alto (pH 9), donde la máxima presión interfacial se alcanza al transcurrir dos horas del proceso cinético empero se tienen en la superficie ($2.386 \text{ E}^{16} \text{ moléculas/cm}^2$) a una concentración de proteína de 0.6 % en peso.

Se hizo mención de los antecedentes referentes a las características químicas y estructurales del suero lácteo, la β - lactoglobulina es la proteína que se encuentra en mayor proporción por lo tanto rige la funcionalidad, al adsorberse ésta estructura globular en medio neutro en una cantidad de soluto de 0.3 % en peso, se observó que el descenso de la tensión superficial fue de 53.4 dinas/cm, cuando la proteína se dispersó en medio alcalino presenta las características de un surfactante –la actividad superficial es positiva-, es decir; conforme aumente la cantidad de soluto en el sistema disminuirá la tensión superficial observando que a la concentración máxima (1.0 por ciento en peso) que se fijó como estudio, la reducción de dicha magnitud fue de 52.9 dinas/cm, empero a estas concentraciones de soluto la interfase se encuentra sobresaturada, información que se obtiene de la gráfica 8 mostrando que a una concentración de 0.7 % en peso se encuentran las máximas posibles moléculas ($5.19 \text{ E}^{16} \text{ moléculas/cm}^2$) proteicas acumuladas en la interfase.

En el proceso cinético de adsorción de las moléculas proteicas lácteas la penetración y reorganización en la superficie es en los primeros instantes del fenómeno fisicoquímico, donde en medio básico las energías cohesivas que se generan en la superficie son mínimas (81.46 dinas/cm) en comparación cuando se dispersa en medio ácido (98.73 dinas/cm) suponiendo que en ambos casos la superficie se encuentra saturada trayendo como consecuencias que las moléculas lácteas se dirijan al seno de la dispersión y las moléculas existentes en la superficie interaccionen entre sí provocando que aumente el trabajo de cohesión en la superficie conforme transcurre el tiempo.

Por otro lado, se sabe que al dispersarse las moléculas proteicas lácteas en medio ácido próximos al punto isoeléctrico, muchas moléculas precipitan, pero otras forman agregados en la interfase en bajas concentraciones, refiriéndose a las concentraciones de soluto de proteína de 0.1-0.4 % en peso que presentan una actividad superficial positiva pero al aumentar la concentración los agregados no logran adsorberse, por lo que muchas moléculas se localizan en el seno de la dispersión, esta modificación que provoca el ambiente ácido indujo que a la concentración de 0.3 % en peso ocasionase que el descenso de la tensión superficial llegara hasta 49.36 dinas/cm, pero contrastando la adsorción de moléculas a esta concentración se observó que hay muy pocas moléculas concentradas en la interfase ($8.5388E^{15}$ moléculas/cm²), sugiriendo que esta película será delgada, proclive a no ser resistente ante esfuerzos mecánicos ó térmicos.

La proteína de soya mostro una sensibilidad a la desnaturalización con ácidos ó bases peculiar, porque al dispersar estas moléculas de β -conglucina que posee una estructura cuaternaria, se difunde hacia la superficie en un medio alcalino ó ácido espontáneamente, atribuido a su bajo peso molecular, de este modo la penetración en la superficie es inmediata por lo que la reorganización y restructuración de la proteína dependió del medio acuoso y de la concentración. La máxima cantidad de moléculas adsorbidas en la superficie ($10.022 E^{16}$ moléculas/cm²) fue en medio ácido a la concentración de 0.74 % en peso, cuando en medio básico a la misma concentración no hay moléculas en la superficie más bien se encuentran en el centro de la solución desempeñando el rol de **retenedor de agua** y no como un agente superficial.

Se hace mención que la concentración influyó en la adsorción, porque se determino que a la concentración de 0.6 % en peso en medio básico es el límite superior en el cual se puede emplear la proteína con fines superficiales pero en medio ácido la proteína se comporta contrariamente.

Recomendaciones

Es imprescindible hacer mención de algunas inquietudes que se vislumbraron en el desarrollo de este estudio y por lo tanto se realizan algunas sugerencias para profundizar en el tema de fenómenos superficiales que es un universo coloidal.

- Desarrollar un estudio termodinámico, empleando ecuaciones como la de exceso de soluto de Gibbs, correlaciones numéricas, donde transmite información concerniente de las cualidades y capacidades de un soluto al adsorberse, fenómeno que se tiene que desarrollar para la formación de espumas y emulsiones.
- Buscar alternativas de la medición de la tensión superficial ya que en los últimos años se han desarrollado metodologías más modernas: balanzas para películas de tipo langmuir donde se pueden estudiar procesos de relajación y dilatación por aplicación de ciclos compresión/ expansión, por mediciones dinámicas de presión superficial y área interfacial (Rodríguez Nió y col., 1998).
- La concentración superficial es un parámetro de suma importancia, la estimación que se obtiene por la ecuación de Gibbs es de ayuda para minimizar la incertidumbre de cuánta cantidad es la necesaria para una óptima actividad superficial, técnicas como los marcadores radioactivos (Hunter y col., 1991), incluyendo elipsometría (Graham y Phillips, 1979); FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) donde se determina por difusión con marcadores isotermas de adsorción (π - Γ), características de drenado y de angostamiento de la película.
- Conocer el espesor de la película.
- Explorar todas las posibles formas de modificar a las proteínas.
- De igual forma se sugiere que las concentraciones donde se presento la mayor cantidad de moléculas adsorbidas con el subsecuente abatimiento de la tensión superficial y a la velocidad a la que se lleva a cabo dicho proceso, se apliquen a sistemas como espumas y emulsiones profundizando en la formación y estabilización de dichos sistemas.

Glosario

Adhesión. Atracción molecular entre superficies de cuerpos distintos puestos en contacto.

Alifático. Compuesto orgánico acíclico con estructura molecular en cadena abierta.

Anfipática o anfifílico. Relativo a una molécula que posee dos extremos con características diferentes, como puede ser un detergente, que tiene un extremo polar (hidrofílico) y un extremo no polar (hidrofóbico), pero cuya longitud es suficiente como para que cada uno de los extremos manifieste sus propias características de solubilidad.

Coalescencia. Es la posibilidad de dos o más materiales de unirse en un único cuerpo. Las fuerzas o mecanismos se refieren tanto a las fuerzas creadas por las fuerzas intermoleculares, los enlaces químicos, así como mecanismos de anclaje mediante rugosidad, adsorción y difusión.

Cohesión. Fuerza que actúa entre las moléculas de un cuerpo y que hace que estas se mantengan unidas

Efecto hidrofóbico. Cuando la molécula en cuestión no es capaz de interactuar con las moléculas de agua ni por interacciones ión-dipolo ni mediante puentes de hidrógeno. Tal es el caso de los hidrocarburos saturados. En esta situación las moléculas de agua en la vecindad del hidrocarburo se orientan y se asocian formando una estructura parecida al hielo, creándose una especie de jaula de moléculas de agua alrededor de la molécula hidrofóbica. Esta estructura se conoce como clatrato.

Estérico. Es un impedimento descrito en la química orgánica causado por la influencia de un grupo funcional de una molécula en el curso de una reacción química. También se produce este efecto cuando un grupo sustituyente interactúa con átomos o grupos de átomos de la cadena en la que se incluye modificando alguna de sus características, como el punto de ebullición.

Error de paralaje. Es la desviación angular de la posición aparente de un objeto, dependiendo del punto de vista elegido. Se denomina así a la diferencia de posición de una línea, dependiendo del ángulo desde donde se le observa o traza.

Floculación. Es la aglomeración de partículas desestabilizadas en microflóculos y después en los flóculos más grandes que tienden a depositarse en el fondo de los recipientes construidos para este fin, denominados sedimentadores.

Hidrófobo. El término se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua, o que no se pueden mezclar con el agua.

Hidrófilo. Es el comportamiento de toda partícula (o molécula, más precisamente) que tiene afinidad por el agua. En una solución o coloide, las partículas hidrófilas tienden a acercarse y mantener contacto con el agua.

Hidrofobicidad. La magnitud de la interacción hidrófoba se suele expresar en términos de la energía libre de transferencia, ΔG_{tr} , de moléculas no polares desde los estados gaseoso, líquido o sólido a agua líquida.

Miscela. Al conjunto de moléculas que constituye una de las fases de los coloides. En disoluciones acuosas las moléculas anfifílicas forman micelas en las que los grupos polares están en la superficie y las partes apolares quedan inmersas en el interior de la micela en una disposición que elimina los contactos desfavorables entre el agua y las zonas hidrófobas y permite la solvatación de los grupos de las cadenas polares. En otro tipo de medios, las moléculas anfifílicas se pueden organizar como micelas inversas.

Monocapa. Son películas monomoleculares de sustancias de carácter anfifílico que se disponen en interfases. Es una sola capa de átomos o moléculas estrechamente empaquetados.

Sinéresis. Es la separación de las fases que componen una suspensión o mezcla. Es la extracción o expulsión de un líquido de un gel, por lo que el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos separados y contenidos en la fase líquida.

Bibliografía

Apenten, R., Khokhar, S. y Galani, D. (2002). Stability parameters of β -lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7. *Food Hydrocolloids*, 17, 469-479.

Ayres, G. (1997). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Harla, 1ª. Edición.

Badui S. (2006). *Química en alimentos*. Pearson Educación. México.

Beverung, C., Randke, C. y Blanch, H. (1999). Protein adsorption at the oil water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81, 59-80.

Camino, N. (2010). Comportamiento de hidroxipropilmetilcelulosas y sus mezclas con β -lactoglobulina en solución, interfases y emulsiones. Tesis Doctoral de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Caric, M. (2010). Davisco International. Disponible en: www.mundohelado.com

Castellan, G. W. (1998). *Fisicoquímica*. Addison-Wesley Longman, México.

Cheftel, J. C. (1989). *Proteínas alimentarias: Bioquímica, propiedades funcionales valor nutricional, modificaciones químicas*. Acribia, Zaragoza, España.

Cho, D . y Cornec, M. A. (1999). A Kinetic Study on the Adsorption of Compact, Water-Soluble Proteins onto Aqueous Surfaces, *BullKoreanChem.Soc.* 20(9): 999-1004.

Dairy Chemistry and Physics. Disponible en <http://www.cip.ukcentre.com/chem1.htm>

Damodaran, S. (1996). Functional Properties. En Nakai & Modler, *Food Proteins*, 167-234. Marcel Dekker, NY-USA.

Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsion and foams. *Journal of Food ciencia*.70 (3), 54-66.

Dalgleish, D. (1996). Food emulsions. En: J. Sjoblom, *Emulsions and emulsion stability* (pp.287-321). New York, USA: Marcel Dekker.

Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 197-210.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R. y Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cows milk. Fith revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631.

Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de tres proteínas adsorbidas en la interfase (líquido-líquido)

Euston, R., Al Amari Al-Bakkush y Campbell, L. (2009). Comparing the heat stability of soya protein and milk whey protein emulsions. *Food Hydrocolloids* 23, 2485-2492.

Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España.

Gunasekaran, S., Ko, S. y Xiao, L. (2006). Use of wey proteins for encapsulation and controlles delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83, 31-40.

Hall, G. (1996). *Basic concepts in Methods of testing protein functionality*. Blackie Academic & Professional, London, UK, capítulo, 1,1-10.

Harrington, W., von Hippel, P. (1961). Formation and stabilization of the collagen fold. *Arch, Biochemical, Biophys*, 92-100.

Israelachvili, J. (1991). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, San Diego.

Jaycock, M. (1981). *Chemistry of interfaces*. Oro Valley Library.USA.

Jirgensons, B. (1965). *Compendio de Química coloidal*. Compañía Editorial Continental.

Linde, G. (1994). *Bioquímica Agroindustrial*. Acribia S. A. México.

López, G. (1995). *Desarrollo y adaptación de programas de computo para fenómenos de transporte*. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Alimentos. FESC- Universidad Nacional Autónoma de México.

Lucassen-Reynders, E.H. (1993). Interfacial viscoelastic in emulsions and foams. *Food structure*, 12, 1-12.

Maldonado, J. (2006). *Caracterización interfacial de proteínas y tensoactivos: aplicación a dispersiones alimentarias*. Tesis de doctorado en Ciencias Físicas. Universidad de Granada

Malmsten, M. (2003). *Biopolymers at interfaces*. M. Dekker New York. USA.

McKenzie, H. A. (1971). B-lactoglobulin. In McKenzie [ed.], *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology*, 275-330. Academic Press, New York, USA.

Miñones, J. (2002). *La interfase aire/agua: Monocapas de Extensión*. Tesis Doctoral de la Real Academia de Farmacia Sección Galicia. Santiago de Compostela. España.

Morr, C. y Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Rev. in Food Science and Nutrition* 33: 431-476.

Mulvihill, D y Donovan, M. (1987). Whey proteins and their termal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.

Nelson, N. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^a ed. Wort. USA.

NMX-F-341-S-1979

NMX-F-065-1984

NOM -036-SSA1-1993

NOM-147-SSA1-1996

Phillips, L., Whitehead, D. y Kinsella, J. (1994). Functional properties of proteins. Structure function properties of food proteins. San Diego, California: Academic Press, Inc.

Salager, L. y Anton, R. (2005). Métodos de medición de la tensión superficial o interfacial. Venezuela.

Salunke, D., Rachie, K. y Dashiell, K. (1992). World oilseeds, Chemistry, Technology and Utilisation. AVI Publishers, New York.

Stryer, L. (1988). Bioquímica. Reverté.

Relkin, P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A Thermodynamic Approach. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 36, 565-601.

Ruis, H.G.M. (2007). Structure- rheology relations in sodium caseinate containing systems. Tesis Doctoral Wageningen University, Holanda.

Tadros, T. F., 2007. Colloid stability: the role of surface forces. Weinheim, Germany.

Tejera, R. (2008). Estabilidad y actividad interfacial de emulsions modelo con interés en alimentación funcional. Tesis Doctoral en Ciencias Físicas. Universidad de Granada.

Timasheff, S., Townend, R. y Mescanti, L. (1966). The optical rotator dispersions of the β -lactoglobulin. Journal of Biological Chemistry, 241, 1863-1870.

Toral, M. T., (1973). Fisicoquímica de superficies y sistemas dispersos. Urmo, Bilbao, España.

Trurnit, H. (1960). Colloid interface Science. 15, 1-13.

Vega, C. (2006). Sobre las propiedades emulsificantes de las caseínas. Mundo lácteo y Cárnico. info@mundolacteoycarnico.com.

Verheul, M., Pedersen, J., Roefs, S. y de Kruif, K. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. Biopolymers 49: 11-20.

Villalta, J. y Monferrer, A. (2001). Propiedades funcionales del lactosuero y sus proteínas primera parte. Barcelona.

Wade, L. (2004). Química Orgánica. Pearson Educación S.A. Madrid.

Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de tres proteínas adsorbidas en la interfase (líquido-líquido)

Wilde, P., Mackie, A. R., Husband, F., Gunning, P. y Morris, V. (2004) *Adv. Colloid Interface Science*. 108-109, 63-71.

Walstra. P., y De Roos L. (1993). Protein at air-water and oil-water interface: Static and dynamic aspect. *Food Reviews International*. 9(4): 503-525.

Anexos

Anexo 1

Para complementar el estudio, se adjunta el fundamento y cómo se emplea el tensiómetro de Du Noüy.

La tensión superficial (γ) se presenta en las interfases y se define como la energía necesaria para la expansión de la superficie por unidad de área y actúa como una fuerza perpendicular a la superficie del líquido que se dirige hacia el seno de este. La tensión superficial en una interfase líquido-gas, se debe a que las fuerzas de atracción intermoleculares que afectan a cada molécula son diferentes en el interior del líquido y en la superficie. Así, en el seno de un líquido a cada molécula está sometida a fuerzas de atracción que en promedio se anulan. Esto permite que la molécula tenga una energía bastante baja. Sin embargo, en la superficie hay una fuerza neta hacia el interior del líquido.

En la página treinta y uno se hizo mención de las características del dispositivo por lo que se explica de forma detallada el procedimiento del uso del equipo, haciendo hincapié que esto se hacía diario y por triplicado.

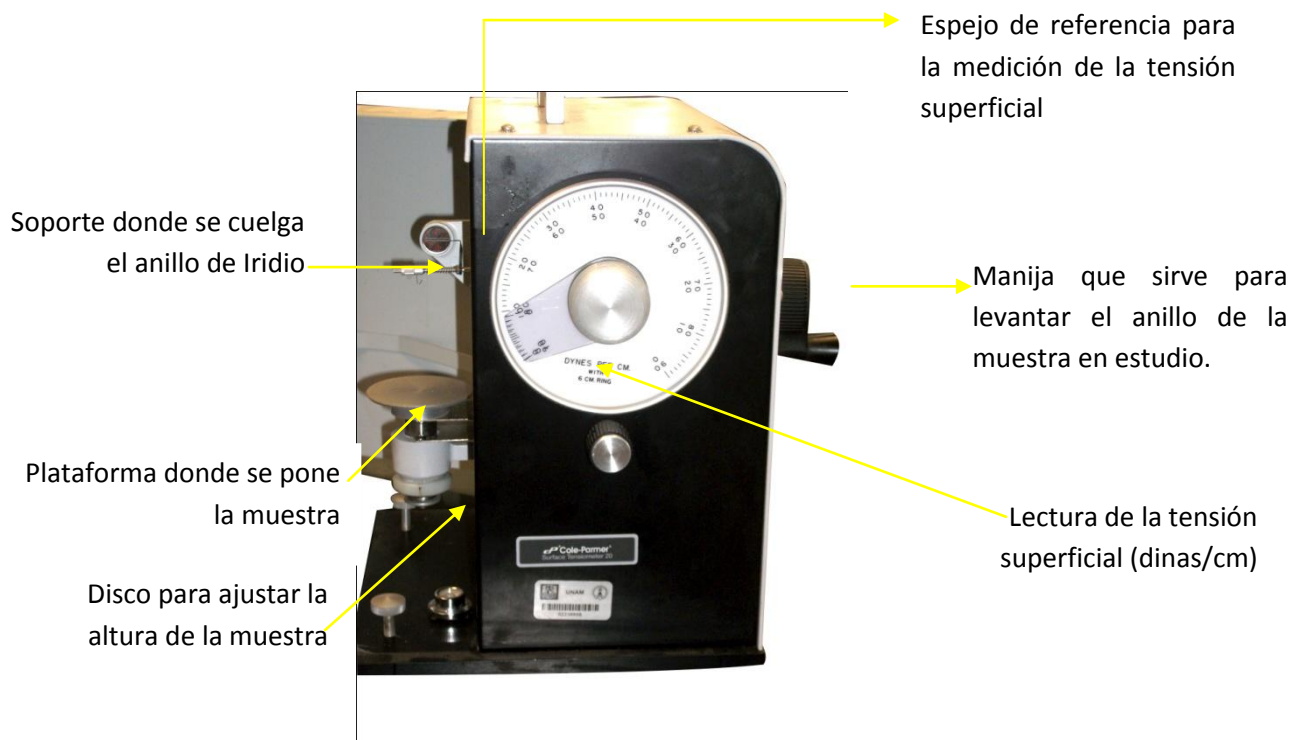


Figura 23. Tensiómetro de Du Noüy

Materiales y reactivos

Materiales

12 Cajas de petri

1 Piseta con agua desionizada facilitada por el laboratorio multidisciplinario de farmacia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

1 Termómetro

1 probeta de 50 ml

Reactivos

Agua desionizada

Acetona

Etanol

Procedimiento experimental

Manejo del tensiómetro

Poner Imagen

1. En una probeta de 50 ml se miden 45 ml de etanol y se toma lectura de la temperatura
2. Se vacía el líquido en estudio en una caja de petri y se coloca en la plataforma del dispositivo.
3. Con ayuda de un disco ajustable que se encuentra por debajo de la plataforma donde se coloca la muestra y con la manija con la que se manipula la aguja que indica la magnitud de la tensión superficial, dicha aguja debe estar localizada en el punto cero y no debe existir movimiento alguno, en caso de que haya alguna perturbación en el medio, esperar a que se mantenga fija como se mencionó en la página 42 se determino esperar diez minutos y se procedía a la medición y con la metodología que de igual forma se menciono en dicha página.
4. Una vez que la aguja se encuentre intacta, se comienza a manipular la manija y el disco que se encuentra debajo de la plataforma, manteniendo cuidado que esta aguja se mantenga en la línea negra que se encuentra en el espejo circular.
5. Hacer dicha operación hasta que el anillo se desprenda del líquido y tomar lectura.
6. Realizar cuantas veces sean necesarias hasta que los valores coincidan con los correspondientes a los líquidos de referencia, en caso contrario es necesario

calibrar el dispositivo por medio del ajuste del puñito que rige la tensión del alambre de torsión.

7. Realizar medidas estadísticas como desviación estándar y coeficientes de variación considerando como un 5 por ciento como límite estadístico donde los datos son confiables.

Anexo 2

Cálculos estequiométricos para la elaboración de los reactivos amortiguadores que se hicieron por medio de la ecuación de Henderson Hasselback (Ayres, 1977).

Las soluciones amortiguadoras son soluciones de ácidos, HA, o bases débiles con sales, NaA, de estos electrolitos, que tienen un ión común y poseen la propiedad de mantener el pH de las soluciones más o menos constantes a pesar de adiciones de cantidades pequeñas de ácidos o bases fuertes.

El equilibrio involucrado es el del ácido o la base débil, en donde la concentración del anión común A, proviene casi exclusivamente de la sal, NaA.



$$K_a = \frac{[H^+] * [HCO_3^-]}{[HA]} \quad (\text{Ec.45})$$

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \quad (\text{Ec.46})$$

$$K_a = \frac{[\text{ácido}]}{[\text{sal}]} \quad (\text{Ec.47})$$

K_a es un valor de una constante y, se conoce el pH de la solución sacando el logaritmo a la ecuación que esta igualada a [H] y quedando de la siguiente forma:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^+]}{[HA]} \quad (\text{Ec.48})$$

Elaboración de la solución amortiguadora con pH 9 con NH_3 (amoníaco)/ NH_4Cl (cloruro de amonio)

- Calcular y pesar los gramos de cada reactivo con grado analítico que se requieren para preparar un litro de disolución amortiguadora.

NH_3 29 % de pureza

$\rho_{NH_3} = 0.8192 \text{ g/mol}$

Trabajando estos reactivos con las siguientes concentraciones molares:

0.2 M NH₃

0.3 M NH₄Cl

Realizando las ecuaciones de disociación:



Entonces:

$K_a = 5.7E^{-10}$ (Referencia de química analítica)

$$K_b = \frac{K_w}{K_a} = \frac{1E^{-14}}{5.7E^{-10}} = 1.75E^{-5}$$

$$[NH_4^+] = 0.3$$

$$[NH_3] = 0.2$$

$$[H_3O^+] = \frac{(K_a)[NH_4^+]}{[NH_3]} = \frac{(5.7E^{-10})(0.3)}{(0.2)} = 8.55E^{-10}$$

$$[OH^-] = \frac{(1.0E^{-14})}{(8.55E^{-10})} = 1.17E^{-5}$$

$$pH = -\log 8.55E^{-10} = 9.07$$

Conociendo las concentraciones molares, se obtiene la cantidad de reactivo que se requiere para preparar un litro de solución amortiguadora de pH 9.

$$0.3 \text{ moles } NH_4Cl * \left(\frac{53.46 \text{ g } NH_4Cl}{1 \text{ mol } NH_4Cl} \right) * 1l = 16.038 \text{ g } NH_4Cl$$

$$0.2 \text{ moles } NH_3^+ * \left(\frac{25 \text{ g } NH_3}{100 \text{ g}} \right) * \left(\frac{17.09 \text{ g } NH_3}{1 \text{ mol } NH_3} \right) * \left(\frac{1 \text{ ml}}{0.8192 \text{ g } NH_3} \right) * 1l = 10.38 \text{ ml}$$

- Calcular y pesar las cantidades necesarias para preparar un litro de solución amortiguadora de pH 5 con los siguientes reactivos ácido acético (CH₃COOH) con acetato de sodio (CH₃COONa)

Preparar un litro de una solución 0.1 N de ácido acético, para lo cual se calcularon los mililitros de la solución concentrada.

$$\text{CH}_3\text{COOH} = 99.8 \%$$

$$\text{Densidad} = 1.05\text{g/mol}$$

$$\left(\frac{99.8\text{CH}_3\text{COOH}}{100\text{ml}}\right) * \left(\frac{1.05\text{g}}{1\text{ml}}\right) * \left(\frac{1000\text{ml} * 1\text{equi} - \text{gr}}{60\text{gCH}_3\text{COOH}}\right) = 17.5\text{N}$$

$$N_a = 17.5\text{N}$$

$$V_a * 17.5\text{N} = 1000\text{ml} * 0.1\text{N}$$

$$V_a = 6\text{ml}$$

Y por último se calculan los gramos de CH_3COONa que se deben añadir a un litro de CH_3COOH 0.1 M para la solución reguladora de pH 5.

$$K_a = 1.78\text{E}^{-5} \quad \text{H}^+ = 1\text{E}^{-5}$$

$$K_a = \text{H}^+ * \frac{C_a}{C_s}$$

$$C_s = \frac{1.78\text{E}^{-5}}{1\text{E}^{-5}} = 0.18\text{M}$$

$$0.18\text{M} * 1\text{l} = 0.18\text{mol}$$

$$0.18\text{mol} * \frac{82\text{g}}{1\text{mol}} = 14.76\text{gCH}_3\text{COONa}$$

Anexo 3

La calibración de los medidores de pH es un proceso en donde se caracteriza y verifica el electrodo de medición, y posteriormente se calibra el potenciómetro y sensor de temperatura mediante una comparación directa con un patrón de mayor jerarquía metrológica.

La calibración se define como el conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada y los correspondientes valores conocidos de una magnitud de medida (BIMP, 1993).

Mantenimiento

Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de tres proteínas adsorbidas en la interfase (líquido-líquido)

El electrodo es de vidrio que necesita ser inmune a las interferencias de color, turbidez, material coloidal. La lectura del pH no será confiable cuando este sucio con grasa o material orgánico insoluble en agua.

El electrodo tiene que ser enjuagado con agua desionizada, este no se seca con una franela, sólo se coloca en un papel para que se seque.

Es necesario que sea calibrado periódicamente para asegurar la precisión.

Precauciones

- El electrodo siempre tiene que estar húmedo.
- No guardarlos o dejarlos todo el tiempo en agua desionizada, ya que este disolvería a los iones con el bulbo de vidrio y el electrodo se volverá inútil.

Calibración

Para verificar la calibración es necesario tener soluciones amortiguadoras en el intervalo de pH 4, 7 y 10 y se registran en el potenciómetro los valores de potencial correspondientes en milivoltios a una temperatura ajustada a 20 °C.

Una vez verificado el buen funcionamiento, se conectan los electrodos de vidrio y de referencia, sumergiéndolo en una solución amortiguadora de pH 7 a temperatura de 20 °C con una precisión de ± 0.1 y se realiza la lectura en milivoltios. Posteriormente se introduce el electrodo en soluciones de referencia de pH 4, 7 y 10, realizando las lecturas correspondientes en milivoltios.