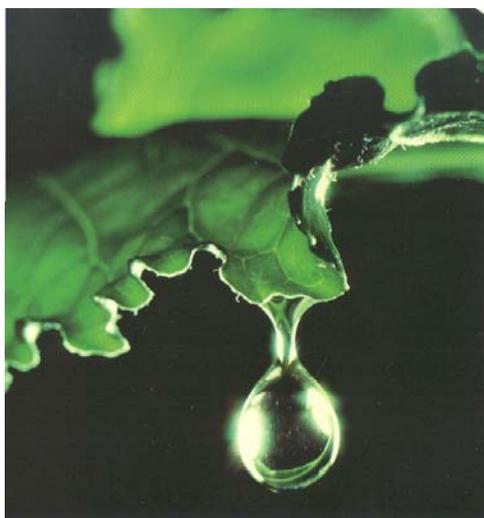


**CARACTERIZACIÓN
INTERFACIAL DE PROTEÍNAS
Y TENSIOACTIVOS:
APLICACIÓN A DISPERSIONES
ALIMENTARIAS**



Julia Maldonado Valderrama

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Granada, 2006



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Julia Maldonado Valderrama
D.L.: Gr. 1022 - 2006
ISBN: 84-338-3898-9

Trabajo presentado para aspirar al
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FÍSICAS
por

Julia Maldonado Valderrama

Licenciada en Ciencias Físicas

DIRECTORES

Dr. Miguel Cabrerizo Vílchez

Catedrático del Departamento de Física
Aplicada. Universidad de Granada

Dr. María José Gálvez Ruiz

Prof. Titular del Departamento de Física
Aplicada. Universidad de Granada

Dr. Antonio Martín Rodríguez

Prof. Titular del Departamento de Física
Aplicada. Universidad de Granada

Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Granada, 2006

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción	11
---------------------------------------	----

Capítulo 2: Conceptos fundamentales del comportamiento interfacial de proteínas y surfactantes

2.1 Introducción.....	21
2.2 Tensión interfacial.....	22
2.2 Monocapas de proteína.....	26
2.3 Adsorción interfacial.....	34
2.4 Módulo dilatacional.....	40
2.5 Películas líquidas.....	45
2.6 Emulsiones y espumas.....	52

Capítulo 3: Modelo termodinámico de surfactantes y proteínas en interfaces fluidas

3.1 Introducción.....	65
3.2 Teoría de adsorción de proteínas en interfaces fluidas..	66
3.3 Modelo de adsorción de sistemas mixtos proteína/surfactante en interfaces fluidas.....	84
3.4 Elasticidad de Gibbs de la capa de proteína adsorbida en interfaces fluidas.....	87
3.5 Dinámica de la adsorción de proteínas en interfaces fluidas.....	88
3.6 Resolución numérica de los modelos de adsorción en interfaces fluidas.....	89

Capítulo 4: Sección experimental

4.1. Introducción.....	101
4.1 Materiales.....	101
4.2 Técnicas experimentales.....	110

Capítulo 5: Comportamiento interfacial de proteínas en interfaces líquido-fluido, emulsiones y espumas

5.1 Introducción.....	135
5.2 Monocapas de β -caseína en interfaces líquido-fluido..	136
5.3 Adsorción de β -caseína en interfaces líquido-fluido....	149
5.4 Dinámica de la adsorción de β -caseína en la interfaz líquido-líquido.....	163
5.5 Reología dilatacional de β -caseína en interfaces líquido fluido.....	170
5.6 Formación y estabilidad de emulsiones y espumas de β -caseína.....	186
5.7 Resumen y conclusiones.....	199

Capítulo 6: Comportamiento superficial, películas líquidas y estabilidad de espumas de sistemas mixtos proteína/surfactante.

6.1 Introducción.....	205
6.2 Adsorción de sistemas mixtos proteína/surfactante en la interfaz aire-agua.....	207

6.3 Películas líquidas de surfactantes, proteínas y sistemas mixtos proteína/surfactante.....	223
6.4 Estabilidad de la espuma del sistema mixto proteína/surfactante.....	232
6.5 Resumen y conclusiones.....	244
Capítulo 7: Summary and conclusions	247
Apéndice I: Teoría de escalado de polímeros	265
Apéndice II: ADSA.....	273
Referencias y bibliografía.....	285

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación *Propiedades interfaciales de emulsionantes naturales* que se desarrolla en el grupo de *Física de Fluidos y Biocoloides* del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada. A su vez, constituye el núcleo de la investigación planteada en el proyecto de investigación AGL2001-3843-C02-02, *Propiedades funcionales de proteínas, polipéptidos y fosfolípidos. Aplicación a la mejora y optimización de dispersiones alimentarias y diseño de alimentos específicos*, del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias.

La formulación de nuevos productos alimentarios (alimentos con bajo contenido en grasas, alimentos instantáneos o semielaborados, alimentos infantiles o para dietas hospitalarias, bebidas espumosas con bajo contenido alcohólico o cremas con elevado contenido en etanol, etc.) o la optimización de los productos tradicionales, está condicionada al conocimiento de las características físico-químicas 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. Esto se debe a la naturaleza anfifílica¹ de estas moléculas que hace que se concentren en interfaces líquido fluido. En concreto, para el caso de una espuma, estas moléculas anfifílicas se sitúan en la superficie de las burbujas mientras que en el caso de una emulsión, éstas se emplazan en la superficie de las gotas de aceite en agua o gotas de agua en aceite. De esta forma, las proteínas y/o surfactantes

¹ Con una parte hidrófila y otra hidrófoba

en las interfaces, constituyen barreras moleculares que estabilizan estas dispersiones y favorecen su formación. Así pues, el estudio de la estructura y comportamiento de las proteínas y surfactantes en interfaces líquido fluido juega un papel esencial en la tecnología alimentaria.

A pesar del enorme incremento de estudios registrado en las últimas décadas sobre el comportamiento interfacial de proteínas y surfactantes con interés alimentario, la complejidad de los fenómenos que tienen lugar en este tipo de sistemas, hace que aún existan numerosas cuestiones sin resolver. En particular, la presencia de una interfaz oleosa complica significativamente el estudio, pues limita el acceso experimental a las magnitudes interfaciales características. Lo mismo ocurre en el caso de sistemas mixtos compuestos por proteínas y surfactantes de bajo peso molecular. En este caso, la interacción entre ambos tipos de moléculas multiplica el número de variables a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Precisamente, son estas dos situaciones son las de mayor interés hoy día en la tecnología de alimentos, pues la mayor parte de las dispersiones alimentarias contienen una fase oleosa y en general, en ellas coexisten surfactantes y proteínas. En consecuencia, la mayor parte de los trabajos son estudios fenomenológicos donde básicamente se describen los resultados obtenidos experimentalmente. Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado diferentes estudios teóricos encaminados a la descripción y predicción del comportamiento interfacial de moléculas anfifílicas. Dada la cantidad de variables puestas en juego, no resulta fácil poder llevar a cabo una comparación explícita teoría-experimento. Por tanto, la validez de aplicación de dichos tratamientos es un tema de gran actualidad y ciertamente prometedor en el control de variables accesibles.

De acuerdo con todo esto, el principal objetivo planteado en esta Tesis Doctoral consiste en la caracterización teórico-experimental de capas interfaciales compuestas de proteínas, surfactantes y de la mezcla de ambos, en dos tipos de interfaces fluidas. Más concretamente, se trata de las proteínas caseinato y β -caseína y del surfactante tween 20, en la interfaz aire-agua y en la interfaz tetradecano-agua. El caseinato constituye el 80% de las proteínas lácteas y está formado por varias fracciones, siendo la fracción mayoritaria la β -caseína. Por otro lado, el surfactante escogido es uno de los más utilizados y conocidos en la industria alimentaria.

Del trabajo realizado destaca, no sólo el interés de los sistemas escogidos por su aplicación sino las innovaciones planteadas en esta investigación. En primer lugar, para este estudio se ha puesto a punto una técnica nueva, una balanza superficial de gota pendiente, que previamente se diseñó y construyó en nuestro laboratorio [Cabrerizo-Vílchez 1999]. En segundo lugar, el estudio experimental comprende una gran variedad de técnicas en distintos laboratorios de investigación europeos, lo que ha permitido abordar el problema desde diferentes perspectivas. Además, uno de los mayores logros de esta Tesis Doctoral es el tratamiento teórico de los datos experimentales. Con este fin, se han desarrollado diferentes programas computacionales encaminados a la resolución numérica de las ecuaciones que describen el sistema en cada caso. Este punto presenta como principal novedad, el tratamiento de los resultados experimentales en la interfaz aceite-agua, lo cual no se había llevado a cabo explícitamente con anterioridad. Finalmente, la interrelación encontrada entre las propiedades interfaciales (microscópico) de los componentes y las características de las dispersiones que forman (macroscópico), no solo demuestra la importancia de la investigación

de física básica sino que presenta una aplicación tecnológica directa de gran interés.

De acuerdo con esto, esta memoria se estructura de la siguiente manera. En primer lugar, se realiza una revisión de los conceptos fundamentales acerca de las propiedades de proteínas y surfactantes en interfaces. Así pues, el capítulo 2 contiene la base sobre la que se estructura todo el resto del trabajo realizándose una descripción básica de todas las magnitudes y fenómenos que se utilizarán a lo largo del trabajo de investigación. El capítulo 3 se dedica a la descripción del modelo termodinámico utilizado en la caracterización interfacial de los sistemas evaluados. La última parte de este capítulo, contiene también la descripción de los programas elaborados para la resolución numérica del modelo. A continuación, se presentan todos los sistemas experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral. Así, el capítulo 4 contiene toda la información acerca de las proteínas, el surfactante y la fase oleosa, así como la descripción de todos los dispositivos experimentales utilizados en este trabajo.

Con respecto a la exposición de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral, estos se han estructurado en dos grandes bloques independientes. El primero contiene una completa caracterización interfacial de la proteína modelo β -caseína. En este sentido, se estudia la estructura de la proteína en dos interfaces fluidas: la interfaz aire-agua y la interfaz tetradecano-agua. Para ello se hace uso de varias técnicas experimentales así como de diversos formalismos teóricos. Las conclusiones derivadas de esta caracterización interfacial resultan fundamentales para evaluar las propiedades de la espuma y de la emulsión formada por esta misma proteína en la última parte de este primer bloque. El segundo bloque de resultados está dedicado al estudio del comportamiento superficial de los sistemas mixtos formados por β -caseína y caseinato y un tween

20. Para ello, también se hacen uso de varias técnicas experimentales y formalismos teóricos. Asimismo, los resultados de este análisis superficial resultan claves para la descripción de a espuma formada por estos sistemas mixtos.

El último capítulo de esta memoria contiene un resumen de las principales conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación. Este resumen se encuentra escrito en inglés y ha sido evaluado por tres investigadores de diferentes centros de la Unión Europea con objeto de poder optar a “la mención de Doctorado Europeo por la Universidad de Granada”.

2.1.- INTRODUCCIÓN

En este capítulo se introducen de manera resumida los elementos básicos para la comprensión del estudio del comportamiento interfacial de proteínas y surfactantes realizado a largo de esta Tesis Doctoral. La Figura 2.1 muestra un diagrama esquemático de la estructura de una espuma líquida, siendo la sucesión de estructuras mostrada, completamente análoga al caso de una emulsión. Este capítulo se ordena de forma que se van a describir cada una de las etapas que aparecen en esta figura desde lo microscópico a lo macroscópico. Así pues, en primer lugar se realiza una introducción al concepto de tensión interfacial, magnitud básica en la ciencia de interfaces. A continuación se describe la estructura general de una película monomolecular (o monocapa) así como el formalismo teórico de escalado usado en la interpretación de los datos experimentales. A continuación se expondrán las claves del proceso de adsorción de proteínas y surfactantes en interfaces líquido fluido junto a las características viscoelásticas de las películas adsorbidas. Una vez definidos estos conceptos, que se refieren a una sola interfaz, se procederá a la descripción de las películas líquidas; la región líquida que separa dos burbujas de aire en el caso de una espuma, o que separa dos gotas de aceite en el caso de una emulsión. Parece claro que la estabilidad de estas películas líquidas estará íntimamente relacionada con la estabilidad de la espuma (o emulsión) resultante. Finalmente, el último apartado de este capítulo tratará precisamente de describir las características generales de una espuma y de una emulsión en el marco de las propiedades definidas anteriormente.

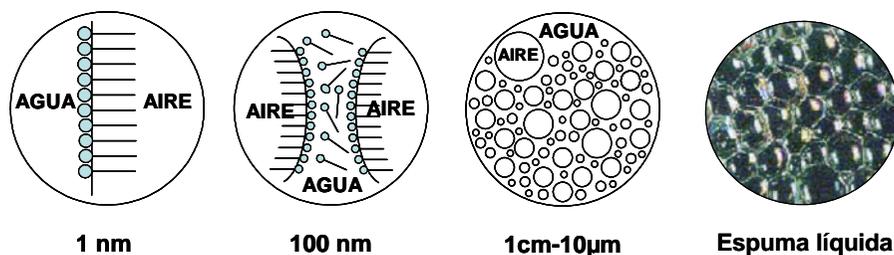


Figura 2.1: Estructura de una espuma líquida

2.2.- TENSIÓN INTERFACIAL

Imaginemos una molécula situada en el interior de un líquido, suficientemente alejada de la superficie libre del mismo como para que su esfera de acción molecular se encuentre completamente en el interior del líquido. Todas las moléculas contenidas en dicha esfera ejercerán fuerzas de atracción sobre ésta y, como consecuencia de la homogeneidad isótropa del líquido, la distribución de fuerzas también será isótropa y su resultante nula. Supongamos ahora que una molécula está situada muy cerca de la superficie libre del líquido, más cerca que la esfera de acción molecular; en estas condiciones, habrá más moléculas atrayéndola hacia el interior del líquido que hacia fuera del mismo. La distribución anisótropa de fuerzas de atracción intermoleculares sobre estas moléculas próximas a la superficie libre resulta en una fuerza neta sobre las mismas, dirigida hacia el interior del líquido y que será tanto más intensa, cuanto más cercana a la superficie libre se encuentre la molécula en cuestión (ver Figura 2.2).

De todo esto se deduce que para llevar una molécula desde el interior del líquido hasta la superficie libre, será necesario realizar un trabajo contra la fuerza resultante que actúa sobre la molécula cuando se aproxima hacia dicha superficie. Por consiguiente, las moléculas situadas en la superficie libre del líquido poseen mayor energía

potencial que las situadas en el interior del mismo. La energía potencial de todas las moléculas que constituyen la superficie libre de un líquido, debido a las fuerzas atractivas que sobre ellas ejercen las moléculas subyacentes, recibe el nombre de “energía superficial”. De acuerdo con las leyes de la mecánica, en situación de equilibrio la energía superficial tiende a tomar un valor mínimo, de modo que la superficie libre del líquido tenderá a presentar la menor extensión posible. El trabajo reversible necesario para aumentar el área de la superficie libre de un líquido, manteniendo constante la temperatura y el volumen es proporcional al área final y esa constante de proporcionalidad se denomina “tensión superficial” y se denota con la letra griega γ . Es decir:

$$dW = -\gamma dA \quad (2.1)$$

Este concepto coincide con la energía superficial mencionada, tratándose de una energía por unidad de área.

$$\gamma = \left(\frac{\partial U}{\partial A} \right)_{T,V,N} \quad (2.2)$$

Para el lector interesado, en la referencia [Rodríguez-Valverde, 2002] se puede encontrar una definición matemática de la tensión superficial.

Todo lo expuesto hasta el momento se refiere a una única fase en contacto con su vapor. Sin embargo, esta situación es generalizable al caso en el que dos líquidos que solamente son parcialmente inmiscibles uno en otro, se superponen. En este caso, se crea una superficie de separación a la que se denomina “interfaz líquido-líquido”. De manera completamente análoga a lo explicado para el caso de una superficie libre (gaseosa), la superposición de fuerzas netas en la interfaz líquido-líquido resulta en una “tensión interfacial”.

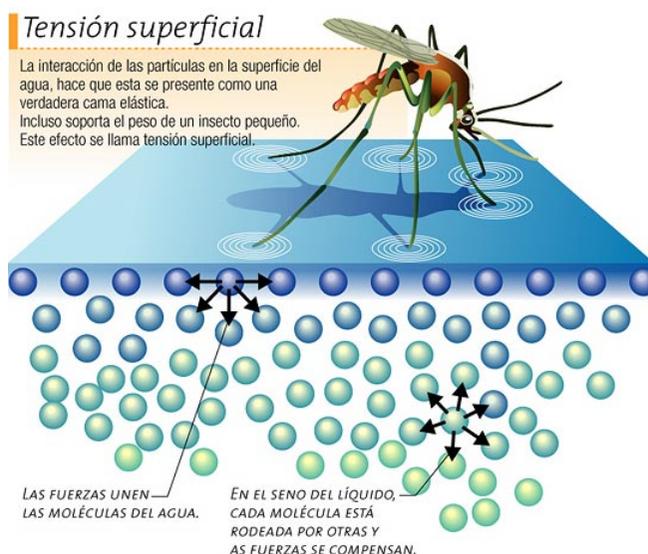


Figura 2.2: Origen molecular de la tensión superficial

La expresión más conocida de la tensión interfacial es la ecuación que relaciona de una forma sencilla las tensiones superficiales de los líquidos puros: $\gamma_{12} = \gamma_1 - \gamma_2$. El origen de esta relación proviene de un análisis simple de las tensiones en la frontera entre fases, teniendo en cuenta que γ_1 mide la atracción de las moléculas por el líquido 1, y γ_2 mide la atracción de las moléculas por el líquido 2, de manera que las moléculas en la interfaz son atraídas por las fases 1 y 2 con una atracción resultante dada por $\gamma_1 - \gamma_2$. Aunque en algunos casos dicha expresión proporciona una estimación razonablemente buena de la tensión interfacial, la evidencia experimental de la ecuación no está demostrada y por el contrario son numerosas las desviaciones de la misma [Kwok, 1995].

En una interfaz líquido-líquido entran en juego al menos tres tipos de fuerzas: fuerzas de interacción homomoleculares en cada uno de los líquidos y fuerzas de interacción heteromoleculares entre los dos líquidos. 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:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - W_{12} \quad (2.3)$$

donde γ_1, γ_2 son las tensiones de los líquidos puros y W_{12} es un término de trabajo que depende del grado de interacción heteromolecular en la interfaz entre las moléculas de tipo 1 y 2. En esta ecuación se observa cómo 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 [Kwok, 1995]; pero hasta ahora, no se ha encontrado una ecuación de estado sencilla entre las tensiones interfaciales de un sistema binario líquido-líquido [Israelachvili, 1991].

De aquí en adelante y a lo largo de todo el trabajo, se hablará de tensión interfacial de una interfaz líquido-fluido, como un concepto general que incluye como caso particular a la tensión superficial (interfaz líquido-aire). Asimismo, se hablará indistintamente de tensión interfacial o de presión interfacial, siendo esta última:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.4)$$

donde γ_0 es la tensión interfacial de las fases puras. Es decir, la tensión superficial de un líquido en equilibrio con su vapor (interfaz líquido-aire) o la tensión interfacial de un líquido en contacto con agua (en un sistema líquido-líquido).

2.3.- MONOCAPAS DE PROTEÍNAS EN INTERFACES LÍQUIDO-FLUIDO

Este apartado se centra en el estudio de las monocapas de proteínas. Para ello se va a describir en primer lugar el concepto de monocapa de molécula anfifílica, y las diferencias estructurales básicas que existen entre las monocapas de proteínas y las monocapas de surfactantes de bajo peso molecular. A continuación se expone brevemente el formalismo teórico que se ha utilizado para extraer la información estructural de los resultados experimentales de monocapas de proteínas. Veamos cada una de estas partes separadamente.

2.3.1 Monocapas de proteínas y surfactantes de bajo peso molecular

Las monocapas son películas monomoleculares de sustancias de carácter anfifílico que se disponen en interfaces. Pese a que en esta Tesis Doctoral únicamente se van a estudiar monocapas de proteínas, con el fin de facilitar la comprensión de los datos experimentales, a continuación se exponen brevemente las claves de las monocapas de surfactantes de bajo peso molecular.

La técnica general de obtención de una monocapa consiste en depositar una cantidad conocida de surfactante sobre una superficie libre. Debido a la naturaleza anfifílica del surfactante, este se quedará en la interfaz formando lo que se denomina una monocapa, como se observa en la Figura 2.3. Una vez hecho esto, se trata de comprimir lentamente la superficie de manera que la concentración superficial aumenta paulatinamente. La ocupación de un área superficial, se traduce en una disminución de la tensión superficial del sistema, que

es mayor cuanto mayor es la concentración de moléculas en la superficie. La Figura 2.4 muestra una isoterma de presión interfacial-área molecular de una monocapa típica. Se observa como la monocapa atraviesa varias regiones estructurales conforme varía la concentración interfacial y esto se refleja en un cambio de la tensión interfacial. Así pues, a partir de estas curvas, denominadas isothermas π - A , se obtiene información acerca de la estructura adoptada por los surfactantes en la interfaz, así como de las interacciones entre moléculas y entre surfactante e interfaz [Gaines 1966; Sánchez, 1999].

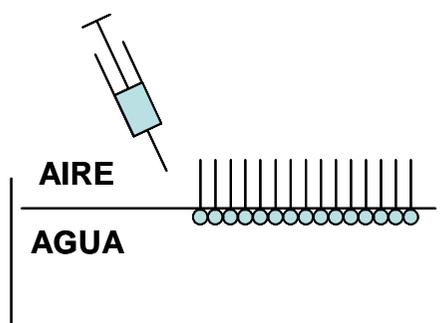


Figura 2.3: Formación de una monocapa de surfactante en la interfaz aire-agua

Las monocapas de proteína 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]. Las proteínas son moléculas muy complejas compuestas de secuencias de aminoácidos de naturaleza polar y no-polar. 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. Una vez que una proteína está desnaturalizada, deja de ser soluble en la fase acuosa y permanece anclada en la superficie. El “Método de Trurnit” consiste precisamente en desnaturalizar la proteína antes de depositarla en la superficie. La técnica de obtención de monocapas de proteínas ha sido puesta a punto a lo largo de esta Tesis Doctoral y constituye una importante novedad [Maldonado-Valderrama, 2003; Maldonado-Valderrama, 2004a]. En el Capítulo 4 se explica en detalle la técnica experimental utilizada para la obtención de monocapas de proteínas en este trabajo.

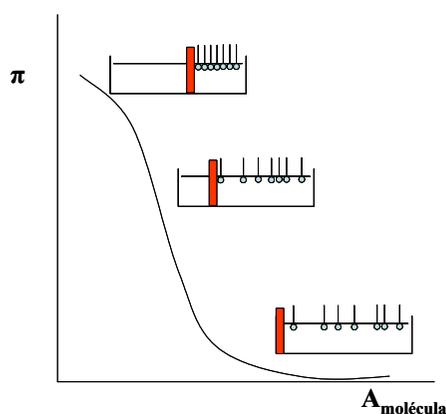


Figura 2.4: Compresión de una monocapa de surfactante

El análisis estructural de las monocapas a partir de las isothermas π - A , que se obtienen tras la compresión de la misma, es bastante más complejo que el de los surfactantes. Para obtener información de la estructura adoptada por la proteína en una monocapa, en este trabajo se ha hecho uso de la Teoría de Escalado. En el apéndice I se exponen algunos conceptos de la teoría general de polímeros y a continuación el caso particular de monocapas de proteína.

2.3.2 Teoría de Escalado de polímeros

Las proteínas son polímeros y por tanto comparten muchas de sus propiedades con estos sistemas. En particular, un heteropolímero, es decir, un polímero compuesto de secuencias alternas hidrófilas e hidrófobas constituye un sistema modelo de las propiedades interfaciales de una proteína [Douillard, 2003]. En un modelo teórico desarrollado por Leclerc y col., la estructura y las propiedades de una proteína adsorbida en una interfaz se modelan haciendo uso de la teoría de escalado de polímeros [Leclerc, 1997; Aguié-Béghin, 1999]. Recientemente, Douillard y col. muestran las ventajas de utilizar argumentos de escalado en el análisis del comportamiento interfacial de varias proteínas modelo [Douillard, 2003].

El modelo teórico, basado en teorías de multibloque, se encuentra descrito en detalle en la referencia [Leclerc, 1997]. Este modelo es posteriormente adaptado al caso particular de proteínas en interfaces fluidas por Aguié-Béghin y col. [Aguié-Béghin, 2003] y este último formalismo ha sido aplicado al estudio de monocapas de proteínas en numerosos trabajos y en condiciones experimentales muy variadas en [Hambardzumyan, 2003; Hambardzumyan, 2004; Douillard, 2003]. Así pues a continuación se resumen brevemente las claves del modelo teórico.

En este modelo teórico se supone en primer lugar que una cadena de polímero está compuesta de N dibloques de dos secuencias A y B, compuestas a su vez de Z_A y Z_B monómeros respectivamente. Los monómeros de las secuencias A y B son de diferente naturaleza química, siendo A de naturaleza hidrófoba y B de naturaleza hidrófila. La estructura química del polímero viene entonces representada por la relación: Z_A/Z_B . Paralelamente, supongamos una interfaz entre dos

disolventes insolubles 1 y 2. Estos dos disolventes se comportan de diferente manera para cada una de las secuencias A y B, es decir son buenos disolventes para uno y otro, respectivamente. Así pues, cada uno de los dibloques se dispone preferentemente de manera que queda en contacto con su buen disolvente y esta es la razón por la cual el copolímero tiende a situarse en la interfaz (ver Figura 2.5).

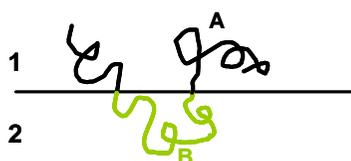


Figura 2.5: Si la especificidad de los disolventes es suficientemente alta, los puntos de unión de entre las secuencias se localizan en la interfaz.

En este punto se puede distinguir en el modelo entre interfaz líquido-aire y líquido-líquido. Cuando el dibloque se encuentra en un estado isotrópico, los centros de masa de cada una de las secuencias coinciden con el centro de masa de la cadena de polímero. Ahora bien, debido a las diferentes solvencias de las dos fases, una vez que el polímero se adsorbe, esta condición deja de cumplirse y los centros de masa de cada una de las secuencias se localizan a ambos lados de la interfaz. Sin embargo, debido a la naturaleza polimérica, una fuerza de naturaleza entrópica tiende a acercarlos mutuamente, puesto que al disminuir la distancia extremo-extremo aumenta el número de conformaciones. Así pues, la localización en la interfaz depende del número de secuencias de la cadena N , del número de monómeros y de lo alta que sea la especificidad de los disolventes (Figura 2.5). Teniendo esto en cuenta, en la interfaz líquido-aire, se considera que el líquido es buen disolvente para la secuencia B mientras que el aire no es buen disolvente para ninguna de las secuencias. Por ello, en este caso se supone que ninguno de los bloques cruzan la interfaz sino que quedan anclados en esta. Por el contrario, en el caso de una interfaz

líquido-líquido, cada una de las secuencias se disuelve mejor en cada una de las fases y por tanto el copolímero se encuentra en una interfaz penetrable.

Una vez adsorbido en la interfaz, el copolímero adopta una configuración bidimensional que varía con la concentración interfacial así como con la naturaleza de las fases adyacentes. Así, al aumentar la concentración interfacial, los polímeros comienzan a superponerse. Conforme aumenta la concentración interfacial, la interfaz atraviesa diferentes regímenes cuyas propiedades vienen determinadas por la concentración interfacial y la naturaleza de ambos disolventes.

El modelo termodinámico, proporciona una descripción de la variación de la presión interfacial con el recubrimiento interfacial dada por [Leclerc, 1997; Anguié-Beghin, 1999].

$$\pi = k_B T \Gamma^\gamma \quad (2.5)$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, Γ es la concentración superficial del polímero definida por $\Gamma = m/A$, donde m es la masa total del polímero adsorbido en la interfaz y A el área total de la misma. En la relación (2.5) aparece el parámetro γ . Este exponente constituye el parámetro clave del modelo y se obtiene directamente de las isotermas experimentales π - A . Además el parámetro γ , también puede ser obtenido mediante la siguiente relación:

$$\varepsilon = \gamma \pi \quad (2.6)$$

donde ε es la “elasticidad límite de Gibbs” que será definida más adelante en el capítulo.

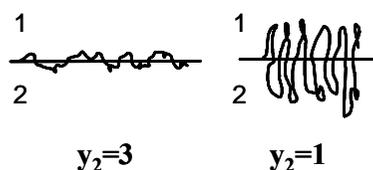


Figura 2.6: Formación de bloques bidimensionales o tridimensionales en la interfaz

El parámetro y proviene de consideraciones de escalado y su origen se encuentra detallado en el Apéndice I. Este parámetro proporciona información acerca de la estructura del polímero en la interfaz y será muy dependiente de la concentración interfacial y de la naturaleza de la interfaz [Leclerc, 1997; Aguié-Béghin, 1999]. El modelo afirma que la interfaz experimenta regímenes estructurales diferentes conforme aumenta la concentración interfacial de polímero denominados “régimen diluido” y “régimen semidiluido” para baja o alta concentración interfacial, respectivamente. En el régimen diluido, si la repulsión entre disolventes no es muy alta, el polímero no se sentiría lo suficientemente atraído por la interfaz. Si la repulsión es intermedia el polímero forma estructuras independientes tridimensionales y si es muy alta, se dispone formando estructuras bidimensionales independientes [Douillard, 1999]. Conforme aumenta la concentración interfacial, las estructuras formadas comienzan a interactuar y la interfaz entra en sucesivos regímenes semidiluidos. Para una concentración interfacial fija, la estructura del polímero depende de la interacción polímero-polímero, de la interacción polímero-interfaz y de la repulsión entre disolventes. Las isothermas π - A contienen la información acerca de dos regímenes semidiluidos en el caso de las proteínas de manera que el parámetro y se obtiene de las isothermas π - A experimentales. La información estructural de la interfaz se obtiene de menor a mayor concentración interfacial de acuerdo con las siguientes premisas. El primer régimen semidiluido significativo de las monocapas de proteínas se caracteriza por un

exponente denominado y_2 . En función de la repulsión entre disolventes, el régimen se corresponde con la superposición de bloques bidimensionales o tridimensionales que se definen por el valor numérico de y obtenido para la curva. Así, si $y_2=1$, entonces se trata de superposición de bloques tridimensionales. Por el contrario, un valor de $y_2 \geq 3$ sería indicativo de la superposición de bloques bidimensionales en la interfaz (ver Figura 2.6). Además, en este caso el valor numérico de y_2 es indicativo de la compacidad neta de la molécula, siendo ésta más compacta cuando menor es el valor del exponente [Douillard, 2003]. El segundo régimen semidiluido que se detecta con este formalismo teórico en la interfaz viene dado por un cambio en la pendiente de la isoterma conforme aumenta la concentración interfacial y se denomina y_3 . Siguiendo consideraciones similares al régimen anterior, el valor numérico de y_3 proporciona información estructural de la monocapa. Así un valor de $y_3=0$ indica la formación de un cuasi-gel en la interfaz, un valor de $y_3=1$ indica la formación de un cuasi-cepillo¹ en la interfaz y finalmente un valor de $y_3 \geq 3$ indicaría una superposición de bloques bidimensionales análoga a la encontrada en el régimen anterior.

La aplicación de este formalismo de escalado a los resultados experimentales de monocapas de proteína en la interfaz aire-agua y en interfaces aceite-agua, proporciona una importante información acerca de la estructura interfacial adoptada por la proteína. En particular, los resultados así obtenidos en la interfaz aceite-agua suponen una contribución original y constituyen uno de los avances conseguidos en esta Tesis Doctoral [Maldonado-Valderrama, 2005c].

¹ Del inglés *cuasi-brush*

2.4.- ADSORCIÓN EN INTERFACES LÍQUIDO-FLUIDO

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 ($72.5-73 \text{ mJ/m}^2$ 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 interfacial de la disolución [MacRitchie, 1990]. 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 evolución de la tensión interfacial del sistema a lo largo del proceso de adsorción proporciona información estructural de la película interfacial formada. Veamos separadamente las claves del proceso de adsorción de proteínas y surfactantes en interfaces líquido-fluido.

2.4.1 Dinámica del proceso de adsorción en interfaces líquido-fluido: $\gamma(t)$

Con respecto al proceso de adsorción de las proteínas, éste difiere en varios aspectos del proceso de adsorción de surfactantes de bajo peso molecular. 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 denomina “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. Pero veamos con detalle cada una de las etapas que caracterizan el proceso de adsorción de proteínas en interfaces líquido-fluido. La Figura 2.7 muestra las etapas del proceso de adsorción en términos de la disminución de la tensión interfacial de la disolución. En esta figura se distinguen tres regiones: Periodo de inducción (a), periodo de penetración (b-c) y periodo de saturación (c-d). Veamos brevemente las características de cada uno de ellos.

i) *Periodo 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% de recubrimiento interfacial [Miller, 2000]. El tiempo necesario para alcanzar este grado de recubrimiento interfacial es lo que se denomina *periodo de inducción* y es característico del proceso de adsorción de proteínas en interfaces líquido-fluido. Su existencia se puede explicar debido a la pequeña contribución de la entropía de la capa interfacial a la presión interfacial [Miller, 2000]. En el capítulo siguiente se verá como la contribución de la entropía de mezcla a la presión interfacial viene determinada por un factor RT/ω , donde ω es el área molar media que ocupa la proteína en la interfaz. Debido al mayor tamaño de las proteínas con respecto al de los surfactantes, este factor es varios órdenes de magnitud menor para las proteínas que el

correspondiente a surfactantes simples. Este hecho hace que en el proceso de adsorción de estos últimos, no aparezca un periodo de inducción sino que la tensión interfacial disminuye en cuanto una molécula llega a la interfaz. Así pues, la existencia de este periodo es un rasgo característico de las disoluciones de proteína, siendo tanto mayor cuanto menor sea la concentración de proteína en el seno de la disolución. Sobre la existencia de este periodo en la adsorción de proteínas en la interfaz aceite-agua, existe en la bibliografía una cierta ambigüedad. Los resultados presentados en este trabajo, así como los de otros autores, corroboran el hecho de que el periodo de inducción, aunque presente ciertas peculiaridades en la interfaz aceite-agua, es una característica de la adsorción de proteínas independiente de la interfaz [Segumpta 1999, Beverung 1999, Miller 2000].

ii) *Periodo 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; Beverung, 1999; Miller, 2000].

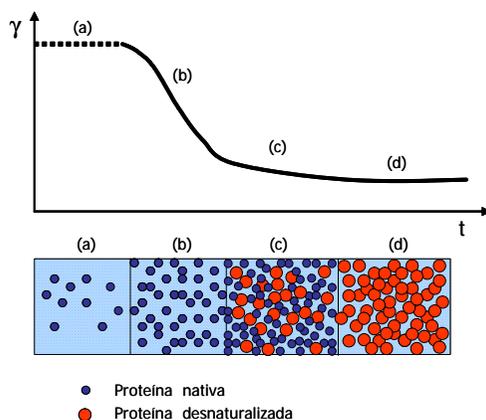


Figura 2.7: Etapas del proceso de adsorción dinámica de proteínas en interfaces líquido-fluido [Wege, 2002].

iii) *Periodo de saturación de la interfaz.* 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 tiempos suficientemente largos de una gelificación interfacial [Beverung, 1999; Freer, 2004]. 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 este fenómeno y la pequeña disminución de la tensión interfacial se debe a la aparición de los tres procesos citados

anteriormente [Beverung, 1999]. Es más, esta última fase de disminución lenta de la tensión interfacial continúa durante semanas.

2.4.2 Equilibrio de adsorción en interfaces líquido-fluido: $\gamma(c)$

Hasta ahora, se ha analizado el proceso dinámico de adsorción, por ello se ha evaluado la evolución temporal de la tensión interfacial. Ahora bien, en general, el proceso de adsorción de moléculas anfífilas se estudia más bien, en términos de la isoterma de tensión interfacial $\pi(c)$. Esta curva proporciona la relación entre la concentración inicial de surfactante (o proteína) en el medio y la tensión interfacial final dada por dicha disolución. La Figura 2.8 muestra las regiones estructurales que se distinguen a lo largo de un proceso de adsorción de un surfactante de bajo peso molecular en términos de la tensión superficial de la disolución en equilibrio.

Una vez que se crea la interfaz, las moléculas de surfactante se dirigen rápidamente a la interfaz por difusión reduciendo la tensión interfacial. En la región de bajas concentraciones, las moléculas de surfactante se sitúan preferentemente en la capa interfacial y se alcanza un equilibrio difusivo entre moléculas en el seno de la disolución y en la interfaz. Conforme aumenta la concentración de surfactante en el seno de la disolución, la tensión interfacial final del sistema disminuye a la vez que se va saturando la interfaz. Gradualmente, la tensión interfacial sigue disminuyendo conforme aumenta la concentración de surfactante hasta que la interfaz se satura por completo debido a la formación de una *monocapa* de surfactante en la superficie. A partir de este punto, la tensión interfacial del sistema prácticamente no varía y el exceso de surfactante se autoorganiza en el seno de la disolución formando micelas. Una micela es una asociación de moléculas de surfactante en disolución

que se forma espontáneamente de manera que las cabezas hidrófilas quedan en contacto con el agua y las colas hidrófobas quedan recluidas en el interior de una entidad esférica. Las micelas se forman a partir de una concentración de surfactante en la disolución, denominada concentración micelar crítica (*cmc*) cuyo valor se puede determinar de manera inmediata a partir de las curvas de $\gamma(c)$ como se observa en la Figura 2.8.

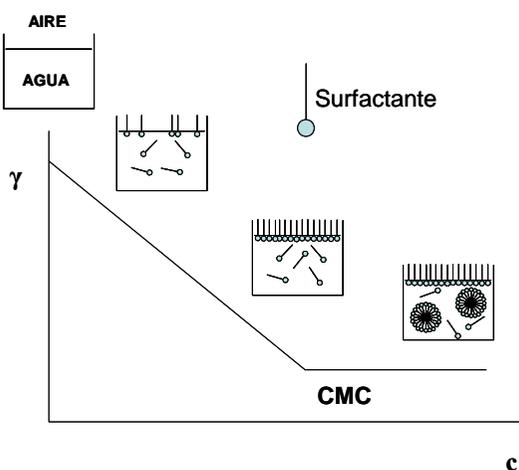


Figura 2.8: Regiones estructurales en el proceso de adsorción en equilibrio de un surfactante: determinación de la concentración micelar crítica.

En el caso de la adsorción de proteínas, debido a su complejidad estructural y a la multitud de fenómenos que tienen lugar en la capa interfacial, la interpretación de la isoterma de presión superficial es más compleja. En este sentido, para obtener información cuantitativa de la estructura interfacial es necesaria la aplicación de un modelo teórico a los datos experimentales. En el capítulo siguiente se presenta el modelo teórico que se ha utilizado en este trabajo para la interpretación de los datos experimentales obtenidos. La aplicación del modelo proporciona información cuantitativa del cambio estructural experimentado por las proteínas durante el proceso de

adsorción así como de los procesos que tiene lugar en la capa interfacial.

2.5.-MÓDULO DILATAACIONAL

En la mayoría de los casos, las aplicaciones tecnológicas que presentan las moléculas anfifílicas no se pueden explicar exclusivamente en términos de los valores de equilibrio de la tensión interfacial. En casos como la formación de espumas o emulsiones, por ejemplo, la capacidad de respuesta de la interfaz a una perturbación o la manera en la que se alcanza un nuevo estado de equilibrio son en general, más importantes que el estado de equilibrio mismo.

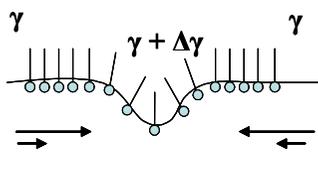


Figura 2.9: Respuesta de una interfaz a una perturbación. Las flechas indican la dirección del líquido interfacial y del seno de la disolución.

La respuesta de una interfaz a una perturbación de su estado de equilibrio se puede describir de manera esquemática en la Figura 2.9. En ésta se observa como un incremento del área interfacial tiende a producir una zona en la que la densidad interfacial es menor y por ello, la tensión interfacial también aumenta localmente ($\Delta\gamma > 0$). Las áreas de alta tensión interfacial tienden a contraerse a expensas de las áreas de menor tensión interfacial con el fin de reducir la energía interfacial de exceso del sistema. Por tanto, el gradiente de tensión interfacial produce movimiento de la interfaz hacia la región de alta tensión interfacial. Para ello, la interfaz y el seno de la disolución se mueven para contrarrestar la perturbación. En general, los efectos

mecánicos producidos por un gradiente de tensión interfacial en una interfaz reciben el nombre de “Efectos de Marangoni”. El primer paso hacia la interpretación cuantitativa de estos fenómenos lo constituye la definición de Gibbs de la elasticidad superficial como el cambio en la tensión superficial por unidad de cambio relativo de área interfacial:

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (2.7)$$

Gibbs definió este parámetro inicialmente para la superficie de un líquido estabilizado por una película de jabón, pero ha resultado ser adecuado para expresar gradientes de tensión interfacial en cualquier interfaz líquido-fluido [Lucassen-Reynders, 1981]. Este parámetro ε se denomina “elasticidad de *Gibbs*” o “elasticidad límite de *Gibbs*”. El término “módulo dilatacional interfacial” se utiliza para el caso más general en el cual la interfaz tiene un comportamiento viscoso además de elástico ante una deformación. La componente viscosa refleja la existencia de procesos de relajación en, o cerca de, la interfaz. Así, el módulo ε es una medida de la resistencia que opone una interfaz a la creación de regiones de alta tensión interfacial y de la velocidad a la que los gradientes de tensión interfacial desaparecen una vez que cesa la perturbación sobre la interfaz [Lucassen-Reynders, 1981].

En un caso general en el que se somete a una interfaz a una perturbación pequeña de área ΔA , la respuesta en tensión interfacial originada, $\Delta\gamma$, se puede escribir como la suma de la contribución elástica y viscosa:

$$\Delta\gamma = \varepsilon_d \Delta \ln A + \eta_d \frac{d\Delta \ln A}{dt} \quad (2.8)$$

Si la deformación es suficientemente pequeña y lenta, los coeficientes ε_d y η_d serán constantes. En este caso, comparando las ecuaciones

(2.7) y (2.8) se obtiene la expresión general del operador matemático, módulo dilatacional:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + \eta_d \frac{d}{dt} \quad (2.9)$$

Esta condición se consigue usualmente en experimentos en los que se imponen oscilaciones de tensión y densidad interfacial al sistema alrededor de sus valores en condiciones de equilibrio. En estos experimentos, la amplitud y la velocidad de la oscilación pueden ser controladas fácilmente. Así pues, en un experimento oscilatorio, el operador d/dt operaría sobre un desplazamiento interfacial dado por una función de onda:

$$\Delta \ln A \propto \exp(ift) \quad (2.10)$$

donde, f es la frecuencia de la oscilación². El módulo dilatacional interfacial para el caso de oscilaciones periódicas es una magnitud compleja dada por la siguiente expresión:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + if\eta_d \quad (2.11)$$

En esta expresión, la parte real, también llamada módulo de almacenamiento, coincide con la elasticidad interfacial dilatacional mientras que la parte imaginaria, que también se denomina módulo de pérdidas, es proporcional a la viscosidad interfacial dilatacional. El carácter complejo de esta magnitud, se refleja experimentalmente en una diferencia de fase que aparece entre el cambio en tensión interfacial, $\Delta\gamma$, y el cambio en área interfacial, ΔA , dada por φ , de tal forma que los componentes elástico y viscoso del módulo dilatacional, se pueden expresar también en función de este desfase:

² Se denotará con f a la frecuencia angular de la oscilación para evitar la confusión con ω que denota al área molar media de la proteína en la interfaz.

$$\begin{aligned}\varepsilon_d &= |\varepsilon| \cos \varphi \\ \eta_d &= \frac{|\varepsilon|}{f} \sin \varphi\end{aligned}\tag{2.12}$$

Existen en la bibliografía multitud de dispositivos experimentales que permiten medir el módulo dilatacional interfacial de capas de proteínas ó surfactantes adsorbidas en interfaces líquido-fluido. En función de las características del dispositivo, la frecuencia de ondulación puede variar en varios órdenes de magnitud. Las referencias [Lucassen-Reynders, 1981; Benjamins, 2001] contienen una detallada descripción de varias de estas técnicas junto a sus intervalos de aplicación.

El módulo dilatacional interfacial contiene una importante información estructural acerca de la capa interfacial de moléculas adsorbidas. Sin embargo, debido a la multitud de fenómenos que afectan a esta magnitud, la correcta interpretación de las curvas experimentales es muy compleja y por ello resulta muy complicado extraer esta información de los resultados experimentales [Freer, 2003; Benjamins, 2001]. Cada uno de los parámetros dilatacionales contiene información diferenciada, por ello una manera de facilitar la interpretación de los datos experimentales es evaluar cada uno de los parámetros dilatacionales separadamente. Por un lado, la elasticidad interfacial contiene la información acerca de la resistencia que opone la capa interfacial a la deformación. Así pues, cuando se encuentra un máximo en la elasticidad interfacial, éste se identifica con la aparición de un cambio estructural de la capa adsorbida que a partir de este máximo, la elasticidad interfacial disminuye de acuerdo con la deformación producida. Por el contrario, la detección de un componente viscoso en la capa interfacial indica que en ella tienen lugar procesos de relajación como son el intercambio difusivo de

moléculas en la capa interfacial con moléculas en el seno de la disolución, y en el caso de películas formadas por macromoléculas, reorganización estructural molecular en la capa interfacial o fenómenos de colapso [Williams, 1996; Benjamins, 1998; Benjamins, 2001].

Existen dos casos límite, accesibles experimentalmente y que facilitan la interpretación de los resultados en los que la película interfacial tiene un comportamiento dilatacional puramente elástico [Lucasse-Reynders, 1981]:

i) *Monocapa insoluble*. En el caso de una monocapa insoluble, se supone que no existe intercambio difusivo entre la capa interfacial y el seno de la disolución. Además, en este caso, la oscilación se realiza lo suficientemente lenta, de forma que la escala temporal en la que tiene lugar cualquier proceso de relajación en la interfaz es mucho menor que el periodo de la oscilación. Así, la capa interfacial cumple que $\Gamma \cdot A \approx \text{cte}$ y la interfaz se encuentra siempre en condiciones de equilibrio pues se adapta de manera inmediata a la deformación. En este caso, la elasticidad interfacial toma un valor límite dado por:

$$\varepsilon_0 = \left(\frac{-d\gamma}{d \ln \Gamma} \right)_{eq} \quad (2.13)$$

ii) *Capa adsorbida puramente elástica*. En este caso sí que puede existir un intercambio difusivo de moléculas entre la capa interfacial adsorbida y las moléculas en el seno de la disolución al producirse la deformación de la interfaz. Una manera de evitar que se produzca este intercambio es realizar la perturbación lo suficientemente rápida como para que la interfaz no tenga tiempo de responder a la perturbación impuesta. Por ello, en este caso límite, no hay tiempo de que se produzcan procesos de relajación en la interfaz y la viscosidad superficial que presenta el sistema en estas condiciones

es despreciable. Así, la capa interfacial adsorbida se comporta una vez más como insoluble y la elasticidad interfacial se puede relacionar con las propiedades en equilibrio de la capa interfacial haciendo uso de la ecuación (2.13).

Las propiedades dilatacionales de las películas adsorbidas de proteínas o de surfactantes de bajo peso molecular son muy diferentes. En términos generales, los surfactantes difunden rápidamente a la interfaz y forman películas, denominadas móviles, en las que una interfaz libre es rápidamente ocupada por una molécula de surfactante. Por el contrario, las proteínas son moléculas grandes, que difunden lentamente y que forman películas interfaciales, denominadas inmóviles, pero muy resistentes debido a la gran interacción intermolecular existente entre las proteínas adsorbidas en la capa interfacial [Wilde, 2000]. Por ello, la interpretación de las curvas experimentales de los parámetros dilatacionales de las películas de proteína adsorbida en interfaces líquido-fluido es más compleja que la de los surfactantes. Una vez más, en este trabajo, se ha hecho uso de un modelo teórico, que se detalla en el capítulo siguiente, para la interpretación de las curvas experimentales de propiedades dilatacionales de capas de proteína adsorbida en interfaces líquido-fluido con el fin de extraer un máximo de información estructural de las mismas.

2.6.- PELÍCULAS LÍQUIDAS

Hemos visto en los apartados anteriores como las propiedades de una región interfacial difieren significativamente de las propiedades de las disoluciones adyacentes debido principalmente a las diferentes interacciones moleculares en estas regiones. Cuando dos regiones interfaciales se acercan entre sí, esas mismas interacciones

moleculares se manifiestan en una fuerza de interacción macroscópica entre las interfaces. Este proceso tiene lugar cuando dos fases se acercan estrechando la región que contiene la fase que las separa hasta que las dos superficies interactúan. Esta situación es equivalente al acercamiento de dos burbujas en una espuma o de dos gotas de aceite en una emulsión. Cuando el espesor de la región que separa las fases se hace comparable al de las regiones interfaciales que la limitan, la región entre capas interfaciales (película) pierde sus propiedades originales de disolución y es necesario un trabajo para seguir estrechando la película. Esto proviene de fuerzas macroscópicas, atractivas o repulsivas, generadas por la superposición de dos regiones interfaciales. Así pues, para mantener un espesor constante de la película tras la superposición de las dos regiones interfaciales es necesaria la aplicación de una fuerza externa (positiva o negativa)³ [Bergeron, 1999]. Estas interacciones se pueden cuantificar como un exceso de presión en función de la región de separación; i.e., espesor de la película. Esta relación se denomina isoterma de presión de disyunción y es la base de la caracterización de las películas líquidas. La definición de la presión de disyunción se puede hacer en términos de variables termodinámicas. De esta manera, el trabajo necesario para modificar el grosor de una película (h) a temperatura (T), presión (P), área (A) y número de moles de especie i -ésima (N_i) constantes viene dada por [Bergeron, 1999]:

$$\Pi(h) = - \left(\frac{dG}{dh} \right)_{T,P,A,N_i} \quad (2.14)$$

³ Este proceso es análogo a la fuerza (positiva o negativa) que hay que aplicar sobre dos imanes para mantener su separación constante una vez que su distancia es tal que sus campos interactúan.

El dispositivo más utilizado para la obtención de las isothermas de presión de disyunción es la “Balanza de Películas”⁴, cuyo funcionamiento se encuentra descrito en detalle en la sección 4.2. En este dispositivo experimental se forman películas líquidas horizontales individuales que se disponen en una célula en la que se puede controlar de manera precisa la presión impuesta a la película, y que en condiciones de equilibrio está compensada por la presión de disyunción. El grosor de la película se mide a través de la intensidad de luz reflejada por la película. Así, se generan las isothermas de presión de disyunción, midiendo el espesor de una película en equilibrio tras aplicar una presión fija a la misma. La variación del espesor de la película con la presión de disyunción contiene importante información estructural de la película así como de las fuerzas de interacción entre interfaces.

El drenaje es la desaparición del líquido en el interior de la película. Este proceso ocurre en espumas debido a la gravedad y afecta a la estabilidad de la misma como se verá en el apartado siguiente. El estudio de películas líquidas con la balanza de películas permite visualizar el drenaje en función de la presión aplicada. En general, el drenaje de una película líquida se produce en varias etapas en función de la concentración de moléculas en la disolución, siempre por encima de la cmc. Veamos cada una de estas etapas de manera genérica.

⁴ Del inglés: *Thin Film Balance*

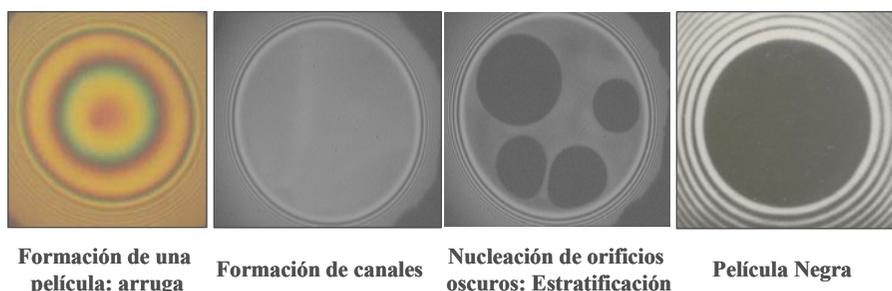


Figura 2.10: Visualización de una película líquida en tres de las etapas del drenaje

Como se observa en la Figura 2.10, inmediatamente después de la formación de la película líquida, ésta posee un espesor no uniforme con una región más gruesa en forma de lente que se denomina “arruga”⁵ y que se sitúa en el centro de la película. Esta arruga es hidrodinámicamente inestable y el líquido que contiene abandona la película de manera espontánea en unos segundos siguiendo un flujo asimétrico. Esta inestabilidad puede causar la ruptura de la película si la elasticidad superficial de la capa adsorbida no es lo suficientemente alta como para resistir la deformación [Langevin, 2000]. Una vez que la arruga desaparece, las superficies de la película quedan prácticamente plano-paralelas y aparecen canales⁶ que atraviesan la película. Esta estructura se estrecha gradualmente hasta medir unos 100 nm de espesor a la vez que los canales desaparecen. A partir de aquí, se observan diversas transiciones escalonadas en la película que tienen lugar por la formación de orificios oscuros que se expanden por la película disminuyendo progresivamente su espesor. Este estrechamiento escalonado de la película se denomina en la bibliografía “estratificación” y se debe a la aparición de fuerzas oscilatorias estructurales debido a la presencia de micelas en la disolución. La disminución del espesor de la película se

⁵ Del inglés: *Dimple*

⁶ Regiones dinámicas de espesor mayor que el resto de la película

produce debido a la expulsión sucesiva de las capas de micelas al aumentar la presión que comenzaba con la formación (nucleación) de un orificio en la película. Una vez que todas las capas de micelas han sido expulsadas, la película líquida alcanza su espesor final de equilibrio que dependerá de las interacciones intermoleculares entre las superficies. La Figura 2.11 muestra los diagramas de presión de disyunción que se obtienen para dos sistemas con diferente concentración de surfactante, lo cual determina el número de transiciones escalonadas que presenta el sistema.

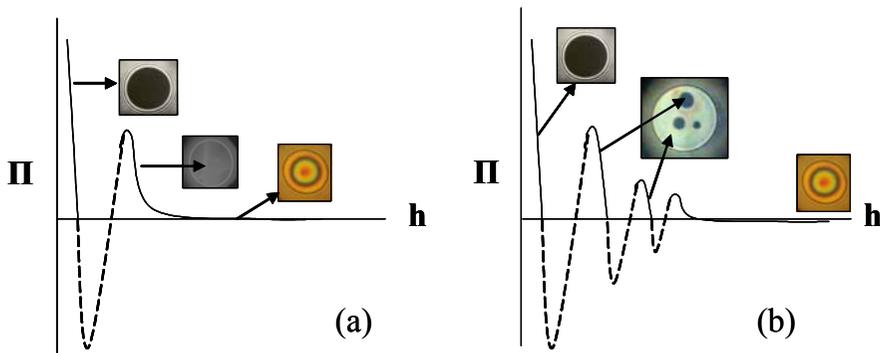


Figura 2.11: Correspondencia de las isothermas de presión de disyunción con la visualización de las etapas del drenaje de películas líquidas (a) $c < cmc$ (b) $c >$

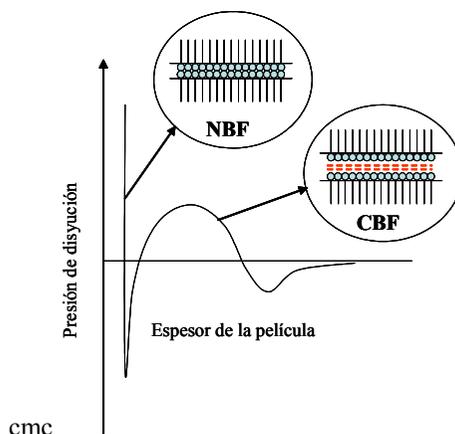


Figura 2.12: Estabilidad de una película negra común (CBF) y una película negra de Newton (NBF).

Cuando la concentración de surfactante en el medio es cercana a la cmc, es decir, la fracción de volumen de micelas es pequeña, pueden ocurrir dos situaciones: o bien solamente existe una transición desde una “Película Negra Común”⁷ a una película muy delgada denominada “Película Negra de Newton”⁸, o no existe transición en absoluto y el espesor de equilibrio de la película corresponde al de una Película Negra Común estabilizada por fuerzas de interacción intermoleculares (Figura 2.11a y 2.12). Por el contrario, cuando la concentración está muy por encima de la cmc, i. e. la fracción de volumen de micelas en la disolución es muy alta, se pueden observar varias transiciones escalonadas debido a la expulsión escalonada de las capas de micelas y que dan lugar a la curva de presión de disyunción oscilatoria debido a las fuerzas estructurales en la película (Figura 2.11b). Además, en este caso se observa como cada etapa del drenaje de la película se corresponde con una presión de disyunción y como en la estratificación de la película coexisten varios espesores a la

⁷ Del inglés: Common Black Film (CBF)

⁸ Del inglés: Newton Black Film (NBF)

misma presión de disyunción. En consecuencia, en sistemas concentrados aparecen oscilaciones con una periodicidad correspondiente al tamaño de las unidades estructurales que componen el ordenamiento (diámetro de la micela), como se observa en la Figura 2.13. Aquí, la presencia de máximos y mínimos responde a la alternancia de situaciones de menor (c, e, f) o mayor (a, b, d) estabilidad, respectivamente. Además, las situaciones (a) y (b) se corresponden con dos tipos de espesores de equilibrio representados en la Figura 2.12. Es decir, la formación de un CBF podría deberse a la existencia de una capa de micelas ($h=d$) o bien a otro tipo de fuerzas repulsivas entre las dos capas de surfactante ($h<d$), representada en ambas figuras con un trazo discontinuo.

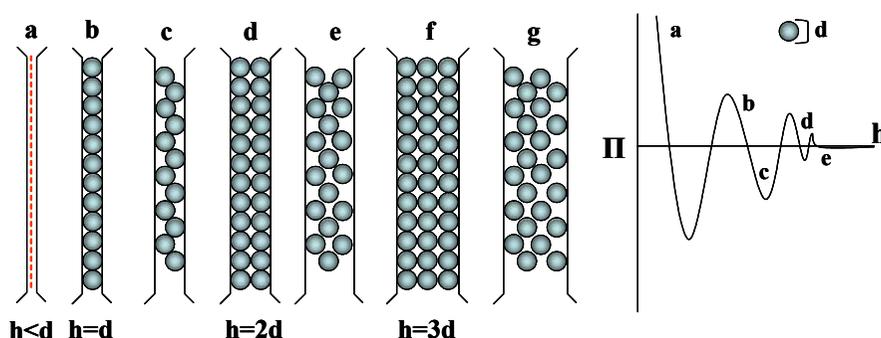


Figura 2.13: Oscilaciones de la presión de disyunción y expulsión de capas de micelas en el drenaje escalonado de una película líquida concentrada

Los cambios en la región interfacial que generan la presión de disyunción en una película se deben a fuerzas intermoleculares. Las diferentes contribuciones de la presión de disyunción se suelen separar varios componentes:

$$\Pi(h) = \Pi_{DCE} + \Pi_{vdW} + \Pi_{estérica} + \dots \quad (2.15)$$

Donde los subíndices indican la naturaleza de la interacción. Es decir, “DCE” se refiere a las fuerzas repulsivas electrostáticas debidas a la

doble capa eléctrica (para sistemas cargados), “vdW” indica las fuerzas atractivas de dispersión de London-van der Waals, “estérica” se refiere a las fuerzas estructurales de naturaleza estérica. Para mayor detalle acerca de las fuerzas oscilatorias en películas líquidas se puede consultar la referencia [Israelachvili, 1991; Bergeron, 1999]

Al igual que ocurre con los fenómenos descritos en el resto del capítulo, el drenaje de películas de proteína difiere en varios aspectos del drenaje de películas de surfactante. Las proteínas forman agregados de gran tamaño y forman películas líquidas con un espesor heterogéneo.

2.7.-EMULSIONES Y ESPUMAS

En términos generales, las emulsiones y las espumas son dispersiones que presentan numerosas analogías entre ellas. En cualquier caso, se va a realizar una descripción general de cada una de ellas por separado.

2.7.1 Espumas

Una espuma es una dispersión de burbujas de aire en un líquido. Debido a la gran cantidad de superficie libre que presentan las espumas, la energía superficial del sistema es muy alta y se trata de un sistema termodinámicamente inestable. La presencia de un agente tensioactivo 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.

Las características finales de una espuma están íntimamente relacionadas con las propiedades de las películas líquidas que la

forman así como de las propiedades dilatacionales de las películas de moléculas adsorbidas en la superficie. El proceso de formación de una espuma (o capacidad espumante) y la estabilidad de la misma son dos fenómenos que no se pueden evaluar de manera independiente puesto que paralelamente a la formación de una espuma, tienen lugar mecanismos de desestabilización de la misma que la van destruyendo si es muy inestable [Langevin, 2000]. Sin embargo, para facilitar la comprensión, veamos estos dos fenómenos separadamente.

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 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 adsorbida. Veamos esto en detalle.

En primer lugar, es evidente que la capacidad espumante de una disolución aumenta con el número de moléculas anfífilas accesibles en el medio ya que la concentración superficial aumenta con la concentración de partículas en el seno de la disolución [Carrera-Sanchez, 2005].

En segundo lugar, la dinámica de adsorción de las moléculas juega un importantísimo papel en la capacidad espumante de las mismas. Cuando se crea una superficie, la velocidad con la cual las moléculas se sitúan en la superficie protegiéndola es un factor determinante en la formación de una espuma. Así, los surfactantes, que difunden rápidamente a la superficie, poseen una gran capacidad

espumante. Además, en estos sistemas, las micelas juegan un papel clave. Cuando se crea una superficie durante el proceso de formación de una espuma, en una disolución suficientemente concentrada de surfactante, las moléculas de surfactante que alcancen la superficie provienen mayoritariamente de las micelas. Por ello, la cantidad de espuma formada está directamente correlacionada con la vida media de las micelas [Oh, 1991]. De esta manera, la estabilidad de las micelas determina la capacidad espumante del surfactante. Con respecto a la proteínas, atendiendo a la velocidad de adsorción, las proteínas pequeñas, flexibles y desordenadas poseen una mayor capacidad espumante que las proteínas grandes y globulares debido a su más rápida difusión a la superficie [Martín, 2002].

Finalmente, para una correcta formación de la espuma, es necesario que cuando una superficie se expande, la nueva superficie creada sea rápidamente ocupada por moléculas. Este fenómeno está directamente relacionado con la viscosidad superficial de la capa de moléculas adsorbida puesto que este parámetro mide precisamente la habilidad de la película para responder a un cambio en área [Durand, 1999; Langevin, 2000]. Una viscosidad superficial muy alta implica que el sistema no se opone a la deformación inducida en la capa superficial y por tanto la creación de área superficial se ve favorecida y con ello la formación de una espuma.

Estabilidad de la espuma

La estabilidad de una espuma está gobernada principalmente por dos procesos: la maduración de Ostwald⁹ y la coalescencia [Langevin, 2000]. Veamos cada uno de estos en detalle.

⁹ Del inglés *Ostwald Rippening*

El primer proceso de desestabilización de una espuma se denomina maduración de Ostwald. Este fenómeno se debe a que la presión del gas en burbujas pequeñas es mayor que la presión del gas en burbujas grandes. En estas condiciones, las burbujas pequeñas desaparecen a expensas de las grandes, debido a la difusión del gas desde las burbujas pequeñas a las grandes por el gradiente de la presión hidrostática entre las dos burbujas. En consecuencia, este mecanismo se encuentra favorecido en el caso de sistemas muy polidispersos. Otro factor importante que afecta a la maduración de Ostwald es la solubilidad del gas en la fase líquida. Si el gas utilizado en la formación de una espuma es muy soluble en la fase acuosa, como es el caso del dióxido de carbono (CO_2), la difusión del gas entre burbujas se ve claramente favorecida. La utilización de gases menos solubles en agua como el nitrógeno (N_2) en la formación de espumas, aumenta significativamente la estabilidad de la misma.

Veamos a continuación el proceso de coalescencia de dos burbujas. Este proceso consiste en la ruptura de la película líquida que queda entre dos burbujas para formar una única burbuja más grande. El proceso de coalescencia se puede separar en dos etapas: drenaje y ruptura.

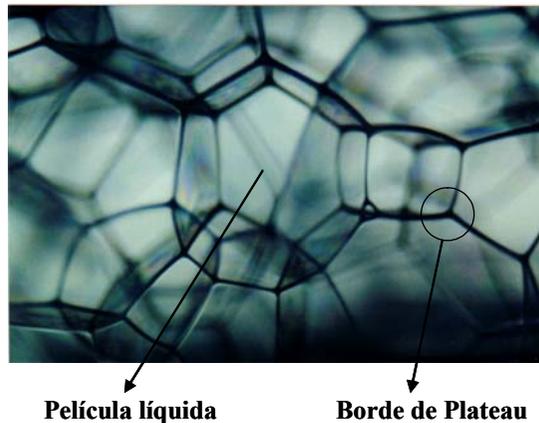


Figura 2.14: Imagen de una espuma real [<http://www.iit.edu/~wasan/ftdes.html>]

En primer lugar, el drenaje consiste en la desaparición del líquido que ocupa el espacio entre dos burbujas de aire y produce el estrechamiento de las películas líquidas que separan dos burbujas. Este fenómeno se produce debido a la gravedad y a las fuerzas capilares en las películas líquidas. Como se observa en la Figura 14, las burbujas se estructuran en una espuma formando lo que se denominan “bordes de *Plateau*”. En estos puntos, convergen tres películas y en ellos la presión del líquido es menor que en el centro de la película. Para compensar esta diferencia de presión, el líquido tiende a dirigirse a los bordes de *Plateau*, también estrechando la película que separa dos burbujas. Este tipo de inestabilidades implican una deformación de la película, de manera que la resistencia de la película a la deformación inducida por el drenaje es clave en la estabilidad de la misma. Al contrario que en el caso de la formación de una espuma, la estabilidad de la misma está determinada por la elasticidad superficial de la película. Este parámetro cuantifica la resistencia a la deformación de la superficie de manera que películas muy elásticas serían capaces de resistir el drenaje de líquido. Más concretamente, la arruga producida por el drenaje del líquido

inmediatamente tras la formación de una burbuja (ver sección 2.5) causará la ruptura de la película si la elasticidad superficial de la misma no es lo suficientemente elevada. Además, puesto que la formación de arrugas está limitada a películas grandes, las espumas formadas por burbujas pequeñas son más estables frente al drenaje.

Una vez que la película de líquido que queda entre dos burbujas se ha estrechado, debido al drenaje, se puede producir la ruptura de la misma. En la bibliografía existen numerosos modelos de ruptura de películas líquidas. En ellos se deduce que la ruptura de la película tiene lugar debido a la amplificación de fluctuaciones de concentración superficial (Γ). Matemáticamente, la amplitud cuadrática media de estas fluctuaciones escala de la siguiente manera [Langevin, 2000]:

$$\langle \delta\Gamma \rangle_\infty \frac{k_B T \Gamma^2}{\varepsilon} \quad (2.16)$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura y ε es la elasticidad superficial de la película. Además, de acuerdo con Langevin, el tiempo correspondiente a la amplificación de una fluctuación $\delta\Gamma$ escala con:

$$\tau \propto \exp\left(\frac{\delta\Gamma^2}{\langle \delta\Gamma^2 \rangle}\right) \quad (2.17)$$

donde $\delta\Gamma$ debería ser al menos igual a $(\Gamma - \Gamma_a)$ siendo Γ_a la concentración superficial a la cual desaparecen las fuerzas repulsivas de corto alcance. Y puesto que este valor es muy pequeño, se cumple que: $\delta\Gamma \approx \Gamma$. Así pues, sustituyendo la ecuación (2.17) en (2.16) se obtiene que el tiempo de ruptura varía exponencialmente con la elasticidad superficial de la película adsorbida.

$$\tau \propto \exp(\varepsilon) \quad (2.18)$$

De este modo, la elasticidad superficial constituye el parámetro clave en la estabilidad de una espuma. En la sección 2.4 se ha visto como la elasticidad superficial depende de la frecuencia de oscilación. Por tanto, es importante indicar en qué condiciones la elasticidad superficial medida proporcionará información acerca del mecanismo de desestabilización. De acuerdo con Langevin, las películas líquidas que forman una espuma se vacían de moléculas entre las dos superficies debido al proceso de drenaje. Así pues, se trataría de un sistema parecido a una película monomolecular. En un experimento dilatacional, si la frecuencia de oscilación es suficientemente alta, la elasticidad superficial medida se corresponde con la de una película monomolecular, luego el parámetro clave en la estabilidad de una espuma es la elasticidad de Gibbs [Langevin, 2000].

2.7.2 Emulsiones

Una emulsión es en términos generales, una dispersión de gotas de un líquido en otro que se denomina fase continua. Los mecanismos de formación y estabilidad de una emulsión son bastante similares a los descritos en el caso de una espuma en el apartado anterior, pese a la diferencia estructural entre ambos sistemas. Pese a ello, veremos a continuación de manera resumida los principales aspectos que caracterizan a este tipo de dispersiones.

Al igual que ocurre en el caso de las espumas, la estabilidad de la emulsión está íntimamente relacionada con las características estructurales de la capa de moléculas adsorbidas en la superficie de las gotas que la componen. En particular, las propiedades reológicas de dicha capa serán, una vez más, clave en la estabilidad de la emulsión. Al igual que ocurre en el caso de las espumas, los mecanismos implicados en la formación de emulsiones y en la estabilidad de la

emulsión no se pueden evaluar de manera independiente. A diferencia de lo que ocurre en el caso de una espuma, la formación de una emulsión no se observa en tiempo real y en general la capacidad emulsionante de una sustancia anfifílica se suele medir en términos del tamaño de gota de la emulsión formada, siendo mayor la capacidad emulsionante de una molécula cuanto menor es el tamaño de las gotas que forman la emulsión. Además, de acuerdo con Poon y col. el uso de homogeneizadores en la formación de emulsiones implica un enorme aporte energético al sistema. Por ello, la adsorción de moléculas en la superficie de las gotas de aceite, no está controlada por difusión como en el caso de la adsorción sobre una interfaz estática y la conexión entre las dos situaciones es, en general, muy compleja [Poon, 2001].

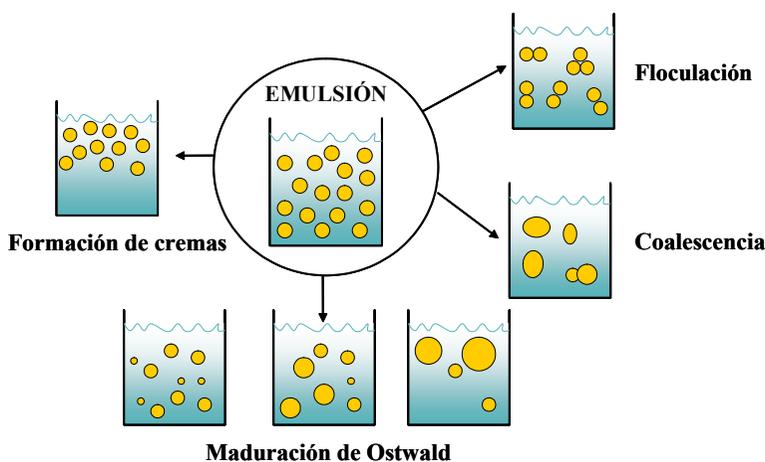


Figura 2.15: Mecanismos de desestabilización de una emulsión

La estabilidad de las emulsiones es un fenómeno que se puede observar y evaluar en tiempo real y por ello, en la bibliografía se encuentra que los mecanismos que afectan a la estabilidad de una emulsión están esquematizados en la Figura 2.15 y se denominan:

maduración de Ostwald, sedimentación/cremación, floculación y coalescencia [Langevin, 2000].

En primer lugar, la maduración de Ostwald es completamente similar al caso de las espumas. Se trata de la difusión del líquido disperso desde las gotas más pequeñas a las más grandes debido a diferencias de presión hidrostática. Al igual que antes, la solubilidad del líquido disperso (aceite) en la fase continua (agua), jugará un papel clave en el control de este mecanismo de desestabilización. Así pues, el uso de alcanos de cadena larga, menos solubles en la fase acuosa que los alcanos de cadena corta, favorecerán la estabilidad de la emulsión frente a este mecanismo [Langevin, 2000].

El principal mecanismo desestabilizador de las emulsiones es la sedimentación/cremado. Este mecanismo tiene lugar en la emulsión cuando el tamaño de las gotas es micrométrico. En este caso, la velocidad, debida a la gravedad, de una gota de líquido de densidad ρ_1 y radio R en otro líquido de densidad ρ_2 y viscosidad η viene dada por la ley de Stokes:

$$v = \frac{2R^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta} \quad (2.19)$$

donde g es la aceleración de la gravedad. De acuerdo con la diferencia de densidades entre el líquido disperso y la fase continua, se produce el fenómeno de sedimentación o cremado. Cuando la fase dispersa es un aceite, el proceso por el cual las gotas de emulsión tienden a situarse en la parte superior de la misma se denomina formación de cremas o cremado [Robins, 2000]. A la vista de la ecuación (2.19), este mecanismo depende del tamaño de las gotas, dentro del intervalo de aplicabilidad, de la diferencia de densidades entre los líquidos y de la viscosidad del medio acuoso [Langevin, 2000; Robins, 2000]. La formación de cremas aumenta significativamente con el tamaño de

gota y por ello, la formación de emulsiones de gotas grandes es muy complicada. Esta es una de las razones por las que la capacidad emulsionante es mayor para tamaños de gota pequeños. En emulsiones más concentradas, el proceso de cremado se ve ralentizado y finalmente desaparece a partir de una fracción de volumen del 60% de fase dispersa. A partir de este momento, las gotas dejan de ser esféricas para ser poliédricas de manera que las regiones líquidas entre gotas son películas líquidas. La apariencia de este tipo de emulsiones es completamente similar a la de una espuma y el drenaje del líquido entre gotas de aceite debido a la gravedad es el nuevo mecanismo desestabilizador.

Finalmente, la coalescencia y la floculación son dos procesos análogos a los encontrados en el caso de las espumas. La floculación es el proceso por el cual dos gotas se encuentran y se unen sin que se produzca la ruptura de la película interfacial. Por tanto, las gotas no pierden su identidad geométrica. Este mecanismo, depende del balance entre las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión de tipo estérico debido a la presencia de moléculas en la interfaz y electrostáticas, si el sistema posee carga superficial. Por lo tanto, la floculación puede ser un proceso reversible que dependa de las interacciones presentes en el sistema. Por el contrario, la coalescencia es el proceso por el cual dos gotas se encuentran y se produce la ruptura de la película interfacial de manera que forman una gota más grande. En consecuencia, este proceso es irreversible y viene determinado por la elasticidad de la película interfacial adsorbida que se opone a la deformación/ruptura de la misma [Husband, 1997; Carrera-Sanchez, 2005; Langevin, 2000; Wilde, 2000]. Asimismo, para que la coalescencia tenga lugar, es necesaria la aparición previa de una floculación o cremado de la emulsión, dado que se requiere que las gotas estén durante un intervalo de tiempo en contacto entre sí.

La coalescencia afecta significativamente a la estabilidad global de la emulsión puesto que la formación de gotas más grandes a partir de gotas más pequeñas favorece también el cremado en la emulsión.

Cabe destacar que debido al aporte energético transferido a la emulsión durante el proceso de formación, la estabilidad de la misma dependerá no solamente de la estructura de la capa de moléculas adsorbida sino que resulta muy dependiente del mecanismo de formación de la misma, que favorecerá en cada caso la incidencia de un mecanismo de desestabilización u otro. Así pues, la conexión entre las propiedades interfaciales de la película de moléculas adsorbida es más compleja en el caso de una emulsión que en el caso de una espuma [Langevin, 2000].

En términos generales, la estabilización de emulsiones y espumas es diferente para surfactantes o proteínas. Los surfactantes difunden rápidamente a la interfaz y forman películas interfaciales muy fluidas que les permiten migrar a regiones en las que la concentración interfacial ha disminuido debido a una deformación del área interfacial. Por el contrario, las proteínas forman películas interfaciales viscoelásticas muy resistentes a la deformación debido a las fuertes interacciones intermoleculares [Wilde, 2000]. Cuando se forma una espuma o una emulsión de un sistema mixto formado por proteínas y surfactantes, la situación se complica significativamente. En general, los surfactantes debilitan las películas viscoelásticas de proteínas y las proteínas obstaculizan la movilidad interfacial de los surfactantes. Dado que las dispersiones alimentarias están formadas por multitud de ingredientes, el estudio de estos sistemas mixtos presenta un enorme interés en la ciencia y tecnología alimentaria con el fin de llegar a comprender y predecir su estabilidad [Mackie, 2005].

Capítulo 3.

MODELO TERMODINÁMICO DEL COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE PROTEÍNAS Y SURFACTANTES

3.1.- INTRODUCCIÓN

A lo largo de las dos últimas décadas, el Dr. Fainerman junto a varios colaboradores han desarrollado un modelo termodinámico que describe las propiedades de una capa de proteína adsorbida en la interfaz líquido-fluido en condiciones de equilibrio. Un análisis termodinámico de este sistema interfacial proporciona una descripción del sistema en forma de tres ecuaciones: i) La ecuación de estado, $\pi(T)$, que relaciona la presión interfacial con la composición de la capa interfacial. ii) La isoterma de adsorción, $\Gamma(c)$, que determina la relación entre la adsorción de los componentes con su concentración en el seno de la disolución. iii) La isoterma de presión interfacial $\pi(c)$ que relaciona de forma directa la presión interfacial con la concentración de la disolución y que por tanto se puede comparar directamente con los datos experimentales. Los primeros formalismos termodinámicos de capas adsorbidas, desarrollados por Langmuir y von Szychowski, no reproducen satisfactoriamente los datos experimentales, debido principalmente a la simplicidad de sus premisas [Fainerman, 2003]. Éstas se pueden resumir en que en la capa interfacial no existe interacción entre moléculas adsorbidas y todas las moléculas poseen igual valor de área interfacial. Así pues, la inclusión de estos fenómenos en la capa interfacial adsorbida es el punto de partida del formalismo termodinámico desarrollado por Fainerman y col.

La teoría se encuentra descrita en profundidad en numerosas publicaciones y *reviews* al respecto, que se detallan a lo largo de todo el capítulo, sin embargo y con el fin de facilitar la comprensión del análisis realizado a los datos experimentales, a continuación se muestra un pequeño resumen de la teoría así como de algunas aplicaciones. En primer lugar se explica la teoría general que describe una capa interfacial. A partir de estas ecuaciones generales, se

obtienen como caso particular las ecuaciones que describen la capa de proteína adsorbida en una interfaz líquido-fluido. De manera similar, se obtiene como caso particular, la ecuación de Frumkin, que describe suficientemente bien la adsorción de surfactantes en interfaces fluidas. Asimismo, se presentará la aplicación de este mismo formalismo al estudio de la adsorción de sistemas mixtos (proteína/surfactante). A continuación se detallan las claves para la extensión del formalismo teórico al estudio de la dinámica de adsorción así como a las propiedades elásticas de la capa de proteína interfacial. Finalmente, se realiza una descripción resumida de la implementación de la teoría mediante un programa informático que se ha realizado en este trabajo para ajustar los datos experimentales con el modelo teórico presentado.

3.2 TEORÍA DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS EN INTERFACES FLUIDAS

Como se ha visto en el capítulo anterior, la adsorción de proteínas en interfaces fluidas difiere significativamente de la adsorción de surfactantes de bajo peso molecular. Estas diferencias se refieren básicamente a las variaciones estructurales existentes entre ambos tipos de moléculas. Concretamente, la diferencia estructural básica consiste en que el valor del área interfacial de las proteínas, al contrario de lo que ocurre con surfactantes simples, es elevada y además, puede variar. En la bibliografía se encuentran diversas formas de abordar este problema desde un punto de vista teórico. En la referencia [Fainerman, 1998a] se encuentran detalladas las principales características, inconvenientes y ventajas de las teorías mecanoestadísticas y de escalado que se usan en la bibliografía para escribir la capa interfacial de proteína. En este trabajo se ha escogido la

aproximación termodinámica del problema. Además, puesto que este modelo teórico ha sido desarrollado a lo largo de varios años, se van a describir separadamente dos versiones del modelo. Una primera descripción teórica que incluye consideraciones de carga electrostática y una segunda versión mejorada y muy reciente del modelo teórico que profundiza en la desnaturalización interfacial de las proteínas. Además, las dos versiones serán aplicadas sucesivamente a los datos experimentales en el Capítulo 5.

El modelo termodinámico propuesto por Fainerman y col. se basa en un concepto derivado por Joos y Serrien tras la aplicación del principio de Braun Le Chatelier¹ al proceso de adsorción de proteínas en interfaces fluidas [Joos, 1991]. Estos autores encuentran que si una molécula adsorbida puede ocupar varias regiones de la interfaz entonces lo hará de acuerdo con la siguiente regla. Si la presión interfacial es baja, el área interfacial ocupada por la proteína será máxima mientras que si la presión interfacial es alta, la molécula ocupará un área interfacial mínima. En este sentido, Joos y Serrien obtienen por vez primera una expresión que describe la adsorción de una proteína que presenta dos estados conformacionales diferentes en la interfaz [Joos, 1991]. En concreto, encuentran que la tensión interfacial controla el grosor y la composición de una capa adsorbida de proteínas de tal manera que la fracción de moléculas adsorbidas en una configuración de área interfacial mínima aumenta con la presión interfacial. El modelo termodinámico que se presenta a continuación generaliza este concepto de manera que la proteína puede adoptar un número dado de estados conformacionales en la interfaz (n) [Fainerman, 1996].

¹ Principio de Braun Le Chatelier: Si se impone cualquier cambio a un sistema en equilibrio, éste tiende a buscar un nuevo equilibrio contrarrestando dicho cambio [Callen, 1985]

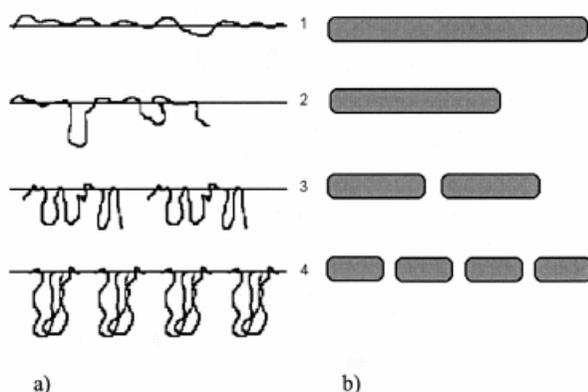


Figura 3.1: Visualización del modelo de adsorción propuesto:

- (a) Cambio conformacional de las moléculas adsorbidas (b) Área molar ocupada por cada molécula de proteína adsorbida. Los estados 1 a 4 corresponden a un incremento de la presión y densidad interfacial (disminución del área molar interfacial media) [Miller 2002]

En la Figura 3.1 se muestra un diagrama esquemático del proceso de adsorción de proteína. A baja presión interfacial, la proteína se encuentra en un estado de máximo desdoblamiento y el área interfacial ocupada es máxima (ω_{max}). Conforme aumenta la densidad interfacial de proteína, i.e. aumenta la competición entre moléculas de proteína adsorbidas, el área ocupada disminuye hasta que se alcanza un valor mínimo (ω_{min}). Esto concuerda asimismo con la evidencia experimental de que el grosor de la capa adsorbida aumenta conforme aumenta la presión interfacial, i.e. la densidad interfacial de proteína [Miller, 2000]. Veamos a continuación los detalles del formalismo teórico que describirán este complejo sistema interfacial.

3.2.1 Teoría general de la capa interfacial

El punto de partida del tratamiento teórico es el potencial

químico de los componentes de la capa superficial μ_i^s (el superíndice s se refiere a la superficie o interfaz) [Fainerman, 1998b; Fainerman, 2001]:

$$\mu_i^s = \mu_i^{0s}(T, P, \gamma) + RT \ln f_i^s x_i^s \quad (3.1)$$

donde $\mu_i^{0s}(T, P, \gamma)$ es el potencial químico de referencia del componente i y depende de la temperatura, de la presión y de la tensión superficial γ , f_i^s es el coeficiente de actividad y x_i^s es la fracción molar del componente i . Con el fin de expresar el potencial químico de referencia únicamente como función de la temperatura y de la presión es necesario introducir una dependencia explícita de este con la tensión superficial/interfacial en la ecuación (3.1). Para ello se aplica la expresión de la variación del potencial superficial de Gibbs en una superficie divisoria de Gibbs a presión y temperatura constantes:

$$dG = -Ad\gamma + \sum \mu_i^s dm_i^s \quad (3.2)$$

donde A es el área superficial y m_i es el número de moles del componente i -ésimo. Puesto que dG es un diferencial exacto, todos los componentes de la capa superficial cumplen la siguiente relación de Maxwell (a presión (P), temperatura (T) y número de moléculas distinto de i ($m_{i \neq j}^s$) constantes):

$$\left(\frac{\partial \mu_i^s}{\partial \gamma} \right)_{m_i^s} = - \left(\frac{\partial A}{\partial m_i^s} \right)_{\gamma} \quad (3.3)$$

Aquí, el término a la derecha de la igualdad (3.3) es por definición el área molar parcial del componente i -ésimo (a P , T y $m_{i \neq j}^s$ constantes):

$$\left(\frac{\partial A}{\partial m_i^s} \right)_\gamma = \omega_i \quad (3.4)$$

Sustituyendo la ecuación (3.4) en la ecuación (3.3) y operando se puede transformar la ecuación (3.2) de la siguiente manera:

$$\mu_i^s = \mu_i^{0s}(T, P) - \int_0^\gamma \omega_i d\gamma + RT \ln f_i^s x_i^s \quad (3.5)$$

En esta ecuación, el potencial químico de referencia es ya independiente de la tensión superficial. Además, si uno supone que el valor de ω_i es también independiente de la tensión superficial, puede realizar fácilmente la integral y obtener finalmente la conocida ecuación de Butler del potencial químico en la superficie [Fainerman, 1998a; Fanerman, 2001]:

$$\mu_i^s = \mu_i^{0s} + RT \ln f_i^s x_i^s - \gamma \omega_i \quad (3.6)$$

Para obtener las ecuaciones de estado y las isothermas de adsorción de la capa interfacial adsorbida es necesario conocer, además del potencial químico de la capa interfacial dado por la ecuación (3.6), la expresión del potencial químico en el seno de la disolución (denotado con el superíndice α). Éste viene dado por:

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^{0\alpha} + RT \ln f_i^\alpha x_i^\alpha \quad (3.7)$$

En condiciones de equilibrio, igualando las ecuaciones (3.6) y (3.7) se obtiene que:

$$\mu_i^{0\alpha} + RT \ln f_i^\alpha x_i^\alpha = \mu_i^{0s} + RT \ln f_i^s x_i^s - \gamma \omega_i \quad (3.8)$$

Donde $\mu_i^{0\alpha}$ es el potencial químico de referencia del componente i -ésimo, dependiente solo de T y P . Aquí, es necesario definir el estado de referencia con precisión. Para el disolvente ($i=0$) se elige un componente puro; $x_0^s=1$, $f_0^s=1$, $x_0^\alpha=1$, $f_0^\alpha=1$ y $\gamma=\gamma_0$. Sustituyendo todo

esto en la ecuación se obtiene (3.8):

$$\mu_0^{0s} - \gamma_0 \omega_0 = \mu_0^{0\alpha} \quad (3.9)$$

Combinando las ecuaciones (3.8) y (3.9) se obtiene la siguiente relación general:

$$\ln \frac{f_0^s x_0^s}{f_0^\alpha x_0^\alpha} = -\frac{(\gamma_0 - \gamma)\omega_0}{RT} \quad (3.10)$$

Paralelamente, el potencial químico de un componente puro está relacionado con el obtenido suponiendo una dilución infinita (denotada por (0) y que cumple: $x_i^\alpha \rightarrow 1$ y $f_i^\alpha = f_i^s = 1$), mediante:

$$\mu_{(0)i} = \mu_i^0 + RT \ln f_{(0)i} \quad (3.11)$$

Introduciendo esta ecuación en la ecuación (3.8) y definiendo

$K_i = \left(\frac{x_i^s}{x_i^\alpha} \right)_{x_i^\alpha \rightarrow 0}$, se tiene finalmente la siguiente relación:

$$\ln \frac{f_i^s x_i^s / f_{(0)i}^s}{K_i f_0^\alpha x_0^\alpha / f_{(0)i}^\alpha} = -\frac{(\gamma_0 - \gamma)\omega_i}{RT} \quad (3.12)$$

Aquí, los coeficientes de actividad adicionales ($f_{(0)i}^s$, $f_{(0)i}^\alpha$), introducidos para establecer una consistencia entre los potenciales químicos de los componentes puros y aquellos en dilución infinita, se pueden incorporar en la constante K_i . Así, (3.10) y (3.12) constituyen las relaciones generales a partir de las cuales se pueden obtener las ecuaciones que describen un sistema interfacial.

Para ello, en primer lugar es necesario introducir en el formalismo el concepto de grado de recubrimiento interfacial $\theta_j = \Gamma_j \omega_j$. Para sistemas compuestos por varios tipos de moléculas o moléculas que puedan presentar diferentes estados interfaciales, los

correspondientes ω_i son diferentes y la superficie divisoria viene dada por la siguiente relación general:

$$\sum_{i=0}^n \Gamma_i = \frac{1}{\omega_\Sigma} \quad (3.13)$$

donde ω_Σ es el área molar superficial media y n es el número total de estados accesibles para la molécula en la interfaz. Además, la contribución de cada componente al área interfacial media viene dada por:

$$\omega_\Sigma = \frac{\sum_{i \geq 1} \Gamma_i \omega_i}{\sum_{i \geq 1} \Gamma_i} \quad (3.14)$$

Y se cumple que:

$$x_i^s = \frac{\Gamma_i}{\sum_{j \geq 0} \Gamma_j} \equiv \Gamma_i \omega_\Sigma; \quad \sum_{i=0}^n \theta_i = 1 \quad (3.15)$$

Introduciendo en las ecuaciones (3.10) y (3.12) el grado de recubrimiento interfacial en lugar de la fracción molar de los componentes y operando se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$\pi = -\frac{RT}{\omega_0} \left[\ln \left(1 - \sum_{i=1}^n \theta_i \right) + \ln f_0^S \right] \quad (3.16)$$

$$K_i x_i = \frac{\theta_i f_i^S}{\left(1 - \sum_{i=1}^n \theta_i \right)^{\omega_i / \omega_0} (f_0^S)^{\omega_i / \omega_0}} \quad (3.17)$$

Ahora sí, las ecuaciones (3.16) y (3.17) constituyen las relaciones generales a partir de las cuales se obtienen las ecuaciones de la capa interfacial adsorbida. Para ello es necesario estimar los

valores de los coeficientes de actividad f_i^s para cada caso particular y sustituirlos en las ecuaciones (3.16) y (3.17).

Veamos las relaciones generales de los coeficientes de actividad. De acuerdo con Fainerman y col. estos coeficientes se pueden expresar en términos de la entalpía (H) y la entropía (E) de mezcla, de manera que vienen dados por la suma de ambas contribuciones [Fainerman, 1996; Fainerman, 2001; Fainerman, 2003]:

$$\ln f_i^S = \ln f_i^{SH} + f_i^{SE}; i \geq 1 \quad (3.18)$$

Aquí la no-idealidad entálpica está determinada por interacciones intermoleculares:

$$RT \ln f_k^{sH} = \sum_i \sum_j \left(A_{ik}^s - \frac{1}{2} A_{ik}^s \right) \theta_i \theta_j \quad (3.19)$$

donde $A_{ik}^s = U_{ii}^s + U_{jj}^s - 2U_{ij}^s$; y U_{ij}^s son energías de interacción entre especies en la capa adsorbida. Y la no idealidad entrópica viene dada de acuerdo con Lucassen-Reynders por [Fainerman, 2003]:

$$\ln f_j^{sE} = 1 - n_j \sum_{i=0}^n \left(\frac{\theta_i}{n_i} \right) \quad (3.20)$$

donde $n_i = \frac{\omega_i}{\omega_0}$.

La combinación de diversos modelos teóricos con las ecuaciones que definen los coeficientes de actividad ((3.19) y (3.20)) permite obtener las expresiones de los coeficientes de actividad concretos. Sustituyendo estos en las ecuaciones (3.16) y (3.17) se obtienen los diferentes modelos teóricos adecuados a las condiciones particulares de la capa interfacial de moléculas adsorbidas. Veamos a continuación el caso particular de proteínas en la capa interfacial.

3.2.2 Modelo de Fainerman I

Consideremos que las moléculas de proteína pueden encontrarse en la capa interfacial en un número dado de estados con diferentes áreas molares. Estos valores de área varían desde un valor máximo ω_{max} que se alcanza a bajo recubrimiento interfacial y un valor mínimo ω_{min} que se alcanza a alto recubrimiento interfacial. Además, las moléculas en diferentes estados se encuentran en equilibrio entre ellas pero se comportan como componentes independientes. Los valores de área molar que la proteína puede alcanzar en la capa interfacial están bien definidos y se expresan en términos del área molar de la proteína en el primer estado, ω_1 , y de un incremento, $\Delta\omega$ (siendo el área que ocupa la proteína en el estado 1, ω_1 , la mínima):

$$\omega_i = \omega_1 + \Delta\omega(i-1); \Delta\omega = \omega_1; \omega_i = i\omega_1 \quad (3.21)$$

Entonces $\omega_{max} = n\omega_1$ y $\omega_{min} = \omega_1$ son los valores extremos de área molar que alcanza la proteína en la interfaz y $\Delta\omega = \omega_1$ es el incremento de área entre dos estados consecutivos.

En esta situación, y con el fin de simplificar el problema los autores asumen que la no idealidad de la entalpía se la capa interfacial es independiente del estado de adsorción y depende solamente de la densidad interfacial total ($\Gamma_\Sigma = \sum_{i \geq 1} \Gamma_i$). Así pues los coeficientes de actividad ((3.19) y (3.20)) toman la siguiente forma simplificada [Makievski, 1998; Fainerman, 1998a]:

$$\begin{aligned} \ln f_i^{SH} &= a(1 - \Gamma_\Sigma \omega_\Sigma); i \geq 1 \\ \ln f_0^{SH} &= a\Gamma_\Sigma^2 \omega_\Sigma^2 \end{aligned} \quad (3.22)$$

$$\ln f_i^{SE} = 1 - n_i \sum_{j \geq 0} \frac{\theta_j}{n_j} = 1 - \omega_i \sum_{j \geq 0} \Gamma_j = 1 - \frac{\omega_i}{\omega_\Sigma}; i \geq 1 \quad (3.23)$$

$$\ln f_0^{SE} = 0$$

donde se ha hecho uso de la relación (3.13) en la expresión (3.23) y a es una constante de interacción molecular que coincide con el parámetro de Flory [Flory 1941; Makievski, 1998].

Además, las proteínas son polielectrolitos, que contienen grupos superficiales que se ionizan y dependiendo del punto isoeléctrico de la proteína y de pH al que se realice la adsorción. Para incluir el efecto de la doble capa eléctrica en la capa de proteína adsorbida, hay que considerar los potenciales electroquímicos en lugar de los potenciales químicos de Butler en las ecuaciones 3.6 y 3.7. En la referencia [Makievski, 1998] se encuentra detallada la obtención de las ecuaciones, que finalmente describen la capa interfacial, teniendo en cuenta la contribución de la doble capa eléctrica. Así pues, incluyendo los coeficientes de actividad dados en 3.22 y 3.23 en las relaciones generales 3.16 y 3.17 y teniendo en cuenta las siguientes hipótesis: (i) El grosor de la doble capa eléctrica es menor que el de la capa adsorbida para una disolución de proteína, (ii) $a_{el} = z^2 F / \omega_\Sigma (8 \varepsilon R T c_\Sigma)$ es una constante que incluye las interacciones íter-iónicas y es mucho mayor que la constante a de Flory, (iii) $\omega_0 = \omega_\Sigma$, se obtienen finalmente la siguiente ecuación de estado y la isoterma de adsorción de la proteína adsorbida:

$$\pi = -\frac{RT}{\omega_\Sigma} \left[\ln(1 - \Gamma_\Sigma \omega_\Sigma) - a_{el} \Gamma_\Sigma^2 \omega_\Sigma^2 \right] \quad (3.24)$$

$$b_1 c = \frac{\Gamma_1 \omega_\Sigma}{(1 - \Gamma_\Sigma \omega_\Sigma)^{\omega_1 / \omega_\Sigma}} \quad (3.25)$$

donde c es la concentración total de proteína en el seno de la

disolución y $b_l = b_i = cte$ es la constante de equilibrio de adsorción de la proteína.

La adsorción total se expresa en términos de la adsorción en el estado 1:

$$\Gamma_{\Sigma} = \Gamma_1 \sum_{i=1}^n i^{(\alpha+1)} \exp\left((i-1) \frac{\omega_1}{\omega_{\Sigma}}\right) \exp\left(-\frac{(i-1)\pi\omega_1}{RT}\right) \quad (3.26)$$

Y finalmente, el área molar media de la proteína y la adsorción en el estado i -ésimo o distribución de estados en la capa interfacial vienen dados por:

$$\omega_{\Sigma} = \omega_1 \frac{\sum_{i=1}^n i^{(\alpha+1)} \exp\left(-\frac{i\pi\omega_1}{RT}\right)}{\sum_{i=1}^n i^{\alpha} \exp\left(-\frac{i\pi\omega_1}{RT}\right)} \quad (3.27)$$

$$\Gamma_i = \Gamma_{\Sigma} \frac{i^{\alpha} \exp\left(-\frac{(i-1)\pi\omega_1}{RT}\right)}{\sum_{i=1}^n i^{\alpha} \exp\left(-\frac{i\pi\omega_1}{RT}\right)} \quad (3.28)$$

Las ecuaciones 3.24-3.28 describen la adsorción de proteínas con cuatro parámetros independientes: ω_1 , $\omega_{max} = n \omega_1$, a_{el} y b_l . Y se puede ver cómo, según este modelo, para valores de π muy pequeños ($0,1 \text{ mJ/m}^2$), el número de moléculas que ocupan un área máxima es mayor que para el resto de los estados, aunque en la capa adsorbida hay moléculas en todos los estados [Makievski, 1998]. Este número disminuye conforme aumenta la presión interfacial hasta que, para $\pi > 10 \text{ mJ/m}^2$, sólo un número muy pequeño de moléculas ocupan un área interfacial mayor que ω_1 . Teniendo en cuenta esto, la capa

adsorbida en equilibrio se caracteriza por una desnaturalización casi completa de la proteína a baja π , mientras que a alta π , la capa interfacial en equilibrio se caracteriza por moléculas de muy pequeña área molar parcial.

Este primer modelo de adsorción de proteínas se comparará con los datos experimentales en el Capítulo 5. En la referencia [Makievski, 1998] se puede encontrar una descripción detalla del formalismo teórico así como su posterior comparación con datos experimentales de adsorción de proteínas en la interfaz aire-agua. En esta Tesis Doctoral, este modelo será aplicado también a resultados experimentales de adsorción de proteínas en una interfaz aceite-agua. La referencia [Maldonado-Valderrama, 2004b] presenta, por primera vez en la bibliografía, la comparación explícita de una curva teórica de adsorción con la curva experimental correspondiente a la adsorción de proteínas en una interfaz aceite-agua. Este resultado se verá en detalle en el Capítulo 5.

3.2.3 Modelo de Fainerman II

De igual manera que en el modelo dado por las ecuaciones (3.24)-(3.28), el modelo teórico propuesto por Fainerman y col. en la referencia [Fainerman, 2003] supone que moléculas de proteína pueden encontrarse en la capa interfacial en un número dado de estados con diferentes áreas molares que varían entre un valor máximo ω_{max} y uno mínimo ω_{min} . Ahora bien, en este nuevo modelo, las áreas molares de dos estados vecinos difieren entre sí un valor dado por $\Delta\omega=\omega_0$. Este valor es mucho más pequeño que el área molar mínima, que era el incremento $\Delta\omega$ dado por la versión anterior del modelo teórico. Además ω_0 coincide con el área ocupada por un segmento de la molécula de proteína. Así pues, el área ocupada por una molécula

en el estado i -ésimo viene dada ahora por:

$$\omega_i = \omega_1 + (i-1)\omega_0 \quad (3.29)$$

Y el área molar máxima que ocupa una molécula de proteína en la interfaz es ahora:

$$\omega_{\max} = \omega_1 + (n-1)\omega_0; 1 \leq i \leq n; \omega_1 = \omega_{\min} \gg \omega_0 \quad (3.30)$$

Teniendo esto en cuenta y considerando el siguiente cambio de notación para simplificar un poco las ecuaciones:

$$\omega_{\Sigma} \equiv \omega = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i \Gamma_i}{\Gamma} \neq \omega_0; \Gamma_{\Sigma} \equiv \Gamma = \sum_{i=1}^n \Gamma_i \quad (3.31)$$

Se tiene, para los coeficientes de actividad [Fainerman, 2003]:

$$\begin{aligned} \ln f_i^{SH} &= a n_i \theta_0^2; i \geq 1 \\ \ln f_0^{SH} &= a \theta^2 \end{aligned} \quad (3.32)$$

$$\begin{aligned} \ln f_i^{SE} &= 1 - n_i \sum_{j \geq 0} \frac{\theta_j}{n_j} = 1 - \frac{\omega_i}{\omega_0} \theta_0 - \frac{\omega_i}{\omega} \theta; i \geq 1 \\ \ln f_0^{SE} &= 1 - \theta_0 - \frac{\omega_0}{\omega} \theta = \theta \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega} \right) \end{aligned} \quad (3.33)$$

donde $\theta = \Gamma \omega = 1 - \theta_0$ es el recubrimiento total de la proteína en la interfaz y a es un parámetro de interacción intermolecular de tipo Frumkin que se definirá más adelante.

Introduciendo estas expresiones para los coeficientes de actividad en las relaciones generales (3.16) y (3.17) se obtienen la siguiente ecuación de estado y la isoterma de adsorción para cada estado (j) de la proteína adsorbida

$$-\frac{\pi\omega_0}{RT} = \ln(1-\theta) + \theta(1-\omega_0/\omega) + a\theta^2 \quad (3.34)$$

$$b_j c_0 = \frac{\omega\Gamma_j}{(1-\theta)^{\omega_j/\omega}} \exp[-2a(\omega_j/\omega)\theta] \quad (3.35)$$

donde c_0 es la concentración de proteína en el seno de la disolución y b_j la constante de equilibrio de la proteína en el estado j -ésimo. Si se supone aquí que las constantes b_j son iguales para todos los estados accesibles de la proteína, la constante de adsorción de la proteína completa será: $\Sigma b_j = nb_j$. Así se deriva la función de distribución de la adsorción sobre varios estados de la molécula de proteína:

$$\Gamma_j = \Gamma \frac{(1-\theta)^{\frac{\omega_j-\omega_1}{\omega}} \exp\left[2a\theta\frac{\omega_j-\omega_1}{\omega}\right]}{\sum_{i=1}^n (1-\theta)^{\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}} \exp\left[2a\theta\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.36)$$

Y finalmente, introduciendo aquí la ecuación del área molar media de la proteína, ecuación (3.31), se obtiene la siguiente expresión para el área molar media:

$$\omega = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i (1-\theta)^{\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}} \exp\left[2a\theta\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}\right]}{\sum_{i=1}^n (1-\theta)^{\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}} \exp\left[2a\theta\frac{\omega_i-\omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.37)$$

Las ecuaciones (3.34)- (3.37) describen completamente la capa de proteína adsorbida. Es más, de acuerdo con Fainerman y col. este conjunto de ecuaciones proporciona un acuerdo completamente satisfactorio con los datos experimentales, mejorando

substantialmente el alcanzado con el modelo de Fainerman I; ecuaciones (3.24)-(3.28) en la interfaz aire-agua. Este hecho será comprobado a lo largo del Capítulo 5 para la β -caseína en la interfaz aire-agua y en una interfaz aceite-agua.

3.2.4 Región de alto recubrimiento interfacial

Experimentalmente, es un hecho bien conocido que existe una concentración de proteína a partir de la cual, la tensión interfacial de la disolución es constante a pesar de que el recubrimiento interfacial siga aumentando [Fainerman, 2003]. Sin embargo, las dos versiones del modelo teórico explicadas en el apartado anterior predicen un aumento continuado de la presión interfacial conforme aumenta la concentración de la disolución (y la densidad interfacial). El aumento significativo del recubrimiento interfacial, que prácticamente no afecta a la tensión interfacial, se puede explicar debido a la aparición de varios mecanismos en la capa adsorbida. En este sentido, Fainerman y col. han desarrollado formalismos teóricos que consideran una condensación bidimensional (agregación) en la capa interfacial [Fainerman, 1999], la formación de una bicapa de proteína adsorbida [Miller, 2001] y la compresibilidad en el estado de área mínima [Fainerman, 2002]. Estos modelos pueden ser comparados con los resultados experimentales fácilmente y así evaluar la incidencia real de los mecanismos propuestos en la capa interfacial. Veamos muy resumidamente cada uno de ellos.

Condensación bidimensional

Uno de los procesos que pueden tener lugar en la capa interfacial de proteína adsorbida de disoluciones suficientemente concentradas (denotadas por c^*) es una agregación interfacial o condensación bidimensional. Este fenómeno se produciría a partir de un cierto valor

del recubrimiento interfacial $\Gamma_\Sigma = \Gamma^*$. A partir de este valor, el área molar media de las moléculas adsorbidas cambia, puesto que los agregados (denotados por el subíndice a) tendrían entidad cinética independiente. Así pues, en el intervalo de concentración $c > c^*$ la definición de área molar media en esta región (ω^*) debe incluir este concepto:

$$\omega^* = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i \Gamma_i + \omega_a \Gamma_a}{\sum_{i=1}^n \Gamma_i + \Gamma_a} \cong \omega_\Sigma \frac{\Gamma_\Sigma}{\Gamma^*} = \omega_\Sigma \Psi \quad (3.38)$$

Teniendo en cuenta esto, la ecuación de estado y la isoterma de adsorción quedarían para la región $c > c^*$:

$$-\frac{\pi\omega_0}{RT} = \frac{1}{\Psi} \left[\ln(1 - \Gamma\omega) + \Gamma\omega - \Gamma\omega_0 + a(\Gamma\omega)^2 \right] \quad (3.39)$$

$$b_{i,c} = \frac{\Gamma_j \omega}{(1 - \Gamma_\Sigma \omega)^{\omega_j / \omega^\Psi}} \exp \left[-\frac{\omega_j}{\omega^\Psi} (2a\Gamma_\Sigma \omega) \right] \quad (3.40)$$

Para mayor detalle acerca del tratamiento teórico de la condensación bidimensional en la capa de proteína adsorbida se pueden consultar las referencias [Fainerman, 1999; Fainerman, 2003].

Formación de una bicapa

Otro proceso que podría explicar el aumento del recubrimiento interfacial observado sin cambios en la presión interfacial podría ser la formación de una segunda capa de proteína adsorbida bajo la capa interfacial. Puesto que este proceso no afecta a los valores de presión interfacial, las ecuaciones de estado descritas en la región de bajo recubrimiento interfacial son válidas también en esta región. Por el contrario, la isoterma de adsorción sí se ve afectada y para derivarla se

asume que el recubrimiento de la segunda capa es proporcional a la constante de adsorción en equilibrio b_{II} de la segunda capa y al recubrimiento de la capa interfacial. La isoterma de adsorción de la bicapa, para valores de recubrimiento interfacial $\Gamma_{\Sigma} > \Gamma_c$, donde Γ_c es el recubrimiento de la capa interfacial saturada viene dada por:

$$\Gamma_{\Sigma} \omega_1 = \frac{b_I c}{1 + b_I c} \left[1 + \frac{b_{II} c}{1 + b_{II} c} \right] \quad (3.41)$$

De acuerdo con esta ecuación, el recubrimiento interfacial total puede alcanzar valores el doble de altos que aquellos correspondientes a la capa interfacial saturada. Para mayor detalle acerca del tratamiento teórico de la formación de una bicapa proteína adsorbida se pueden consultar las referencias [Miller, 2001; Fainerman, 2003].

Compresibilidad en el estado de área interfacial mínima

Una última posibilidad que describe el aumento del recubrimiento interfacial de disoluciones concentradas independientemente del valor de presión interfacial es la consideración de una compresibilidad intrínseca de las moléculas de proteína en el estado de área mínima. Este mecanismo es consecuencia de las fuerzas de repulsión finitas que actúan entre moléculas cuando la capa interfacial se encuentra en un estado próximo a la saturación. En este caso, se podría admitir que una vez que las moléculas se encuentran en el estado de área mínima, pueden comprimirse de manera que el área molecular presenta una dependencia aproximadamente lineal con la presión interfacial:

$$\omega_1 = \omega_0 (1 - \kappa \pi) \quad (3.42)$$

donde κ es un coeficiente de compresibilidad relativa bidimensional.

Se ha comprobado en la bibliografía que la inclusión de este concepto en el formalismo teórico, apenas afecta a los valores de tensión interfacial. Por el contrario, aparecen pequeñas diferencias en el recubrimiento interfacial siendo la elasticidad límite de Gibbs (ver sección 2.5) la que se ve más afectada por la consideración de este fenómeno [Fainerman, 2002; Fainerman, 2003b; Fainerman, 2004].

La incidencia de estos tres mecanismos en la capa interfacial se puede evaluar ajustando con cada uno de los tres modelos teóricos las curvas experimentales de presión interfacial, recubrimiento interfacial y elasticidad de Gibbs. Todo esto será analizado en detalle en el Capítulo 5 para la capa adsorbida de β -caseína en la interfaz aire-agua y tetradecano-agua.

3.2.5 Obtención de las ecuaciones de Frumkin de adsorción de surfactantes

Al igual que se ha hecho en la sección anterior con el modelo de capa interfacial de proteína adsorbida, la capa adsorbida de surfactantes también se puede describir a partir de las relaciones generales (3.16) y (3.17). En particular, el modelo de Frumkin de adsorción de surfactantes se puede obtener como un caso particular de la teoría de adsorción de proteínas presentada a lo largo de este capítulo haciendo algunas simplificaciones.

Así, el primer paso es encontrar las expresiones correspondientes a los coeficientes de actividad para un sistema monocomponente y que no presenta variación del área interfacial molar ($i=1$). En estas condiciones, las expresiones generales de los coeficientes de actividad (3.19) y (3.20) toman la siguiente forma [Fainerman, 2001]:

$$\begin{aligned}\ln f_1^{SH} &= a(1-\theta^2) \\ \ln f_0^{SH} &= a\theta^2\end{aligned}\quad (3.43)$$

$$\begin{aligned}\ln f_1^{SE} &= a\theta^2 + 1 - \theta \\ \ln f_0^{SE} &= 0\end{aligned}\quad (3.44)$$

Sustituyendo esto en las ecuaciones (3.16) y (3.17) y teniendo en cuenta que la entropía de mezcla de los componentes de la capa interfacial es ideal, es decir $n=1$, se obtienen las ecuaciones de estado y la isoterma de adsorción de Frumkin [Frumkin, 1925]:

$$\begin{aligned}\pi &= -\frac{RT}{\omega_0} [\ln(1-\theta) + a\theta^2] \\ bc &= \frac{\theta}{(1-\theta)} \exp(-2a\theta)\end{aligned}\quad (3.45)$$

Donde c es la concentración de surfactante en la disolución, $b=K/\rho \exp(-a)$, donde $\rho \approx 55.6 \text{ molH}_2\text{O/l}$ (la relación entre la densidad del disolvente, agua, y su peso molecular) y donde $a=-U/RT$, es el parámetro de Frumkin que mide la relación entre la energía de interacción entre moléculas en la capa adsorbida (U) y la energía térmica de las mismas (RT).

3.3 MODELO DE ADSORCIÓN DE SISTEMAS MIXTOS PROTEÍNA/SURFACTANTE EN INTERFACES FLUIDAS

Una vez que la adsorción de proteínas y surfactantes se encuentra bien descrita por el modelo teórico, haciendo un razonamiento completamente similar, los autores han formulado un modelo que describe la adsorción de sistemas mixtos proteína/surfactante no iónico en interfaces fluidas [Miller, 2004b; Fainerman, 2004b]. Así pues, el primer paso es encontrar las

expresiones de los coeficientes de actividad teniendo en cuenta que en estos sistemas también se verifica la no idealidad de la entalpía y de la entropía en la capa interfacial:

$$\begin{aligned}\ln f_0^{SE} &= \theta_p \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega} \right) \\ \ln f_{ip}^{SE} &= \theta_p \left(1 - \frac{\omega_i}{\omega} \right) \\ \ln f_s^{SE} &= 0\end{aligned}\quad (3.47)$$

$$\begin{aligned}\ln f_0^{SH} &= a_p \theta_p^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{ps} \theta_p \theta_s \\ \ln f_{ip}^{SH} &= a_p n_i (1 - \theta_{pi} - \theta_s)^2 + a_{ps}^* \theta_s^2 + (a_p + a_{ps}^* - a_s) (1 - \theta_{pi} - \theta_s) \theta_s \\ \ln f_s^{SH} &= a_s (1 - \theta_p - \theta_s)^2 + a_{ps}^* \theta_p^2 + (a_s + a_{ps}^* - a_p) (1 - \theta_p - \theta_s) \theta_p \\ 2a_{ps} &= a_s + a_p - a_{ps}^*\end{aligned}\quad (3.46)$$

donde los superíndices p y s se refieren a la proteína y al surfactante respectivamente. Además, ω es el área molar media de la proteína, ω_s es el área molar del surfactante, a es un parámetro de interacción de tipo Frumkin (a_p para la proteína, a_s para el surfactante y a_{ps} para el sistema proteína/surfactante), Γ_i es la densidad superficial de la proteína en el estado i -ésimo, $\theta_p = \omega \Gamma = \sum_{i=1}^n \omega_i \Gamma_i$ es el grado de recubrimiento interfacial total de la proteína, $\Gamma = \sum_{i=1}^n \Gamma_i$ es la densidad de adsorción total de la proteína, $\theta_s = \Gamma_s \omega_s$ es el grado de recubrimiento interfacial por el surfactante y Γ_s es la densidad de adsorción de surfactante en la capa interfacial.

Así, introduciendo estas expresiones en las relaciones generales (3.16) y (3.17) se obtiene la ecuación de estado para la capa adsorbida de proteína/surfactante no iónico en el caso más general, suponiendo $\omega_0 \neq \omega_s$:

$$\frac{-\pi(\theta_p \omega_0 + \theta_s \omega_s)}{RT(\theta_p + \theta_s)} = \ln(1 - \theta_p - \theta_s) + \theta_p \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) + a_p \theta_p^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{ps} \theta_p \theta_s \quad (3.48)$$

La isoterma de adsorción para cada estado i de la molécula de proteína en la mezcla de proteína/surfactante viene dada por:

$$b_p c_p = \frac{\omega_1 \Gamma_1}{(\omega_1 / \omega)(1 - \theta_p - \theta_s)^{\omega_1 / \omega}} \exp[-2a_p (\omega_1 / \omega) \theta_p - 2a_{ps} \theta_s] \quad (3.49)$$

Mientras que para la molécula de surfactante viene dada por:

$$b_s c_s = \frac{\theta_s}{(1 - \theta_p - \theta_s)} \exp[-2a_s \theta_s - 2a_{ps} \theta_p] \quad (3.50)$$

Finalmente, la distribución de estados de proteína en la mezcla es igual que la de una capa de proteína y viene dada por:

$$\Gamma_j = \Gamma \frac{(1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_j - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_j - \omega_1}{\omega}\right]}{\sum_{i=1}^n (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.51)$$

teniendo en cuenta esta ecuación, la expresión del área molar media que ocupa la proteína en el sistema interfacial mixto es:

$$\omega = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]}{\sum_{i=1}^n (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.52)$$

Las ecuaciones (3.48)-(3.52) describen completamente la capa interfacial de sistemas mixtos proteína/surfactante no iónico conociendo los parámetros que se obtienen del ajuste de las curvas de adsorción de los componentes puros: ω_0 , ω_s , ω_{max} , ω_{min} , b_p , b_s , a_p y a_s . Así pues, únicamente se tiene como parámetro de ajuste el parámetro

de interacción de tipo Frumkin a_{ps} . Este modelo se aplicará a los datos experimentales de la adsorción de un sistema mixto con el fin de obtener más información acerca de la interacción entre ambos componentes en la capa interfacial formada en equilibrio.

3.4 ELASTICIDAD DE GIBBS DE LA CAPA DE PROTEÍNA ADSORBIDA

La elasticidad de Gibbs o elasticidad límite de una monocapa se define como la elasticidad interfacial medida a una frecuencia de oscilación tal que la tensión interfacial no se ve afectada por procesos de relajación en la escala de tiempo en la que tiene lugar la deformación. En este caso límite, el valor de la elasticidad de la capa interfacial se puede expresar en función de la ecuación de estado del sistema y obtener así una expresión matemática de la misma. Para el caso particular de una capa interfacial de proteína, aplicando la definición de elasticidad en equilibrio a la ecuación de estado dada por la ecuación (3.34) y teniendo en cuenta que en el caso de proteínas se cumple que $\omega_0 \ll \omega$:

$$E_0 = \frac{d\pi}{d \ln \Gamma} = \frac{RT}{\omega_0} \left[\frac{\theta}{1+\theta} - \theta - 2a\theta^2 \right] \left(1 + \frac{d \ln \omega}{d \ln \Gamma} \right) \quad (3.53)$$

Aquí se observa como la dependencia del área interfacial de la proteína con el recubrimiento interfacial afecta significativamente el valor de la elasticidad límite de la capa de proteína adsorbida. A lo largo de todo el formalismo teórico se ha visto como el área interfacial ocupada por la proteína disminuye con el grado de recubrimiento. En particular, en la ecuación (3.36) esto queda reflejado por el factor exponencial $(1-\theta)^{(\omega_j - \omega_0)/\omega}$. Este factor implica que la probabilidad de existencia de una molécula caracterizada por un valor grande de área

interfacial disminuye con el aumento del recubrimiento interfacial. De esta manera, de la ecuación (3.36) se deduce fácilmente que $d\ln\omega/d\ln\Gamma < 0$.

Así pues, la presencia de este término menor que 1 en la ecuación (3.53) hace que se verifique un hecho experimental ampliamente demostrado en la bibliografía que es la menor elasticidad superficial presentada por las películas de proteínas con respecto a la elasticidad superficial de películas de surfactantes de bajo peso molecular [Lucassen-Reynders, 2004]. La referencia [Lucassen-Reynders, 2004] muestra en mayor detalle la aplicación del modelo termodinámico de Fainerman y col. a la elasticidad límite de Gibbs de una capa de proteína adsorbida en la interfaz aire-agua. Una vez más, la aplicación de este modelo teórico a la elasticidad de Gibbs de una capa de proteína adsorbida en la interfaz aceite-agua constituye la principal novedad del tratamiento teórico aplicado a los datos experimentales en este trabajo.

3.5 DINÁMICA DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS EN INTERFACES FLUIDAS

En este último apartado de la presentación del formalismo teórico utilizado en la interpretación de los datos experimentales, se extiende el formalismo al estudio de la dinámica de la adsorción de proteínas. El procedimiento utilizado en la derivación de la ecuación dinámica de la adsorción es completamente similar al utilizado en la obtención de la elasticidad de Gibbs en el apartado anterior. Es decir, se parte de la relación general entre la adsorción dinámica y la concentración subsuperficial propuesta por Ward y Tordai en [Ward, 1946]:

$$\Gamma(t) = 2\sqrt{\frac{D}{3.14}} \left[c_0 \sqrt{t} - \int_0^{\sqrt{t}} c(0, t-t') d(\sqrt{t'}) \right] \quad (3.54)$$

donde c_0 es la concentración de proteína en el seno de la disolución, t es el tiempo, t' es una variable de integración muda y D es el coeficiente de difusión de la proteína. Así, introduciendo en la integral la isoterma de adsorción de la capa de proteína adsorbida (ecuación (3.35)), se obtiene la dependencia de $\Gamma(t)$. Finalmente la curva teórica de la variación de la presión interfacial en función del tiempo ($\pi(t)$) se calcula aplicando la ecuación de estado de la capa de proteína adsorbida (ecuación (3.34)). Este procedimiento se encuentra descrito en detalle y aplicado a la adsorción de β -caseína en la interfaz aire-agua en la referencia [Miller, 2004a]. La principal novedad introducida en este trabajo, es una vez más la aplicación de este formalismo teórico a la dinámica de la adsorción de una proteína en una interfaz aceite-agua, tal y como se verá en el Capítulo 5.

3.6 RESOLUCIÓN NUMÉRICA DE LOS MODELOS DE ADSORCIÓN EN INTERFACES FLUIDAS

A lo largo de los Capítulos 5 y 6 se presentan los resultados experimentales obtenidos en este trabajo junto a las curvas teóricas proporcionadas por la aplicación del modelo teórico presentado en los apartados anteriores. Los programas que resuelven las ecuaciones que describen la elasticidad de Gibbs (que incluye las tres aproximaciones de la capa interfacial saturada) y la dinámica de la adsorción han sido realizados por el Dr. Eugene Akseneko del *Institute of Colloid Chemistry and Chemistry of Water, Kiev, Ucraina* y suministrados para su utilización en el ajuste de los datos experimentales por el Dr. Reinhard Miller del *Max Planck Institut für Kolloid und*

Grenzflächenforschung, Golm, Alemania. Los programas que resuelven las ecuaciones de adsorción de proteínas, surfactantes y sistemas mixtos han sido implementados y realizados en la Universidad de Granada y constituyen uno de los logros de esta Tesis Doctoral. Este apartado tiene como objetivo describir los programas de ordenador elaborados en lenguaje C++ para resolver numéricamente los sistemas de ecuaciones que describen la adsorción de proteínas, la adsorción de surfactantes (modelo de Frumkin) y la adsorción de sistemas mixtos en interfaces líquido-fluido. Veamos cada uno de ellos por separado.

3.6.1 Resolución numérica del modelo teórico de adsorción de proteínas en interfaces fluidas

En este apartado se presenta la resolución numérica del sistema de ecuaciones 3.24-3.28 que describen la capa de proteína adsorbida en una interfaz fluida. Para facilitar la comprensión, a continuación se repite el conjunto de ecuaciones que se va a resolver con el programa:

$$\pi = -\frac{RT}{\omega_{\Sigma}} \left[\ln(1 - \Gamma_{\Sigma} \omega_{\Sigma}) - a_{el} \Gamma_{\Sigma}^2 \omega_{\Sigma}^2 \right] \quad (3.24)$$

$$b_1 c = \frac{\Gamma_1 \omega_{\Sigma}}{(1 - \Gamma_{\Sigma} \omega_{\Sigma})^{\omega_1 / \omega_{\Sigma}}} \quad (3.25)$$

$$\Gamma_{\Sigma} = \Gamma_1 \sum_{i=1}^n i^{(\alpha+1)} \exp\left((i-1) \frac{\omega_1}{\omega_{\Sigma}} \right) \exp\left(-\frac{(i-1)\pi\omega_1}{RT} \right) \quad (3.26)$$

$$\omega_{\Sigma} = \omega_1 \frac{\sum_{i=1}^n i^{(\alpha+1)} \exp\left(-\frac{i\pi\omega_1}{RT} \right)}{\sum_{i=1}^n i^{\alpha} \exp\left(-\frac{i\pi\omega_1}{RT} \right)} \quad (3.27)$$

De acuerdo con estas expresiones se puede calcular la concentración de proteína en equilibrio con la película de proteína adsorbida sobre la interfaz para cada valor de presión interfacial, lo que se corresponde con la curva experimental $\pi(c)$ que se quiere ajustar. Los parámetros de entrada son entrada n , α , ω_l , b ,

El procedimiento seguido es en primer lugar el cálculo de ω_Σ con la ecuación (3.27) y los parámetros de entrada n , α y ω_l . Una vez conocido este valor, ya se puede calcular Γ_Σ con la ecuación (3.26). Ahora bien, el cálculo Γ_Σ no es directo, sino que para su obtención se ha utilizado un método iterativo de resolución de la ecuación (3.26) escrita en la siguiente forma:

$$\Gamma_\Sigma = \frac{1}{\omega_\Sigma} \left[1 - \exp \left(a_{el} \Gamma_\Sigma^2 \omega_\Sigma^2 - \frac{\pi \omega_\Sigma^2}{RT} \right) \right] \quad (3.55)$$

y que consta de las siguientes etapas:

1. El punto de partida es proponer un valor inicial para la adsorción total, que denominaremos $\Gamma_\Sigma^{entrada}$. En nuestro caso el valor elegido en todos los cálculos es $\Gamma_\Sigma^{entrada} = 0.0001 \text{ mg/m}^2$.
2. La solución $\Gamma_\Sigma^{entrada}$ se introduce en la expresión (3.55) y se obtiene como resultado una nueva solución Γ_Σ^{salida} .
3. *Ecuación de mezcla.* Dado que inicialmente el valor de salida diferirá en gran medida del de entrada, se considera que el problema tiene una solución única, cuando la diferencia entre el valor de entrada y salida sea despreciable. Con este fin, es necesario repetir el proceso ii) de manera iterativa introduciendo los valores de salida de la ecuación (3.55) como datos de entrada hasta que la diferencia entre ambas funciones sea menor que un número muy pequeño. Por otro lado si la diferencia $\Gamma_\Sigma^{salida} - \Gamma_\Sigma^{entrada}$ es muy grande, es posible que la presencia de singularidades haga que el proceso pueda “saltarse” la

solución real del sistema y que en lugar de acercarse a ella, se aleje cada vez más y haga que el programa no finalice nunca. Una manera de evitar esto es crear una función que sea mezcla de ambas, Γ_{Σ}^{mezcla} y es ésta última la que se propone como nueva solución a la ecuación. Para ello se define previamente un parámetro de mezcla λ que toma valores comprendidos entre 0 y 1. Mediante esta magnitud se ajusta el peso de una determinada solución con objeto de que la nueva función de entrada no difiera en gran medida de la anterior:

$$\Gamma_{\Sigma}^{mezcla} = \lambda\Gamma_{\Sigma}^{salida} + (1-\lambda)\Gamma_{\Sigma}^{entrada} \quad (3.56)$$

De este modo el proceso ii) se repite hasta que la función de mezcla introducida en la ecuación (3.55) difiera muy poco de la solución obtenida a partir de ella.

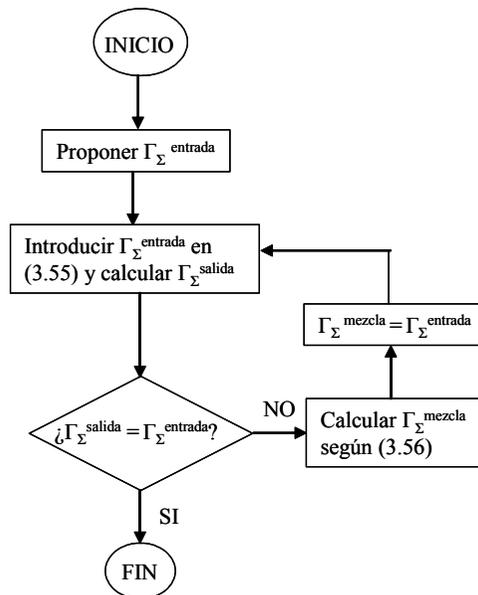


Figura 3. 2: Diagrama de flujo del programa que resuelve la ecuación 3.55.

La Figura 3.2 muestra un diagrama de flujo en el que se representa de manera esquemática como se ha implementado este proceso iterativo para la resolución de la ecuación (3.55).

Una vez obtenido el valor de Γ_Σ , éste es utilizado junto con ω_Σ en el cálculo de Γ_l con la ecuación 3.26. Finalmente, la ecuación 3.24 proporciona la concentración correspondiente a la presión interfacial dada y se obtiene la pareja de valores π - c teórica que se puede comparar directamente con los datos experimentales.

3.6.2 Resolución numérica del modelo teórico de adsorción de surfactantes en interfaces fluidas: Modelo de Frumkin

Al igual que se ha hecho en la descripción del programa de ajuste de los datos de adsorción de proteínas en el apartado anterior, se recuerdan a continuación el sistema de ecuaciones que constituye el Modelo de Frumkin y que se tratará de resolver:

$$\begin{aligned} \pi &= -\frac{RT}{\omega_s} \left[\ln(1 - \theta_s) + a_s \theta_s^2 \right] = \frac{RT}{\omega_s} \left[\ln(1 - \Gamma_s \omega_s) + a_s \Gamma_s^2 \omega_s^2 \right] \\ b_s c &= \frac{\theta_s}{(1 - \theta_s)} \exp(-2a_s \theta_s) = \frac{\Gamma_s \omega_s}{(1 - \Gamma_s \omega_s)} \exp(-2a_s \Gamma_s \omega_s) \end{aligned} \quad (3.45)$$

donde el subíndice s indica que las ecuaciones se refieren la adsorción de un surfactante puro y donde además se ha tenido en cuenta que se cumple que $\theta_s = \omega_s \Gamma_s$.

Este conjunto de ecuaciones es mucho más sencillo que el anterior y el procedimiento utilizado en la elaboración del programa es completamente análogo al descrito previamente. En este caso, los datos de entrada son ω_s , b_s y a_s . Se trata en primer lugar de obtener el valor de la densidad de adsorción interfacial Γ_s en la primera ecuación del conjunto (3.45) (la ecuación de estado) y sustituir este dato en la

segunda para así tener la curva teórica de $\pi(c)$ que se pueda comparar directamente con los datos experimentales.

El procedimiento escogido para realizar el primer cálculo es también un método iterativo de resolución de la ecuación (3.45a) rescrita en la siguiente forma:

$$\Gamma_s = \frac{1}{\omega_s} \left[1 - \exp \left(\frac{\omega_s \pi}{RT} - a_s \Gamma_s^2 \omega_s^2 \right) \right] \quad (3.57)$$

Así pues, el método iterativo consta de tres etapas completamente análogas a los pasos i), ii) y iii) descritos en el apartado anterior. En este caso, el valor de entrada propuesto en la ecuación (3.57) es $\Gamma_s^{entrada} = 0.001 \text{ mg/m}^2$. Con este valor, la solución de la ecuación (3.57) es Γ_s^{salida} que se compara con el valor inicial $\Gamma_s^{entrada}$. La ecuación de mezcla (3.56) se usa de manera iterativa en sucesivos cálculos de $\Gamma_s^{entrada}$ y Γ_s^{salida} en la ecuación (3.57) hasta que la diferencia entre ambas magnitudes es menor que 10^{-12} . Esta solución es la que se introduce en la isoterma de adsorción para resolver el sistema de ecuaciones (3.45).

3.6.3 Resolución numérica del modelo teórico de adsorción de sistemas mixtos proteínas/surfactante no iónico

En este último apartado se describe el programa realizado para la resolución del sistema de ecuaciones (3.48)- (3.52) referente a la adsorción de sistemas mixtos que se recuerdan a continuación:

$$\frac{-\pi(\theta_p \omega_0 + \theta_s \omega_s)}{RT(\theta_p + \theta_s)} = \ln(1 - \theta_p - \theta_s) + \theta_p \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega} \right) + a_p \theta_p^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{ps} \theta_p \theta_s \quad (3.48)$$

$$b_p c_p = \frac{\omega_1 \Gamma_1}{(\omega_1 / \omega)(1 - \theta_p - \theta_s)^{\omega_1 / \omega}} \exp \left[-2a_p (\omega_1 / \omega) \theta_p - 2a_{ps} \theta_s \right] \quad (3.49)$$

$$b_s c_s = \frac{\theta_s}{(1 - \theta_p - \theta_s)} \exp[-2a_s \theta_s - 2a_{ps} \theta_p] \quad (3.50)$$

$$\omega = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_j - \omega_i}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_j - \omega_i}{\omega}\right]}{\sum_{i=1}^n (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.52)$$

Donde la expresión de la adsorción en el primer estado (Γ_1) viene dada por [Fainerman, 2004b]:

$$\Gamma_1 \omega = \frac{\theta_p}{\sum_{i=1}^n (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]} \quad (3.58)$$

Como se verá en el Capítulo 6, los experimentos realizados consisten en el estudio de la adsorción de un sistema mixto compuesto por una concentración fija de proteína, c_p conocida y constante en todo el proceso de adsorción y se varía la concentración de surfactante en la disolución. De esta manera, la presión interfacial inicial de una disolución sin surfactante no es nula puesto que contiene una cierta concentración de proteína. En concreto, el sistema de ecuaciones se ha resuelto para presiones interfaciales mayores de 20 mJ/m². Además, en este sistema de ecuaciones los parámetros de entrada, conocidos por los ajustes previos de los sistemas puros, son: ω_0 , ω_s , ω_{max} , ω_{min} , b_p , b_s , a_p y a_s . El único parámetro de ajuste del sistema es el parámetro a_{ps} que proporciona información acerca del grado de interacción entre proteína y surfactante.

Para resolver este sistema de ecuaciones se ha hecho uso de un razonamiento completamente análogo al de los dos casos anteriores. Es decir, se proponen soluciones iniciales a las ecuaciones y se resuelven de manera iterativa haciendo uso de ecuaciones de mezcla

hasta alcanzar un conjunto de soluciones que resuelvan el sistema. El programa tiene como valor de entrada la presión interfacial y las incógnitas son: ω , θ_p , θ_s y c_s así pues se tiene un sistema de ecuaciones de cuatro ecuaciones trascendentes con cuatro incógnitas. Para resolverlo se ha seguido el siguiente algoritmo:

1. Introducir unos valores de entrada: $\omega^{entrada} = (\omega_{max} + \omega_{min})/2$, $\theta_p^{entrada}$ y $\theta_s^{entrada}$.

2. Calcular ω con estos valores y la ecuación (3.52)

3. Comparar el valor obtenido en el paso 2 con el valor de $\omega^{entrada}$ propuesto y realizar el método iterativo aplicando la siguiente ecuación de mezcla hasta que la diferencia entre el valor de entrada y salida (ω^{salida}) sea mínima:

$$\omega^{mezcla} = \lambda \omega^{salida} + (1 - \lambda) \omega^{entrada} \quad (3.59)$$

Denotaremos al valor de ω obtenido finalmente en este paso como ω_3 .

4. Calcular θ_s con los valores ω_3 , $\theta_p^{entrada}$ y $\theta_s^{entrada}$ en la ecuación (3.49) escrita en la forma:

$$\theta_s = 1 - \theta_p - \left[\frac{\theta_p \exp(-2a_p (\omega_1 / \omega) \theta_p - 2a_{ps} \theta_s)}{b_p c_p \sum_{i=1}^n (1 - \theta_p - \theta_s)^{\frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}} \exp\left[2a_p \theta_p \frac{\omega_i - \omega_1}{\omega}\right]} \right]^{\omega / \omega_1} \quad (3.60)$$

5. Comparar el valor obtenido en el paso 4 para θ_s con el valor de $\theta_s^{entrada}$ propuesto en el paso 1 y realizar el método iterativo aplicando la siguiente ecuación de mezcla hasta que la diferencia entre el valor de entrada y salida (θ_s^{salida}) sea muy pequeña:

$$\theta_s^{mezcla} = \lambda \theta_s^{salida} + (1 - \lambda) \theta_s^{entrada} \quad (3.61)$$

Denotaremos al valor de θ_s obtenido en este paso como θ_{s5}

6. Para un valor dado de π , calcular θ_p con los valores ω_3 , θ_{s5} y $\theta_p^{entrada}$ en la ecuación (3.48) escrita en la forma:

$$\theta_p = 1 - \theta_s - \exp\left[\frac{-\pi(\theta_p\omega_0 + \theta_s\omega_s)}{RT(\theta_p + \theta_s)} - \theta_p\left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) - a_p\theta_p^2 - a_s\theta_s^2 - 2a_{ps}\theta_p\theta_s\right] \quad (3.62)$$

7. Comparar el valor obtenido en el paso 6 para θ_p con el valor de $\theta_p^{entrada}$ propuesto en el paso 1 y realizar el método iterativo aplicando la siguiente ecuación de mezcla hasta que la diferencia entre el valor de entrada y salida (θ_p^{salida}) sea muy pequeña:

$$\theta_p^{mezcla} = \lambda\theta_p^{salida} + (1 - \lambda)\theta_p^{entrada} \quad (3.63)$$

Denotaremos al valor de θ_p obtenido en este paso como θ_{p7}

8. Con el nuevo trío de valores ω_3 , θ_{s5} y θ_{p7} , repetir los pasos 2-7 y obtener otro trío de soluciones ω'_3 , θ'_{s5} y θ'_{p7} . Estas nuevas soluciones son a su vez comparadas con las anteriores y mediante tres nuevas ecuaciones de mezcla, se volverá a proponer tres nuevas soluciones. Este proceso se repetirá hasta que las tres soluciones converjan al mismo tiempo para un valor fijo de π (ver Figura 3.3).

9. Con estas soluciones, calcular c_s con la ecuación (3.50) escrita en la siguiente forma:

$$c_s = \frac{\theta_s}{b_s(1 - \theta_p - \theta_s)} \exp[-2a_s\theta_s - 2a_{ps}\theta_p] \quad (3.64)$$

Este proceso se realiza para cada valor de la presión interfacial, y se obtiene finalmente la curva teórica de $\pi(c_s)$. Dada la cantidad de veces que ha de resolverse cada ecuación trascendente, se usaron diferentes parámetros de mezcla a lo largo del programa con el fin de optimizar el proceso de convergencia.

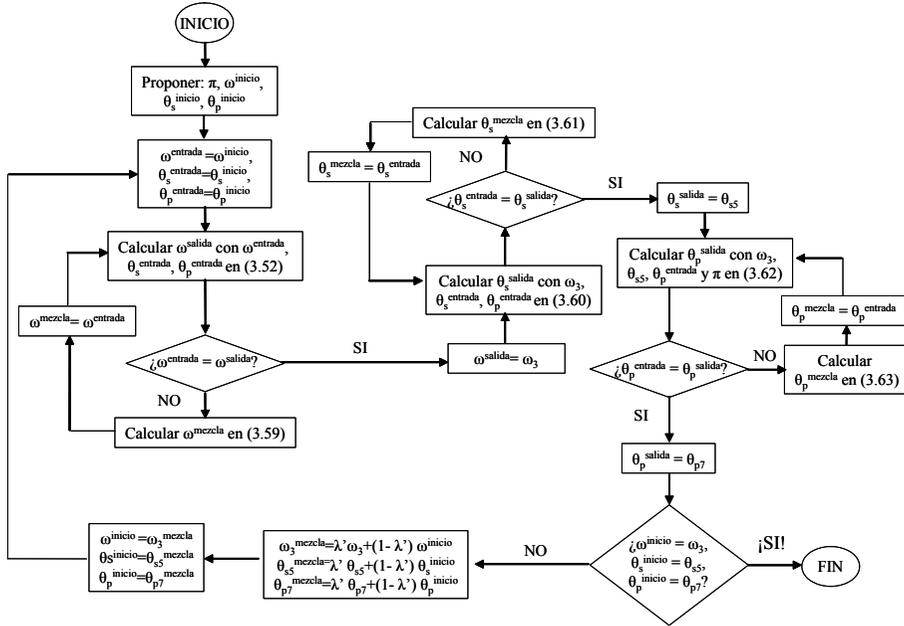


Figura 3.3: Algoritmo diseñado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones (3.52), (3.60) y (3.62).

Además del cálculo de la isoterma de presión interfacial, este formalismo teórico permite obtener información acerca de cómo varía el grado de recubrimiento interfacial de proteína al aumentar la concentración surfactante en la disolución, que sería la curva $\theta_p(c_s)$. Asimismo, se obtiene la adsorción del surfactante, así como la variación del área interfacial media ocupada por la proteína por la llegada de surfactante a la interfaz, $\omega(c_s)$. Todo esto se verá en mayor detalle para un caso particular en el Capítulo 6.

Capítulo 4

SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo de este capítulo es la descripción de cada uno de los sistemas experimentales utilizados en este trabajo; tanto los materiales como los dispositivos experimentales. En este sentido, el capítulo se divide en dos secciones. En primer lugar, se describen las proteínas y tensioactivos utilizados así como la fase oleosa elegida en la caracterización en la interfaz líquido-líquido. En esta misma sección, también se describen los protocolos de limpieza y de preparación de las disoluciones. Estos protocolos, constituyen factores clave en el estudio de fenómenos interfaciales debido a la sensibilidad de estos sistemas a la presencia de contaminantes. En segundo lugar, se presentan brevemente todos los dispositivos y técnicas experimentales utilizados en este trabajo de investigación para realizar la caracterización interfacial planteada.

4.2.- MATERIALES

4.2.1 Emulsionantes

Caseinato

El papel de la leche en la naturaleza consiste básicamente en nutrir y proporcionar protección inmunológica al neonato [Horne, 2002; Tuinier, 2002; McMahan, 1998]. La leche constituye una fuente nutricional básica en el desarrollo del mamífero. 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, gases y vitaminas. A la hora de analizar las propiedades de la leche, la estructura física que presenta es tan importante como su composición. La leche es un fluido

complejo en que los glóbulos de grasa y las micelas de caseinato se encuentran dispersos en un suero acuoso que contiene proteínas solubles, lactosa y sales. Si uno mira la leche al microscopio de pocos aumentos, observará un líquido turbio y uniforme. A 500 aumentos se observan gotas esféricas de grasa. A 50000 aumentos, se observan micelas de caseinato.

Tabla 4.I: Composición del caseinato [Benjamins, 2001; Turhan, 2003].

Monómero	% en el caseinato	Peso molecular	Punto Isoeléctrico	Carga a pH 6.6	Estructura
α_1 -caseína	38.5	23 kDa	4.93	-21.8	α hélice y β - <i>sheet</i>
α_2 -caseína	10	24 kDa	5.34	-14.7	α hélice y β - <i>sheet</i> , puentes disulfuro
β -caseína	35.8	24 kDa	5.24	-12.3	α hélice y β - <i>sheet</i>
κ -caseína	12.7	19 kDa	5,76	-2.5	α hélice, β - <i>sheet</i> , puentes disulfuro

El caseinato (o las caseínas) constituye el 80 % de las proteínas de la leche. Las caseínas son un heterogéneo grupo de fosfoproteínas entre las que se distinguen cuatro tipos de monómeros: α_{s1} y α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína. El caseinato contiene todos ellos en las proporciones que se indican en la Tabla 4.I. Estos monómeros se encuentran en la leche formando agregados, que se denominan micelas de caseinato. La estructura de estas micelas aún presenta interrogantes y existen varios modelos propuestos en la bibliografía

[Horne, 2002; McMahon, 1998]. Su función biológica es extremadamente importante desde un punto de vista nutricional. Son las responsables del transporte de fosfato de calcio (CaP) al neonato [Horne, 2002; McMahon, 1998; Tuinier, 2002]. El fosfato cálcico precipita debido a la falta de solubilidad que presentan estos minerales. En la leche, las caseínas se encuentran recubriendo núcleos de fosfato cálcico formando complejos que se asocian entre sí formando micelas. Como consecuencia, las micelas de caseinato previenen la calcificación de las glándulas mamarias y permiten el transporte de gran cantidad de minerales al neonato. Las micelas son polidispersas en tamaño y presentan un radio medio de 100 nm [Tuinier, 2002].

Las caseínas presentan una estructura extremadamente flexible y en consecuencia una estructura abierta en disolución. Esta flexibilidad estructural las hace muy resistentes a cambios estructurales a los que se adaptan fácilmente sin romper su estructura y esto contribuye a su utilización en la estabilización de productos alimentarios. Por ejemplo, las caseínas soportan largos periodos de ebullición sin ver alterada su solubilidad. También producen disoluciones con altos valores de viscosidad. Además, presentan unas propiedades de fusión únicas que constituyen la base de la fusión de quesos. Por todo ello su uso en la producción de productos lácteos es generalizado.

El caseinato utilizado en este trabajo ha sido suministrado por SIGMA-ALDRICH y utilizado sin purificación adicional.

β -caseína

Gran parte del estudio planteado en este trabajo se realiza con uno de los monómeros que componen el caseinato: la β -caseína. La β -caseína representa el 25% de las proteínas lácteas y debido a su gran

capacidad emulsificante ha sido muy estudiada en la bibliografía [Dickinson, 1999].

Desde el punto de vista de la física de polímeros, la β -caseína es un polielectrolito flexible y lineal con peso molecular no demasiado alto. Sus principales propiedades se resumen en la Tabla 4.II. La β -caseína consiste básicamente en una serie de secuencias alternas hidrófobas e hidrófilas de una longitud total de 720 Å extendidas. Está formada por 209 aminoácidos que se distribuyen en la cadena de polipéptido de una manera irregular. Los primeros 50 residuos de aminoácidos contienen una carga negativa neta a pH 7, haciendo esta parte de la molécula hidrófila. El resto de la molécula contiene básicamente residuos neutros que confieren un carácter hidrófobo al resto de la molécula. Como resultado, la β -caseína es la más hidrófoba de las variantes del caseinato y además posee un marcado carácter anfifílico. Como consecuencia de esta estructura, la β -caseína se comporta como un copolímero dibloque superficialmente muy activo capaz de formar micelas prácticamente esféricas por encima de una cierta concentración crítica [Leclerc, 1997]. Estas micelas tienen un radio externo de 13.5 nm y uno interno de 7 nm. Respecto al monómero de β -caseína, presenta en disolución una estructura de ovillo estadístico altamente extendida y con un radio de giro de 4.6 nm.

La β -caseína utilizada en este trabajo es de origen bovino (90% por electroforesis) y ha sido suministrada por SIGMA-ALDRICH y utilizada sin purificación adicional. El uso de esta fracción del caseinato permite realizar un estudio sistemático de la proteína como sistema modelo. La utilización de una proteína modelo, purificada y con propiedades definidas y homogéneas, como es la β -caseína, permite y facilita la aplicación de un modelo teórico a los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 4.II: Propiedades estructurales de la β -caseína [Damodaran, 1998; Cascao-Pereira, 2003; Benjamins, 2001]

Peso molecular	23980 Dalton
Numero de aminoácidos	209
α -hélices	10 %
β -sheet	13-16%
Puentes disulfuro	Ninguno
Punto isoelectrico	pH = 5.26
Hidrofobicidad media	5.58 KJ/residuo
Densidad de grupos no polares	1.534 grupos/molec
Densidad de grupos polares	0.903 grupos/molec
Unidad de carga elemental por partícula a pH 7	Z = -13
Radio de giro	4.6 nm

Tween 20-Polisorbato 20

El tensioactivo utilizado en este trabajo se conoce genéricamente como tween 20. Ha sido suministrado por SIGMA-ALDRICH y utilizado sin purificación adicional. También se denomina: polioxietilen sorbitán monolaurato ó polietilenglicol sorbitán monolaurato. Sus nombres genéricos son: tween 20 o polisorbato 20. Su fórmula química se encuentra representada en la Figura 4.1.

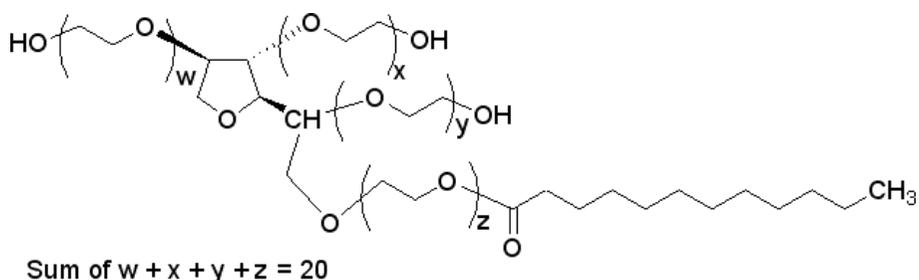


Figura 4.1: Fórmula química del tween 20 (C_{12} -sorbitán- E_{20})

Tabla 4.III: Propiedades físicas del tween 20 [SIGMA-ALDRICH]

Composición química	$C_{58}H_{114}O_{26}$
Peso molecular	1228 g/mol
Densidad	1.1 g/ml
Viscosidad (25°C)	370-430 cps
HLB ¹	16.7
Índice de refracción	1.4685

Se trata de un tensioactivo no iónico, soluble en agua y que se presenta en forma de líquido viscoso amarillento. Sus propiedades físicas se encuentran detalladas en la Tabla 4.III. El tween 20 pertenece a la familia de los polisorbatos. Se trata de un derivado del sorbitol que se obtiene de varios tipos de fruta. Presenta multitud de aplicaciones en varios campos. Se utiliza como detergente con aplicaciones bioquímicas. Asimismo, se utiliza como recubrimiento en la impresión fotográfica. Su capacidad emulsionante lo hace un importante componente en la industria farmacéutica. Finalmente, se utiliza como aditivo alimentario, no tóxico según la directiva

¹ HLB (Hydrophilic-Lipofilic Balance): Relación de la tendencia hidrófila o lipófila de un tensioactivo.

67//548/EC. En particular, se encuentra en la composición de aderezos de ensalada y en la fabricación de glaseados y cremas lácteas [Stauffer, 1999].

4.2.2 Disolventes

Subfase acuosa

La subfase acuosa usada en todos los experimentos realizados en este trabajo es única. Se trata de una disolución tampón TRIS obtenida mezclando 6.61 g/l de Trizma® hydrochloride y 0.97 g/l de Trizma® base en agua ultrapura bidestilada de un dispositivo MilliQ (0.054 μ S). Con el fin de evitar la contaminación microbiana se añaden asimismo a la disolución tampón, 0.5 g/l de NaN_3 . Todos los componentes son de grado *purísimo*, suministrados por SIGMA-ALDRICH y utilizados sin purificación adicional. La disolución acuosa posee un pH final de 7.4 y una fuerza iónica de 0.05 M. Esta subfase acuosa se ha utilizado para todas las experiencias: para la caracterización interfacial, para las películas líquidas, para la formación de espumas y para la preparación de emulsiones. De esta manera, las condiciones de trabajo son siempre las mismas con fin de realizar la correcta interpretación de los datos experimentales en busca de la posible interconexión de los diferentes fenómenos estudiados.

Subfase oleosa

Las fases oleosas mayoritariamente elegidas en estudios emulsionantes en interfaces líquido-líquido pertenecen a la familia de los alcanos. Los alcanos son hidrocarburos que contienen únicamente enlaces covalentes simples y su fórmula genérica es $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. Los alcanos poseen una simetría tridimensional, en la que cada átomo de carbono está rodeado por cuatro hidrógenos formando un tetraedro.

Poseen las propiedades físicas encontradas en los hidrocarburos; son moléculas no polares, insolubles y menos densas que el agua. Asimismo, poseen un bajo punto de fusión y un bajo punto de ebullición, aumentando estas últimas propiedades con la longitud de la cadena hidrocarbonada [Hardy, 2005].

Tabla 4.IV: Propiedades del n-tetradecano [Birdi, 1997]

Fórmula química	C ₁₄ H ₃₀
Peso molecular	198.3 g/mol
Densidad	0.7628 g/ml
Punto de fusión	5.50 °C
Punto de ebullición	252.50 °C
Tensión superficial (25°C)	25,6 mJ/m ²
Tensión interfacial (25°C)	52,8 mJ/m ²

El alcano elegido en este estudio es n-tetradecano (99+%) y sus propiedades se resumen en la Tabla 4.IV [Birdi, 1997]. El n-tetradecano ha sido suministrado por ALDRICH y sometido a un protocolo de limpieza con el fin de eliminar las impurezas superficialmente activas que pudiese contener [Goebel, 1997]. El procedimiento de purificación se resume a continuación. Se realiza una mezcla de 10 ml de n-tetradecano y 2,5 g de resinas de cromatografía Florisil® 60-100 mesh y se somete a una agitación mecánica durante tres horas. La mezcla resultante es centrifugada y posteriormente filtrada con membranas de PTFE y 0,2 µm de tamaño de poro y almacenada en un recipiente de vidrio limpio con el procedimiento detallado en el apartado siguiente. Incluso tras este procedimiento de purificación, se observa que el tetradecano contiene

un bajo nivel de impurezas superficialmente activas, que reducen la tensión interfacial aproximadamente 1 mJ/m^2 durante un periodo de 24 horas. En cualquier caso, se ha comprobado que en estas condiciones, la actividad interfacial de la proteína usada, impera sobre los efectos de estas impurezas en los resultados experimentales [Murray, 1996; Beverung, 1999]

4.2.3 Limpieza y preparación de experiencias

Todos los utensilios de vidrio utilizados en todos los experimentos se limpian siguiendo el siguiente protocolo. En primer lugar, se mantienen llenos de ácido sulfúrico durante al menos 10 horas. A continuación, se enjuagan repetidamente con agua destilada y se secan con nitrógeno Alfacaz®. Solamente la limpieza del vidrio fritado, presente en la balanza de películas y en la columna de espumas se realiza de otra manera debido a los requisitos específicos de este material. El vidrio fritado se dispone, en primer lugar, en una disolución jabonosa y se mantiene a 90°C durante 3 horas. A continuación se enjuaga minuciosamente con agua destilada haciendo uso de un extractor. Una vez eliminados todos los restos de jabón, la célula de vidrio fritado se introduce en una mezcla de 1 ml de amoníaco (NH_3) y 4 ml de peróxido (H_2O_2). Ésta se mantiene en ebullición durante 30 minutos. Finalmente se vuelve a enjuagar la célula de vidrio copiosamente con agua destilada, con el extractor de agua.

Para la preparación de disoluciones se utiliza siempre agua ultrapura bidestilada de un dispositivo Milli-Q ($0.054 \mu\text{S}$). Las disoluciones de proteína se preparan justo antes de cada experimento para evitar procesos de degradación de la proteína y son filtradas con membranas de PTFE $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Antes de comenzar

cada experimento de caracterización interfacial y con el fin de verificar la ausencia de sustancias superficialmente activas, se comprueban los valores de tensión superficial e interfacial de la interfaz limpia, es decir, de la disolución acuosa usada, obteniendo valores comprendidos entre 72 y 73 mJ/m² para la interfaz aire-agua y entre 51 y 53 mJ/m² para la interfaz tetradecano-agua.

Todos los experimentos se han realizado a una temperatura constante de 23°C y se comprueba la reproducibilidad de los resultados experimentales mediante repetición de los experimentos completos.

4.3.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES

4.3.1 Balanza de Gota Pendiente

Tensión interfacial

El dispositivo experimental que ha sido utilizado para la realización de las medidas de tensión interfacial es una balanza de tipo Langmuir de Gota Pendiente que ha sido diseñado en el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides de la Universidad de Granada y que se encuentra descrita en detalle en [Cabrerizo-Vílchez, 1999]. En la Figura 4.2 se presenta un esquema del dispositivo experimental y a continuación se detalla brevemente su funcionamiento.

Con el fin de minimizar las posibles vibraciones que producirían imágenes movidas que dificulten la detección del perfil, el laboratorio se encuentra en un sótano y todo el dispositivo descansa sobre una mesa óptica antivibratoria. Asimismo el laboratorio se encuentra en condiciones de extrema limpieza y con un adecuado sistema de ventilación para purificar y renovar el ambiente [Wege, 2002]. La gota se encuentra en una cubeta de espectrofotómetro

(Hellma 110-OS), a su vez alojada en una célula termostatorada de aluminio, que proporciona una atmósfera saturada de vapor del líquido y aísla el sistema de la posible contaminación y de oscilaciones externas.

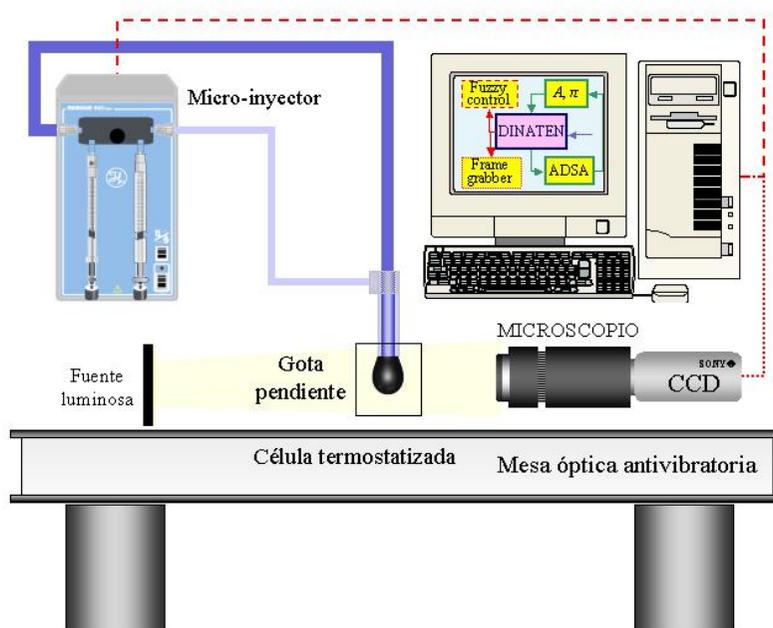


Figura 4.2: Esquema de la Balanza de Gota Pendiente.

Las gotas se forman en el extremo del capilar externo de un conjunto de dos capilares coaxiales conectados a dos jeringas de un microinyector (modelo Microlab 500 de Hamilton) mediante una pieza que permite un funcionamiento independiente de los mismos [Cabrerizo-Vílchez, 1999; Cabrerizo-Vílchez, 1998; Wege, 2002;].

Dadas las dimensiones de la gota, un microscopio se encuentra acoplado a la cámara CCD (Charge Couple Device) que captura las imágenes. La interfaz se ilumina por contraste mediante una fuente

luminosa plana y homogénea (Dolan Jenner QVABL). La señal de vídeo de la imagen (eléctrica analógica) se digitaliza por medio de una tarjeta digitalizadora de vídeo insertada en el ordenador conectado a dicha cámara. El proceso de detección proporciona, así, un conjunto ordenado de puntos del perfil de la gota que representa a la interfaz. Ahora bien, puesto que las coordenadas de cada punto están expresadas en *píxeles* es necesaria la aplicación de un calibrado que proporcione finalmente las coordenadas físicas del perfil. El proceso de calibrado consta de una rejilla cuadradas de 0.25 mm de lado, que corrige las posibles aberraciones geométricas y proporciona la transformación geométrica entre píxel y unidad de longitud. Tras aplicar el calibrado, se obtienen las coordenadas físicas del perfil debidamente alineado con respecto a la vertical. La curva generatriz, que se obtiene de la superposición de las mitades, guarda toda la información de la interfaz. Haciendo uso de la técnica ADSA-P, que se encuentra descrita brevemente en el apéndice II, el programa informático determina la curva laplaciana que mejor se ajuste al perfil experimental detectado. A partir de ésta, el programa calcula y proporciona los valores de área y tensión superficial de la gota analizada.

Los programas informáticos de captura, procesado y cálculo: Dinaten[®] y Contacto[®] han sido diseñadas por el profesor de la Universidad de Granada, Juan Antonio Holgado Terriza [Holgado-Terriza, 2002].

Las medidas de adsorción se realizan manteniendo el área interfacial constante. En el caso de la interfaz aire-agua, este valor es de 28 mm² mientras que en la interfaz aceite-agua es de 35 mm². Las isotermas $\pi(A)$ se generan modificando el volumen de la gota, mediante inyección o extracción de volumen con el capilar interno de

manera controlada y midiendo simultáneamente tensión y área interfacial [Wege 2002].

Técnica de obtención de monocapas de proteína

La puesta a punto de un método de obtención de monocapas depositadas sobre la superficie de la gota pendiente constituye uno de los principales avances conseguidos en esta Tesis Doctoral y se encuentra descrito en las referencias [Maldonado-Valderrama, 2003; Maldonado-Valderrama, 2004a]. Las proteínas presentan una dificultad añadida a la ya laboriosa tarea de depositar monocapas de tensioactivos. Ésta reside en el hecho de que la mayoría de las proteínas en su estado nativo presentan cierta solubilidad en la fase acuosa. Por ello, las proteínas no forman una monocapa al ser depositadas directamente sobre la interfaz sino que se disuelven en la fase acuosa. En la bibliografía se pueden encontrar varios métodos de obtención de monocapas de proteínas en los que se aborda de diversas maneras este problema [McRitchie 1986]. Uno de los métodos más usados en estudios de monocapas es el *método de Trurnit para depositar proteínas* descrito en [Trurnit, 1960]. En este método, se resuelve el problema de la solubilidad de la proteína, tratando de desnaturalizarla antes de alcanzar la superficie de la gota. Cuando una molécula de proteína alcanza una interfaz apolar sufre una reorganización estructural de sus segmentos de manera que las partes hidrófobas quedan en contacto con el medio no polar y las partes hidrófilas quedan en contacto con la fase acuosa. Este proceso se denomina desnaturalización superficial y la proteína en su estado desdoblado deja de ser soluble en la fase acuosa y permanece anclada en la superficie. El método de Trurnit consiste en deslizar un volumen conocido de disolución acuosa de proteína por una varilla de vidrio antes de contactar con la superficie acuosa sobre la que se formará la monocapa. De esta manera, la proteína sufre el proceso de

desdoblamiento superficial al entrar en contacto con el aire en la aguja de vidrio y, al alcanzar la superficie acuosa, no se disuelve en la subfase, sino que permanece en la superficie formando una monocapa. Este método ha sido usado en balanzas de superficies convencionales por un gran número de autores [Rodríguez-Niño, 1999; Min, 1998; Krägel, 1999; Murray, 1998; Sánchez-González, 1999; Gálvez-Ruiz, 1999; Sánchez-González, 2001].

En este estudio se ha realizado una detallada adaptación del *método de Trurnit* a las exigencias de la gota pendiente, en un proceso cuyas fases se encuentran esquematizadas en la Figura 4.3.



Figura 4.3: Adaptación del método de Trurnit a la gota pendiente.

Las dimensiones de la aguja de vidrio, fabricada específicamente para este fin, son de 0.3 mm de diámetro y 10 cm de largo. La aguja se dispone sobre la superficie de la gota como se muestra en la Figura 4.3. A continuación, 1 μ l de disolución acuosa de proteína se desliza hasta la superficie de la gota y la proteína, desnaturalizada al contacto con el aire durante el deslizamiento, se extiende sobre la superficie. Para asegurar que toda la proteína depositada en el capilar de vidrio se transfiere a la superficie de la gota, el proceso se repite deslizando 1 μ l de disolución tampón con el fin de arrastrar cualquier resto de proteína adherida al capilar.

La compresión-expansión de la interfaz se realiza por inyección-extracción de volumen de disolución acuosa con el capilar interno. La velocidad de compresión de la interfaz es asimismo un parámetro crítico en la obtención de las isothermas. Cuando una monocapa se comprime demasiado rápido, la isoterma se puede desplazar hacia áreas mayores [Murray, 1996]. Además, las isothermas son independientes de la velocidad de compresión cuando éstas son suficientemente lentas y se supone un “equilibrio” de la monocapa, i.e. relajación rápida de movimientos de los segmentos debida a interacciones laterales [Rodríguez-Niño, 1999; Cicuta, 2002]. La velocidad finalmente elegida en este estudio es la más rápida que cumple la condición de “equilibrio”, para evitar efectos de contaminación en la interfaz. De esta forma, se encuentra que las isothermas son independientes de la cantidad de proteína depositada, demostrando la reproducibilidad de la deposición. El dispositivo experimental proporciona la variación de la presión interfacial en función del área interfacial o volumen de la gota; la isoterma $\pi(A)$.

Para el estudio de monocapas de β -caseína en la interfaz aceite-agua, tras la deposición, se reduce el volumen de la gota y se eleva suavemente la cubeta llena con tetradecano previamente saturado con agua. Una vez sumergida completamente la gota en la fase oleosa se expande de nuevo hasta el máximo valor de área interfacial y se procede a la obtención de las isothermas π -A de manera completamente análoga a la descrita anteriormente para la interfaz aire-agua.

Reología dilatacional

Los experimentos de reología dilatacional han sido diseñados y realizados en el *Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung, Golm, Alemania*. El dispositivo experimental es también una balanza de gota pendiente denominada PAT1 y

comercializada por Sinterface Technologies, Alemania [Sinterface]. El dispositivo experimental se divide en tres partes básicas:

1) El montaje de medida, compuesto por la célula de medida, el capilar y la jeringa (Hamilton) junto con el inyector.

2) El sistema óptico, compuesto de una fuente de iluminación, un objetivo de microscopio y una cámara de vídeo CCD, panasonic, WV-BP310 B/W.

3) El sistema informático, un microprocesador Intel-Pentium, con una tarjeta monocroma de adquisición de imagen, National Instrument IMAQ PCI-1408.

Los parámetros característicos (volumen, área y tensión interfacial) se obtienen tras ajustar los perfiles de gota experimentales a la ecuación de capilaridad de Young-Laplace. El formalismo utilizado en el cálculo de los parámetros interfaciales así como el funcionamiento general del PAT1 se encuentra descrito en detalle en la referencia [Loglio, 2001].

El sistema de dosificación computerizado permite mantener el área interfacial constante o inducir deformaciones de la misma. Para los experimentos de reología dilatacional se introduce una perturbación sinusoidal a la interfaz, inyectando y extrayendo alternativamente líquido de la gota pendiente. A partir del comportamiento oscilatorio de la tensión interfacial, inducido por la perturbación del área interfacial, se obtiene el denominado módulo de elasticidad complejo definido por la siguiente ecuación:

$$E(i\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega) = \mathfrak{F}\{\Delta\gamma(t)\} / \mathfrak{F}\{\Delta \ln A(t)\} \quad (4.1)$$

Donde, $\mathfrak{F}\{\Delta\gamma(t)\}$ es la transformada de Fourier del cambio en tensión interfacial, γ , inducido por la perturbación en el área interfacial, A . E' y E'' son respectivamente las partes real e imaginaria

del módulo de elasticidad complejo. Éstas tienen un significado físico teniendo en cuenta que se identifican con los siguientes sumandos [Lucassen-Reynders, 1981]:

$$E(i\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega) = \varepsilon(\omega) + i\omega\eta(\omega) \quad (4.2)$$

Donde, ε es la elasticidad interfacial y η es la viscosidad interfacial, magnitudes descritas ya anteriormente en la sección 2.4. El programa proporciona finalmente esta pareja de parámetros característicos de la capa interfacial formada para cada valor de la frecuencia impuesta.

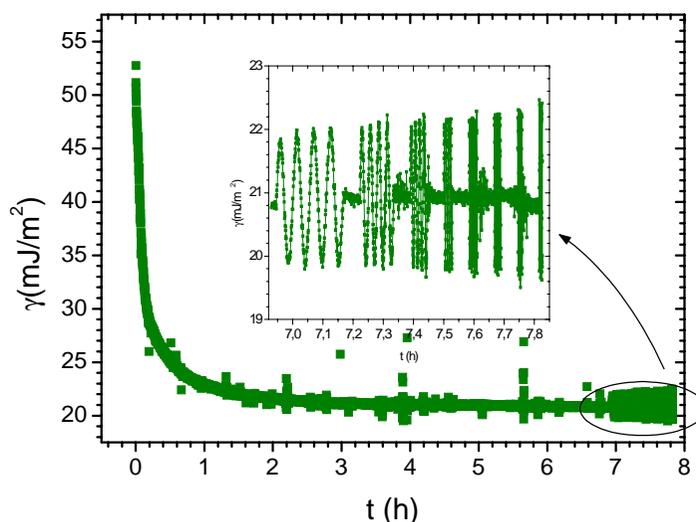


Figura 4.4 Fases de un experimento modelo de reología dilatacional de β -caseína en la interfaz aceite-agua.

Los experimentos de reología dilatacional se han diseñado siguiendo el siguiente protocolo, que se puede visualizar en la Figura 4.4. En primer lugar, la tensión interfacial de la gota de la disolución a estudiar se monitoriza manteniendo el área interfacial constante durante 7 horas para las disoluciones concentradas y hasta 20 horas

para las más diluidas. Transcurrido este periodo de tiempo, el cambio detectado en la tensión interfacial es prácticamente inexistente. De esta manera, los experimentos de reología dilatacional se efectúan en “condiciones de equilibrio”, imponiendo a la interfaz la perturbación sinusoidal. En el experimento se realizan ocho ondulaciones tipo seno a una frecuencia fija seguido de 10 minutos de registro a área interfacial constante. Tras esto se vuelve a repetir el proceso a otra frecuencia de oscilación. En total se han evaluado los parámetros dilatacionales a un total de 8 frecuencias. Cada uno de los experimentos completos comprende la siguiente serie de frecuencias: 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.14 y 0.2 s^{-1} . De esta manera, las oscilaciones son lo suficientemente pequeñas como para que la gota conserve una forma laplaciana en todo el proceso y el algoritmo usado por el programa sea siempre válido. Asimismo, el cambio en el volumen de la gota, es decir, la amplitud de la oscilación, se mantiene por debajo de un 10% del volumen total de la gota. De esta manera, queda garantizada la linealidad del comportamiento reológico y se evita la destrucción de las estructuras interfaciales [Wüstneck, 1999].

4.3.2 Técnica del Plato Poroso

Los experimentos realizados con la Técnica del Plato Poroso, también denominada Balanza de Películas, han sido todos ellos diseñados y realizados en el *Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris XI, Francia*. Este laboratorio posee una amplia experiencia en el manejo de esta técnica y el dispositivo en cuestión ha sido diseñado y fabricado en el mismo. Su funcionamiento se encuentra descrito en detalle en [Bergeron, 1992]. A continuación, se detalla brevemente su funcionamiento.

Una espuma es una dispersión de un gas en un líquido. De una observación más detallada se observa que las burbujas de aire que componen la espuma están separadas entre sí por regiones líquidas, denominadas películas, que contienen el tensioactivo. De la estabilidad de estas películas líquidas depende la estabilidad de todo el sistema. La técnica del plato poroso permite precisamente evaluar la estabilidad de estas películas líquidas en función de la presión hidrostática aplicada. En la sección 2.5 se encuentra descrito brevemente el fundamento físico de las películas líquidas; a continuación se procede a explicar la técnica experimental utilizada para su obtención y medida.

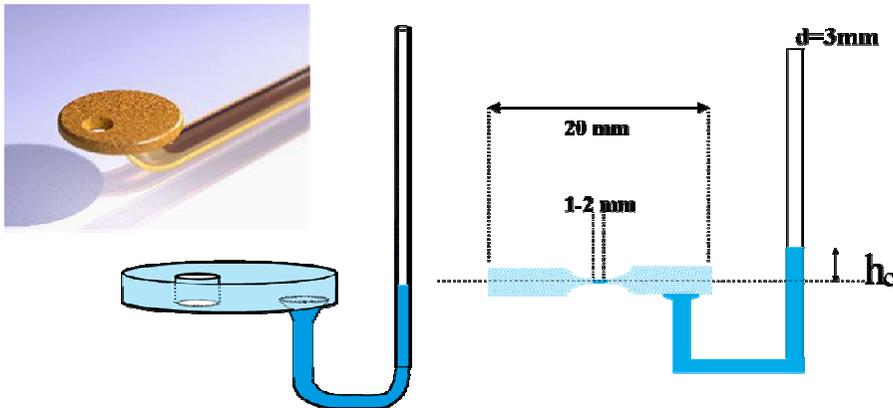


Figura 4.5: Soporte en el cual se forman las películas compuesto de un disco de vidrio fritado acoplado a un capilar de vidrio por el que se introduce la disolución.

El soporte sobre el cual se forma la película líquida consiste en un disco de vidrio fritado en el cual se ha realizado un orificio de tamaño milimétrico (1-2 mm). Este disco se encuentra soldado a un capilar de vidrio como se observa en la Figura 4.5. La disolución de tensioactivo se introduce por el capilar hasta que el disco de vidrio fritado se encuentra completamente embebido de disolución. Asimismo, se dispone, una pequeña gota de disolución en el orificio

practicado en el disco. El soporte con la película se dispone en una célula de plexiglas cerrada herméticamente de manera que la extremidad del capilar queda en el exterior, expuesta a una presión de referencia (presión atmosférica). En el interior de la célula, la película líquida se encuentra en una atmósfera saturada con la disolución a estudiar para evitar problemas de evaporación y a una temperatura de 23°C.

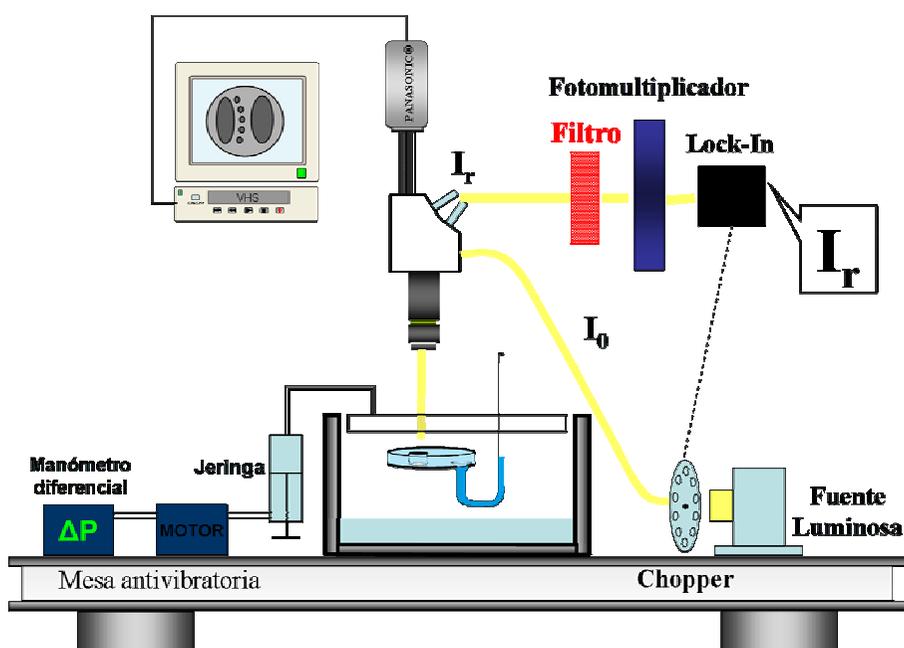


Figura 4.6: Diagrama esquemático de la balanza de películas

En la Figura 4.6 se encuentra representado un dibujo esquemático de la técnica del plato poroso. La célula con la película está conectada a un pistón, que permite variar la presión hidrostática en el interior de la misma (P). Al aumentar la presión progresivamente, se comprime la pequeña gota dispuesta en el orificio del disco de vidrio fritado. La región líquida se estrecha y se aplanada debido a la presión aplicada. De esta forma, se crea una película

líquida de disolución completamente análoga a la región líquida existente entre dos burbujas de aire en una espuma.

En esta película, la diferencia entre la presión de la fase gaseosa (P) y la presión de la fase líquida (P_l) es la presión superficial (π). En el equilibrio, la presión superficial se encuentra compensada por la presión de disyunción que estabiliza la película (P_d):

$$P_d = \pi = P - P_l \quad (4.3)$$

Para determinar la presión de disyunción basta con conocer los valores de P y P_l . P es la presión impuesta con el pistón y P_l viene dada por la expresión:

$$P_l = P_0 + \Delta\rho gh_c - 2\frac{\gamma}{r_c} \quad (4.4)$$

Donde, P_0 es la presión atmosférica, γ es la tensión superficial del líquido, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre la disolución y el gas, g es la constante de la gravedad, h_c es la altura por encima del líquido y r_c es el radio del tubo capilar.

De manera que la presión de disyunción se obtiene sustituyendo la ecuación (3.4) en la (3.3) de la siguiente manera:

$$P_d = P - P_l = P + 2\frac{\gamma}{r_c} - P_0 - \Delta\rho gH_l \quad (4.5)$$

Para realizar estas medidas de presión es necesario proteger al sistema de cualquier perturbación; cualquier movimiento de la célula podría provocar inestabilidades en la película que falsearían la medida. Por ello, se dispone de un recipiente anexo de 60 l de aire cuya función es amortiguar las fluctuaciones de presión. Asimismo, el nivel de presión en la célula se controla con un barómetro clásico, un

tubo en U con una regla graduada, y así se verifica el que no varíe más de ± 1 mm (± 10 Pa).

Todo el sistema se encuentra iluminado con una fuente de luz blanca de 150 W, de intensidad modulada por un *chopper* a una frecuencia de 390 Hz². Este haz de luz incide sobre la película líquida y la luz reflejada por la misma se recoge en un objetivo (Leite Wetzlar, Alemania 10X) y es dividida en dos haces por una lámina óptica, que presenta una inclinación de 45°. Uno de los haces luminosos se envía a una cámara de vídeo que permite la observación de la muestra en una monitor. El otro haz de luz es dirigido hacia un objetivo provisto de una fibra óptica (Gamma Scientific, modelo 700-3B) de 450 μm de diámetro. La luz recogida por la fibra atraviesa un filtro rojo (630 ± 10 nm) antes de llegar a un fotomultiplicador (Hamamatsu R550). Para sincronizar la señal con la frecuencia del *chopper* se utiliza un amplificador *lock-in*. Con este montaje, la información suministrada por este dispositivo es doble. Por un lado, el fotomultiplicador proporciona la intensidad de la luz reflejada (I_r) por la película y por otro lado, la video-cámara proporciona imágenes en tiempo real de la evolución de la película líquida, lo que permite analizar la dinámica de formación de regiones de diferente espesor [Marquez Beltrán, 2004; Sonin, 1993; Márquez, 2003].

Una vez que se tiene la intensidad reflejada por la película líquida, la interferometría de luz reflejada permite medir el espesor de la misma. Supongamos una película plana de espesor h e índice de refracción n_f que separa dos medios de índices refracción n_1 y n_2 respectivamente. Si un haz luminoso de intensidad I_0 incide sobre la

² “Chopper” (en inglés): se trata de un disco recortado en láminas a intervalos regulares y que gira a una frecuencia controlable produciendo un haz de luz de intensidad modulada.

película desde el medio 1, la intensidad total reflejada por la película será la suma de la intensidad reflejada por la primera interfaz y la intensidad reflejada por la segunda interfaz. La diferencia de caminos ópticos entre estos dos campos reflejados es proporcional al espesor de la película. En incidencia normal, es decir, suponiendo que el haz de luz incide sobre la película perpendicular a la interfaz ($\theta_i=0^\circ$) se tiene que:

$$\frac{I_r}{I_0} = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2r_1r_2 \cos \varphi}{1 + r_1^2r_2^2 + 2r_1r_2 \cos \varphi} \quad (4.6)$$

Donde:

$$r_1 = \frac{n_f - n_1}{n_f + n_1}; r_2 = \frac{n_f - n_2}{n_f + n_2}, \quad \varphi = 2\pi \frac{2n_f h}{\lambda} \text{ y } \lambda \text{ es la longitud de}$$

onda de la luz incidente.

En esta expresión se observa como es necesario conocer los valores de I_0 e I_r para conocer el valor del espesor de la película h . Debido a las intensidades parásitas que, pese a la existencia del *chopper* y del *lock-in*, aparecen en el montaje, la medida de I_0 e I_r no es inmediata. Para resolver este problema se utiliza el *método de Scheludko* [Scheludko, 1967]. Este método se basa en el cálculo de

$$\Delta = \frac{(I_r - I_r^{\min})}{(I_r^{\max} - I_r^{\min})} \quad (4.7)$$

Donde I_r^{\max} y I_r^{\min} son las intensidades de interferencia máxima y mínima, respectivamente, y que se obtienen para los valores de h múltiplos de $\lambda/4n_f$. Además, teniendo en cuenta que en el caso de una película líquida en aire se cumple que $n_1 = n_2 = 1$ y que $r_1 = -r_2$, se obtiene finalmente que h viene dado por:

$$h = \frac{\lambda}{2n_f\pi} \arcsin \sqrt{\frac{\Delta}{1 + (1 + \Delta) \frac{4R}{(1 - R^2)}}}; R = \left(\frac{n_f - 1}{n_f + 1} \right)^2 \quad (4.8)$$

En una película líquida iluminada por luz blanca, las interferencias entre los rayos de diferente longitud de onda reflejados provocan la aparición de colores. A cada color le corresponde un espesor. Puesto que el espesor de una película líquida es siempre inferior a 100 nm, las regiones de diferente espesor en la misma se distinguen por diferentes niveles de grises.

El protocolo que se sigue para realizar los experimentos es el siguiente. En primer lugar se introduce la disolución de tensioactivo de bajo peso molecular (o de proteína) en el soporte de películas. Este proceso se realiza de manera que no quede ninguna burbuja de aire en el tubo capilar, puesto que la medida sería en este caso incorrecta. Una vez lleno el capilar, el soporte se encaja en la célula y se cierra herméticamente. A continuación se incrementa la presión en el interior de la célula con el pistón. Este proceso de aumento de la presión se debe realizar en etapas de pequeños incrementos seguidos de 20 minutos de espera. Esto se hace para permitir la relajación del flujo de disolución en el interior del material poroso producido por el incremento de la presión. Una vez que ha transcurrido este tiempo se procede a la medida de la presión de disyunción y de la intensidad reflejada por la película. En el caso de que existan varios espesores coexistiendo en la película, el dispositivo permite determinar las diferentes intensidades reflejadas por cada zona simplemente moviendo el objetivo. Este proceso se repite aumentando progresivamente la presión hasta que la película se rompe. Así, se pueden medir de manera independiente la presión de disyunción y el espesor de la película. Esto permite construir la isoterma de presión de

disyunción frente a espesor ($P(h)$), que contiene la información sobre las fuerzas de interacción repulsivas en la película líquida.

4.3.3 Columna de Espumas

Todos los experimentos de formación y estabilidad de espumas han sido diseñados y realizados en el *Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris XI, Francia*. El dispositivo utilizado se encuentra esquematizado en la Figura 4.7.

Se trata de una columna de plexiglas de base cuadrada de 4 cm de lado y 1 m de altura. La columna posee en su base un sistema mediante el cual le puede ser acoplado un cilindro de vidrio fritado. El tamaño de las burbujas que forman la espuma depende de la porosidad de este vidrio fritado siendo el poro mayor cuanto menor es el número que lo define. En este trabajo se han utilizado dos vidrios con diferente porosidad: poro 0 (160-250 μm) y poro 2 (40-100 μm). De esta forma las burbujas que componen la espuma son tanto mayores cuanto mayor es el tamaño del poro y menor el número que lo caracteriza. A través de estos cilindros de vidrio fritado se dispensa al sistema un flujo de aire controlado por un caudalímetro. Para los estudios de formación y estabilidad de espumas planteados en este trabajo el flujo de aire se mantiene siempre constante a $5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$.

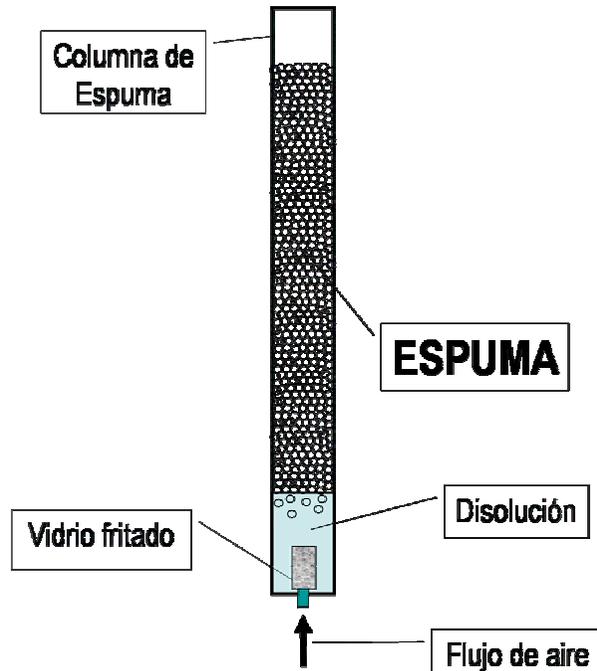


Figura 4.7: Esquema del dispositivo utilizado en el estudio de la formación y estabilidad de espumas.

Los experimentos se realizan tomando como medida de la estabilidad de la espuma, la velocidad de drenaje de la misma, siguiendo el siguiente protocolo. Se vierten 200 ml de la disolución deseada en la columna de espumas, dispuesta con el adecuado vidrio fritado en su base. Se conecta el dispensador de aire y se mide la altura de espuma en la columna en función del tiempo. Una vez que la espuma formada ha alcanzado una altura de 80 cm se desconecta el caudalímetro y se mide el tiempo que tarda la espuma formada en drenar. Este tipo de experimentos, pese a su carácter cualitativo, permiten establecer una comparación entre las características de formación y la estabilidad de espumas de los diferentes emulsionantes y se utiliza ampliamente en la bibliografía [Bhattacharyya, 2000; Carrera-Sánchez, 2005; Husband, 1997].

4.3.4 Formación y estabilidad de emulsiones

El estudio experimental que se refiere a la formación y estabilidad de emulsiones ha sido diseñado y realizado en el Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides de la Universidad de Granada, España.

Formación de las emulsiones

De acuerdo al trabajo previo realizado en la interfaz aceite-agua, las emulsiones que se han estudiado son emulsiones de β -caseína en tetradecano. Para prepararlas se ha seguido el siguiente protocolo:

En primer lugar se, prepara una disolución de proteína en la disolución tampón presentada anteriormente a la concentración deseada. A continuación se mezcla la disolución de proteína el volumen de tetradecano requerido en un volumen final de 7 ml. La emulsión se prepara con un dispersador "DiAx 900, Heidolph", realizando siempre el siguiente ciclo de agitación: 1 min a 6000 rpm, 2 min a 28000 rpm y 1 min a 6000 rpm. Las disoluciones y las emulsiones se preparan siempre inmediatamente antes de cada medida.

En este trabajo se han evaluado emulsiones de tetradecano en disolución acuosa de β -caseína a una concentración fija de 1 g/l y variando el contenido de aceite en la emulsión a 5%, 10% y 20% peso de tetradecano. A todas ellas se les ha medido la estabilidad y el tamaño de gota. Para la realización de dicho estudio se han utilizado dos dispositivos experimentales basados en dispersión de luz cuyo fundamento se describe brevemente a continuación.

Estabilidad de emulsiones

La estabilidad de las emulsiones se ha medido haciendo uso de un Turbiscan Classic MA2000 (Ramonville St Agne, France). La estabilidad de una emulsión viene determinada por la aparición de dos fenómenos: aumento de tamaño de las gotas de aceite debido a una coalescencia, floculación y migración de partículas dando lugar al cremado de la emulsión como se ha explicado en detalle en la sección 2.6. El análisis de la luz transmitida y retrodispersada³ por la emulsión en función del tiempo permite reconocer la aparición de estos fenómenos y cuantificar la desestabilización de la misma [Chanamai, 2000; Durand, 2003].

El dispositivo se encuentra totalmente automatizado y un ordenador conectado al Turbiscan Classic MA2000 controla todo el sistema. Se disponen 7 ml de emulsión en un tubo de vidrio cilíndrico de 15 cm de altura y 16 mm de diámetro interno. El dispositivo mide el porcentaje de luz transmitida y retrodispersada por la muestra en dicho tubo. Este doble resultado permite tener acceso a un amplio intervalo de concentración de partículas. Para una fracción de volumen $\Phi < 0.03$ se analiza la luz transmitida (*transmission regime*): dispersiones claras o turbias. Para fracciones de volumen mayores, se analiza la luz dispersada (*backscattering regime*): dispersiones opacas. En el caso de emulsiones, como el que nos ocupa, la luz dispersada contiene gran parte de la información.

La fuente luminosa es un diodo electro luminiscente de longitud de onda cercana al infrarojo, $\lambda = 850$ nm. Dos sensores ópticos sincronizados reciben la luz transmitida y dispersada por la emulsión, respectivamente. Concretamente, la luz transmitida por la muestra se detecta por el sensor de transmisión, dispuesto a 180° con

³ Del inglés, *backscattered*.

respecto a la dirección del haz incidente. La luz retrodispersada por la muestra se recoge por el detector de retrodispersión, situado formando un ángulo de 45° con la dirección de la radiación incidente. El instrumento se autocalibra automáticamente para corregir los posibles errores debidos a cambios térmicos en los componentes optoelectrónicos así como al envejecimiento de los mismos. El lector óptico realiza un barrido de la altura total de la muestra en el tubo (80 mm) tomando las medidas de intensidad transmitida y retrodispersada cada $40\ \mu\text{m}$. El programa informático proporciona así las curvas correspondientes a la luz transmitida y retrodispersada en tanto por ciento en función de la altura de la muestra en milímetros. El barrido se repite cada cierto intervalo de tiempo con el fin de obtener la evolución temporal de la emulsión. De esta forma, se evalúa cuantitativamente la apariencia y la desestabilización de la emulsión preparada a lo largo de un periodo de 24 horas.

Tamaño de gota

El tamaño promedio de gota de las emulsiones más estables se ha medido con un dispositivo ALV®-NIBS/HPPS. Este dispositivo combina la tecnología *High Performance Particle Sizer (HPPS)* con el método *Non Invasive Back Scattering (NIBS)*. Este dispositivo está especialmente diseñado para el análisis de muestras muy concentradas puesto que su sistema de detección minimiza el registro de dispersión múltiple. La muestra se introduce en una cubeta rectangular de plástico cuya sección de medida se controla de forma automática hasta conseguir que el volumen de dispersión esté correctamente enfocado. La muestra se ilumina con un láser de He-Ne con una potencia de salida de 2.5 mW y una longitud de onda de 632.8 nm. La unidad de detección está ubicada a 173° respecto a la dirección del haz incidente. Un receptor de fibra óptica selectiva procesa la luz y un detector fotónico (fotomultiplicador) convierte los fotones a pulsos

electrónicos y mediante un correlador digital (ALV®5000/E) se obtiene la función de correlación de la intensidad que contiene toda la información de la muestra.

La función de correlación $g_2(t)$ está relacionada con la función de correlación del campo $g_1(t)$ mediante la relación de Siegert:

$$g_1(q, t) = 1 + \beta |g_2(q, t)|^2 \quad (4.9)$$

donde, β es un parámetro característico del dispositivo y q es el vector de dispersión:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4.10)$$

donde λ es la longitud de onda del haz incidente, θ es el ángulo de dispersión y n el índice de refracción del disolvente.

A partir de la caída inicial de la función de correlación del campo se puede obtener el coeficiente de difusión de las partículas haciendo uso del método de los cumulantes [Koppel, 1972]

$$\ln(g_2(q, t)) = -\Gamma_1(q)t + \Gamma_2(q)t^2 - \Gamma_3(q)t^3 + \dots \quad (4.11)$$

Aquí, el primer cumulante $\Gamma_1(q)$ está relacionado con el coeficiente de difusión, D_0 , mediante la siguiente expresión: $\Gamma_1(q) = D_0 \cdot q^2$. El segundo cumulante contiene la información de la polidispersidad en tamaño de la muestra ($IP = \Gamma_2(q) / \Gamma_1^2(q)$). Finalmente, suponiendo simetría esférica en las partículas, el coeficiente de difusión D_0 es inversamente proporcional al radio hidrodinámico según la relación de Stokes-Einstein:

$$D_0 = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta a} \quad (4.12)$$

donde, κ_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad del disolvente.

Capítulo 5.

COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE PROTEÍNAS EN INTERFACES LÍQUIDO-FLUIDO, EMULSIONES Y ESPUMAS

5.1.- INTRODUCCIÓN

Este capítulo constituye el primero de los dos grandes bloques en los que se ha dividido el trabajo realizado y en los que se van a exponer los resultados y logros de esta Tesis Doctoral. Este primer bloque se centra en el estudio de una proteína modelo, que constituye un ingrediente clave en productos lácteos: la β -caseína. Sin duda, debido a su importancia en la industria alimentaria, ya se ha realizado un enorme esfuerzo para comprender el comportamiento interfacial de esta proteína. Sin embargo, se encuentran aún en la bibliografía numerosos interrogantes e incluso discrepancias en su comportamiento interfacial, especialmente en interfaces líquido-líquido. En este sentido, este trabajo presenta una completa caracterización interfacial de la β -caseína en la que se han utilizado varias técnicas experimentales. Además, y con el fin de profundizar en la comprensión de los fenómenos que tienen lugar en la capa interfacial, se ha hecho uso de un modelo teórico que proporciona importante información adicional acerca de la estructura interfacial de la proteína e incluso clarifica algunas de las discrepancias encontradas en la bibliografía. Finalmente, se ha buscado una aplicación tecnológica de este estudio fundamental de las propiedades interfaciales de la β -caseína analizando las espumas y las emulsiones formadas por esta proteína. Este último apartado presenta una aplicación completamente novedosa desarrollada en esta Tesis Doctoral.

Así pues, este largo capítulo se estructura de la siguiente manera. En primer lugar se presenta un análisis teórico y experimental de las monocapas de β -caseína en la interfaces aire-agua y tetradecano-agua. En segundo lugar se realiza un estudio exhaustivo de la adsorción de la β -caseína en esas mismas interfaces también desde un punto de vista teórico y experimental. A continuación se

presenta un estudio adicional sobre la dinámica de adsorción de la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua. Seguidamente, se presentan los resultados experimentales de reología dilatacional de β -caseína en las dos interfaces así como el tratamiento teórico de éstos en condiciones de equilibrio. Finalmente, se ha realizado un estudio preliminar de la formación y estabilidad de emulsiones y espumas del mismo sistema experimental en el que se pretende relacionar las conclusiones derivadas del estudio previo con las propiedades de las dispersiones alimentarias formadas. Todos los resultados que se presentan se han realizado en las mismas condiciones¹ con el fin de establecer una correcta comparación entre todos los fenómenos.

5.2 MONOCAPAS DE β -CASEÍNA EN INTERFACES LÍQUIDO-FLUIDO

La caracterización mediante la técnica de monocapas constituye un primer paso en el estudio de la estructura interfacial de las proteínas en interfaces. Esta técnica ha sido usada extensamente en el estudio de la estructura interfacial de la β -caseína en la interfaz aire-agua. Ahora bien, la dificultad añadida por la presencia de una interfaz líquida se traduce en una indudable escasez de estudios de monocapas de proteínas en la interfaz aceite-agua. Por otro lado, debido a su complejidad son incluso menos los trabajos que proporcionan un análisis cuantitativo de la estructura de la monocapa mediante la aplicación de un modelo teórico. En este sentido, el objetivo planteado en este apartado es primeramente la formación de monocapas β -caseína en las interfaces aire-agua y aceite-agua. A continuación se analizan los datos experimentales en el marco de la teoría de polímeros presentada en la sección 2.2. Finalmente, este análisis

¹ pH 7, 0.05 M y T = 23°C

teórico se aplica también a datos experimentales encontrados en la bibliografía para la misma proteína pero en diferentes interfaces y con los cuales existen aparentemente discrepancias. De esta forma, no solamente se cuantifica la estructura interfacial de la β -caseína en la interfaz aire-agua y aceite-agua sino que se discute el papel de la naturaleza de la interfaz.

5.2.1 Monocapas de β -caseína en interfaces líquido-fluido

La Figura 5.1 muestra las isotermas típicas obtenidas tras la deposición de 1 μ l de disolución de β -caseína de concentración conocida sobre las interfaces aire-agua y tetradecano-agua. Estas monocapas se han formado mediante una adaptación de método de Trurnit a la gota pendiente que se encuentra descrita en detalle en la sección experimental y que constituye uno de los logros de esta Tesis Doctoral [Maldonado-Valderrama, 2003; Maldonado-Valderrama, 2004a]. Las isotermas π - A de β -caseína en la interfaz aire-agua obtenidas con este novedoso sistema se encuentran en concordancia con las obtenidas con métodos convencionales [Mellema, 1998; Cicuta, 2001, Rodríguez-Niño, 1999].

Veamos resumidamente algunos detalles del método de formación de monocapas utilizado. La velocidad de compresión-expansión es un parámetro crítico en la obtención de isotermas reproducibles puesto que las isotermas se podrían desplazar hacia áreas moleculares mayores si son comprimidas demasiado rápidamente [Murray, 1996]. Así, en este estudio se ha utilizado una velocidad de compresión tal que podamos considerar despreciables los efectos de relajación. Para ello, se ha realizado un barrido de velocidades y se ha comprobado que por debajo de una cierta velocidad de compresión, todas las isotermas coinciden. Para evitar

efectos de contaminación y degradación de la proteína se eligió la velocidad más alta que cumplía esta condición: $0.022 \text{ mm}^2/\text{s}$. De esta forma, las monocapas en la interfaz aire-agua son estables y presentan ciclos reproducibles de compresión-expansión [Maldonado-Valderrama, 2003]. Sin embargo, las monocapas en la interfaz tetradecano-agua se comportan de manera diferente [Maldonado-Valderrama, 2004a]. Si se deja la monocapa en área máxima durante 3 horas y posteriormente se comprime, la monocapa aparece ligeramente más expandida, i. e. la isoterma aparece desplazada a la derecha; a valores más altos de área específica. Pero si tras este ciclo, la monocapa es inmediatamente comprimida de nuevo, la isoterma recupera su forma original. Este comportamiento, también ha sido encontrado por otros autores para monocapas de BSA y β -lactoglobulina en la misma interfaz oleosa [Murray, 1996]. Estos autores justifican este resultado en términos del lento desdoblamiento interfacial que sufren estas proteínas y que resulta en una expansión residual que desaparece en ciclos sucesivos pero que reaparece si la película permanece durante horas estática [Murray, 1996]. Para mayor detalle acerca del procedimiento experimental utilizado en la formación de las monocapas cuyas isotermas están expuestas en la Figura 5.1, éste se encuentra explicado en las referencias [Maldonado-Valderrama, 2003; Maldonado-Valderrama, 2004a].

En la 5.1 se presentan las isotermas π - A registradas al comprimir y expandir monocapas de β -caseína en las interfaces aire/agua y tetradecano-agua. Ambas isotermas presentan una forma sigmoide típica de las isotermas registradas para películas de proteínas en interfases fluidas. Algunos autores como McRitchie y col. [McRitchie, 1990] y Ahluwalia y col. [Ahluwalia, 1991, 1992] postulan que esta forma de las isotermas puede deberse a una desorción parcial de la proteína de la interfaz, es decir, a la desorción

de algunos segmentos (conjunto de residuos aminoácidos) durante el proceso de compresión de las películas. Sin embargo, puede interpretarse también como debido a la formación de estructuras tridimensionales. Lo que es claro, es que esta forma sigmoide que implica una región intermedia de la isoterma donde aumenta la elasticidad de la misma, se deberá a una disminución de la densidad interfacial causada por alguno de los mecanismos mencionados.

También destaca el hecho de que las películas de β -caseína se encuentran mucho más compactas o menos extendidas en la interfaz aire-agua que en la interfaz aceite-agua. A las condiciones experimentales que se han registrado las isotermas, los valores de área específica límite (que resulta de extrapolar a $\pi=0$ la última parte lineal de la isoterma) son $0,54 \text{ m}^2/\text{mg}$ y $1,25 \text{ m}^2/\text{mg}$ en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua respectivamente. Estos valores se corresponden para nuestra proteína, con una masa molecular de 23800 D y 209 residuos de aminoácido, con los valores de $10,2 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ y $23,6 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$, respectivamente. En el caso de la interfaz aire-agua, si comparamos este valor con el que se obtiene por medidas independientes (como difracción de R.X.) para un residuo de aminoácido, aproximadamente $15 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$, observamos que en efecto el obtenido a partir de nuestras isotermas es inferior, lo que indica que a altas presiones interfaciales las películas de β -caseína se encuentra en un alto grado de compactación, de ahí, que hayamos tenido que adaptar el método de Trurnit a los requisitos de la gota pendiente para poder formar monocapas de β -caseína estables en esta interfaz. Al extrapolar la primera parte lineal de la isoterma recién depositada la película, el valor de área específica límite que se obtiene está en torno a $1 \text{ m}^2/\text{mg}$ correspondiendo este valor a $18,9 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$, indicativo de que la proteína se encuentra completamente desplegada

en la interfaz y que por tanto, se ha operado experimentalmente de forma correcta.

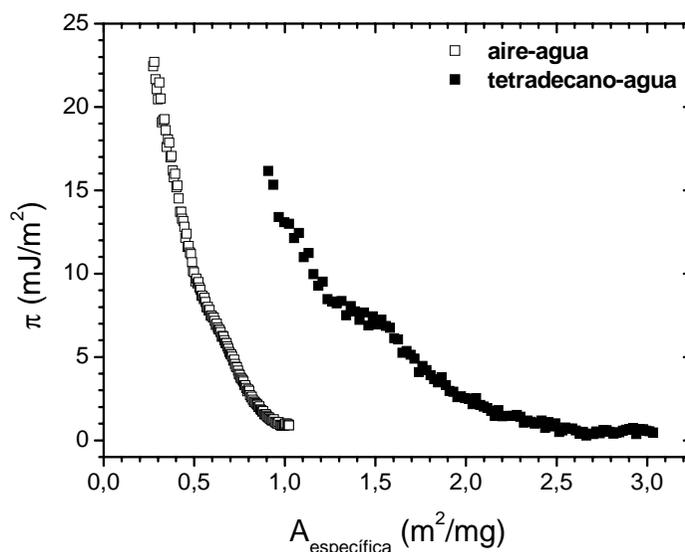


Figura 5.1: Isotermas π - A de monocapas de β -caseína extendida en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua.

El alto valor de área específica límite obtenido a partir de las isotermas registradas en la interfaz aceite-agua obedece a un comportamiento más complejo que tiene que ver con la interacción de la proteína con la fase oleosa y que se explica detalladamente a continuación. También se observa una gran diferencia en los valores de presión de colapso, estando el correspondiente a la monocapa en la interfaz aire/agua en torno a 23 mJ/m^2 y el correspondiente a la monocapa en la interfaz aceite-agua alrededor de 16 mJ/m^2 . A priori, estos valores indicarían que la proteína β -caseína forma películas más estables en la interfaz aire-agua que en la aceite-agua, sin embargo, hay que tener presente que las tensiones interfaciales difieren en ambas interfaces.

Así pues, la presencia de una interfaz líquida afecta significativamente a la estructura interfacial adoptada por la proteína. Con respecto al desplazamiento de la isoterma registrada en la interfaz tetradecano-agua hacia valores mayores de área específica, Murray y col. encuentran un desplazamiento similar hacia áreas mayores en monocapas formadas en la misma fase no-polar (tetradecano) pero con otras proteínas modelo [Murray, 1996]. Paralelamente, estudios de monocapas de β -caseína en otras fases oleosas muestran un comportamiento contrario al dado en la Figura 5.1 con isotermas desplazadas hacia valores menores de área específica [Graham, 1979c]. Esta aparente contradicción será discutida en mayor detalle más adelante sobre la base de consideraciones teóricas. Veamos a continuación, algunos argumentos preliminares en la posible explicación del comportamiento de las monocapas de β -caseína mostrado en la Figura 5.1.

En primer lugar, se puede asumir que la fase hidrocarburo es un mejor disolvente que el aire para las partes hidrófobas de los residuos de aminoácidos presentes en la cadena de polipéptido de la proteína, que pueden, de hecho, penetrar en la fase oleosa [Murray, 1996; Wüstneck, 1999]. Esta solubilidad parcial implicaría una posible adhesión entre la proteína y el tetradecano, responsable del fenómeno de histéresis encontrado. En segundo lugar, Sengupta y col. sugieren que la mayor afinidad de la proteína por una interfaz oleosa tiene su origen en una interacción cohesiva entre las moléculas de hidrocarburo y las partes hidrófobas de la proteína [Sengupta, 1999]. Finalmente, el marcado carácter hidrófobo del aceite lo hace muy repulsivo hacia las moléculas de agua de manera que la proteína tiende a expandirse lo más posible en la interfaz con el fin de oponerse a esta interacción desfavorable [Anderson, 2001]. Teniendo todo esto en cuenta, los resultados experimentales se podrían explicar de la

siguiente manera. A bajo recubrimiento interfacial, el último argumento propuesto favorecería una mayor área efectiva por molécula en la interfaz tetradecano-agua, de acuerdo con el desplazamiento observado de la isoterma en relación a la posición de la isoterma registrada en la interfaz aire-agua. A continuación y conforme la interfaz se comprime, la interacción cohesiva existente entre los segmentos hidrófobos y las moléculas de aceite unido a la solubilidad parcial en el tetradecano, serían los responsables del fenómeno de histéresis encontrado.

5.2.2 Aplicación de la teoría de escalado

Con el fin de obtener más información de las isotermas mostradas en la Figura 5.1, los datos experimentales se han analizado mediante el modelo desarrollado por Leclerc y col. en [Leclerc, 1997] y Aguié-Béghin y col. en [Aguié-Béghin, 1999]. En esta teoría, se obtiene información estructural de la monocapa a partir de un parámetro: y . Este parámetro se ha obtenido de dos maneras; a partir de las isotermas ($\pi \propto A^y$) y a partir de sus derivadas ($-d\pi/dA \propto yA$) como se explica en la sección 2.2 y en el Apéndice I. Ambos procedimientos proporcionan valores muy similares [Maldonado-Valderrama, 2005c] y los valores del parámetro y finalmente considerado es la media de ambos y se encuentran expuestos en la Tabla 5.I.

El valor numérico del exponente y obtenido para cada una de las regiones lineales encontradas en las curvas experimentales proporciona información acerca de la estructura del polímero en la interfaz en los sucesivos regímenes semidiluidos, como se encuentra descrito en la sección 2.2. Brevemente, para las proteínas, el primer régimen semidiluido significativo viene caracterizado por el

exponente y_2 y se corresponde con la superposición de bloques tridimensionales (si $y_2=1$) o bidimensionales (si $y_2 \geq 3$). Además, la magnitud de este valor cuantifica el grado de compactación de la molécula; siendo y_2 mayor conforme la proteína se compacta en el régimen bidimensional ($y_2 \geq 3$) [Mellema, 1998; Cicuta, 2001]. El segundo régimen significativo se caracteriza por el valor de y_3 . En una aproximación similar, un valor de $y_3=0$ indicaría la formación de un cuasi-gel, un valor de $y_3=1$ indicaría la formación de un cuasi-cepillo² y finalmente, un valor de $y_3 \geq 3$ indicaría de nuevo la superposición de bloques bidimensionales [Douillard, 2003].

Tabla 5.I: Valores de los parámetros y_2 e y_3 de la ecuación de estado para monocapas de β -caseína en diferentes interfaces [Douillard, 2003; Graham, 1978c; Segumpta, 1998] y sus respectivas tensiones interfaciales a 25°C [Weast, 1974].

INTERFAZ	y_2	y_3	γ (mJ/m ²)
Aire-agua	5.5±0.4	1.7±0.4	72.6
Tetradecano-agua	3.7±0.4	1.8±0.4	53
Tolueno-agua	2	2	35
Trioleína-agua	1.1	1.1	14.6

Teniendo en cuenta estas premisas, analicemos los valores encontrados para los parámetros y_2 e y_3 para las monocapas de β -caseína en cada una de las interfaces y que se encuentran expuestos en la Tabla 5.I.

Por un lado, en la interfaz aire-agua, el valor ($y_2 \sim 5.5$) es coherente con otros análisis de escalado de monocapas de β -caseína en esta misma interfaz y en las mismas condiciones, recopilados por

² Del inglés *cuasi-brush*

Douillard y col en [Douillard, 2003]. Al igual que se estipula en ese trabajo, este valor de y_2 indica una configuración algo compacta de la β -caseína en la interfaz aire-agua. La confirmación de este resultado viene dada por los valores de y_2 menores que éste reportados para el caso de monocapas de β -caseína formadas en condiciones en las que se espera un desdoblamiento de la proteína, como es en presencia de un agente desnaturizador [Hambardzumyan, 2004], a temperaturas más altas [Hambardzumyan, 2003] o a valores de pH lejanos de su punto isoeléctrico [Cicuta, 2001]. A continuación, conforme aumenta el recubrimiento superficial, la proteína entra en el siguiente régimen caracterizado por el valor de y_3 . El valor encontrado ($y_3 \sim 1.7$) muestra como la superposición de bloques bidimensionales, característica del régimen anterior, evoluciona hacia una especie de fluido tridimensional de bloques hidrófobos que aumenta su grosor con la concentración como indican Douillard y col. [Douillard, 2003].

Por otro lado, veamos los resultados obtenidos en la interfaz tetradecano-agua. El primer régimen semidiluido que atraviesa la β -caseína en esta interfaz se caracteriza por un valor de $y_2 \sim 3.7$. Este valor es claramente menor que el característico de la interfaz aire-agua en esta misma región de bajo recubrimiento interfacial. De acuerdo con la teoría [[Leclerc, 1997; Aguié-Béghin, 1999] y con trabajos experimentales [Hambardzumyan, 2004; Hambardzumyan, 2003; Cicuta, 2001] un menor valor del exponente indica una configuración más extendida de la proteína en la interfaz tetradecano-agua, claro indicativo de un mayor desdoblamiento de la molécula en esta interfaz. Este resultado es completamente coherente con el desplazamiento de la isoterma observado en la Figura 5.1. Asimismo, a concentraciones interfaciales más altas, a juzgar por el valor de $y_3 \sim 1.8$, tiene lugar en la película interfacial la formación de estructuras tridimensionales y la formación de cuasi-cepillos parece dominar el

comportamiento de la monocapa. Este resultado corrobora igualmente la interpretación realizada de los datos experimentales en la que se sugiere una penetración de las partes hidrófobas en la fase oleosa.

Ahora bien, pese a que la información proporcionada por el análisis de escalado de las curvas parece confirmar los resultados experimentales, desde un punto de vista teórico se podría estar incurriendo en ciertas incoherencias. Efectivamente, el modelo teórico propuesto, señala que los exponentes y_2 e y_3 no pueden ser mayores que 1 en interfaces líquidas [Douillard, 2003]. Los valores encontrados en este trabajo en la interfaz tetradecano-agua, se desvían claramente de esta premisa. Siendo así, y con el fin de solventar esta contradicción, el modelo ha sido aplicado a monocapas de β -caseína en otras interfaces líquidas, cuyas isothermas se han presentado por otros autores en la bibliografía. La Tabla 5.I recoge los parámetros y_2 e y_3 obtenidos tras la aplicación de la teoría de escalado a las isothermas de β -caseína en la interfaz tolueno-agua dados por Graham y Phillips [Graham, 1978c], a los obtenidos por Sengupta y col en la interfaz trioleína-agua [Sengupta, 1998] así como los obtenidos en este trabajo en la interfaz tetradecano-agua, para facilitar su comparación.

Por un lado, Sengupta y col. exponen que la β -caseína adopta una configuración más compacta en la interfaz trioleína-agua haciendo una interpretación de los datos experimentales análoga a la hecha de la Figura 5.1. En este contexto, Douillard y col. indican que la β -caseína retiene una estructura tridimensional en todo el intervalo de presión interfacial considerado. Concretamente, los valores de los exponentes y_2 e y_3 expuestos en la Tabla 5.I, se identifican con la superposición de bloques tridimensionales a bajo recubrimiento interfacial mientras que a formación de un “cuasi-cepillo” domina a alta presión interfacial de acuerdo con los resultados experimentales [Sengupta, 1999; Douillard,

2003]. Por otro lado, Graham y Phillips obtienen conclusiones similares del análisis de las curvas experimentales de β -caseína en la interfaz tolueno-agua. Es decir, también concluyen que la proteína adopta una estructura más compacta en la interfaz líquida que la adoptada en la interfaz aire-agua [Graham, 1978c]. La aplicación del tratamiento teórico verifica parcialmente esta hipótesis. Aunque los valores de y_2 e y_3 dados en la Tabla 5.I, efectivamente, indican que la proteína retiene una conformación tridimensional, el aumento del valor del exponente indica que esta es menos acentuada que en el caso de la interfaz trioleína-agua. En resumen, a la vista de los resultados del tratamiento teórico, la aparición de dominios bidimensionales en la capa interfacial parece igualmente improbable en estas dos interfaces oleosas. Las regiones descritas por los exponentes y_2 e y_3 en las interfaces trioleína-agua y tolueno-agua, parecen estar formadas por unidades estructurales similares que además son prácticamente tridimensionales.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la aplicación de la teoría de escalado a las monocapas de β -caseína en otras interfaces líquidas verifica las hipótesis experimentales. Asimismo, proporcionan una explicación razonada a la aparente discrepancia entre la estructura interfacial adoptada en cada una de las interfaces, facilitando una visualización de la misma. Paralelamente, el análisis presentado ciertamente sugiere que la estructura adoptada por la proteína en la interfaz depende significativamente de la naturaleza de la misma. La cuestión es ahora cómo modifican los diferentes tipos de aceite la estructura de la proteína interfacial. Pues bien, admitamos que el desdoblamiento interfacial de la proteína tiene lugar con el fin de disminuir el exceso de energía interfacial [Anderson, 2000]. En este caso, se podría buscar una conexión entre la estructura interfacial adoptada por la proteína y la naturaleza de la fase

oleosa en términos de su tensión interfacial. La Tabla 5.I muestra las tensiones interfaciales de los tres aceites analizados [Weast, 1974]. Existe una clara correlación entre los valores obtenidos para el exponente y_2 y las respectivas tensiones interfaciales de las fases líquidas. Analicemos estos valores en detalle.

Consideremos la tensión interfacial como una medida de la repulsión entre las dos fases en contacto, siendo ésta mayor cuanto mayor es la repulsión. Primeramente, la interfaz trioleína-agua tiene una tensión interfacial extremadamente baja. Así, el desdoblamiento interfacial no se encontrará en este caso completamente favorecido e incluso podría ser que la proteína penetrase preferentemente en la fase oleosa formando una estructura tridimensional. Esta hipótesis, además, podría explicar el notable recubrimiento interfacial reportado en [Sengupta, 1999] que contrasta con la inapreciable reducción de la tensión interfacial debido a una transferencia completa de la proteína a la fase oleosa. Con respecto a la interfaz tolueno-agua, el ligero incremento dado para los valores de y_2 e y_3 , dentro de la región tridimensional, predice una cierta expansión de la proteína en esta interfaz con respecto a la alcanzada en la interfaz trioleína-agua. En claro acuerdo con esta conclusión, la tensión interfacial del tolueno es más alta que la de la trioleína. Por tanto, era de esperar un aumento similar del desdoblamiento de la proteína en la interfaz, cuya expansión se encuentra favorecida por el aumento de la repulsión entre las fases adyacentes. Finalmente, la incluso mayor tensión interfacial del tetradecano implicaría, de manera similar, un aún mayor desdoblamiento de la proteína en contacto con esta última interfaz. Así, este razonamiento proporciona una explicación completamente satisfactoria a las discrepancias encontradas en la bibliografía con respecto a la estructura interfacial de la β -caseína en interfaces líquidas que n son finalmente tales.

Por otro lado, haciendo uso de argumentos similares, uno puede encontrar una explicación al, a priori sorprendentemente alto, valor obtenido para γ_2 en la interfaz tetradecano-agua. De hecho, la tensión interfacial del tetradecano no solamente es más alta que la de las otras dos interfaces sino que se aproxima a la tensión superficial del agua. Como consecuencia, el comportamiento interfacial de la β -caseína en esta interfaz también se aproxima al comportamiento de la proteína en la interfaz aire-agua. Prueba de ello es la aparición de dos regiones bien diferenciadas así como de estructuras de naturaleza bidimensional en el caso de la interfaz tetradecano-agua y no en las otras dos interfaces.

La aplicación de la teoría de escalado a las isothermas π -A de monocapas de proteína proporciona una valiosa información estructural. El análisis presentado, no solamente permite comprender el comportamiento de las monocapas en la interfaz aire-agua y tetradecano-agua, sino que su aplicación a datos bibliográficos proporciona una visión generalizada del fenómeno en la que la naturaleza de la fase oleosa es un factor clave en la estructura interfacial adoptada por la proteína. Resumiendo, la imagen de la molécula, al menos en la región de alto recubrimiento interfacial, sería la de un polímero con bloques hidrófilo-hidrófobo alternados y con una configuración dependiente de la naturaleza de las fases adyacentes. La proteína se tiende a situar en la interfaz desdoblándose más conforme la tensión interfacial de la fase oleosa pura aumenta. Además, el comportamiento interfacial de la proteína tiende a parecerse al que presenta en la interfaz aire-agua conforme aumenta la tensión interfacial de la fase oleosa.

5.3 ADSORCIÓN DE β -CASEÍNA EN INTERFACES LÍQUIDO-FLUIDO

En este segundo apartado se propone evaluar el comportamiento de la β -caseína adsorbida en las dos mismas interfaces en las que se ha realizado el estudio de monocapas. Así, el primer objetivo planteado es la obtención e interpretación de los resultados experimentales de adsorción de β -caseína en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua. Sin embargo, y de manera análoga a lo expuesto en el apartado anterior, el mero análisis de las curvas experimentales resulta insuficiente para obtener una caracterización estructural de las películas formadas en ambas interfaces. En este punto, surge el segundo objetivo de este trabajo que es el análisis de los resultados experimentales en el marco de un modelo termodinámico desarrollado por Fainerman y col. a lo largo de la última década [Fainerman, 1996; Makievski, 1998; Fainerman, 1999; Fainerman, 2003] La validez de esta teoría ha sido extensamente comprobada con varias proteínas en la interfaz aire-agua. Sin embargo, la comparación explícita con datos experimentales en la interfaces líquidas no se había realizado hasta ahora y constituye uno de los logros de esta Tesis Doctoral.

5.3.1 Determinación de los valores de equilibrio de π -c

La aplicación de modelo teórico ha de realizarse sobre valores de presión interfacial en condiciones de equilibrio termodinámico con las fases adyacentes. Para ello, la adsorción de β -caseína en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua es monitorizada manteniendo el área interfacial constante durante periodos muy largos de tiempo (hasta 20 horas). La Figura 5.2 muestra las curvas dinámicas de adsorción de la proteína en las dos interfaces estudiadas.

Solo se muestran en la figura las 5 primeras horas de la adsorción con el fin de facilitar la visualización del proceso.

Cabe destacar como el equilibrio se alcanza rápidamente solamente para las disoluciones más concentradas y esto ocurre igualmente en ambas interfaces de acuerdo con estudios previos [Beverung, 1999; Tripp, 1995]. Sin embargo, sí que aparecen diferencias notables al comparar las curvas de adsorción para la misma concentración de proteína en cada interfaz. En particular, la velocidad de aumento de la presión interfacial es mayor en la interfaz tetradecano-agua para un valor dado de concentración. Beverung y col. encuentran igualmente velocidades mayores de adsorción para la β -caseína en la interfaz heptano-agua con respecto a otras proteínas globulares y explican este hecho debido a la estructura desordenada de la β -caseína en disolución [Beverung, 1999]. Asimismo, Sengupta y col. relacionan las diferencias en la velocidad de adsorción de la β -caseína en la interfaz aire-agua con respecto a la interfaz trioleína-agua con diferencias en la interacción de dispersión entre la proteína y la fase no polar [Sengupta, 1999]. Esta interacción es siempre atractiva en el caso de interfaces oleosas y podría igualmente explicar la mayor velocidad de adsorción encontrada para la interfaz tetradecano-agua en la Figura 5.2.

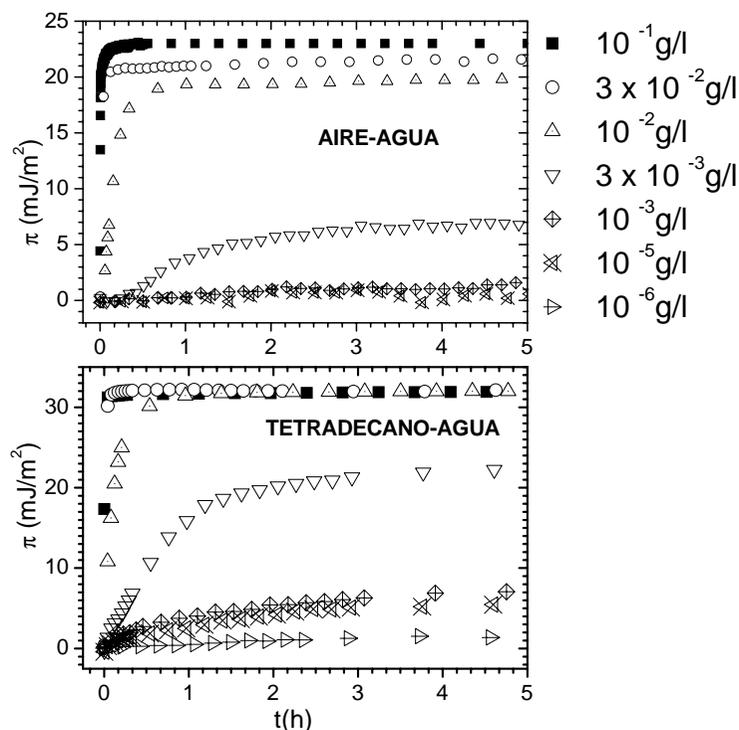


Figura 5.2: Curvas dinámicas de la adsorción de β -caseína en la interfaz aire-agua (gráfica superior) y en la interfaz tetradecano-agua (gráfica inferior).

Con el fin de analizar con mayor detalle como afecta la presencia de una interfaz líquida a la adsorción de la β -caseína, es necesario obtener los valores de presión interfacial de equilibrio alcanzados para cada concentración. Esto se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en [Fainerman, 1994; Makievski, 1997]. En él, los valores de equilibrio de la tensión interfacial se estiman considerando un mecanismo de adsorción mixto a través de la extrapolación de las derivadas $d\gamma/dt^{-1/2}$ y $d\gamma/dt^{-1}$. Estas dos extrapolaciones se corresponden con la consideración de un mecanismo de adsorción controlado por difusión y con la presencia de

una barrera a la adsorción, respectivamente. La primera consideración resulta en la conocida relación de Joos-Hansen [Fainerman, 1994]. Los resultados estimados por esta extrapolación, resultan ligeramente mayores a los predichos por esta ecuación, debido a que el formalismo se derivó originariamente para tensioactivos [Wüstneck, 1996]. Para contrarrestar esto, se hace uso de la segunda consideración para extrapolar los datos experimentales de adsorción como se describe en la referencia [Makievski, 1998]. Los valores de tensión interfacial estimados por estos dos procedimientos de extrapolación son muy próximos entre sí [Maldonado-Valderrama, 2004b]. Además, debido a los larguísimos periodos de tiempo de adsorción dispuestos, estos valores extrapolados coinciden prácticamente con el valor final alcanzado por la tensión interfacial en cada experimento. Finalmente, los datos considerados en la construcción de las isothermas son la media aritmética de estos valores. Las Figuras 5.3 y 5.6 muestran las isothermas de adsorción obtenidas mediante este procedimiento para la β -caseína en la interfaz aire-agua y en la interfaz tetradecano-agua. Estas figuras muestran igualmente las predicciones teóricas, pero veamos cada una de ellas por separado.

5.3.2 Modelo de Fainerman y col. I

A la vista de los resultados experimentales mostrados en la Figura 5.3 se pueden apreciar importantes diferencias entre el comportamiento de la β -caseína en la interfaz aire-agua y en la interfaz tetradecano-agua. Brevemente, en la interfaz oleosa, la isoterma aparece desplazada hacia valores menores de la concentración a la vez que a la misma concentración le corresponde un valor mayor de presión interfacial. Asimismo, la presión interfacial

dada en la región de saturación, es decir a valores de recubrimiento interfacial muy alto, es mucho mayor en la interfaz oleosa; siendo 22 y 32 mJ/m^2 , para la interfaz aire-agua y la interfaz tetradecano-agua, respectivamente.

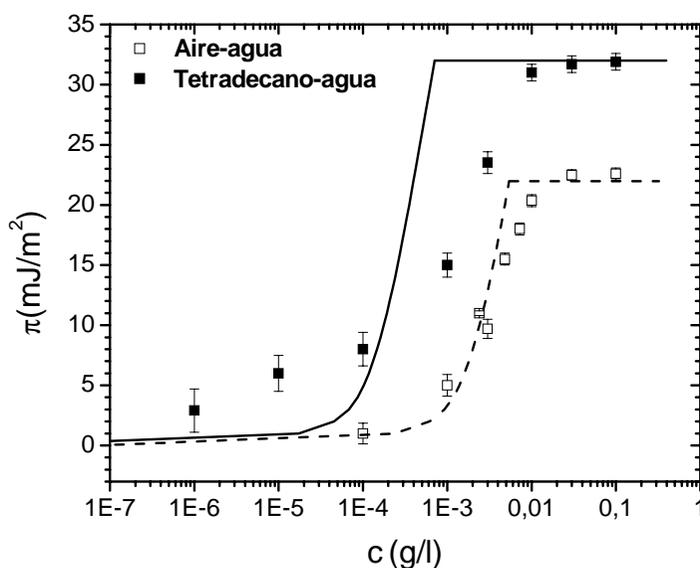


Figura 5.3: Isotermas π - c experimentales β -caseína en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua y ajustes teóricos con las ecuaciones (3.24)-(2.28) con los parámetros en la Tabla 5.II

Basándonos en estas premisas, cabe deducir dos cosas. Por un lado, a juzgar por las curvas dinámicas de adsorción, las fuerzas que llevan a la proteína a la interfaz se ven modificadas por la presencia de una interfaz oleosa. Por otro lado, la estructura adoptada por la proteína en la interfaz se ve similarmente afectada por la naturaleza de la misma.

Teniendo en cuenta las conclusiones derivadas del estudio de monocapas presentado en el apartado anterior, la interpretación de los datos experimentales de adsorción se realiza haciendo uso de los

mismos argumentos. De esta manera, el aceite es un mejor disolvente para las partes hidrófobas de la molécula adsorbida que así pueden penetrar en la fase no polar. Así, incluso a altos valores de recubrimiento interfacial, el proceso de desdoblamiento interfacial puede producirse así como la adsorción de nuevas moléculas y esto explicaría el mayor valor de presión interfacial en la región de saturación obtenido en la interfaz tetradecano-agua. La interacción fuertemente repulsiva entre el tetradecano y el agua, puesta de manifiesto en el apartado anterior por su alta tensión interfacial, desempeña en el proceso de adsorción un papel completamente similar al desempeñado en la formación de monocapas. La proteína tiende a expandirse lo más posible para contrarrestar la alta energía interfacial. En este sentido, Chipot y col. apoyan este argumento en un estudio del comportamiento interfacial de un péptido en la interfaz hexano-agua usando técnicas de dinámica molecular. Este estudio muestra que el péptido se localiza preferentemente paralelo a la interfaz o bien orientado de manera que parte de la molécula se encuentra inmersa en la fase oleosa [Chipot, 1998]. Teniendo esto en cuenta, en nuestro caso a bajo recubrimiento interfacial el desdoblamiento interfacial se encuentra favorecido en la interfaz tetradecano-agua. Conforme aumenta la concentración interfacial, el alto número de moléculas en la interfaz resulta en una cierta restricción a los cambios conformacionales y prevalece la penetración en la fase no-polar [Wüstneck, 1999].

Al igual que ocurría con las monocapas de β -caseína en el apartado anterior, el análisis de las curvas experimentales proporciona una idea aproximada de la estructura interfacial. Sin embargo, no proporciona información cuantitativa de los procesos interfaciales y para ello se requiere la aplicación de un modelo teórico. La Figura 5.3 muestra las predicciones teóricas de las ecuaciones (3.24)-(3.28 para

la β -caseína en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua. Los parámetros de entrada considerados son los indicados por los autores del modelo en ambas interfaces y expuestos en la Tabla 5.II [Miller, 2000]. Las curvas teóricas se han obtenido tras la elaboración de un programa descrito en la sección 3.6 y en la referencia [Maldonado-Valderrama, 2004b]

Tabla 5.II: Parámetros de ajuste y de entrada para las ecuaciones (3.24)-(3.28) en la interfaz aire-agua y tetradecano-agua [Miller, 2000].

Parámetro	Aire-agua	Tetradecano-agua
b_I	$6.9 \cdot 10^{-6}$ l/mol	$9.4 \cdot 10^{-7}$ l/mol
a_{el}	70 ± 20	70 ± 20
α	0.00	0.00
ω_{min}	5 nm ² /molec	5 nm ² /molec
ω_{max}	100 nm ² /molec	100 nm ² /molec

Como se observa en la Figura 5.3, la teoría concuerda perfectamente con los resultados experimentales en la interfaz aire-agua, de acuerdo con estudios previos de adsorción de la misma proteína [Fainerman, 1996; Makievski, 1998; Miller, 2000]. Sin embargo, en la interfaz tetradecano-agua la correlación entre teoría y experimento no parece tan satisfactoria. Este hecho, no resulta del todo sorprendente teniendo en cuenta la interpretación de las curvas experimentales de adsorción y sobre todo los resultados del estudio de monocapas presentado en el apartado anterior. En ambos casos, se sugiere un mayor desdoblamiento de la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua que no se ve reflejado en los parámetros de la Tabla

5.II. Por esta razón, resulta lógico incluir este resultado en el tratamiento teórico de los datos de adsorción. La Figura 5.4 muestra el efecto que tiene un incremento del área molar mínima ocupada por la proteína en la interfaz (ω_{min}). Se observa claramente como el ajuste de los datos experimentales mejora notablemente conforme aumenta el valor de este parámetro. Este hecho concuerda perfectamente con las conclusiones extraídas del análisis de escalado de las monocapas de β -caseína en la interfaz tetradecano-agua.

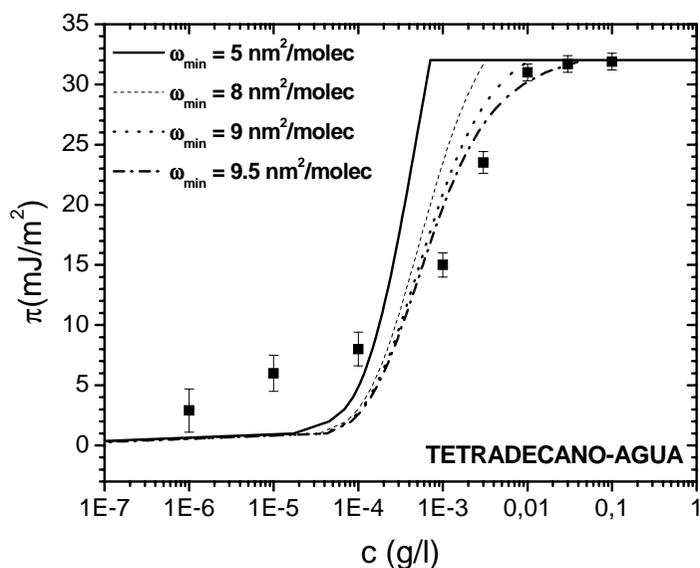


Figura 5.4: Efecto de un incremento de área en el formalismo teórico, ecuaciones (3.24)-(2.28), aplicado a la isoterma π - c de la β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua. El resto de los parámetros se encuentran expuestos en la Tabla 5.II.

La validez de este tratamiento teórico ha sido comprobada ampliamente en la bibliografía con varias proteínas en la interfaz aire-agua [Miller, 2000; Miller, 1998]. Por ello, las predicciones teóricas mostradas en la Figura 5.4 deben proporcionar información fiable acerca de la estructura interfacial de la β -caseína en

la interfaz tetradecano-agua. De acuerdo con esto, la aplicación del modelo teórico no solamente corrobora sino que además cuantifica las hipótesis experimentales.

Siguiendo un esquema análogo al seguido en la sección anterior, y con el fin de evaluar el efecto de la naturaleza de la interfaz sobre la estructura de la proteína adsorbida, el tratamiento teórico se ha aplicado a los resultados de adsorción de β -caseína en otra interfaz oleosa. La Figura 5.5 muestra explícitamente una comparación de las isothermas de adsorción de la β -caseína en las interfaces tetradecano-agua obtenidas en este trabajo [Maldonado-Valderrama, 2004b] y en la interfaz tolueno-agua, obtenidas por Graham y Phillips [Graham, 1979b].

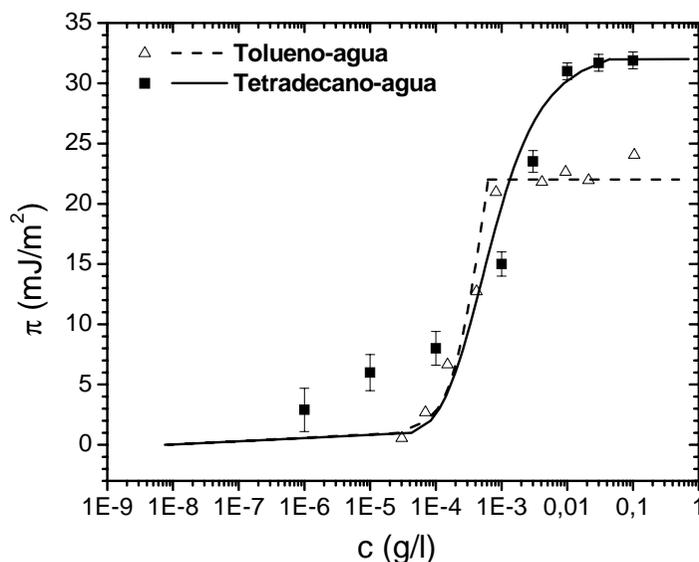


Figura 5.5: Isothermas π -c experimentales de la β -caseína en las interfaces tetradecano-agua y tolueno-agua [Graham, 1979b] y ajustes teóricos con las ecuaciones (3.24)-(2.28) usando los parámetros en la Tabla 5.III

Como se puede observar, las dos isothermas aparecen localizadas en la misma región de concentraciones aunque difieren significativamente en la forma de la isoterma y sobre todo en la máxima presión interfacial alcanzada en la región de saturación. Esta última observación ha sido ya tratada por Makievski y col. y la justifican en términos de diferencias entre las técnicas de medida [Makievski, 1998]. Con respecto a las diferencias en la forma de la isoterma, éstas se deberán a la naturaleza de la fase oleosa utilizada. La aplicación del modelo teórico proporciona información acerca de la configuración estructural adoptada por la proteína en ambas interfaces. Concretamente, la Figura 5.5 muestra también los ajustes teóricos realizados con los parámetros expuestos en la Tabla 5.III. Si consideramos que el parámetro ω_{min} cuantifica el desdoblamiento interfacial, se concluye que la β -caseína adopta una configuración más extendida en la interfaz tetradecano-agua que la adoptada en la interfaz tolueno-agua y esta a su vez es prácticamente igual que la adoptada en la interfaz aire-agua, de acuerdo con las conclusiones de Graham y Phillips [Graham, 1979b; Graham, 1979c]. Además, este resultado también concuerda con el estudio presentado en el apartado anterior. El menor valor de ω_{min} obtenido para la interfaz tolueno-agua, con respecto al obtenido en la interfaz tetradecano-agua, coincide con los resultados de la teoría de escalado que afirma que la β -caseína retiene cierta estructura tridimensional en una monocapa en la interfaz tolueno-agua. De este modo, la conexión encontrada entre la estructura de las monocapas de β -caseína y la tensión interfacial de la fase oleosa utilizada se puede extrapolar a la estructura adoptada por la proteína adsorbida en interfaces.

Tabla 5.III: Parámetros de ajuste y de entrada para las ecuaciones (3.24)-(3.28) en la interfaz tolueno-agua y tetradecano-agua.

Parámetro	Tolueno-agua	Tetradecano-agua
b_I	$6 \cdot 10^{-7}$ l/mol	$9.4 \cdot 10^{-7}$ l/mol
a_{el}	70 ± 20	70 ± 20
α	0.00	0.00
ω_{min}	$5 \text{ nm}^2/\text{molec}$	$9.5 \text{ nm}^2/\text{molec}$
ω_{max}	$100 \text{ nm}^2/\text{molec}$	$100 \text{ nm}^2/\text{molec}$

Con respecto a la región de bajo recubrimiento interfacial, se observa que las predicciones teóricas se desvían de los datos experimentales. En esta región, las moléculas se encuentran en estado de máximo desdoblamiento. En los ajustes teóricos presentados en la Figura 5.4 solamente se ha modificado el valor del área interfacial mínima ocupada por la molécula. Este parámetro atañe principalmente a la región de alto recubrimiento interfacial y por ello esta es la zona en la que se mejora el ajuste. De hecho, al aumentar el valor del área interfacial máxima las predicciones teóricas obtenidas no se ven alteradas.

5.3.3 Modelo de fainerman y col. II

Con el fin de mejorar este resultado, se ha realizado el ajuste de los mismos datos experimentales pero con una versión nueva del modelo teórico, recientemente desarrollada [Fainerman, 2003]. Brevemente, la proteína difunde rápidamente a la interfaz aire-agua y sufre un cierto desdoblamiento interfacial en la misma. La principal modificación introducida en la teoría consiste en la división de la

descripción de la estructura molecular en la interfaz en tres parámetros independientes: ω_{max} , ω_{min} y ω_0 como se encuentra descrito en el Capítulo 3.

La Figura 5.6 muestra de nuevo las isothermas experimentales de adsorción de β -caseína en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua así como las predicciones teóricas obtenidas con la versión mejorada del modelo teórico y los parámetros expuestos en la Tabla 5.IV. Se aprecia claramente en la figura una mejora notable de la correspondencia entre teoría y experimento con este modelo. Veamos con detalle el valor dado a los parámetros de ajuste.

Los parámetros utilizados en el ajuste de la isoterma en la interfaz aire-agua proporcionan una excelente correlación y se encuentran descritos en detalle en [Fainerman, 2003]. Con respecto a los datos de entrada utilizados en la interfaz tetradecano-agua, la elección de los mismos se ha realizado teniendo en cuenta el estudio previo realizado. Por un lado, se asume que la β -caseína adopta una configuración más extendida en la interfaz tetradecano-agua que en la interfaz aire-agua. Asimismo, considerando la ausencia de correlación entre los datos experimentales y la teoría (modelo de Fainerman I) en la zona de bajo recubrimiento interfacial al imponer el mismo valor de área máxima interfacial en las dos interfaces, en el nuevo modelo teórico es el valor de ω_{max} el que se incrementa en el ajuste de los datos en la interfaz oleosa. Por otro lado, la principal novedad en la descripción termodinámica de la adsorción de proteínas dada en el nuevo modelo teórico es la introducción de área del segmento de la proteína adsorbida en el formalismo. Una proteína flexible como es la β -caseína se encuentra sujeta a grandes cambios conformacionales en el proceso de adsorción [Damodaran, 2003; Fainerman, 2003; Miller, 2000]. Estos cambios incluyen formación de bucles y colapso de segmentos y su forma es muy dependiente de la naturaleza de las fases

adyacentes. A partir del análisis de las monocapas realizado en el apartado anterior se deduce que la longitud de los segmentos que colapsan en la interfaz tetradecano-agua es mayor que la obtenida en la interfaz gaseosa debido al mayor desdoblamiento de su estructura. En la Figura 5.1 se observa que el valor en la interfaz tetradecano-agua es prácticamente el doble. Así pues, la modificación del área del segmento en el tratamiento teórico, parece más realista que cambiar el área mínima de la molécula en la interfaz. De esta forma, en el nuevo modelo teórico utilizado, el valor de ω_{min} permanece invariable en las dos interfaces e igual al dado para la β -caseína en la interfaz aire-agua en [Fainerman, 2003] mientras que los valores de ω_0 y ω_{max} duplican su valor en la interfaz tetradecano-agua con respecto al utilizado en la interfaz aire-agua. Finalmente, los valores de a y b_1 se han considerado como parámetros de ajuste en la interfaz tetradecano-agua, tomando aquellos que proporcionan el mejor ajuste, tal y como se indica en la referencia [Fainerman, 2003].

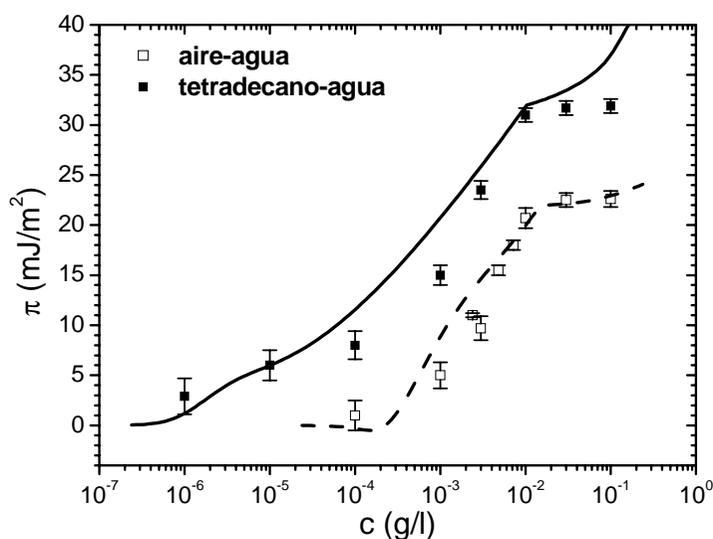


Figura 5.6: Isotermas de adsorción de β -caseína en la interfaz aire-agua y tetradecano-agua. Ajuste teórico con las ecuaciones (3.34)-(3.37) y parámetros en la Tabla 5.IV. Interfaz aire-agua (línea discontinua) y en la interfaz tetradecano-agua (línea continua)

De esta manera, la aplicación del modelo teórico modificado proporciona una descripción cuantitativa más completa de la estructura adoptada por la β -caseína en las dos interfaces que la dada por la versión anterior del tratamiento teórico. Los valores de los parámetros de área interfacial permiten evaluar el grado de desdoblamiento interfacial alcanzado por la β -caseína en las dos interfaces estudiadas. De acuerdo con el trabajo previo realizado, la proteína sufre un desdoblamiento más acusado en la interfaz tetradecano-agua. Recientemente, Damodaran encuentra en un estudio experimental del desdoblamiento superficial que la estructura flexible de la β -caseína resulta en una menor desnaturalización superficial al compararla con otras proteínas globulares [Damodaran, 2003]. Es probable, que la interacción de la proteína adsorbida con la fase oleosa sea la responsable del mayor desdoblamiento encontrado en esta interfaz. Asimismo, el valor del parámetro de Frumkin disminuye en la interfaz tetradecano-agua y esto indica una menor interacción entre las moléculas en la interfaz oleosa con respecto a la interacción entre dos moléculas en la interfaz aire-agua. Una vez más la interacción de éstas con la fase oleosa justificaría este resultado. Además, Freer y col. también reportan una interacción más débil entre moléculas de β -caseína en la interfaz hexano-agua que la encontrada entre moléculas de lisocima en la misma interfaz [Freer, 2004] consistente con los resultados presentados.

Tabla 5.IV: Parámetros de ajuste y de entrada para las ecuaciones (3.34)-(3.37) en la interfaz aire-agua [Fainerman, 2003] y tetradecano-agua.

Parámetro	Aire-agua	Tetradecano-agua
b_1	$3.5 \cdot 10^3 \text{ m}^3/\text{mol}$	$10^5 \text{ m}^3/\text{mol}$
b_2	$10 \text{ m}^3/\text{mol}$	$10^3 \text{ m}^3/\text{mol}$
a	1.00	0.50
ω_0	$2.5 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$	$4.0 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$
ω_{min}	$4.5 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{mol}$	$4.5 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{mol}$
ω_{max}	$4.5 \cdot 10^7 \text{ m}^2/\text{mol}$	$4.5 \cdot 10^8 \text{ m}^2/\text{mol}$

El tratamiento teórico dado a los datos experimentales en este trabajo ofrece un amplio abanico de posibilidades en la clarificación del proceso de adsorción de proteínas en interfaces líquidas. A partir de una serie de experimentos relativamente sencillos, como es la adquisición de las isothermas π - c , la aplicación del modelo teórico de la manera propuesta proporciona información cuantitativa de la estructura interfacial adoptada por la proteína.

5.4 DINÁMICA DE LA ADSORCIÓN DE β -CASEÍNA EN LA INTERFAZ TETRADECANO-AGUA

Es un hecho aceptado en la bibliografía que en términos generales, el proceso de adsorción de proteínas en interfaces fluidas se desarrolla en tres etapas. Cada una de ellas está caracterizada por un régimen de disminución de la tensión interfacial. En primer lugar, las proteínas en disolución difunden hacia la interfaz y se adsorben en su estado nativo. El recubrimiento interfacial correspondiente a este

periodo es mínimo (10-20%) y el cambio en la tensión interfacial apenas perceptible. Este periodo se denomina tiempo de inducción y es característico de la adsorción de proteínas. Conforme transcurre el tiempo, la concentración interfacial de proteínas aumenta y los residuos hidrófobos de las moléculas comienzan a disponerse en contacto con la fase no polar así como a interactuar entre ellos [Freer, 2004; Anderson, 2000]. Este es el periodo de mayor cambio en la tensión interfacial. Finalmente, a tiempos muy largos, mientras continúan la adsorción y los cambios conformacionales, tienen asimismo lugar la formación multicapas [Beverung, 1999; Graham, 1979a], procesos de agregación [Beverung, 1999] y de gelificación interfacial [Freer, 2004]. En este último periodo, la variación de la tensión interfacial es de nuevo mínima, aunque continúa durante larguísimos periodos de tiempo. Estos mecanismos de adsorción se pueden observar en los diferentes regímenes de cambio de la tensión interfacial en la Figura 5.7. En esta figura se muestra una colección representativa de las curvas de adsorción dinámicas de β -caseína en la interfaz tetradecano-agua que ya se mostraron en la Figura 5.2. Así, en la Figura 5.7 se observa como la variación de la tensión interfacial depende notoriamente de la concentración de la disolución. Así pues, el periodo de inducción aparece únicamente para las disoluciones más diluidas mientras que solamente las disoluciones más concentradas parecen alcanzar la saturación de la interfaz.

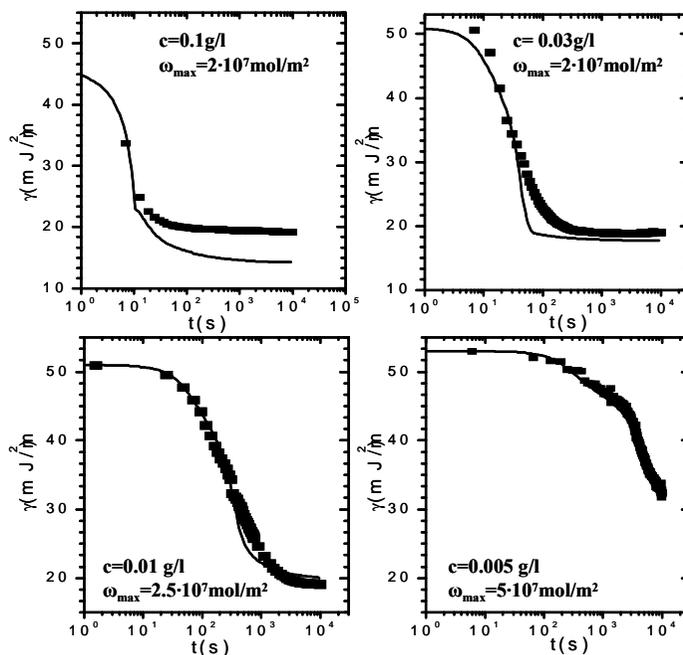


Figura 5.7: Curvas experimentales (símbolos) y teóricas (líneas), correspondientes a la ecuación (3.54) de la adsorción de β -caseína en la interfaz tetradecano-agua con los parámetros de la Tabla 5.IV

La Figura 5.7 muestra igualmente las curvas teóricas obtenidas tras la aplicación del formalismo descrito en el Capítulo 3. Los parámetros de ajuste incluidos en este formalismo son los mismos que los requeridos en el ajuste de las isothermas de adsorción con la adición de un parámetro extra: el coeficiente de difusión efectiva D . Cabe destacar, que los valores numéricos dados a estos parámetros son exactamente los mismos que los utilizados en el ajuste de la isoterma de adsorción en equilibrio y expuestos en la Tabla 5.IV. Solamente el valor dado al área interfacial máxima ocupada por la proteína hubo de ser cambiado. Veremos este resultado con detalle más adelante.

En términos generales, se aprecia en la Figura 5.7 que la correlación entre teoría y experimentos disminuye conforme el sistema se acerca a su valor de equilibrio, i. e. tiempos muy largos y disoluciones muy concentradas. Este hecho es consistente con la descripción del proceso de adsorción. La aplicación de la ecuación de Ward y Tordai describe un proceso de adsorción controlado por difusión. Teniendo en cuenta los tres regímenes existentes en la adsorción de proteínas, esta aproximación es solamente válida en los primeros instantes del proceso, en los cuales domina la difusión de moléculas desde el seno de la disolución a la interfaz. Transcurrido el suficiente tiempo, tienen lugar otros mecanismos en la capa interfacial. De acuerdo con esto, en la Figura 5.7 se observa como la tensión interfacial experimental varía más lentamente que la tensión interfacial teórica a tiempos largos y esta diferencia se acentúa conforme aumenta la concentración de proteína en la disolución. Este comportamiento es completamente análogo al encontrado por la β -caseína en la interfaz aire-agua y analizado en detalle en ese caso en la referencia [Miller, 2004a]. El Dr. Fainerman y sus colaboradores se encuentran actualmente trabajando en la incorporación de más mecanismos de adsorción en el tratamiento teórico.

Otra observación derivada del ajuste realizado es la relación encontrada entre el ajuste de las curvas en equilibrio y las curvas dinámicas de adsorción. La teoría ajusta bien las curvas dinámicas correspondientes a concentraciones de proteína que se ajustan también bien en el equilibrio. Es decir, en la Figura 5.6, se observa como la curva teórica se desvía levemente de los datos experimentales a concentraciones de proteína altas mientras que reproduce perfectamente los resultados conforme disminuye la concentración de proteína. Este hecho se encuentra asimismo en la correlación entre teoría y experimento de curvas dinámicas de adsorción que también

mejora conforme disminuye la concentración de proteína en la disolución.

Con respecto a los valores obtenidos tras el tratamiento teórico para el coeficiente de difusión de la proteína, este varía para cada una de las interfaces estudiadas. El coeficiente de difusión efectivo de la β -caseína en la interfaz aire agua es de $10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ mientras que en la interfaz tetradecano-agua es ligeramente superior, siendo $4 \cdot 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$. Los valores reportados por Benjamins para el coeficiente de difusión aparente de la β -caseína en la interfaz aire-agua se encuentran en el intervalo de $(2,5-5) \cdot 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ y se atribuye a procesos de convección [Benjamins, 2000]. Este argumento podría explicar también el mayor valor obtenido para D en la interfaz tetradecano-agua de acuerdo con el mayor volumen de gota utilizado en los experimentos con respecto al utilizado en la interfaz aire-agua. Asimismo, Sengupta y col. también encuentran que el coeficiente de difusión aparente aumenta en la adsorción en la interfaz trioleína-agua, con respecto al encontrado en la interfaz aire-agua para varias proteínas. Estos autores explican este comportamiento debido a la existencia de una interacción atractiva entre proteína y fase oleosa.

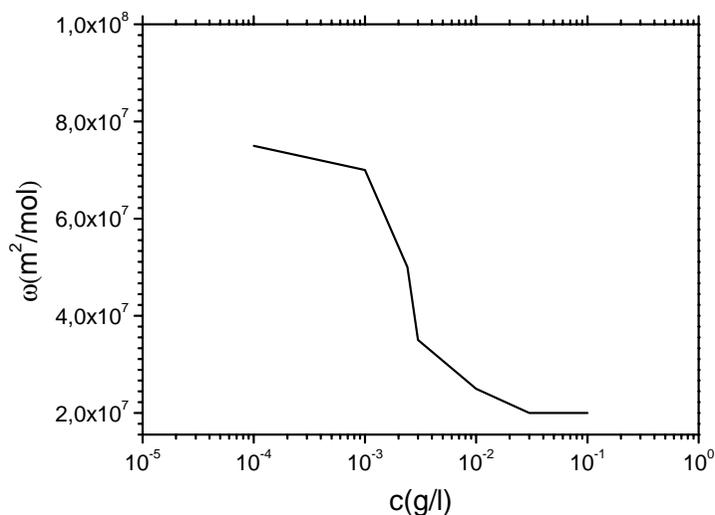


Figura 5.8: Valores teóricos de ω_{max} utilizados para cada concentración en el ajuste de las curvas teóricas de adsorción dinámica de β -caseína en la interfaz tetradecano-agua (ecuación (3.54) y parámetros de la tabla 5.IV).

Finalmente, el resultado más novedoso del ajuste de las curvas dinámicas de adsorción se refiere a los valores de área interfacial máxima obtenidos en el mismo. Algunos de ellos se encuentran detallados en la Figura 5.7, sin embargo, con el fin de evaluar más fácilmente este resultado, la Figura 5.8 muestra los valores de ω_{max} utilizados para cada una de las concentraciones de proteína evaluadas. Cabe destacar que esta gráfica reproduce un comportamiento interfacial bien conocido. La ω_{max} obtenida en el ajuste de la curva de adsorción en equilibrio, se define como el área molar parcial máxima que puede una proteína ocupar en la interfaz. Por ello, es posible que este valor tan elevado se encuentre únicamente en las disoluciones más diluidas, en las cuales la proteína tiene espacio suficiente para desdoblarse al máximo en la interfaz. No obstante, conforme aumenta el recubrimiento interfacial, es decir, la concentración de la disolución, las moléculas con menor área predominan en la interfaz

[Joos, 1991; Fainerman, 2003] y ese alto valor de área máxima predicho por la curva en equilibrio podría no alcanzarse para ninguna molécula. Así pues, con el fin de introducir este hecho experimental en el formalismo teórico, el valor de área máxima utilizado en el ajuste de cada una de las curvas dinámicas se cambia en función de la concentración de la disolución.

La excelente correlación obtenida entre la teoría y los experimentos siguiendo este procedimiento se aprecia claramente en la Figura 5.8. Además, la curva $\omega_{max}(c)$ mostrada en dicha figura, proporciona una imagen detallada de los cambios conformacionales experimentados por la proteína al adsorberse sobre la interfaz tetradecano-agua. De acuerdo con el principio de Braun-Le Chatelier [Joos, 1991], a bajas concentraciones el desdoblamiento interfacial no está restringido [Wüstneck, 1996]. Previamente en la bibliografía, la configuración interfacial de las proteínas se ha estudiado cualitativamente sobre la base de este principio [Beverung, 1999; Wüstneck, 1999]. Precisamente, la Figura 5.8, no solamente verifica sino que paralelamente cuantifica el acusado desdoblamiento de la proteína en la interfaz tetradecano-agua. Así, el desdoblamiento interfacial de una proteína flexible como la β -caseína depende considerablemente de la cantidad de proteína en la interfaz. El cambio en área mostrado en la Figura 5.8 sugiere, de acuerdo con lo visto en el estudio de monocapas, que la proteína atraviesa diferentes regímenes conformacionales en la interfaz tetradecano-agua. A bajo recubrimiento interfacial, la interacción entre la fase oleosa y las moléculas de proteína resulta en una estructura más extendida en esta interfaz que en la interfaz aire-agua. Pero conforme la interfaz se llena, el área máxima ocupada por la proteína en la interfaz tetradecano-agua disminuye con respecto a la ocupada en la interfaz aire-agua. La mejor solvencia de los residuos hidrófobos en la fase

oleosa deriva en una cierta penetración de la proteína en la fase oleosa, responsable de esta disminución y completamente de acuerdo con el estudio de monocapas presentado.

5.5 REOLOGÍA DILATACIONAL DE β -CASEÍNA EN INTERFACES LÍQUIDO FLUIDO

El comportamiento reológico de las capas de proteína adsorbidas en interfaces fluidas es un fenómeno sumamente complejo que acapara desde hace tiempo la atención de numerosos investigadores [Bos, 2001; Benjamins, 2000; Wilde, 2004; Murray, 1998; Langevin, 2000]. El complejo comportamiento de las proteínas adsorbidas en interfaces fluidas visto en las secciones anteriores ya anuncia la complejidad del comportamiento dilatacional. En este sentido, Freer y col. señalan la dificultad de la interpretación de los resultados experimentales de reología dilatacional interfacial a la vez que destacan que los parámetros dilatacionales contienen información ciertamente ilustrativa de la estructura de la proteína en la interfaz [Freer, 2004].

Williams y Prins constituyen unos de los primeros autores que reportan un estudio comparativo del comportamiento dilatacional de la β -caseína en las interfaces aire-agua y parafina-agua haciendo uso de la técnica del anillo de Wilhelmy [Williams, 1996]. Debido a las limitaciones del dispositivo, el intervalo de concentraciones considerado varía solamente entre 10^{-4} y 1 g/l y el estudio reporta un *plateau* en la elasticidad de la película formada en ambas interfaces a bajas concentraciones. Como ya apuntan estos autores, la elasticidad debería ser nula cuando no haya proteína en la disolución. Benjamins y col. comprueban mas tarde esta deducción encontrando un máximo en la elasticidad de la β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua y

también en la interfaz tetradecano-agua [Benjamins, 1998]. Desde entonces, dicho máximo se ha observado repetidamente en la interfaz aire-agua [Hambardzumyan, 2003; Hambardzumyan, 2004; Cicuta, 2001; Mellema, 1998] y sin embargo, los mecanismos que tienen lugar en la interfaz aun presentan interrogantes.

Así pues, la comprensión del citado máximo en la elasticidad, especialmente en la interfaz aceite-agua, constituye el primer objetivo planteado en este estudio. Para ello se ha elaborado una serie completa de experimentos de reología dilatacional que cubren un amplio intervalo de frecuencias de oscilación y de concentración de proteína en dos interfaces fluidas. En primer lugar, los resultados experimentales de elasticidad y viscosidad interfacial se presentan independientemente para cada una de las interfaces y se analizan detenidamente con el fin de extraer la máxima información. El segundo objetivo planteado en este estudio se refiere a la dificultad de extraer la información que contienen los parámetros dilatacionales. En este sentido, el modelo termodinámico desarrollado por Fainerman y col. [Fainerman, 2003] y utilizado en el análisis del proceso de adsorción ha sido recientemente aplicado en la obtención de una expresión de la elasticidad límite de Gibbs [Lucassen-Reynders, 2004]. De esta forma, el ajuste de los datos experimentales con este formalismo teórico proporciona información adicional de los procesos interfaciales y constituye uno de los principales logros de esta Tesis Doctoral.

Todos los resultados experimentales obtenidos en el estudio dilatacional se muestran en las Figuras 5.9 y 5.10. En particular, la primera muestra los resultados de elasticidad interfacial (ϵ) y la última muestra los resultados de viscosidad interfacial (η) de la β -caseína en las dos interfaces estudiadas.

A primera vista, se observa como los comportamientos elástico y viscoso de la capa interfacial son complementarios en cuanto a su dependencia con la frecuencia de la oscilación impuesta. Concretamente, ε aumenta conforme aumenta la frecuencia de la oscilación mientras que η disminuye al aumentar la misma. Efectivamente, a frecuencias bajas, la proteína tiene tiempo suficiente para responder al cambio en área. Así, pueden producirse fenómenos de relajación en la capa interfacial y de esta forma el comportamiento viscoso se hace patente. Por el contrario, un aumento de la frecuencia de la oscilación disminuye el tiempo que tiene la proteína interfacial para adaptarse a la deformación. De esta forma, el componente elástico de la capa interfacial aumenta en detrimento del comportamiento viscoso de la misma. Finalmente, a frecuencias suficientemente altas, la viscosidad de la capa interfacial se hace despreciable y por encima de una frecuencia de 0.1 Hz, se considera que la capa interfacial presenta un comportamiento puramente elástico. Este hecho experimental se encuentra descrito ampliamente en la bibliografía [Benjamins, 2000; Freer, 2004; Hambarzumyan, 2003; Benjamins, 1996, Lucassen-Reynders, 2004].

Pese a este comportamiento de las propiedades viscoelásticas, cualitativamente independiente de la naturaleza de la interfaz, la frecuencia de oscilación impuesta tiene un importante efecto en los parámetros dilatacionales resultantes como se puede apreciar en las figuras. Es más, aparecen diferencias notables entre ambas interfaces si uno compara el comportamiento dilatacional en función del recubrimiento interfacial. Con el fin de facilitar la comprensión de la interpretación de los datos experimentales, veamos separadamente el comportamiento elástico y viscoso de las capas interfaciales formadas en cada una de las interfaces.

5.5.1 Elasticidad interfacial (ϵ)

La Figura 5.9 muestra la elasticidad interfacial obtenida para la β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua y en la interfaz tetradecano-agua. A primera vista se pueden apreciar importantes diferencias entre ambas interfaces. Brevemente, en la interfaz tetradecano-agua aparece un único máximo cuya altura y anchura disminuyen con la frecuencia de la oscilación mientras que, en la interfaz aire-agua, se pueden apreciar dos máximos que convergen en uno conforme aumenta la frecuencia de la oscilación impuesta.

De acuerdo con la bibliografía, la aparición de un máximo en la elasticidad interfacial está ligado a cambios conformacionales en la capa interfacial [Benjamins, 1998; Cicuta, 2001; Mellema, 1998]. Como resultado, parece que la capa interfacial formada experimenta transformaciones estructurales diferentes en función del tiempo del que dispone la película interfacial para responder al cambio en área. La aparición de dos máximos en la elasticidad en la interfaz aire-agua, ha sido previamente encontrada en la bibliografía [Cicuta, 2001; Mellema, 1998]. En estos trabajos, la capa adsorbida es comprimida muy lentamente de manera que la proteína disponga de suficiente tiempo para responder al cambio en área. De acuerdo con estos trabajos, en la Figura 5.9, los dos máximos aparecen únicamente a las frecuencias de oscilación mas bajas. Cicuta y col. identifican el primer máximo con un colapso de segmentos en la subfase y el segundo con la formación de bucles.

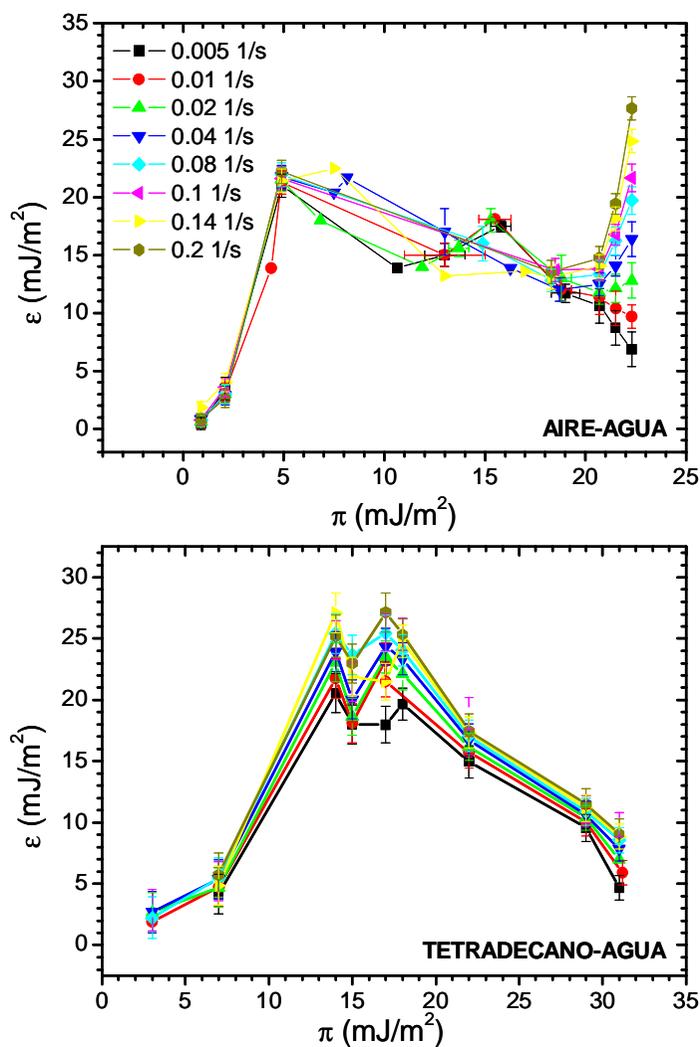


Figura 5.9: Elasticidad interfacial de β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua (gráfica superior) y en la interfaz tetradecano-agua (gráfica inferior).

Conforme aumenta el valor de la frecuencia de oscilación empleada, en la interfaz aire-agua, aparece un único máximo localizado aproximadamente en 7 mJ/m^2 . Similarmente, la elasticidad de la capa formada en la interfaz tetradecano-agua presenta un único

máximo localizado aproximadamente en 15 mJ/m^2 . Es decir, se observa que la localización del cambio conformacional que tiene lugar en la capa interfacial depende de la naturaleza de la fase no polar. De esta forma, en las dos interfaces estudiadas se pueden distinguir dos “regiones conformacionales” diferentes que aparecen separadas por los máximos encontrados en cada una ellas. En este sentido, Miller y col. describen en [Miller, 2004a] una transición conformacional de la β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua localizada en el mismo intervalo de presión interfacial. Estos autores, atribuyen la transición conformacional encontrada a la formación de una bicapa en la interfaz. Es decir, a este valor de la presión interfacial el recubrimiento interfacial es suficientemente alto como para que la proteína se adsorba formando dos capas de proteína consecutivas. Teniendo esto en cuenta y en relación a la interfaz tetradecano-agua, el desplazamiento del máximo hacia presiones interfaciales más altas indicaría la necesidad de un mayor recubrimiento interfacial para que se produzca la transición conformacional. En este sentido, el razonamiento presentado anteriormente sería válido de nuevo. Debido a la interacción cohesiva que tiene lugar entre las cadenas hidrófobas y las moléculas de aceite, la proteína tendería preferentemente a situarse en contacto con la fase oleosa, en lugar de en capas interfaciales sucesivas. De esta forma, se explicaría el desplazamiento de la formación de una segunda capa de β -caseína en la interfaz oleosa a presiones interfaciales mayores.

Con el fin de conocer la estructura interfacial de la proteína en cada una de las dos “regiones estructurales”, se evalúan a continuación dos características del comportamiento elástico encontrado en la Figura 5.9. Primeramente, se analiza la pendiente de la parte lineal creciente del máximo y a continuación, la altura del mismo.

Por un lado, veamos la parte lineal de la elasticidad encontrada en la región de presiones interfaciales entre 0 y 7 mJ/m². De acuerdo con la teoría de escalado presentada anteriormente, la pendiente en esta región es indicativa del grado de compactación de las moléculas en la interfaz [Benjamins, 1998; Hambardzumyan, 2003; Hambardzumyan, 2004; Aguié-Béghin, 1999]. En particular, la pendiente aumenta conforme disminuye la flexibilidad de las moléculas en la interfaz. Como se puede apreciar en la Figura 5.9 la pendiente resultante en la interfaz aire-agua es mayor que la obtenida en la interfaz tetradecano-agua. De acuerdo con esto, la estructura adoptada por la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua es más flexible que en la interfaz aire-agua en este intervalo de presión interfacial. Hambardzumyan y col. encuentran una disminución similar de la pendiente lineal de la elasticidad superficial al aumentar la temperatura para la misma proteína [Hambardzumyan, 2003]. Teniendo en cuenta que un aumento de la temperatura está ligado a una desnaturalización de la proteína, es decir una expansión de la misma, el aumento de la flexibilidad dado por la disminución de la pendiente de ε está relacionado con el área molecular interfacial. De esta manera, la menor pendiente dada para la capa interfacial de β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua en esta región podría indicar un mayor desdoblamiento de la proteína en esta interfaz. Este hecho está completamente de acuerdo con los análisis de las monocapas y de la adsorción presentados anteriormente.

Por otro lado, se aprecia en la Figura 5.9 como el máximo encontrado para la película formada en la interfaz tetradecano-agua es más alto y más ancho que el encontrado para la película en la interfaz aire-agua. De esta forma, al aumentar la presión interfacial llega un momento en que el valor de la elasticidad de la película formada en la interfaz oleosa supera al de la elasticidad de la película formada en la

interfaz gaseosa. Como consecuencia, en esta región la capa interfacial formada es más resistente en la interfaz tetradecano-agua [Benjamins, 1996; Benjamins, 2000; Cascao-Pereira, 2003]. Una vez más, algunos autores relacionan la altura del máximo a la presencia de fuertes interacciones entre los segmentos hidrófobos de la proteína adsorbida y las moléculas de aceite. Asimismo, de acuerdo con Hambardzumyan y col. las interacciones de Wan der Waals, entre partes hidrófobas de la molécula, juegan un papel crucial en el comportamiento elástico de la película interfacial [Hambardzumyan, 2003]. De acuerdo con esto, la mayor elasticidad presentada por la proteína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua podría ser consecuencia de la intensificación de este tipo de interacción en esta interfaz en esta región de recubrimiento interfacial intermedio.

5.5.2 Viscosidad interfacial (η)

A continuación, veamos con detalle la viscosidad de las capas de proteína formadas en ambas interfaces y que se muestran en la Figura 5.10. El comienzo del comportamiento viscoso se debe a la detección de procesos de relajación en la interfaz [Benjamins, 1998; Williams, 1996; Benjamins, 1996; Wüstneck, 1999]. Y se entiende como proceso de relajación al intercambio de moléculas interfaciales entre capas interfaciales sucesivas, a la reorganización conformacional

de moléculas en la interfaz, y a los fenómenos de colapso.

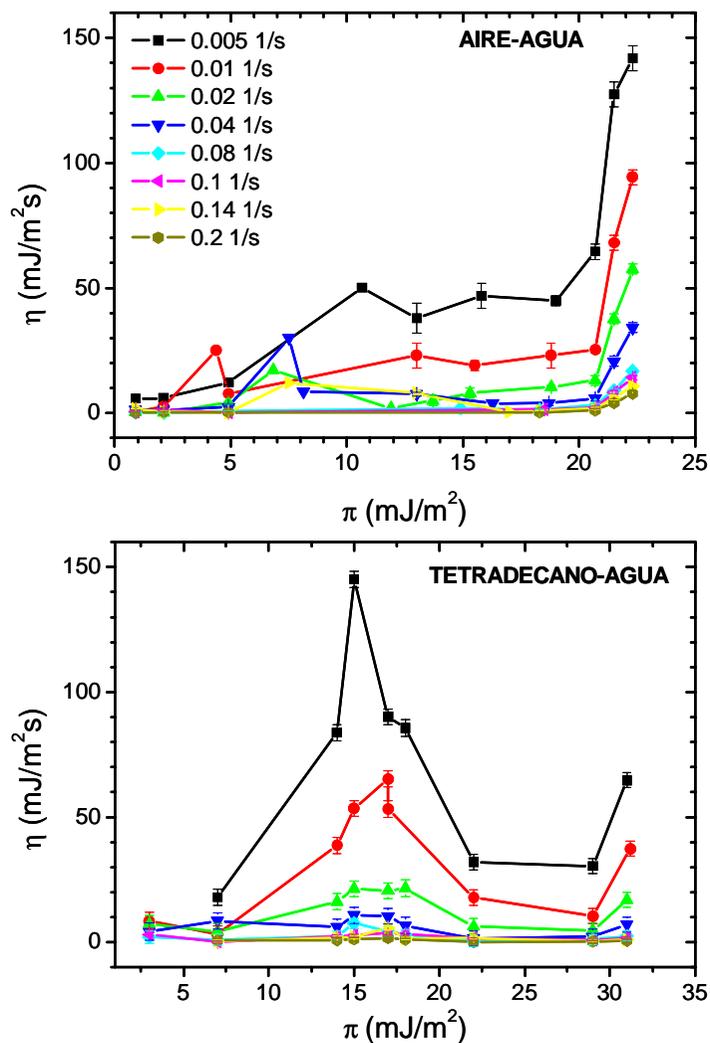


Figura 5.10: Viscosidad interfacial de β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua (gráfica superior) y en la interfaz tetradecano-agua (gráfica inferior).

Con fin de facilitar la comprensión del análisis de los datos experimentales, éste se realiza distinguiendo dos regiones en la Figura

5.10; la primera de presiones interfaciales altas y la segunda de presiones interfaciales bajas.

Veamos, en primer lugar la región de alto recubrimiento interfacial. Se aprecia en la Figura 5.10 como la tendencia es completamente similar en las dos interfaces estudiadas. Se produce un aumento brusco de la viscosidad a las presiones interfaciales más altas. Teniendo en cuenta el alto recubrimiento interfacial existente en esta región, es probable que el proceso de relajación detectado sea mayoritariamente debido a un intercambio de moléculas interfaciales con moléculas en capas adyacentes. En este sentido, Hambarzumyan y col. encuentran un brusco aumento del comportamiento viscoso para la β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua localizado igualmente a unos 17 mJ/m^2 , que además no se ve afectada por un aumento de la temperatura [Hambarzumyan, 2003]. Puesto que la temperatura modifica la estructura de la proteína, este hecho experimental proporciona una evidencia de la interpretación dada al aumento de η . Es decir, el comportamiento ocurre independientemente de la estructura de la proteína y tendría que ver más bien con moléculas completas. Además, se observa en la Figura 5.10 como el componente viscoso es claramente mayor en la interfaz aire-agua. Una posible explicación a este hecho reside nuevamente en la interacción entre proteína e interfaz. La mayor afinidad que presenta la proteína por la interfaz oleosa podría resultar en una mayor interacción cohesiva que se opondría parcialmente al intercambio de moléculas detectado por la componente viscosa. La solubilización parcial de los segmentos hidrófobos en la fase oleosa apoya también esta hipótesis. Asimismo, este fenómeno es coherente con el aumento de la resistencia de la capa interfacial dada por la mayor elasticidad de la capa interfacial formada en la interfaz tetradecano-agua en esta región. Finalmente, cabe destacar que Freer y col. encuentran un aumento similar de la

viscosidad la β -caseína adsorbida en la interfaz hexadecano-agua [Freer, 2004]. En este trabajo se identifica el proceso de relajación detectado con intercambio de moléculas dentro de la estructura de multicapas formada a altas presiones interfaciales.

Veamos en segundo lugar el comportamiento de la viscosidad interfacial en la región de baja presión interfacial en las dos interfaces. Se puede observar en la Figura 5.10 como el comportamiento viscoso aparece únicamente a frecuencias bajas en ambas interfaces de acuerdo con las predicciones teóricas [Langevin, 2000]. Además, para este intervalo de frecuencias, η muestra un máximo muy claro en la interfaz tetradecano-agua mientras que en la interfaz aire-agua aumenta de manera simple. Una vez más, hay que tener en cuenta que el recubrimiento interfacial en esta región no es muy alto. Por ello, el proceso de relajación causante de la viscosidad de la capa interfacial probablemente será debido a cambios conformacionales en la capa interfacial. Con respecto a la interfaz aire-agua, los valores de η parecen corroborar el colapso de segmentos dado por el primer máximo a estas frecuencias de oscilación. En cuanto a la interfaz tetradecano-agua, la importante componente viscosa detectada podría estar relacionada con desdoblamiento interfacial de la proteína. Concretamente, la tendencia de la proteína de expandirse en la superficie tetradecano-agua, vista en las secciones anteriores, junto a la interacción cohesiva que tiene lugar entre las moléculas de aceite y de proteína podrían resultar en una estructura interfacial que se adapta fácilmente a una perturbación en área adhiriéndose a la interfaz. De esta forma, el proceso de desdoblamiento interfacial se encuentra favorecido para la β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua con respecto a la interfaz aire-agua. Esta estructura fácilmente deformable es completamente coherente con la menor elasticidad mostrada por la película en este intervalo de presiones interfaciales así

como con la conformación más extendida de la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua dada por los modelos teóricos aplicados en los apartados anteriores.

5.5.3 Elasticidad límite de Gibbs

Finalmente, con el fin de profundizar en la comprensión del comportamiento dilatacional de las capas interfaciales se ha realizado un tratamiento teórico de los datos experimentales. La Figura 5.11 muestra únicamente los datos experimentales correspondientes a las frecuencias 0.1 Hz, 0.14 Hz y 0.2 Hz. En estas condiciones, la viscosidad de la capa interfacial es completamente despreciable y el comportamiento interfacial de la película se considera como puramente elástico [Langevin, 2000; Hambardzumyan, 2003]. Como prueba de esto, se observa en la Figura 5.11 que los valores de ε son completamente independientes de la frecuencia aplicada. Esta figura muestra también las curvas teóricas obtenidas tras la aplicación de la ecuación (3.53). Además, en esta ecuación se ha introducido dos variantes del modelo teórico para la interfaz aire-agua y tres para la interfaz tetradecano-agua. Concretamente, se ha ensayado sobre los datos experimentales el modelo de capa monomolecular (ecuaciones (3.34)-(3.37)), el modelo de formación de una bicapa (ecuación (3.41)) y el modelo de compresibilidad adicional en el estado de mínima área interfacial (ecuación (3.42)), este último solo en la interfaz tetradecano-agua. De esta forma, la incidencia de cada uno de estos mecanismos en el proceso de adsorción puede ser fácilmente analizada por comparación de cada uno de los modelos con los datos experimentales. Cabe destacar que los parámetros utilizados en todos los ajustes son los mismos que se han utilizado en el tratamiento de los datos de adsorción y que se encuentran expuestos en la Tabla 5.IV.

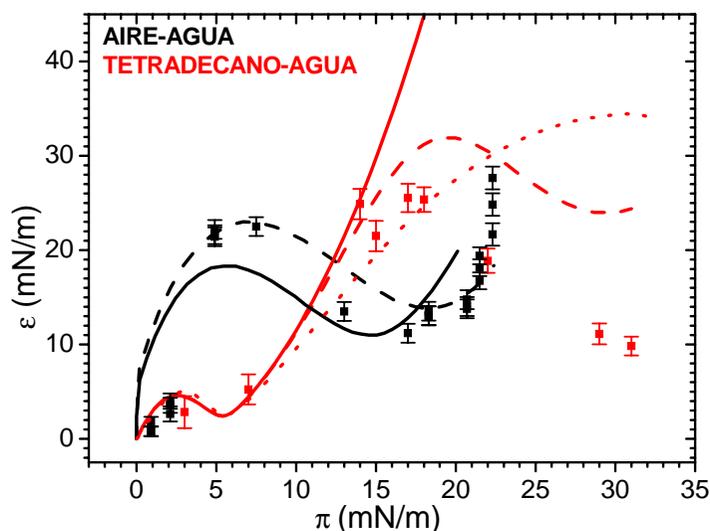


Figura 5.11: Símbolos, datos experimentales de elasticidad interfacial para frecuencias entre 0.1-0.2Hz. Líneas, ajustes teóricos con los datos de la Tabla 5.IV. Líneas continuas, modelo de monocapa; líneas discontinuas, modelo de bicapa; línea de puntos: modelo de compresibilidad en el estado de área mínima.

Con respecto a las curvas obtenidas para la interfaz aire-agua, ya se muestra en la referencia [Lucassen-Reynders, 2004] que la consideración de la formación de una bicapa apenas si modifica los resultados obtenidos con un modelo de capa monomolecular. Sin embargo, es cierto que la correlación entre teoría y experimento se ve algo mejorada con la consideración de una segunda capa.

En la interfaz tetradecano-agua la consideración de los diferentes modelos sí que modifica sustancialmente el resultado de $\varepsilon(\pi)$. Se puede apreciar en la Figura 5.11 que la inclusión del modelo de capa interfacial monomolecular proporciona una curva teórica que se desvía completamente de los resultados experimentales. En contraste, la correlación entre teoría y experimentación mejora substancialmente con la consideración de los otros dos modelos. En

este sentido, en la Figura 5.12 se observa como solamente la consideración de la formación de una bicapa o de compresibilidad adicional en la capa interfacial proporciona el aumento de densidad interfacial con el aumento de la concentración en de la disolución que muestran los resultados experimentales. Conjuntamente, la presencia de un punto de inflexión en la curva $\pi(I)$ determina la posición de un máximo en la elasticidad límite [Lucassen-Reynders, 2004]. Este hecho se corrobora teóricamente en la Figura 5.11 en la que el modelo de capa monomolecular no proporciona un máximo en la elasticidad mientras que la inclusión de los otros dos mecanismos sí que lo hace. Cabe destacar que la posición de los máximos en la Figura 5.11 coincide con la posición de los puntos de inflexión en la Figura 5.12 (en presión interfacial). Además, el punto de inflexión es más acentuado en la curva $\pi(I)$ en el caso del modelo de bicapa y este hecho está igualmente reproducido en la forma del máximo en $\varepsilon(\pi)$. Así pues, la consideración de una bicapa en el tratamiento teórico proporciona una mejora significativa en el ajuste de los datos experimentales. Por lo tanto, a raíz de este análisis se podría concluir que a altas concentraciones se forma una bicapa de β -caseína en la interfaz tetradecano-agua. Ahora bien, contrariamente a lo que ocurre en la interfaz aire-agua, en la interfaz tetradecano-agua la correlación entre teoría y experimentos es meramente cualitativa y ciertamente disminuye conforme aumenta la concentración de proteína en el medio. La estructura de bicapa interfacial ha sido sugerida por otros autores en la bibliografía para la β -caseína en la interfaz aire-agua y en la interfaz aceite-agua, mediante elipsometría [Russev, 2000; Grigoriev, 2002], refracción de neutrones [Dickinson, 1993] y monocapas autoorganizadas de octadeciltricloroxilano (OTS) [Fragneto, 1995]. Asimismo, también se proponen en la bibliografía otras estructuras para interfaces aceite-agua mediante técnicas de reología dilatacional y tensión superficial como son la formación de

multicapas o procesos de agregación y gelificación interfacial [Freer, 2004; Beverung, 1999]. En cualquier caso, la menor viscosidad encontrada en este trabajo a alto recubrimiento interfacial, unida a las pequeñas discrepancias que aparecen entre teoría y experimento para la β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua podría indicar que está teniendo lugar en la interfaz un proceso mixto en que todos los fenómenos citados superponen.

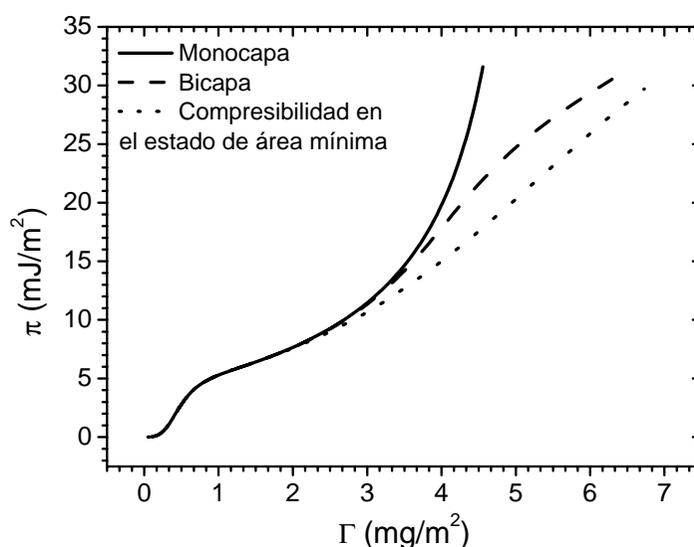


Figura 5.12: Predicción teórica del recubrimiento interfacial en términos de la presión interfacial para la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua para tres modelos teóricos (véase sección 3.2)

La bibliografía dedicada al estudio de la estructura interfacial adoptada por la β -caseína en la interfaz aire-agua es mucho más numerosa que la dedicada a la interfaz aceite-agua. En este sentido, resulta interesante comparar las conclusiones extraídas del ajuste de los datos experimentales mostrado en la Figura 5.11 con estudios de monocapas. En la interfaz aire-agua, el valor máximo de elasticidad límite es aproximadamente 20 mJ/m^2 y se produce a una presión

interfacial de aproximadamente 7 mJ/m^2 . Estos valores son completamente coherentes con los datos en varios estudios de monocapas encontrados en la bibliografía [Mellema, 1998; Cicuta, 2001; Rodríguez-Patino, 1999; Carrera-Sánchez, 1999]. Todos ellos identifican este máximo con el colapso de residuos hidrófobos, la expulsión de segmentos y bucles, y la formación de una red compleja en la interfaz. Conclusiones muy similares se encuentran en estudios de refracción de neutrones y rayos X de β -caseína adsorbida en la interfaz aire-agua [Harzallah, 1990]. Por otro lado, estudios recientes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) y reflectividad relativa muestran que a presiones superficiales mayores de 10 mJ/m^2 , la capa superficial formada por la β -caseína no solamente aumenta su grosor sino que además muestra una estructura no homogénea [Rodríguez-Patino, 1999; Carrera-Sánchez, 1999]. Asimismo, estudios de AFM revelan un aumento del grosor de la película conforme aumenta la concentración que resulta en una superposición de moléculas en la superficie y que finalmente forman agregados [Bantchev, 2004]. Este hecho, concuerda con las conclusiones obtenidas mediante el ajuste de los datos experimentales presentado. Concretamente, Lucassen-Reynders y col. exponen que a presiones interfaciales superiores a 10 mJ/m^2 , gran parte de las moléculas de β -caseína se encuentran ocupando un área interfacial mínima [Lucassen-Reynders, 2004]. Y es muy probable que en ese estado de área mínima las moléculas muestren una gran tendencia a una agregación o condensación bidimensional, contrariamente a lo que les ocurre a moléculas que se encuentren en una configuración más extendida.

A la vista de este razonamiento, el ajuste teórico de las curvas experimentales de elasticidad límite de β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua sugiere la existencia de la misma variedad de mecanismos que la encontrada en la interfaz aire-agua. Sin

embargo, los mecanismos concretos que tienen lugar en interfaces líquidas aun presentan interrogantes. La aplicación del modelo teórico en la forma descrita, es completamente novedosa en las interfaces aceite-agua. Además, proporciona una manera accesible de comprobar la incidencia de diferentes mecanismos en la capa interfacial formada en interfaces líquidas. Indudablemente, este procedimiento proporciona una valiosa información encubierta en los datos experimentales. Así pues, el procedimiento descrito presenta un enorme potencial en la interpretación de los datos experimentales de elasticidad límite y constituye una herramienta muy prometedora en la comprensión del comportamiento interfacial de proteínas.

5.6 FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE EMULSIONES Y ESPUMAS DE β -CASEÍNA

El objetivo planteado en esta sección es la realización de una caracterización básica de la formación y estabilidad de espumas y emulsiones formadas con la β -caseína. La finalidad es tratar de relacionar las propiedades de estas dispersiones con la caracterización interfacial realizada de la β -caseína en apartados previos. En este sentido, encontrar una posible interrelación entre las propiedades interfaciales de las proteínas con su capacidad espumante (o emulsionante) o con la estabilidad de la espuma (o emulsión) que forman, constituye uno de los principales retos científicos que se plantean en el campo de la tecnología alimentaria actual [Foegeding, 2006; Carrera-Sánchez, 2005; Martin, 2002, Wilde, 2000; Bos, 2003; Langevin, 2000]. Debido a la enorme complejidad de los fenómenos que tienen lugar en este tipo de sistemas, la cuestión presenta aun a día de hoy numerosos interrogantes. En este sentido, las concentraciones de proteína utilizada para las espumas y las emulsiones en este trabajo

son pequeñas. De esta forma se tratará de relacionar las propiedades encontradas con las propiedades interfaciales dadas en el resto del Capítulo [Cornec, 1996]. Así pues, el trabajo realizado se basa en la modificación del tamaño de burbuja (en las espumas) y de gota (en las emulsiones), de tal forma que se obtiene información acerca de los diversos procesos que contribuyen a la desestabilización de las dispersiones formadas. Siendo así, este último apartado del capítulo se estructura en dos bloques diferenciados: la espuma de β -caseína y las emulsiones de tetradecano en disolución acuosa de β -caseína.

5.6.1 Espumas de β -caseína

Dentro de la caracterización de una espuma se pueden distinguir dos fenómenos que dependen de diferentes procesos, la formación y la estabilidad de la espuma. Pese a que estos dos fenómenos están íntimamente relacionados, para facilitar la interpretación de los resultados, se van a evaluar cada uno de estos dos separadamente. Veremos en primer lugar los fenómenos que definen la capacidad espumante de una proteína para posteriormente relacionarlos con los resultados experimentales obtenidos. En segundo lugar y de manera completamente similar, veremos los fenómenos que determinan la estabilidad de la espuma antes de mostrar y comentar los resultados experimentales. Además, puesto que se trata de establecer una relación con la caracterización interfacial, a lo largo de este apartado se hará continua referencia de las figuras mostradas a lo largo de los apartados anteriores.

Capacidad espumante de la β -caseína

De acuerdo con la bibliografía, la capacidad espumante de una proteína está relacionada con la cantidad de proteína en el medio, con la velocidad de adsorción y con las propiedades dilatacionales de la

película adsorbida. Veamos esto en detalle. En primer lugar, la capacidad espumante de una proteína aumenta con la concentración de proteína en el seno de la disolución, debido a que también aumenta el grado de recubrimiento superficial de las burbujas [Carrera-Sánchez, 2005]. En segundo lugar, Martin y col. encuentran que la capacidad espumante de una proteína aumenta con la velocidad de adsorción de ésta sobre la superficie. Así, proteínas pequeñas, flexibles y desordenadas poseen una mayor capacidad espumante que las proteínas grandes y globulares debido a su más rápida difusión a la superficie [Martin, 2002]. Finalmente, un parámetro determinante de la capacidad espumante de una proteína es la viscosidad superficial de la capa adsorbida [Langevin, 2000; Holmberg, 2003; Durand, 1999]. El proceso de formación de una espuma implica la creación de área superficial que debe ser rápidamente ocupada por proteína y protegida contra la ruptura. La viscosidad superficial es una medida de la habilidad de la película para responder a un cambio en área y por ello se considera que este parámetro dilatacional debería jugar un papel clave en la estabilidad de espumas.

Veamos ahora los resultados experimentales, la Figura 5.13 muestra la evolución temporal del volumen de espuma formada por dos concentraciones de proteína y haciendo uso de dos tamaños de poro diferentes. El tamaño de poro del vidrio fritado determina el tamaño de las burbujas que forman la espuma siendo las burbujas más grandes cuanto menor es el número de poro (véase la sección 4.2). De acuerdo con otros trabajos, las dos concentraciones escogidas son las menores que proporcionan espuma [Carrera-Sánchez, 2005; Martin, 2002]. La primera parte de la gráfica (a la izquierda de la línea vertical) recoge las propiedades espumantes de la β -caseína. Es decir, la evolución temporal del volumen de espuma mientras se insufla aire a través del poro. La estabilidad de la espuma formada, que veremos

más adelante, se obtiene monitorizando la evolución temporal del volumen de espuma una vez que el flujo de aire se detiene (a la derecha de la línea vertical de separación).

Veamos entonces las propiedades espumantes de la β -caseína. Se observa claramente en la Figura 5.13 como, en todos los experimentos realizados, las propiedades espumantes de la β -caseína son completamente similares. Este resultado se puede cuantificar mediante dos parámetros numéricos que describen la capacidad espumante de una proteína: la capacidad espumante global, (OFC³) y la capacidad espumante (FC⁴) [Carrera-Sánchez, 2005]. El primero se corresponde con la pendiente de la curva de volumen de espuma durante la inyección de aire y el segundo es una medida de la retención de aire en la espuma y viene dado por el cociente entre el volumen final de espuma y el volumen total de aire inyectado, $FC = V_{\text{espuma}}(\text{final}) / V_{\text{aire}}(\text{final})$.

En el caso que nos ocupa, los valores obtenidos para la FC de las curvas mostradas en la Figura 5.13 se encuentran en el intervalo (0,6-0,8). Asimismo, la OFC de las espumas se encuentra en todos los casos en el intervalo (4-6 ml/s). Los valores obtenidos concuerdan con los encontrados por Carrera-Sánchez y col. para las mismas concentraciones de proteína en [Carrera-Sánchez, 2005] y lo más llamativo es que la capacidad espumante encontrada para la β -caseína es completamente similar en todos los casos estudiados. Además de mantenerse constante la capacidad espumante de la β -caseína, ésta aumenta de manera muy brusca con la concentración. Es decir, una disolución de 0.01 g/l de β -caseína no producía espuma en absoluto (resultado no mostrado en la figura). Sin embargo, un pequeño

³ Del inglés: Overall foaming capacity

⁴ Del inglés: Foam capacity

aumento de la concentración de proteína proporciona un aumento de la capacidad espumante que además se mantiene ya constante.

La conexión de estos resultados experimentales con la velocidad de adsorción de la proteína y las propiedades dilatacionales de la capa adsorbida se puede realizar teniendo en cuenta las claves dadas anteriormente. La velocidad de adsorción de la β -caseína sobre la interfaz aire-agua viene dada por la velocidad del cambio de la presión interfacial mostrada en la Figura 5.1. Se observa como la velocidad de adsorción de las proteínas a las dos concentraciones de β -caseína a la que se ha formado la espuma es alta y sobre todo prácticamente igual en los dos casos. Esta observación concuerda con los resultados de Martin y col. y explicaría la similitud en sus propiedades espumantes [Martin, 2002]. Además, en la evolución de la viscosidad superficial de la β -caseína en la Figura 5.10, se puede apreciar un aumento muy brusco de la misma, en la región de alto recubrimiento interfacial, correspondiente a las concentraciones de proteína utilizada en la formación de espuma. En consecuencia, el aumento brusco de la capacidad espumante de la β -caseína se encuentra perfectamente correlacionado con el brusco aumento encontrado en la viscosidad superficial.

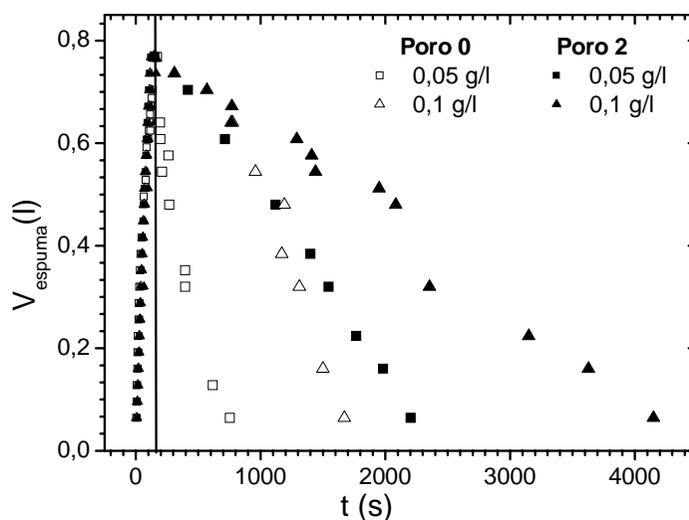


Figura 5.13: Formación y estabilidad de la espuma de β -caseína con dos tamaños de burbuja

Estabilidad de la espuma de β -caseína

Al igual que se ha hecho en el análisis de la capacidad espumante de la β -caseína, a continuación se resumen los fenómenos que determinan la estabilidad de una espuma en términos generales. En la sección 2.6 se puede encontrar esta explicación en mayor detalle. La estabilidad de una espuma está gobernada principalmente por tres procesos: la maduración de Ostwald⁵ y la coalescencia. La maduración de Ostwald se debe a la difusión del gas desde las burbujas pequeñas a las grandes debido a diferencias entre las presiones hidrostáticas. La solubilidad del gas en la fase líquida juega un importante papel en este mecanismo y la maduración de Ostwald produce un aumento del tamaño de las burbujas en el tiempo. Finalmente, la coalescencia es la ruptura de la película líquida que

⁵ Del inglés: Ostwald rippening

queda entre dos burbujas para formar una única burbuja más grande. Se puede separar en dos etapas: drenaje y ruptura de la película.

De acuerdo con numerosos estudios estos fenómenos se encuentran íntimamente relacionados con la elasticidad superficial de la película de proteína adsorbida sobre la superficie de las burbujas. Esto es debido a que, en general, el proceso de desestabilización de una espuma está relacionado con la resistencia de la película a deformarse en el tiempo. Puesto que la elasticidad superficial de una película de proteína cuantifica precisamente esta propiedad, éste podría constituir el parámetro clave en la estabilidad de una espuma [Langevin, 2000; Wilde, 2000; Bhattacharya, 2000, Holmberg, 2003]. Con el fin de poder relacionar la estabilidad de la espuma formada con las propiedades elásticas de la película de β -caseína adsorbida que se presentan en la Figura 5.9, hay que determinar la frecuencia de oscilación que se corresponde con los experimentos de estabilidad de espumas [Bhattacharya, 2000]. De acuerdo con Langevin, la elasticidad superficial obtenida a frecuencias altas es la que se puede equiparar a la situación existente en una película en proceso de desestabilización [Langevin, 2000]. Esto se debe a que los procesos de estrechamiento de las películas son muy rápidos; frecuencias del orden de 10^6 Hz. En consecuencia, se considerarán los valores de elasticidad superficial obtenidos a las frecuencias más altas (Figura 2.11).

Así pues, veamos a continuación la estabilidad de la espuma formada por la β -caseína. En la Figura 5.13, a la derecha de la línea vertical, se muestra la evolución temporal de las espumas proporcionadas por la β -caseína. Llama la atención como, a diferencia de la capacidad espumante, la estabilidad de la espuma se ve considerablemente afectada por la concentración de proteína en la disolución así como por el tamaño inicial de las burbujas formadas.

Veamos en primer lugar la dependencia con la concentración de proteína utilizada. La Figura 5.13 muestra como la estabilidad de la espuma aumenta al aumentar la concentración de proteína en el seno de acuerdo con estudios similares [Carrera-Sánchez, 2005; Martín, 2002]. Asimismo, este resultado, se puede relacionar con las propiedades elásticas de la película de proteína adsorbida en la interfaz aire-agua conforme a lo explicado previamente. En efecto, se observa en la Figura 5.9 que la elasticidad de la película presenta un notable aumento con la concentración en la zona de alto recubrimiento interfacial (y a altas frecuencias). Este aumento se encuentra perfectamente correlacionado con la mayor estabilidad de la espuma formada.

El efecto de aumentar el tamaño de las burbujas en la espuma es muy llamativo. La estabilidad de la espuma formada disminuye significativamente al aumentar el tamaño de las burbujas que la componen. A través de la observación del sistema se advierte un importante aumento del tamaño de las burbujas con el tiempo. Así pues, el fenómeno predominante en la desestabilización de la espuma de la β -caseína formada en este intervalo de concentraciones es la maduración de Ostwald ya que en este proceso las burbujas grandes se hacen grandes y las más pequeñas desaparecen. Este mecanismo es también el dominante en la desestabilización de la espuma de β -caseína reportada por Martin y col. en [Martin, 2002]. Los factores que influyen en la maduración de Ostwald son la solubilidad del aire en la fase acuosa y sobre todo la polidispersidad del sistema. En efecto, la solubilidad parcial del aire en la fase acuosa facilita la aparición de la maduración de Ostwald [Langevin, 2000]. Asimismo, los tamaños típicos de las burbujas formadas con el poro 0 son de hasta 2 mm mientras que las formadas con el poro 2 son de hasta 0.5 mm. De esta manera, la polidispersidad de la espuma formada con el

poro 0 aumenta notablemente y al aumentar el tamaño de las burbujas las diferencias de presión encontradas entre las diferentes burbujas son mayores. Esta observación justificaría una mayor incidencia de este mecanismo en esta espuma de acuerdo con los resultados obtenidos.

5.6.2 Emulsiones de tetradecano en disolución acuosa de β -caseína

Al igual que se ha hecho en el caso de las espumas, pesa que e la sección 2.6 se encuentran expuestos los principales fenómenos que caracterizan la formación y estabilidad de las emulsiones, continuación se expone un recordatorio. Los fenómenos que afectan a la capacidad emulsionante y a la estabilidad de la emulsiones se encuentran íntimamente relacionados. En el proceso de formación, el gran aporte energético al sistema hace que el fenómeno de adsorción no se pueda relacionar de manera tan directa a como se ha realizado en el caso de una espuma. De acuerdo con eso, en general, la capacidad emulsionante de una proteína viene caracterizada por el tamaño de las gotas que componen la emulsión formada [Cornec, 1996; Husband, 1997]. Con respecto a la estabilidad de las emulsiones, los mecanismos que afectan a la estabilidad de las emulsiones son: la maduración de Ostwald, la formación de cremas o cremado, la floculación y la coalescencia. La maduración de Ostwald consiste en transporte de líquido disperso entre gotas de diferente tamaño que forman la emulsión. Al igual que ocurre en el caso de espumas, la polidispersidad y la solubilidad del aceite utilizado en la fase acuosa son más importantes que la compactación de la capa de proteína adsorbida en la superficie de las gotas [Langevin, 2000]. Asimismo, la formación de cremas o cremado de una emulsión es el proceso por el cual las gotas de emulsión tienden a situarse en la parte superior de la misma y constituye el principal mecanismo desestabilizador de las emulsiones [Robins, 2000]. La formación de

cremas depende del tamaño de las gotas, de la diferencia de densidades entre los líquidos y de la viscosidad del medio acuoso [Langevin, 2000; Robins, 2000]. La floculación es el proceso por el cual dos gotas se unen sin perder su entidad geométrica y finalmente la coalescencia consiste en la ruptura de la película que separa dos gotas de emulsión y conduce a la formación de gotas más grandes. Estos dos procesos se encuentran íntimamente relacionados entre sí y además dependen fundamentalmente de las propiedades viscoelásticas de la capa de proteína adsorbida en la superficie de las gotas [Husband, 1997; Carrera-Sanchez, 2005; Langevin, 2000; Wilde, 2000].

Veamos a continuación los resultados experimentales sobre la base de estas claves. La actividad emulsionante de la β -caseína es relativamente baja comparada con los otros componentes del caseinato [Poon, 2001]. Además, al igual que se ha realizado en el estudio planteado de la espuma formada por la β -caseína, las emulsiones estudiadas en este apartado se forman con una mínima cantidad de proteína y variando el contenido en tetradecano de manera que el recubrimiento interfacial de las gotas de aceite se corresponde con la zona de alto recubrimiento interfacial en la caracterización interfacial realizada en apartados previos [Cornec, 1996]. Luego las emulsiones formadas en este trabajo son ciertamente inestables y exhiben una pequeña capa de espuma en la parte superior de la emulsión. Este fenómeno también es encontrado por Poon y col. y lo atribuyen a la gran actividad superficial de la β -caseína [Poon, 2001; Dickinson, 1998].

Las características concretas de las emulsiones formadas con tetradecano en una disolución de β -caseína a pH 7 y 0.05 M se encuentran expuestas en la Tabla 5.V.

Tabla 5.V: Caracterización de las emulsiones formadas por 1 g/l de β -caseína con varios contenidos en aceite

% Tetradecano	Diámetro de gota (μm)	Polidispersidad (%)	Velocidad de cremado (mm/min)
5 %	1.1 ± 0.2	0.2-0.3	4.1 ± 0.2
10 %	1.4 ± 0.5	0.2-0.3	2.6 ± 0.1
20 %	3.4 ± 0.8	0.2-0.3	1.3 ± 0.5

En esta tabla se detallan en primer lugar los tamaños de gota característicos de cada una de las emulsiones formadas. El tamaño medio de las gotas que componen la emulsión recién preparada se ha medido con un ALV-NIBBS justo tras la preparación de la emulsión y proporcionan una medida de la capacidad emulsionante de la β -caseína. Cabe destacar el aumento del tamaño de gota de aceite conforme aumenta la cantidad del mismo en el medio. Este resultado indica que al aumentar la cantidad de aceite en el medio no hay suficiente proteína recubrir toda la superficie y el tamaño de las gotas aumenta para disminuir la superficie libre total. Además, este resultado concuerda con el trabajo de Carrera-Sánchez y col. en el que reportan un tamaño aún mayor de gota para una emulsión preparada con un 30% de aceite [Carrera-Sánchez, 2005]. El análisis realizado de los datos experimentales proporciona, además del tamaño de gota, la polidispersidad de la emulsión. En la Tabla 5.V se observa que este valor es prácticamente igual en todos los casos y bastante significativo. A diferencia de lo que ocurría en el caso de las espumas, el tetradecano es un aceite muy poco soluble en la fase acuosa, de manera que la maduración de Ostwald es muy lenta en este tipo de emulsiones [Langevin, 2000].

En el trabajo de Husband y col. se realiza un exhaustivo análisis de las propiedades superficiales de la β -caseína y su conexión

con las espumas y emulsiones formadas. En particular, encuentran que las emulsiones de β -caseína en tetradecano son mucho más estables que las espumas de β -caseína formadas en las mismas condiciones [Husband, 1997]. Estos autores no son los únicos que señalan la relación existente entre la altura del máximo en la elasticidad interfacial de las películas de proteínas se relaciona con la estabilidad de la emulsión formada [Husband, 1997; Cornec, 1996; Carrera-Sánchez, 2005; Martin, 2002]. Ahora bien, en ese trabajo los autores señalan la falta de estudios dilatacionales en la interfaz tetradecano-agua de manera que la cuestión queda sin resolver [Husband, 1997]. En este sentido, los resultados de reología dilatacional de β -caseína presentados en la Figura 5.9 proporcionan una explicación experimental a los resultados de Husband y col. puesto que el máximo de la elasticidad en la interfaz tetradecano-agua es mayor que el encontrado en la interfaz aire-agua.

Con el fin de cuantificar la estabilidad de las emulsiones preparadas se ha hecho uso de un Turbiscan Classic MA2000. La Tabla 5.V muestra los valores encontrados mediante este dispositivo para la velocidad de cremado de cada una de las emulsiones preparadas. Este parámetro se calcula fácilmente a partir del perfil de retrodispersión⁶ obtenido. La velocidad de cremado se define como la pendiente de la evolución temporal de la anchura del pico de luz retrodispersada. Esto a su vez se define como la anchura del pico de luz retrodifundida al 50% de la altura máxima del pico [Chanamai, 2000; Carrera-Sanchez, 2005]. Se observa muy claramente la tendencia en la Tabla 5.V: la velocidad de cremado disminuye con la cantidad de aceite presente en la emulsión. En la sección 2.6 se encuentra descrito en detalle el proceso de cremado en función de la ley de Stokes, según la cual la velocidad de cremado aumenta con el

⁶ Del inglés *backscattering*

tamaño de gota. De acuerdo con esto, parece claro que en las emulsiones formadas no se encuentra un proceso de cremado puro. Más bien, los resultados expuestos en la Tabla 5.V podrían indicar que varios mecanismos contribuyen simultáneamente a la desestabilización de las emulsiones. De acuerdo con todo lo explicado anteriormente, la clave de este comportamiento se podría encontrar en la elasticidad interfacial de la película adsorbida de β -caseína en este intervalo de concentraciones que se muestra en la Figura 5.9. A diferencia de lo que ocurría en la interfaz aire-agua, la elasticidad de la película en tetradecano disminuye para todas las frecuencias de oscilación al aumentar la concentración en el intervalo de alto recubrimiento interfacial, comparable al recubrimiento de las gotas que componen las emulsiones en este trabajo. Las emulsiones formadas por una mayor cantidad de aceite poseen un menor recubrimiento interfacial debido a la mayor superficie de aceite accesible. Es decir, las gotas que componen la emulsión preparada con un 5% de aceite poseen un mayor recubrimiento interfacial y en consecuencia poseen una menor elasticidad interfacial que la que tienen las emulsiones formadas con un 10-20% de aceite (menor recubrimiento interfacial) de acuerdo con la Figura 5.9. Así pues, la menor elasticidad interfacial podría resultar en que las gotas que forman la emulsión con un 5 % de aceite fueran más susceptibles a la coalescencia. Como consecuencia, se formarían gotas más grandes y ello explicaría la mayor incidencia del cremado en estas emulsiones expuesta en la Tala 5.V

Esto no significa que al seguir aumentando la concentración de proteína en la fase acuosa, vaya a seguir aumentando la formación de cremas y no se vayan a formar emulsiones estables. En la bibliografía se encuentran emulsiones más estables de β -caseína formadas con una mayor cantidad de proteína [Husband, 1997]. Es más, es probable que

la elasticidad interfacial de la película de β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua también vuelva a aumentar al aumentar la concentración de la disolución. De hecho, las predicciones teóricas mostradas en la Figura 5.11, así lo indican.

5.7 RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este capítulo se ha dedicado al estudio de las propiedades interfaciales de una proteína modelo, la β -caseína, en dos interfaces diferentes; la interfaz aire-agua y la interfaz tetradecano-agua. Con el fin de comprender los fenómenos que tienen lugar en la capa interfacial, este tema se aborda de varias maneras obteniendo una serie de resultados que se complementan perfectamente entre sí. Es más, las propiedades encontradas en este trabajo para las capas de β -caseína formadas en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua, proporcionan la información necesaria para la comprensión del comportamiento que muestra la espuma de β -caseína y la emulsión de tetradecano en disolución acuosa de β -caseína, respectivamente. Veamos a continuación de manera muy resumida las conclusiones generales que se extraen del estudio realizado.

En primer lugar se ha realizado un estudio de las monocapas de β -caseína en la interfaz aire-agua y tetradecano-agua. La técnica de obtención de monocapas es completamente novedosa y constituye el primero de los logros conseguidos en esta Tesis Doctoral. El análisis de las isothermas sugiere importantes diferencias en estructura adoptada por la proteína en cada una de las interfaces. Estas diferencias se explican en términos de una serie de factores que actúan de manera conjunta; la interacción cohesiva entre los residuos hidrófobos de la proteína interfacial y la fase oleosa, la mayor solvatación de estos residuos en la fase oleosa y el mayor

desdoblamiento alcanzado por la β -caseína en la interfaz tetradecano-agua. La Teoría de Escalado proporciona una imagen detallada de la estructura interfacial de la proteína que corrobora los resultados experimentales y resuelve algunas aparentes discrepancias con resultados de la bibliografía. En particular, la naturaleza de la fase oleosa determina la estructura de la proteína y en este sentido, la tensión interfacial del aceite es el parámetro clave. Concretamente, el grado de desdoblamiento interfacial de la proteína aumenta con la tensión interfacial de la fase oleosa.

En segundo lugar, se ha estudiado el comportamiento de la β -caseína adsorbida en las interfaces aire-agua y tetradecano-agua, experimentalmente y mediante la aplicación de un modelo termodinámico de capa de proteína adsorbida en interfaces fluidas. Experimentalmente se deduce, de acuerdo además con los resultados obtenidos previamente, que la proteína adopta una conformación más extendida en la interfaz aire-agua. Teniendo esto en cuenta, a continuación se propone un procedimiento de ajuste teórico de los datos experimentales en el que se modifica el área interfacial ocupada por la β -caseína en función de la interfaz fluida sobre la que se adsorbe. De esta forma se cuantifica el desdoblamiento interfacial de la proteína en contacto con una fase líquida y además se encuentra una relación entre la tensión interfacial y el grado de desdoblamiento de la proteína que corrobora los resultados de monocapas. El procedimiento teórico propuesto se aplica de manera similar haciendo uso de una versión mejorada del modelo teórico a los datos de adsorción en equilibrio y a las curvas experimentales de dinámica de adsorción. Como resultado, se obtiene una caracterización cuantitativa de la estructura interfacial adoptada por la β -caseína en las dos interfaces. Además, hasta donde nosotros sabemos, la aplicación explícita de un modelo teórico al comportamiento de una proteína en una interfaz

aceite-agua es completamente novedosa y esto constituye el principal logro de esta Tesis Doctoral.

Para finalizar la caracterización de la β -caseína en estas dos interfaces, se ha realizado un minucioso estudio del comportamiento dilatacional. La presencia de una fase oleosa también afecta muy significativamente a las propiedades dilatacionales de la capa de proteína adsorbida y también en este caso, el estudio realizado es experimental y teórico. La elasticidad interfacial y la viscosidad interfacial se discuten independientemente en función del grado de recubrimiento interfacial y de la frecuencia de la oscilación. A bajo recubrimiento interfacial las propiedades dilatacionales, indican la formación de una película de β -caseína adsorbida en la interfaz tetradecano-agua, más deformable (viscosa) que la que se forma en la interfaz aire-agua. Sin embargo, a alto recubrimiento interfacial, la película adsorbida en la interfaz tetradecano-agua es más resistente (elástica). Asimismo, la subsiguiente aplicación del modelo teórico a los datos de elasticidad límite de Gibbs, con los parámetros derivados del ajuste de las isoterms en equilibrio, proporciona una clara mejora de la interpretación de los datos experimentales. Este ajuste proporciona una manera sencilla y completamente novedosa de evaluar la incidencia de varios mecanismos en la capa interfacial. En particular, la formación de una bicapa de β -caseína en las dos interfaces aparece como el fenómeno predominante al aumentar el recubrimiento interfacial de la película.

La última parte de este capítulo contiene un estudio preliminar acerca de la interrelación existente entre las propiedades interfaciales vistas hasta ahora y las de las espumas de β -caseína y las emulsiones de tetradecano en disolución acuosa de β -caseína. Con respecto a la espuma, el brusco aumento de la viscosidad superficial se encuentra perfectamente correlacionado con un brusco aumento de la capacidad

espumante de la β -caseína. De manera similar, la estabilidad de la espuma aumenta con la elasticidad superficial de la película de β -caseína en la interfaz aire-agua. En lo que concierne a las emulsiones, capacidad emulsionante disminuye con la cantidad de aceite en el medio, es decir conforme disminuye el recubrimiento interfacial de las gotas. Sin embargo, la estabilidad de la emulsión disminuye al aumentar el recubrimiento interfacial de las gotas en el intervalo de concentraciones escogido. En este intervalo, la elasticidad interfacial también disminuye con el recubrimiento interfacial. Esto favorecería la coalescencia de las gotas y justifica así la mayor velocidad de cremado encontrada en las emulsiones con menos tetradecano.

La interconexión entre las propiedades interfacial de las proteínas y su capacidad espumante/emulsionante o la estabilidad de la espuma/emulsión que forman es un tema apasionante con una utilidad tecnológica directa. Por ello, este estudio final constituye una importante novedad y contiene unos resultados muy prometedores. Otro aspecto destacado de este capítulo es el tratamiento teórico dado a los resultados experimentales, que ofrece numerosas posibilidades en la comprensión de los fenómenos interfaciales. Aparte de la originalidad del tratamiento de los datos en la interfaz aceite-agua, cabe destacar cómo considerando experimentos relativamente simples, la aplicación de los modelos teóricos en la manera propuesta proporciona información cuantitativa acerca de la estructura adoptada por la proteína en las diversas interfaces así como de su interacción con la fase no-polar.

Capítulo 6

COMPORTAMIENTO SUPERFICIAL, PELÍCULAS LÍQUIDAS Y ESTABILIDAD DE ESPUMAS DE SISTEMAS MIXTOS PROTEÍNA/SURFACTANTE.

6.1 INTRODUCCIÓN

En una dispersión alimentaria, en general coexisten proteínas, surfactantes y lípidos; todos ellos sustancias anfifílicas que compiten por el área interfacial accesible. Por consiguiente, las propiedades de las interfaces formadas por sistemas mixtos han sido, y continúan siendo, objeto de estudio en los últimos años. Especialmente, la competición existente entre estos tipos de moléculas resulta en un comportamiento muy complejo de la dispersión alimentaria. Ya se ha visto en este trabajo como las proteínas forman estructuras viscoelásticas en las interfaces que estabilizan las diferentes dispersiones gracias a la red inmóvil viscoelástica que forman [Mackie, 2005]. Los surfactantes de bajo peso molecular, por el contrario, estabilizan las interfaces por medio de un mecanismo muy diferente. Los surfactantes poseen una gran movilidad interfacial, luego forman películas interfaciales móviles y estabilizan la interfaz mediante el mecanismo de Gibbs-Marangoni¹. Así pues, cuando los dos tipos de sustancias están presentes en la interfaz, puede ocurrir que ninguno de los dos mecanismos pueda operar satisfactoriamente, o que se produzca alguna clase de sinergismo. La estabilidad de la dispersión dependerá básicamente de la estructura de la capa interfacial mixta y de las interacciones entre moléculas, de manera que el control de éstas es de vital importancia en la correcta elaboración de productos.

En este capítulo se plantea el estudio de un sistema mixto de interés en la industria alimentaria. Para ello se ha escogido como surfactante el tween 20; un surfactante de bajo peso molecular, soluble en agua y no-iónico, cuyas propiedades fisicoquímicas se encuentran

¹ Véase Capítulo 2.

detalladas en el Capítulo 4. La proteína escogida es el caseinato; una proteína básica en la estabilización de productos lácteos, también descrita en detalle en el capítulo 4. Así pues, con el sistema mixto caseinato/tween 20 se ha realizado una caracterización bastante completa que comprende un estudio de la adsorción en la interfaz aire-agua, un estudio del drenaje de las películas líquidas y de la estabilidad de las espumas. Además, a la vista de la información adicional que se obtiene de las curvas de adsorción mediante la aplicación del modelo teórico descrito en el Capítulo 3, se ha introducido en el estudio una variante. Para aplicar el formalismo teórico es necesario trabajar con un sistema modelo. El caseinato es una proteína compuesta de varias fracciones que no cumple este requisito mientras que la β -caseína es una de esas fracciones mayoritaria y purificada que sí es un sistema modelo. En consecuencia, se ha analizado también la adsorción del sistema mixto formado por β -caseína y tween 20 en el marco del modelo teórico. Además, se tratará de relacionar los resultados obtenidos con la estabilidad de la espuma de este mismo sistema. Por último, cabe destacar que, al igual que en el capítulo anterior, todas las medidas experimentales se han realizado en las mismas condiciones de trabajo² con el fin de realizar una correcta correlación entre todos los fenómenos. A continuación veremos separadamente las conclusiones obtenidas del estudio realizado en esta Tesis Doctoral.

² pH 7.4, 0.05 M, T=23°C

6.2 ADSORCIÓN DE SISTEMAS MIXTOS

PROTEÍNA/SURFACTANTE EN LA INTERFAZ AIRE-AGUA

En este apartado se va a evaluar el fenómeno de adsorción de sistema mixto proteína/surfactante en la interfaz aire-agua. Para ello se van a presentar en primer lugar las isothermas de adsorción de los dos sistemas mixtos estudiados. En segundo lugar se expondrán las conclusiones derivadas de la aplicación del modelo teórico a las isothermas del sistema mixto β -caseína/tween 20. Finalmente, se expone un pequeño apunte sobre la dinámica de la adsorción de los dos sistemas mixtos estudiados.

6.2.1 Isothermas de presión superficial

El estudio de la adsorción del sistema mixto se ha realizado de manera que las concentraciones de las dos proteínas son fijas en todo el estudio realizado. Se ha escogido una concentración de 0.1 g/l ($\approx 5 \cdot 10^{-6} \text{M} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/m}^3$). Un poco más adelante se verá como ésta concentración de proteína proporciona una capa superficial saturada tanto para la β -caseína como para el caseinato. De este modo, existen suficientes proteínas en el medio y en la superficie para poder evaluar adecuadamente el papel que juega el tween 20 en un sistema mixto, para un amplio intervalo de concentraciones.

Con el fin de obtener las isothermas de adsorción del sistema mixto, el primer paso reside en la obtención de la isoterma de presión superficial para el surfactante puro. Una vez que se tiene el intervalo de concentraciones en el cual se produce la variación de la tensión superficial por el llenado de la superficie, se usará este mismo intervalo en el estudio de la mezcla. La Figura 6.1 muestra los

resultados experimentales del estudio de adsorción en equilibrio de los dos sistemas mixtos planteados.

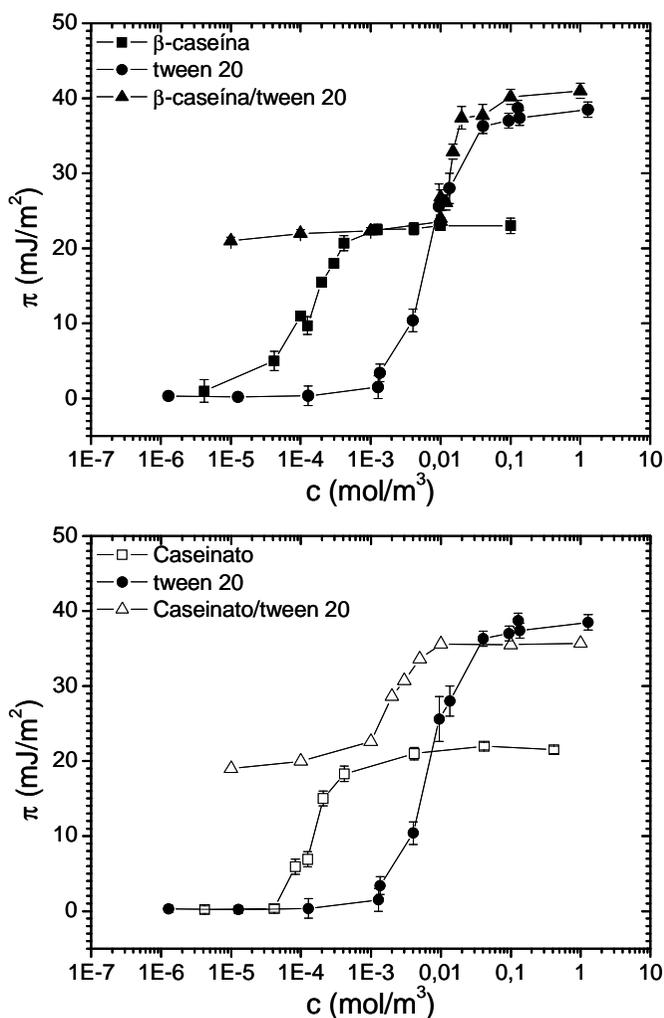


Figura 6.1: Isothermas de adsorción de los sistemas mixtos β -caseína($5 \cdot 10^{-6}$ M)/tween20 (gráfica superior) y caseinato($5 \cdot 10^{-6}$ M)/tween 20 (gráfica inferior).

En estas figuras se exponen las curvas π - c correspondientes al tween 20 puro y las curvas correspondientes a las disoluciones de 0.1 g/l ($\approx 5 \cdot 10^{-6}$ M) de β -caseína y caseinato, respectivamente, a las que se les ha añadido el tween 20. Así pues, la concentración indicada en el eje de ordenadas es la concentración de surfactante. En la Figura 6.1 se encuentran asimismo representadas las isothermas π - c correspondientes a la adsorción de las proteínas puras. Estas curvas se han añadido con el fin de facilitar la comparación puesto que la concentración de proteína en la adsorción del sistema mixto es constante en todo el proceso. Las isothermas de presión superficial se han obtenido en todos los casos siguiendo el procedimiento de extrapolación de las curvas dinámicas de presión superficial descrito en el Capítulo 5.

Veamos en primer lugar las isothermas correspondientes a las proteínas puras. De acuerdo con sus isothermas π - c , la actividad superficial del caseinato es muy similar a la de la β -caseína puesto que las propiedades de la capa superficial adsorbida, evaluadas en términos de su presión interfacial en condiciones de equilibrio así lo indican. Ahora bien, a pesar de esta similitud en las isothermas de presión superficial, es probable que existan diferencias estructurales entre las capas adsorbidas en cada caso, que no se manifiesten en dichas curvas. Dado que la β -caseína es una proteína modelo y que el caseinato es una mezcla de diversas fracciones que a su vez presentan diferencias estructurales, es de esperar que la capa de caseinato adsorbida presente ciertas inhomogeneidades. Por tanto, es muy posible que estas diferencias estructurales entre la β -caseína y el caseinato, se traduzcan en diferencias en las propiedades de esta capa adsorbida que se observen a la luz de otras técnicas de análisis superficial. En este sentido, J. Benjamins muestra importantes diferencias entre las propiedades viscoelásticas entre las capa de β -

caseína y de caseinato adsorbidas en la interfaz aire-agua [Benjamins, 2001]. Sobre este tema se volverá más adelante.

Con respecto, a la isoterma de presión superficial del tween 20 mostrada en la Figura 6.1, la diferencia básica con las isotermas correspondientes a las proteínas se refiere a la mayor presión superficial alcanzada por la disolución del surfactante con respecto a la que alcanzan las dos proteínas. Este es un comportamiento general de los surfactantes, y se debe principalmente a que presentan capas interfaciales muy compactas con una presión superficial muy alta. A partir de las curvas de presión superficial se puede obtener la concentración micelar crítica (cmc) del tween 20 que, de acuerdo con la Figura 6.1, es $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/m}^3 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Este resultado concuerda con resultados de la bibliografía [Rodríguez-Niño, 1998].

Finalmente, las curvas π - c de los sistemas mixtos muestran claramente como la presencia del tween 20 en la disolución afecta de diferente manera al caseinato o a la β -caseína. En primer lugar, la isoterma de presión superficial del sistema mixto formado por β -caseína/tween 20 presenta un comportamiento que sugiere una débil interacción entre los dos componentes de la mezcla. En particular, a bajas concentraciones de surfactante, la presión superficial del sistema mixto es completamente similar a la de la β -caseína pura. Se puede afirmar que la proteína gobierna el proceso de adsorción formando una capa superficial que prácticamente no permite la *entrada* de surfactante, que se situaría bajo la capa superficial de proteína. A una concentración de 0.01 mol/m^3 de tween 20 se produce bruscamente un cambio en el comportamiento superficial de la mezcla. A partir de esta concentración, la isoterma de adsorción de la mezcla y la del tween 20 solo coinciden. Así, la presión interfacial aumenta de manera muy pronunciada en un pequeño intervalo de concentraciones de tween 20 y se produce una saturación de la capa superficial prácticamente a la

cmc del surfactante. Además, la presión superficial de saturación coincide prácticamente con la obtenida para el surfactante puro. Estos resultados experimentales podrían indicar que el tween 20 penetra rápidamente en la capa superficial y que desplaza a la proteína de la misma para finalmente crear una capa superficial de surfactante situando a la proteína bajo dicha capa. Este fenómeno superficial se denomina “desplazamiento orogénico” y ha sido estudiado en detalle por Wilde y col. e incluso visualizada mediante estudios con microscopía de fuerza atómica (AFM) y de ángulo de Brewster (BAM)³ [Wilde, 2004; Mackie, 2004].

Por otro lado y a la vista de la Figura 6.1, la isoterma de presión superficial del sistema mixto formado por caseinato/tween 20 presenta ciertas diferencias con respecto al sistema β -caseína/tween 20. A bajas concentraciones de surfactante, la presencia del caseinato domina el comportamiento de la mezcla que presenta igual valor de la tensión superficial que el caseinato solo. A muy altas concentraciones de surfactante, la presión interfacial del sistema mixto coincide con la del surfactante puro apuntando la presencia mayoritaria de tween 20 en la capa superficial. Sin embargo es en la situación intermedia en la que aparecen diferencias con el sistema β -caseína/tween 20. A diferencia de este último, el sistema caseinato/tween 20, presenta un aumento progresivo de la presión superficial que se extiende por un intervalo de concentraciones de surfactante de casi dos órdenes de magnitud. Además, el cambio de pendiente de la curva π - c , debido a la saturación de la superficie, se manifiesta en el caso del sistema caseinato/tween 20, antes de la cmc del surfactante; a una concentración de tween 20 de $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/m}^3 = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. La existencia de una concentración previa a la cmc del surfactante a la cual se produce una asociación de los componentes del sistema es una característica

³ Del inglés *Atomic Force Microscopy* y *Brewster Angle Microscopy*

particular de algunos sistemas mixtos y se denomina concentración de agregación crítica (cac) ⁴. El hecho de que la saturación de la superficie se alcance a una concentración de surfactante por debajo de su cmc, así como la mayor presión superficial alcanzada tras la adición de este, sugiere que el surfactante se sitúa en la interfaz y coexiste con la proteína. El caseinato está formado por varias fracciones de diferentes características estructurales descritas en el Capítulo 4. A la vista del comportamiento superficial de los sistemas mixtos, podría ocurrir que el tween 20 desplace de la superficie a la fracción de β -caseína presente en el caseinato y que sin embargo no sea capaz de desplazar al resto de fracciones por igual. Ahora bien, con el fin de verificar esta explicación, dada a la vista de las isotermas de tensión superficial, resulta esencial la aplicación de otras técnicas experimentales que aporten información adicional acerca del comportamiento del sistema mixto caseinato-tween 20.

6.2.2 Ajuste teórico de las isotermas de presión superficial

Con el fin de obtener más información acerca de las propiedades de la capa superficial formada por estos sistemas mixtos, se ha realizado un ajuste teórico de los datos experimentales sobre la base del modelo termodinámico utilizado en el capítulo 5. Debido a la naturaleza compleja del caseinato, que se compone de varias fracciones con diferentes características, los resultados experimentales obtenidos con este sistema no pueden ser ajustados con el modelo teórico. La β -caseína sin embargo, al tratarse de una fracción del caseinato purificada, posee unas propiedades unívocas y se comporta como un sistema modelo que puede ser tratado teóricamente. Además, la aplicación del modelo al sistema mixto formado por la β -caseína y

⁴ Del inglés *Critical Aggregation Concentration*

el tween 20 está supeditada al ajuste previo de los datos experimentales correspondientes a los sistemas individuales. Para ello se han elaborado sendos programas de ordenador que resuelven los sistemas de ecuaciones que describen tanto la adsorción de surfactantes como la adsorción de un sistema mixto proteína/surfactante. Tanto las ecuaciones que componen el formalismo teórico como los algoritmos diseñados para resolver numéricamente los diferentes sistemas de ecuaciones, se encuentran descritos en detalle en el Capítulo 3.

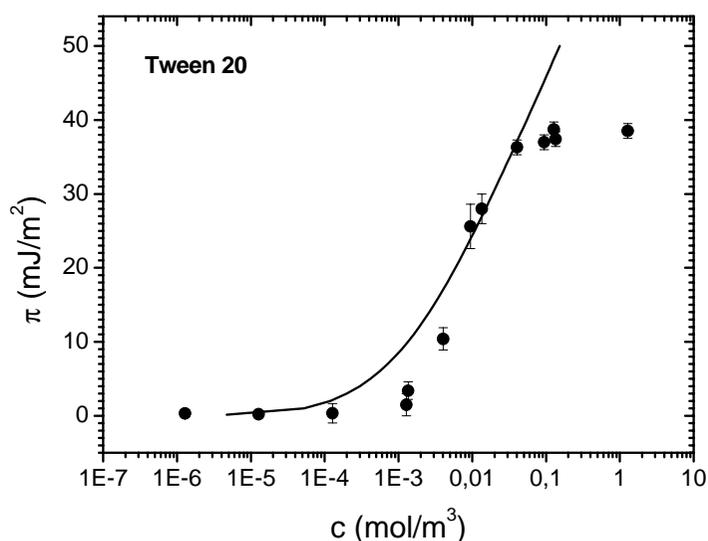


Figura 6.2: Isoterma de adsorción experimental y ajuste teórico del tween 20 en la interfaz aire-agua con las ecuaciones (3.45) y con los parámetros mostrados en la Tabla 6.I.

El ajuste teórico de la isoterma de presión superficial de tween 20, no se ha encontrado en la bibliografía de manera explícita pese a ser un surfactante muy común, por lo que los resultados mostrados a este respecto suponen otra de las novedades expuestas en esta Tesis Doctoral. Así pues, la Figura 6.2 muestra los datos experimentales

correspondientes a la adsorción de tween 20 en la interfaz aire-agua junto al ajuste teórico dado por las ecuaciones (3.45) y los parámetros mostrados en la tabla 6.I.

Tabla 6.I. Parámetros de entrada y de ajuste del modelo de Frumkin, ecuaciones (3.45)

Parámetro	Tween 20
b	$21.9 \cdot 10^3 \text{ m}^3/\text{mol}$
a	-0.25
ω	$2.5 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$

Cabe destacar que el acuerdo entre teoría y experimento es razonablemente bueno en el intervalo de aplicación del modelo, que no incluye a la zona de saturación de la interfaz [Fainerman, 2002]. El valor del área molecular media derivada del ajuste concuerda razonablemente bien con el valor de área molecular del tween 20, de $1.8 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$ (2.3 nm/molec) obtenido por Liu y col. mediante la técnica de monocapas [Liu, 2005]. Por otro lado, uno de los parámetros de entrada para realizar el ajuste teórico es el parámetro de Frumkin, que recordemos se definía como $a = -U/RT$; el balance entre U (energía de interacción entre moléculas en la capa adsorbida y RT la energía térmica de las mismas). En el caso de un surfactante adsorbido en una superficie, este parámetro está relacionado con las fuerzas atractivas (de van der Waals) entre las cadenas hidrófobas y con las fuerzas repulsivas debidas a la hidratación de las cabezas hidrófilas y/o de origen electrostático [Galgoci, 2004]. En consecuencia, U toma un valor positivo cuando la interacción atractiva es mayor que interacción repulsiva, y en este caso el parámetro de Frumkin toma un valor negativo. Así pues, el valor encontrado para el tween 20 (C₁₂-sorbitán-E₂₀) mediante el tratamiento teórico de los datos experimentales mostrado en la Tabla 6.I, indica que la interacción

repulsiva existente entre los grupos hidrófilos (E_{20}) es menor que la interacción atractiva entre las cadenas hidrocarbonadas (C_{12}). Esto es lógico tratándose de un surfactante no-iónico y con un grupo polar relativamente grande, lo que favorece su hidratación. Este parámetro tiene una relación directa con la estabilidad de la espuma resultante y esto se verá en detalle más adelante en la sección 6.4.

Con respecto al ajuste teórico de la isoterma de presión superficial de la β -caseína en la interfaz aire-agua, este se ha realizado en detalle en el capítulo 5 así como en las referencias [Miller, 2000; Fainerman, 2003]. La β -caseína modifica su estructura en la superficie con respecto a la que presenta en disolución y el modelo cuantifica este cambio proporcionando los valores mínimos y máximos de área interfacial de la proteína. A presiones bajas, las moléculas se encuentran en un estado de máximo desdoblamiento mientras que a presiones superficiales muy altas, las moléculas se encuentran ocupando un área superficial mínima. A diferencia del valor dado para el parámetro de Frumkin en el caso del tween 20 (a_s), el parámetro toma un valor positivo en el caso de la β -caseína, a_p (véase Tabla 5.IV y Tabla 6.II). Esto indica que las moléculas interfaciales manifiestan una cierta interacción repulsiva que, como se verá más adelante es clave en la estabilidad de las espumas que forman.

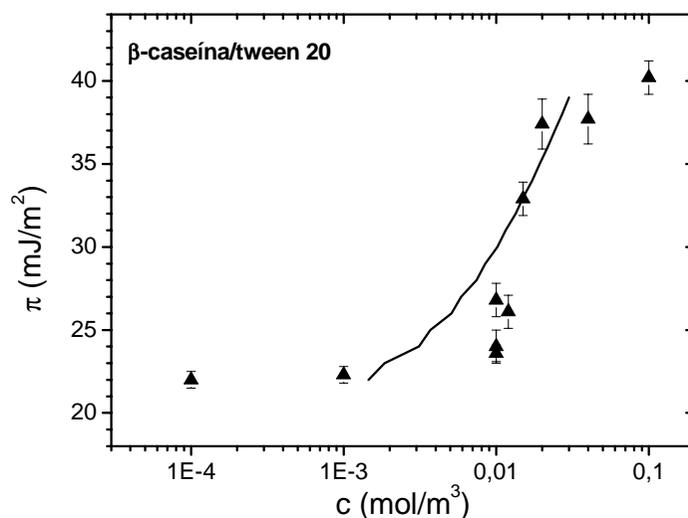


Figura 6.3: Isoterma de adsorción experimental y ajuste teórico del sistema mixto β -caseína/tween 20 en la interfaz aire-agua con las ecuaciones (3.48)-(3.52) y con los parámetros mostrados en la Tabla 6.II.

La Figura 6.3 muestra la isoterma de presión superficial obtenida para el sistema mixto β -caseína/tween 20 junto a la curva teórica obtenida con el sistema de ecuaciones (3.48-3.52) y los parámetros expuestos en la tabla 6.II. Los parámetros con el subíndice p se corresponden con los derivados del ajuste de la curva π - c de la β -caseína en la interfaz aire-agua y expuestos en la Tabla 5.IV. Los parámetros denotados con el subíndice s se refieren al ajuste de la curva π - c del surfactante puro mostrado en la Figura 6.2 y expuestos en la tabla 6.I. En este caso, el único parámetro libre del modelo de adsorción de sistemas mixtos proteína/surfactante no iónico es el parámetro a_{ps} , que da cuenta de la posible interacción entre proteína y surfactante. De acuerdo con los resultados experimentales expuestos en la Figura 6.1, no existe una concentración de agregación crítica diferente de la cmc del surfactante lo que implicaría que no existe

ningún tipo de interacción específica entre la proteína y el surfactante. En estas condiciones, el valor de la constante a_{ps} se toma tal que $a_{ps}=(a_p+ a_s)/2$ [Miller, 2004b]. La Figura 6.3 muestra una correspondencia notable entre los datos experimentales y el modelo teórico tomando este valor del parámetro de interacción. Este resultado coincide perfectamente con los datos experimentales discutidos en la sección anterior y concuerda con la ausencia de interacción entre β -caseína y tween 20 propuesta anteriormente.

Tabla 6.II. Parámetros de entrada y de ajuste del modelo de sistemas mixtos proteína/surfactante, ecuaciones (3.48)-(3.52).

Parámetro	β -caseína/tween 20
b_s	$3.5 \cdot 10^3 \text{ m}^3/\text{mol}$
b_p	$10 \text{ m}^3/\text{mol}$
a_s	-0.25
a_p	1.00
a_{ps}	0.375
ω_0	$2.5 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$
ω_{\min}	$4.5 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{mol}$
ω_{\max}	$4.5 \cdot 10^7 \text{ m}^2/\text{mol}$
ω_s	$2.5 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{mol}$

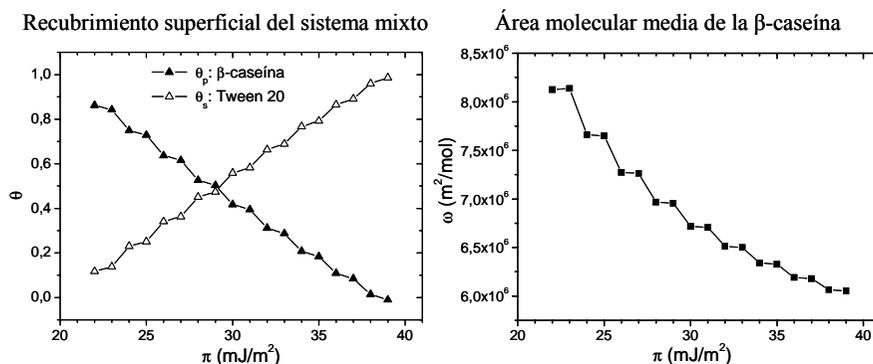


Figura 6.4: Grado de recubrimiento superficial de proteína y de surfactante en la mezcla (gráfica izquierda) y evolución teórica del área molecular superficial media de la proteína en la mezcla (gráfica derecha).

La resolución numérica del sistema de ecuaciones que describen la capa superficial compuesta por el sistema β -caseína/tween 20 proporciona, además de la isoterma de presión superficial, las variaciones de otros parámetros que contienen importante información acerca de la capa adsorbida. La Figura 6.4 muestra la evolución del grado de recubrimiento superficial de proteína y de surfactante con la presión superficial. En esta figura se observa como, en ausencia de surfactante, la capa superficial está cubierta completamente por la proteína, de acuerdo con la elevada concentración escogida ($\theta_p=0,86$). Conforme aumenta la presión superficial de la disolución mixta, se observa claramente en la Figura 6.4, cómo el grado de recubrimiento superficial de β -caseína disminuye a expensas del surfactante. A presiones superficiales suficientemente altas, se aprecia cómo el surfactante ha desplazado completamente a la proteína de la superficie de acuerdo con los resultados experimentales discutidos previamente. Resulta interesante, asimismo, evaluar como varía el área media de la proteína al entrar en competencia con el tween 20 en la disolución. En la Figura 6.4 se

observa dicha variación con la presión interfacial, es decir conforme aumenta la presencia de tween 20 en la superficie. Esta figura muestra una tendencia claramente decreciente del área media de la proteína que disminuye ligeramente desde un valor de $8,12 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{mol}$ a $6,05 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{mol}$. El pequeño valor encontrado para el área en ausencia de surfactante concuerda, una vez más, con el elevado valor de concentración de proteína utilizado. La disminución observada concuerda asimismo, con la hipótesis del desplazamiento de la misma de la interfaz. La vuelta al seno de la disolución podría inducir un replegamiento de los segmentos hidrófobos hacia el interior de la molécula que explicaría la ligera reducción del área encontrada.

6.2.3 Dinámica de la adsorción del sistema mixto

Las Figuras 6.5 y 6.6 muestran la evolución temporal de la presión superficial para los sistemas puros y algunas de las mezclas analizadas. Con el fin de evaluar la posible interacción en diferentes condiciones, las Figuras 6.5 y 6.6 muestran situaciones especialmente representativas, es decir; una concentración de surfactante muy baja (10^{-6}M), una concentración de surfactante justo por debajo de la cmc (10^{-5}M) y una concentración por encima de la cmc del surfactante (10^{-4}M). Estas concentraciones claves, serán utilizadas a lo largo de todo el capítulo para estudiar los diferentes sistemas.

Con respecto a la adsorción de la proteína pura, se observa en la figura que a la concentración elegida ($0.1 \text{ g/l} \approx 5 \cdot 10^{-6}\text{M}$), la capa de proteína adsorbida en la superficie es bastante compacta y la adsorción se produce muy rápidamente. Es decir, el periodo de inducción es prácticamente inapreciable, el aumento de presión superficial es muy brusco y se alcanza rápidamente un valor prácticamente constante de

la misma correspondiente a una saturación de la capa superficial. Esto se observa de igual manera para la β -caseína (Figura 6.5) y para el caseinato (Figura 6. 6).

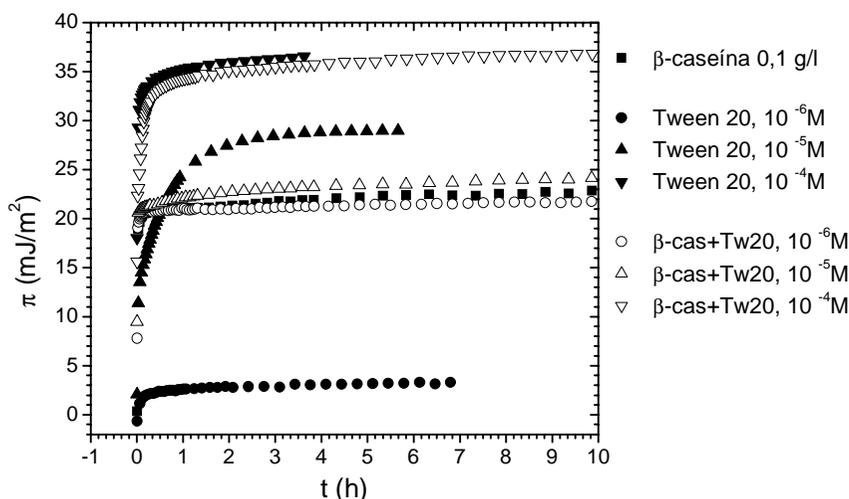


Figura 6.5: Adsorción dinámica de los componentes puros y del sistema mixto β -caseína/tween 20.

Con respecto a la dinámica del tween 20, se puede observar en ambas gráficas cómo el periodo de inducción es inexistente, incluso para las disoluciones más diluidas (en la figura, 10^{-6} M). La velocidad de aumento de la presión superficial aumenta significativamente con la concentración de surfactante en el medio y la presión superficial alcanzada para las disoluciones más concentradas, por encima de la cmc, es bastante superior que la que alcanza una disolución de proteína pura. Esto sugiere que la capa superficial de tween 20 formada es muy compacta, lo cual concuerda con los resultados del ajuste teórico realizado en la sección anterior.

En relación a la evolución temporal de los sistemas mixtos, el comportamiento general coincide con lo observado en el estudio de las

propiedades en equilibrio; a bajas concentraciones de surfactante (muy por debajo de la cmc), la dinámica es completamente similar a la de la proteína pura, mientras que a altas concentraciones de surfactante (muy por encima de la cmc), la dinámica de adsorción está claramente dominada por la actividad superficial del surfactante. Estas situaciones extremas parecen darse igualmente para la mezcla con caseinato y β -caseína. Sin embargo, se aprecian importantes diferencias en cuanto a la dinámica de adsorción de los dos sistemas mixtos formados con la concentración de tween 20 intermedia, 10^{-5} M, la cual se encuentra justo debajo de la cmc de este surfactante. Por un lado, la dinámica del sistema β -caseína/tween 20 se corresponde prácticamente con la de la proteína pura, alcanzando así la mezcla, una presión superficial menor que la que alcanza el surfactante puro (ver Figura 6.5). Por el contrario, para esa misma concentración de tween 20 mezclado con caseinato, la dinámica del sistema mixto se ve modificada con respecto a la dinámica de ambos sistemas individuales, alcanzándose una presión superficial más alta que la de ambos sistemas puros (ver Figura 6.6). Es evidente que las diferencias estructurales existentes entre la β -caseína y el caseinato se manifiestan en su interacción con el tween 20.

En el capítulo anterior se ha visto que la β -caseína es una proteína que presenta una notable actividad superficial. De hecho en la Figura 6.5 se observa como la velocidad de aumento de la presión superficial es mayor para la β -caseína que para una disolución de tween 20 de 10^{-5} M. De acuerdo con esto, podría ocurrir que las moléculas de β -caseína alcanzasen la superficie antes que el tween 20 de manera que la mezcla se comporta como la proteína pura. Según este razonamiento, y teniendo en cuenta la supuesta ausencia de interacción entre tween 20 y β -caseína dada por el modelo teórico (y por los resultados experimentales), el llenado de la superficie ocurriría

de la siguiente manera. A concentraciones bajas de surfactante, la interfaz se satura rápidamente de proteína y la mezcla se comporta como el caseinato solo. Una vez que la concentración de tween 20 sea tal que la velocidad de cambio de la tensión superficial supere a la de la β -caseína, el surfactante alcanzará la superficie antes que la proteína y la disolución mezcla se comporta igual que la de surfactante puro. Esto se ve perfectamente en la curva en equilibrio en la cual no hay ningún tipo de comportamiento mixto; la mezcla se comporta o bien como la proteína pura, o bien como el surfactante puro.

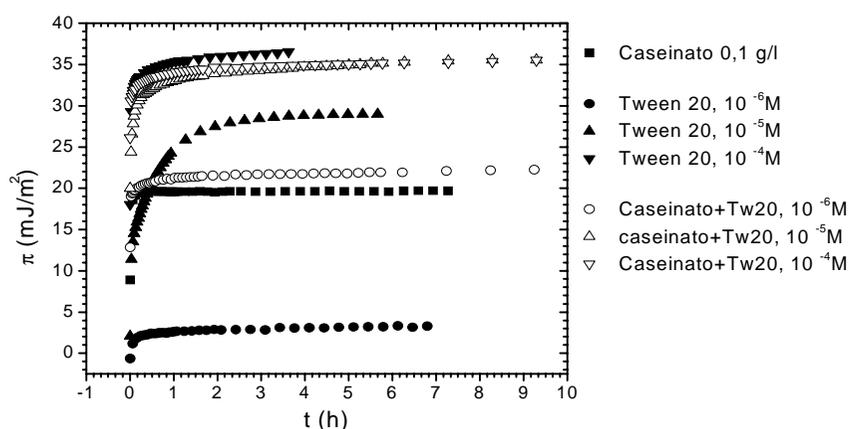


Figura 6.6: Adsorción dinámica de los componentes puros y del sistema mixto caseinato/tween 20.

En contraste, los resultados expuestos en la Figura 6.6, confirman la coexistencia de las moléculas de tween 20 y de caseinato en la superficie, que se traduce en un comportamiento que se desvía del que presenta el surfactante puro y del que presenta la proteína pura en un cierto intervalo de concentración y que también se veía reflejado en el comportamiento en condiciones de equilibrio. Al igual que se propone en el apartado anterior, las diferentes propiedades de cada una de las fracciones que componen el caseinato podrían ser las

responsables del comportamiento dinámico de la mezcla y que conducirán a su interacción con el surfactante.

6.3 PELÍCULAS LÍQUIDAS DE SURFACTANTES, PROTEÍNAS Y SISTEMAS MIXTOS PROTEÍNA/SURFACTANTE

El estudio de la adsorción en equilibrio de los sistemas mixtos caseinato/tween 20, así como el análisis de las curvas dinámicas de adsorción apuntan a la existencia de una posible interacción entre proteínas y surfactantes. Con el fin de obtener más información acerca de esta posible interacción se ha realizado un estudio de la estructura de las películas líquidas formadas con estos mismos sistemas. Las conclusiones obtenidas de este estudio se exponen a continuación de manera que en primer lugar se muestran las características de las películas líquidas formadas por los componentes individuales y a continuación las correspondientes a las películas líquidas del sistema mixto caseinato/tween 20. Todo ello se discute en términos de las isothermas de presión de disyunción obtenidas a partir del drenaje de las películas líquidas.

6.3.1 Drenaje de las películas de los sistemas puros

La Figura 6.7 muestra algunas imágenes representativas de la apariencia que presenta una película estabilizada por tween 20, así como la isoterma de disyunción correspondiente al drenaje de las películas de tween 20 a una concentración muy por encima de la cmc. En particular, se ha escogido una concentración de surfactante de 50 g/l para poder ilustrar el fenómeno de la estratificación con claridad.⁵

⁵ Véase sección 2.5

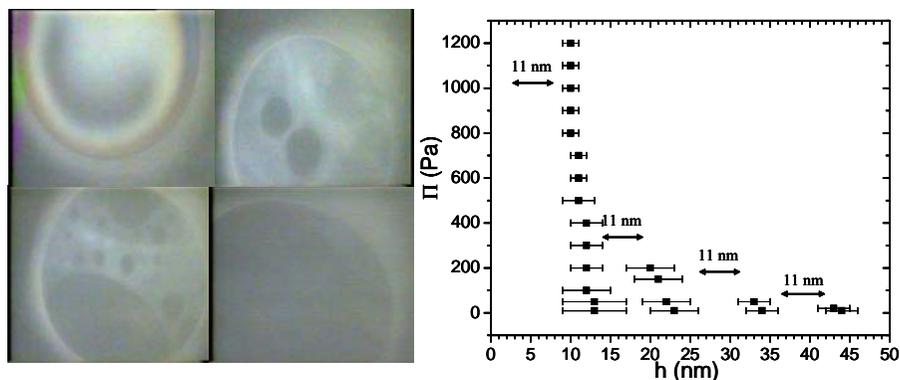


Figura 6.7: Imagen de varias etapas del drenaje de una película e isoterma de disyunción de una disolución de tween 20, 50 g/l

Experimentalmente lo que se observa es que inmediatamente tras la formación de la película, aparecen patrones de interferencia que dan cuenta del espesor de la misma. Estos patrones son muy fluidos debido a la naturaleza móvil del surfactante. Una vez que el color de la película se hace uniforme comienza la aparición de núcleos oscuros que crecen hasta que la película se muestra completamente negra y es muy estable. De acuerdo con la descripción de la balanza de películas dada en el capítulo 3, a partir de la visualización del drenaje de la película líquida puede obtenerse la correspondiente isoterma de presión de disyunción (Figura 6.7). De este modo, se puede cuantificar el drenaje escalonado que da lugar al fenómeno de estratificación de la película. De acuerdo con esta isoterma, pueden distinguirse cuatro espesores en la película espaciados entre sí una distancia de (11 ± 3) nm. Esta distancia coincide con valores similares encontrados en la bibliografía y se corresponde con el diámetro de una micela de tween 20 [Wilde, 1997; Dimitrova, 2001]. En consecuencia, la estratificación observada coincide con la expulsión secuencial de capas micelares atrapadas en el interior de la película líquida. Por otro lado, el espesor de la película final de equilibrio es igual a (11 ± 3) nm y es muy estable

pues resiste altas presiones. Esto indica que se trata de una película negra común (CBF) en la cual hay atrapada una capa de micelas de tween 20 entre las caras de la película que la estabiliza frente a la ruptura.

De manera similar, la Figura 6.8 muestra la apariencia de una película de caseinato junto a la isoterma de disyunción obtenida para este sistema. Una vez más, se ha utilizado una concentración alta de proteína (1 g/l) para optimizar la visualización del fenómeno. A la vista de esta figura es clara la existencia de numerosas diferencias en las propiedades del drenaje de películas de proteínas y surfactantes.

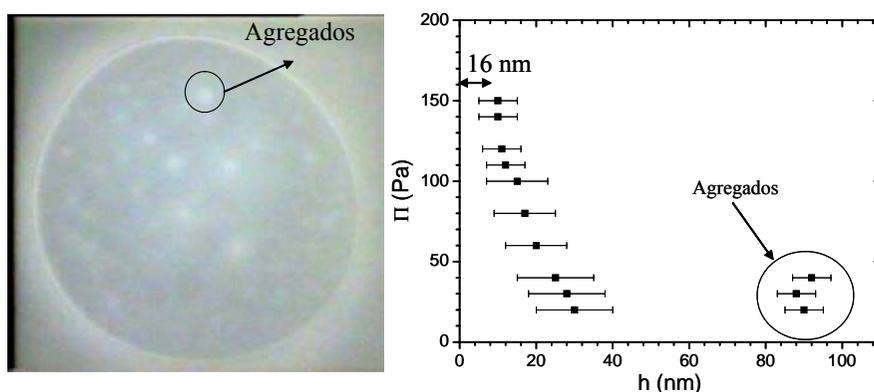


Figura 6.8: Imagen del drenaje de una película e isoterma de disyunción de una disolución de caseinato 1 g/l

Las películas líquidas estabilizadas por caseinato muestran la presencia de agregados en la misma que permanecen prácticamente inmóviles en la película y que desaparecen muy lentamente a medida que aumenta la presión. Los agregados son las pequeñas regiones más gruesas, i. e. más claras, que aparecen en la película. A diferencia de lo que se observa con el tween 20, el espesor de la película de caseinato disminuye de manera continua hasta alcanzar un valor de equilibrio sin experimentar oscilaciones en la presión de disyunción.

Este fenómeno es típico de películas en las que la concentración de surfactante es baja y existen pocas micelas en el medio como se explica en la sección 2.5 (Figura 2.12a).

Dada la escasa información acerca de películas líquidas de proteínas, resulta compleja la interpretación de la isoterma mostrada en 6.8. No obstante, en la bibliografía se encontrado recientemente un excelente trabajo sobre drenaje de películas de β -caseína a diferentes condiciones por Casçao-Pereira y col. [Casçao-Pereira, 2003]. Estos autores encuentran que según el valor de pH (y por tanto de la carga de proteína) y de la concentración de electrolito en el medio, las películas pueden experimentar o no un drenaje escalonado. En particular, cuando las condiciones favorecen la existencia de una repulsión electrostática entre las proteínas, no se observa estratificación y el drenaje se produce de manera continua como en nuestro caso. Por el contrario, a un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína y/o una concentración elevada de sal, condiciones en las cuales se reduce notablemente la interacción electrostática entre proteínas, se observa una estratificación en el drenaje. En este último caso, la transición se justifica en términos de la expulsión de una capa de moléculas de β -caseína. De acuerdo con estos resultados, la ausencia de oscilaciones en la Figura 6.8 indicaría que la repulsión electrostática puede ser la responsable de que se produzca un drenaje continuo.

Por otro lado, el espesor final de la película de caseinato observado en la Figura 6.8 es de (16 ± 4) nm. Si se compara este valor con los resultados de Casçao-Pereira y col. para la β -caseína en el caso en el que hay un drenaje continuo, vemos que el espesor final de la película es de 26 nm. Teniendo en cuenta que el espesor de una capa de β -caseína es aproximadamente 10 nm [Dimitrova, 2001; Casçao-Pereira, 2003], la película estaría formada en su caso por dos capas

monomoleculares de β -caseína, algo separadas entre sí debido a la repulsión electrostática entre las moléculas de β -caseína [Casçao-Pereira, 2003]. De acuerdo con esto, el espesor obtenido para la película final de caseinato indica la formación de una estructura diferente. Las condiciones de trabajo en las cuales se ha obtenido la isoterma de presión de disyunción del caseinato difieren bastante de las utilizadas por Casçao-Pereira y col. Concretamente, estos autores trabajan a pH 9 y una concentración de 0.01 M de NaCl, mientras que en nuestras condiciones de trabajo son de pH de 7.4 y una fuerza iónica de 0.05 M. Teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de cada una de las fracciones que componen el caseinato (Tabla 4.I) y la elevada fuerza iónica en nuestro caso, es lícito suponer que la repulsión electrostática en la película de caseinato en nuestras condiciones de trabajo es menor que la que sienten en las películas de β -caseína en las condiciones de Casçao-Pereira y col. referidas anteriormente. En consecuencia, esto podría dar lugar a un mayor acercamiento de las dos capas de caseinato responsable del menor espesor en la película final de esta proteína con respecto al espesor final de las películas de β -caseína.

Finalmente, existe otro factor importante a tener en cuenta a la hora de comparar las propiedades de las películas formadas por caseinato o β -caseína. La naturaleza heterogénea del caseinato, formado por varias fracciones con diversas características estructurales, sugiere la formación de una película líquida igualmente heterogénea. La κ -caseína es la fracción que difunde más rápidamente a la interfaz [Turhan, 2003], al igual que es la fracción que posee menos carga (-2.5 unidades de carga elemental por partícula a pH 6.6) y menor tamaño (9 nm de diámetro) [Benjamins, 2001]. Asimismo, al igual que la fracción α_2 -caseína, posee una cierta estructura secundaria

y terciaria debido a la presencia de puentes disulfuro⁶ de manera que estas dos fracciones pueden formar estructuras supramoleculares [Turham, 2003]. Así pues, en la película líquida de caseinato, podría ocurrir que el espesor variase localmente en función de la composición local de la película debido al diferente tamaño, estructura y carga que presentan las diversas fracciones.

En resumen, las dos capas de caseinato adsorbido sobre las superficies de que forman las películas de esta proteína en nuestras condiciones de trabajo, tienden a acercarse más entre sí que las dos capas de β -caseína a pH 9 y 0.01 M. Este fenómeno puede explicarse en términos de una menor repulsión electrostática global y de la presencia de puentes disulfuro en algunas fracciones que generan una fuerte interacción intermolecular.

6.3.2 Drenaje de las películas del sistema mixto

Una vez vistas las propiedades de las películas de tween 20 y caseinato por separado, en esta sección se estudia las características del drenaje de películas formadas por sistemas mixtos. Con el fin de complementar los resultados de caracterización interfacial de sistemas mixtos, se han empleado las mismas concentraciones de proteína y surfactante para formar las películas que las utilizadas en el estudio de la adsorción en la interfaz aire-agua.

⁶ Véase sección 4.2

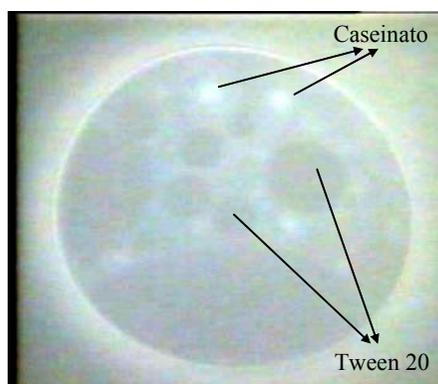


Figura 6.9: Imagen de la coexistencia de caseinato (0.1g/l) y tween 20 (10^{-3} M) en la película mixta

En general, se observó que el drenaje mostrado por las películas líquidas formadas por sistemas mixtos caseinato/tween 20, es muy dependiente de la concentración de surfactante en la mezcla. La Figura 6.9 muestra la apariencia de una película típica formada por una mezcla en la que se puede observar la coexistencia en la misma de las moléculas de proteína y de surfactante. Así pues, en las películas formadas por el sistema mixto se encuentra un comportamiento intermedio entre el drenaje uniforme del caseinato mostrado en la Figura 6.8 y el drenaje escalonado mostrado en la Figura 6.7. El drenaje de la película se aproxima al del surfactante solo conforme aumenta la concentración de tween 20 en la mezcla y, a concentraciones suficientemente altas de surfactante, aparecen nucleación de orificios oscuros y así la apariencia del drenaje de la película mixta coincide prácticamente con el del surfactante puro. Este tipo de comportamiento intermedio así como la transición hacia el comportamiento del surfactante puro, ha sido igualmente observado por Wilde y col. en películas mixtas de BSA/tween 20 [Wilde, 1997] las cuales resultan ser muy similares a las encontradas para la mezcla de caseinato y tween 20.

Con el fin de evaluar más detenidamente el drenaje de las películas líquidas, la Figura 6.10 muestra las isothermas de presión de disyunción obtenidas para dos sistemas mixtos especialmente representativos; la mezcla con una concentración de surfactante inferior, pero del mismo orden de magnitud que su cmc (10^{-5}M) y una concentración muy superior a ésta (10^{-3}M).

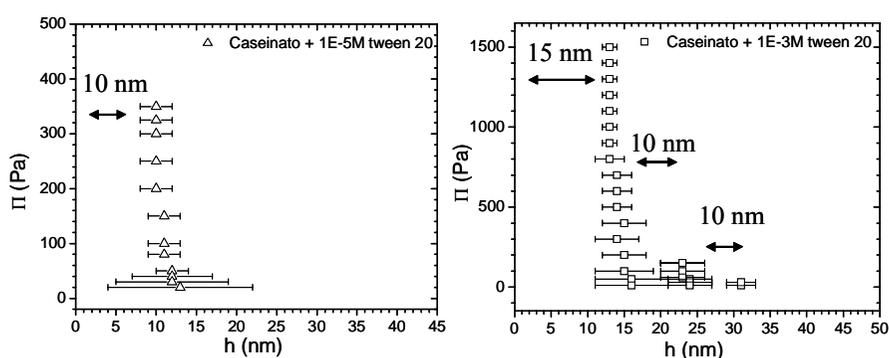


Figura 6.10 Isothermas de disyunción del sistema mixto 0.1 g/l de caseinato y tween 20. No se han representado los agregados pese a estar presentes en casi todos los casos.

En el primer caso, puede observarse como el drenaje se produce de manera monótona y el espesor final de la película tiene un valor muy pequeño en relación al encontrado en el caso de caseinato solo. En particular, se ha estimado un espesor de (10 ± 4) nm. Dado que a esta concentración de surfactante aún no se han formado micelas y teniendo en cuenta que este espesor es inferior al de una bicapa de caseinato observada en el caso anterior (sección 6.3.1), se puede suponer que en la película coexiste una capa de proteínas con moléculas de surfactante. Esta suposición concuerda con lo observado en la isoterma de presión superficial mostrada en la Figura 6.1 en donde para una concentración de tween 20 de $10^{-5}\text{M} = 10^{-2}\text{ mol/m}^3$, el surfactante se encuentra en la superficie con el caseinato. Además, en

estas condiciones de trabajo la concentración de tween 20 se encuentra entre la cac y la cmc y por tanto, existe una asociación de los componentes del sistema mixto. Así pues, cabe concluir que la película final está compuesta por complejos surfactante-proteína.

Finalmente, la Figura 6.10 muestra también la isoterma de presión de disyunción correspondiente a la mezcla de caseinato con una concentración de tween 20 muy por encima de su cmc. La aparición de oscilaciones en la isoterma cuantifica la estratificación, ya observada en las imágenes de las películas. Teniendo en cuenta la ausencia de oscilaciones en el caso de caseinato solo y que los valores de espesor de los estratos observados en la isoterma coinciden con el diámetro de una micela de tween 20, la estratificación tendría su origen en la expulsión secuencial de capas de micelas. Por otro lado, la el espesor final de la película en este caso tiene un valor de (15 ± 2) nm. Este valor es bastante mayor que el del caso anterior lo cual sugiere que en estas condiciones, la película final contiene una mezcla de micelas de tween 20 junto con proteínas y moléculas de surfactante. Sin embargo, la similitud de este espesor con el hallado para películas de únicamente caseinato, podría indicar que localmente también se formen bicapas de proteínas junto con moléculas de tween 20. De acuerdo con esta segunda hipótesis estaría el hecho de que al haber superado la cmc, se favorezca a que las moléculas de tween 20 formen micelas frente a la formación de complejos proteína/surfactante.

A la vista de estos resultados, la presencia de micelas de tween 20 en la mezcla afecta significativamente al comportamiento del sistema mixto. Es más, al margen de lo discutido sobre la base de las isotermas de presión de disyunción, experimentalmente se observan diferencias en cuanto a la estabilidad de las películas. En particular, las películas resultantes de la mezcla caseinato/ 10^{-5} M

tween 20 son muy inestables y se rompen fácilmente mientras que las películas formadas por la mezcla caseinato/ 10^{-3} M tween 20 resultan más resistentes en el tiempo. Así pues, la presencia de micelas parece favorecer la estabilidad de las películas mixtas. Este hecho se evalúa en detalle en el apartado siguiente.

6.4 ESTABILIDAD DE LA ESPUMA DE SISTEMAS MIXTOS PROTEÍNA/SURFACTANTE

Las espumas son sistemas extremadamente complejos cuya estabilidad depende de multitud de factores⁷. Se ha explicado ya anteriormente que los mecanismos de estabilidad de películas de surfactantes y proteínas, en general, son completamente diferentes. Por un lado, los surfactantes disminuyen marcadamente la tensión superficial debido a la rápida difusión de las moléculas a la superficie. Las películas superficiales de surfactantes suelen ser muy elásticas debido a la capacidad de los surfactantes de difundir hacia, y por, la superficie y este es el principal mecanismo estabilizador de la espuma. Por el contrario, las proteínas disminuyen menos la tensión superficial aunque forman películas superficiales con propiedades viscoelásticas debido a las interacciones intermoleculares que tienen lugar entre proteínas adsorbidas en la superficie. En consecuencia, cuando se crea una espuma mixta formada por proteínas y surfactantes, estos dos mecanismos estabilizadores entran en competencia. Es muy importante conocer los fenómenos que tienen lugar en la capa interfacial con el fin de comprender las propiedades de las espumas mixtas, que en general dependen de multitud de factores. A continuación se presentan en primer lugar las características de la

⁷ Véanse secciones 2.6 y 5.6

espuma formada exclusivamente por el surfactante así como las diferencias encontradas entre las espumas formadas por las dos proteínas utilizadas. Seguidamente, se exponen los resultados concernientes a las espumas formadas por los sistemas mixtos y se tratará de relacionar con la caracterización superficial y el comportamiento en películas líquidas presentado anteriormente. Además, algunos resultados de la bibliografía referentes a las propiedades dilatacionales de las capas superficiales resultan claves en la comprensión de los fenómenos que se manifiestan. Todas las medidas se han realizado en las mismas condiciones⁸ que las películas líquidas y la adsorción de manera que se puedan relacionar correctamente todas las magnitudes.

6.4.1 Estabilidad de la espuma de los sistemas puros

Al igual que se hizo en la sección 5.6, a la hora de evaluar las características de la espuma que se forma con una disolución de tween 20, se puede distinguir entre la formación y la estabilidad de la misma. Así pues, la Figura 6.11 muestra dos gráficas correspondientes a la espuma formada por el tween 20 con un vidrio fritado de porosidad 2⁹. En la primera se encuentra representada la evolución del volumen de espuma frente al volumen de aire inyectado. De esta forma, en esta figura se observa la capacidad espumante del tween 20. De acuerdo con los resultados mostrados en dicha gráfica, cabe destacar que no se observa formación de una espuma en absoluto para concentraciones de surfactante por debajo de su cmc, de acuerdo con los resultados de Liu y col. para el mismo sistema [Liu, 2005]. Una vez superada la cmc, la capacidad espumante del tween 20 aumenta bruscamente y se

⁸ pH 7.4, I= 0.05 M, T=23°C

⁹ Véase Capítulo 4.

mantiene constante en el intervalo de concentraciones estudiado. Así pues, la formación de una espuma parece depender de manera fundamental de la presencia de micelas en el medio. No se han encontrado en la bibliografía resultados experimentales de la reología dilatacional de las capas superficiales de tween 20, que probablemente aclararían este comportamiento.

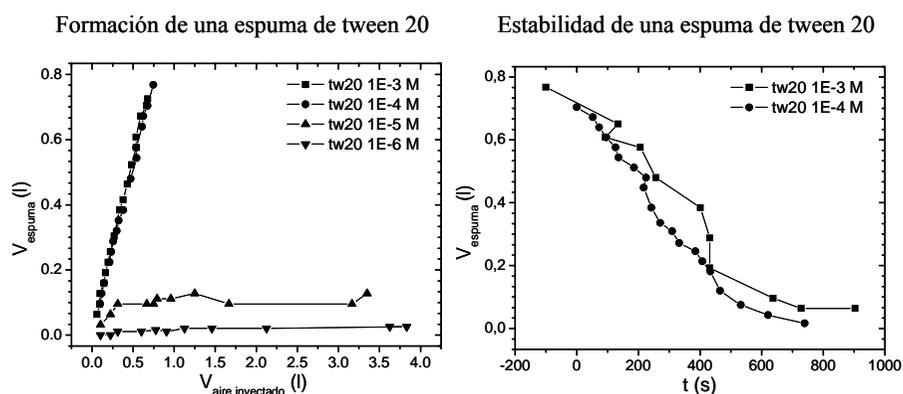


Figura 6.11: Formación y estabilidad de la espuma formada por el tween 20

Con respecto a la estabilidad de la espuma, que se encuentra representada en la segunda gráfica de la Figura 6.11, se observa igualmente una gran similitud entre las concentraciones evaluadas por encima de la cmc del surfactante. En general, como se observa en la Figura 6.11, la espuma formada por el tween 20 es muy inestable y desaparece a los pocos minutos. Este hecho, concuerda perfectamente con el valor negativo encontrado para el parámetro de Frumkin del tween 20 en el ajuste teórico de los datos de adsorción en las mismas condiciones (Tabla 6.I). El valor del parámetro de Frumkin está directamente relacionado con la estabilidad de la espuma formada por el surfactante [Galgoci, 2005]. Cuando la película líquida entre dos burbujas se estrecha debido al drenaje, la película se curva y como consecuencia, los grupos hidrófilos del surfactante adsorbido en la

superficie se comprimen. Por ello, solamente si la interacción repulsiva entre éstos es suficientemente alta, la película resistirá el drenaje sin romperse. Además, la inestabilidad de la espuma formada por el tween 20 estaría favorecida por la ausencia de carga de este surfactante y podría ser indicativo de la alta estabilidad de las micelas del tween 20 que se resisten a ceder surfactante a la superficie [Oh, 1991]. Asimismo, la poca estabilidad mostrada con la espuma del tween 20 contrasta con la notable estabilidad vista para la espuma de β -caseína en el Capítulo 5. Este hecho concuerda igualmente con el valor positivo encontrado para el parámetro de Frumkin en el ajuste de la isoterma de β -caseína (Tabla 5.IV).

Una vez evaluada la espuma formada por el tween 20, veamos las principales características que muestran las correspondientes espumas de las dos proteínas utilizadas en este trabajo. Puesto que la concentración de proteína en la mezcla se mantiene constante, solamente se evalúa la espuma correspondiente a dicha concentración de proteína, 0.1 g/l en los dos casos. La Figura 6.12 muestra una comparación explícita de la estabilidad de una espuma formada por disoluciones puras de caseinato y β -caseína en las mismas condiciones y formadas con un vidrio de igual porosidad (2).

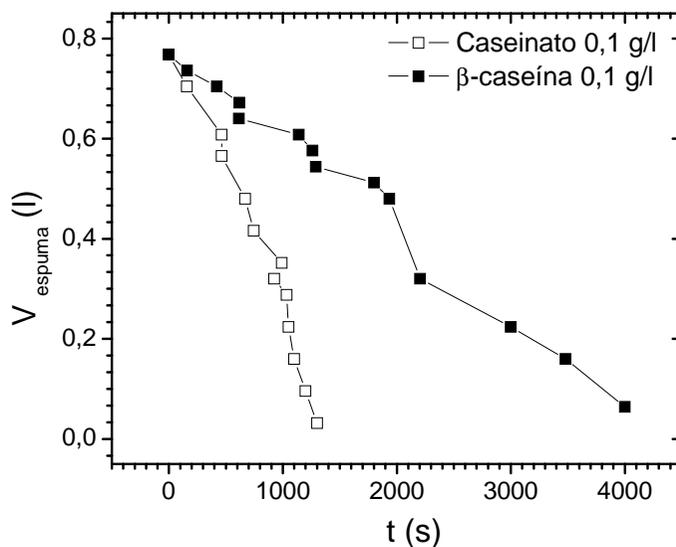


Figura 6.12: Estabilidad de las espumas formadas por el caseinato y por la β -caseína a la misma concentración

Cabe destacar de esta figura, la gran diferencia existente entre la espuma formada por el caseinato y la espuma formada por β -caseína, siendo esta última bastante más estable que la anterior. Por un lado, las diferencias en la estabilidad de la espuma formada por la β -caseína y el caseinato podrían tener una explicación teniendo en cuenta el estudio llevado a cabo por Benjamins en [Benjamins, 2001]. En ese trabajo se muestran las propiedades dilatacionales de ambos sistemas en condiciones de trabajo comparables a las que se han utilizado aquí (pH 7 y F. I.=0.05M). La tabla 6.III muestra los valores encontrados por Benjamins para los sistemas que nos conciernen. El autor muestra los valores del módulo dilatacional $|\epsilon|$ y del ángulo de fase viscosa φ (diferencia de fase) que se transforman fácilmente en elasticidad y viscosidad superficial mediante las ecuaciones (2.10).

Tabla 6. III: Parámetros dilatacionales de las películas de caseinato (0.3 g/l) y β -caseína (0.01 g/l) adsorbidas en la interfaz aire-agua medidos a una frecuencia angular de 0.84 rad/s [Benjamins, 2001]

Proteína	$ \varepsilon $ (mJ/m ²)	φ (°)	ε (mJ/m ²)	η (mJ/s·m ²)
Caseinato	19.7	12	19	5
β -caseína	16	0	16	0

Ya se ha explicado a lo largo de esta memoria cómo la estabilidad de una espuma depende principalmente de la elasticidad superficial de la capa adsorbida que aumentará con la resistencia de la película a la deformación [Holmberg, 2003; Langevin, 2001]. Además, una alta viscosidad superficial favorece la desestabilización de la espuma formada con la proteína [Holmberg, 2003]. De acuerdo con esto, la existencia de una pequeña viscosidad superficial en la capa de caseinato adsorbida en la interfaz aire-agua, que no se manifiesta en la capa de β -caseína adsorbida en la misma interfaz, podría contribuir a la mayor estabilidad mostrada por la espuma de esta última. Ahora bien, el indudablemente menor espesor de equilibrio mostrado por las películas de caseinato con respecto al que presentan las películas de β -caseína [Casçao-Pereira, 2003], podría contribuir de manera decisiva a la mayor estabilidad mostrada por la espuma de β -caseína. En una espuma formada por burbujas separadas entre sí por capas más delgadas, tanto la maduración de Ostwald como la coalescencia, se verían importantemente favorecidos.

6.4.2 Estabilidad de la espuma de las mezclas

Finalmente, en este apartado se evalúa la estabilidad de las espumas formadas por los sistemas mixtos β -caseína/tween 20 y caseinato/tween 20. Veamos cada una de ellas por separado.

La Figura 6.13 muestra la variación temporal del volumen de las espumas formadas por el sistema mixto β -caseína/tween 20 así como la de los sistemas puros para facilitar la comparación entre curvas. Al igual que se ha hecho en el resto del capítulo, solamente se encuentran dibujadas en la Figura 6.13 dos concentraciones de tween 20 especialmente representativas; una justo debajo de la cmc (10^{-5}M) y una muy por encima de ésta (10^{-3}M).

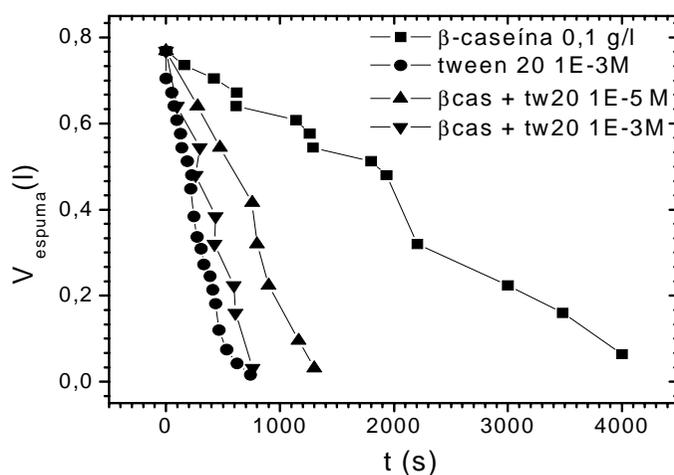


Figura 6.13: Estabilidad de la espuma del sistema mixto β -caseína/tween 20

El comportamiento del sistema mixto, reproduce visiblemente el comportamiento observado en la adsorción del mismo sistema. A concentraciones bajas de surfactante en la mezcla, la estabilidad de la espuma de la mezcla se corresponde con la de la β -caseína pura (datos no mostrados) mientras que a concentraciones altas de surfactante, la variación temporal del volumen de la espuma de la mezcla prácticamente se superpone a la que presenta el tween 20 puro. Este

hecho se muestra en la Figura 6.14, en la que se representa el tiempo que tarda el volumen de espuma en reducirse a la mitad frente a la concentración de tween 20 en el medio. Así, en la curva del tween 20 se observa como la vida media de la espuma aumenta y alcanza un cuasi-*plateau*. Por el contrario, la vida media de la espuma formada por la mezcla β -caseína/tween 20 disminuye desde el valor que presenta la β -caseína hasta el valor que presenta el tween 20 puro.

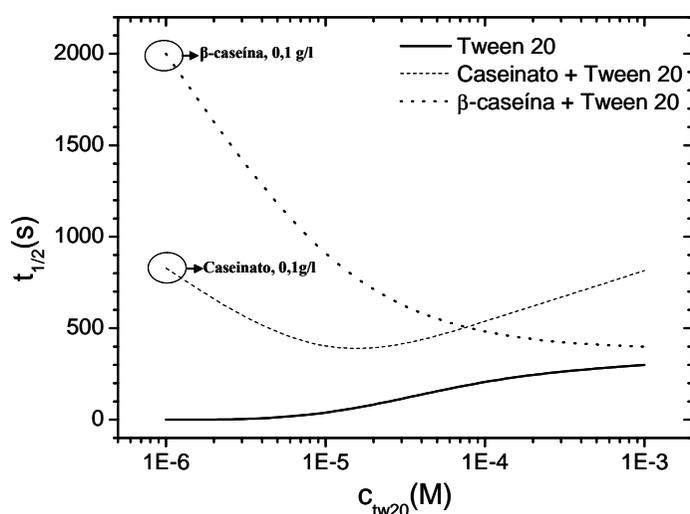


Figura 6.14: Evolución de la vida media de la espuma con la concentración de surfactante en la mezcla

Este comportamiento concuerda igualmente con el encontrado por Krägel y col. en un estudio experimental muy completo en el que se evalúa la reología superficial de cizalla y el espesor de las películas formadas por una mezcla de β -caseína y tween 20 [Krägel, 1999]. Estos autores encuentran con ambas técnicas que a concentraciones suficientemente altas de surfactante, éste desplaza completamente a la proteína de la superficie. A la vista de estos resultados, cabría concluir que la película superficial formada por una disolución mixta de β -

caseína/tween 20 está compuesta únicamente por surfactante, a concentraciones de este último suficientemente altas. La proteína parece quedar bajo la capa superficial de tal manera que las propiedades de la capa superficial no se ven afectadas prácticamente por la presencia de proteína. La estabilidad de la espuma reproduce perfectamente el mecanismo de desplazamiento de la proteína por el surfactante predicho por las isotermas de tensión superficial del sistema mixto y visualizado en la Figura 6.4 en términos del grado de recubrimiento superficial obtenido teóricamente.

Veamos a continuación las características de la espuma formada por el sistema mixto caseinato/tween 20. De manera similar a lo expuesto para el anterior sistema mixto, la Figura 6.15 muestra la variación temporal de la espuma formada por los sistemas individuales y los sistemas mixtos con varias concentraciones de surfactante en la mezcla. A diferencia de lo que ocurre con la β -caseína, la presencia de tween 20 en la espuma de caseinato tiene un efecto desigual y por ello en esta figura se encuentran representadas más concentraciones de tween 20. Así pues, a concentraciones muy bajas de surfactante (10^{-6}M), como era de esperar, el sistema se comporta igual al caseinato puro. Al aumentar la cantidad de tween 20 en la mezcla, pero sin alcanzar la cmc del surfactante (10^{-5}M), la estabilidad de la espuma formada disminuye bruscamente. El volumen de espuma desaparece en el tiempo incluso tan rápido como si sólo hubiera surfactante en la mezcla. Sin embargo, al aumentar más aún la cantidad de tween 20 en la mezcla, ya por encima de la cmc, se observa una inesperada reestabilización del sistema que se mantiene al aumentar más aún la concentración de surfactante en la mezcla. De hecho, la variación temporal del volumen de espuma se corresponde prácticamente con la que se obtiene para la disolución de caseinato puro. En la Figura 6.14 se observa la vida media de la espuma

formada por el sistema mixto en función de la concentración de surfactante en la mezcla. En esta figura se observa claramente la aparición de un mínimo en la estabilidad de la espuma que se recupera una vez que se supera la cmc del tween 20.

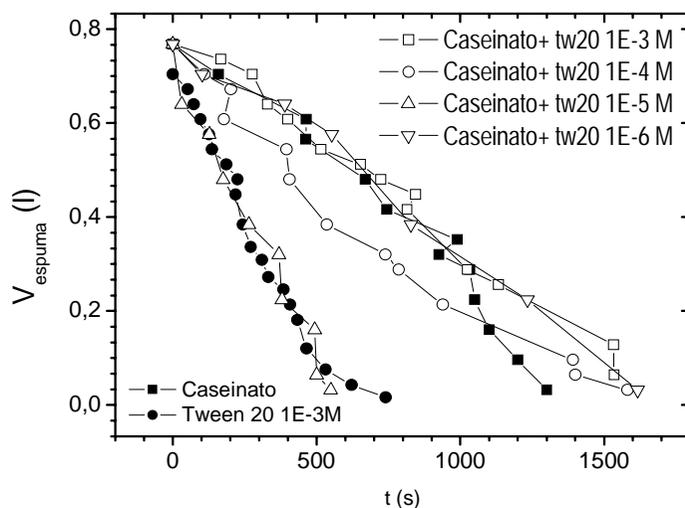


Figura 6.15: Estabilidad de la espuma del sistema mixto Caseinato/tween 20

El estudio del drenaje de las películas líquidas, realizado en el apartado anterior proporciona varias claves para la comprensión de los procesos que tienen lugar en la espuma formada por los sistemas mixtos. En la Figura 6.10 se ha evaluado la composición de las películas líquidas en cada una de las mezclas. En ella se observa como la mezcla de caseinato con una concentración de tween 20 justo por debajo de la cmc proporciona unas películas líquidas que reducen sustancialmente su espesor con respecto al que presenta la proteína sola. Este hecho, podría ciertamente ser la causa de la súbita desestabilización sufrida por la espuma, ya que las burbujas serían más susceptibles a la coalescencia y a la maduración de Oswald. De manera análoga, la Figura 6.10 muestra también la película líquida

resultante de una mezcla de caseinato con una concentración bastante elevada de tween 20. En esta ocasión, el análisis de los datos experimentales muestra que el tween 20 no desplaza completamente a la proteína de la superficie, como ocurría en el caso de la β -caseína, sino que desvela la existencia de proteína en la película. Asimismo, la película mixta a estas concentraciones de surfactante manifiesta una mayor estabilidad que la mostrada por las películas de tween 20. Estos hallazgos concuerdan perfectamente con la estabilidad de la espuma del sistema mixto encontrada en la Figura 6.15. Asimismo, en la Figura 6.14 se muestra de manera muy clara como la presencia de micelas en la mezcla afecta de diferente manera a la estabilidad de la espuma del sistema mixto. Al igual que se concluyó a partir del estudio de las películas, el hecho de que al haber superado la cmc, se favorezca a que las moléculas de tween 20 formen micelas frente a la formación de complejos proteína/ surfactante de manera que el efecto en la mezcla es más llamativo cuando la cantidad de surfactante libre es máxima, es decir, justo antes de la cmc del surfactante.

Finalmente, se trata de relacionar la estabilidad de la espuma del sistema mixto con el comportamiento dilatacional de la capa adsorbida de la mezcla caseinato/tween 20 en la interfaz aire-agua, al igual que se hizo en el Capítulo 5. Sin embargo, no se han encontrado hasta el momento datos en la bibliografía al respecto. Ahora bien, de acuerdo con Benjamins, pese a que el comportamiento dilatacional del caseinato difiere significativamente del comportamiento dilatacional de la β -caseína, éste es bastante parecido, al menos desde un punto de vista cualitativo, al que presenta la BSA en la interfaz aire-agua [Benjamins, 2001]. Asimismo, en el apartado anterior se ha encontrado un comportamiento muy similar entre las películas líquidas formadas por el sistema mixto BSA/tween 20, descritas por Wilde y col. en [Wilde, 1997] y las realizadas en este trabajo con

caseinato y tween 20. De acuerdo con esto, el comportamiento dilatacional del sistema BSA/tween 20, que sí se encuentra estudiado en detalle en [Rodríguez-Niño, 1998], podría esclarecer el complejo comportamiento encontrado en la espuma del sistema mixto. En este sentido, Rodríguez-Niño y col. encuentran un mínimo en la elasticidad superficial del sistema mixto BSA/tween 20 localizado a una concentración de tween 20 del mismo orden de magnitud que la cmc del surfactante pero algo menor que esta [Rodríguez-Niño, 1998]. Este resultado podría explicarse de la siguiente manera. Tratándose de surfactante solo, las moléculas tenderían a situarse preferentemente en la superficie ante una deformación de la superficie, lo cual iría en detrimento de la elasticidad superficial de la película. La presencia de micelas en la película podría favorecer un intercambio de moléculas superficiales con moléculas formando micelas, siendo las dos situaciones igualmente favorables para el surfactante, lo cual resultaría en un aumento de la resistencia de la película a la deformación, i.e. la elasticidad superficial. Ya se ha explicado con anterioridad que la estabilidad de la espuma está íntimamente relacionada con la elasticidad superficial de la capa superficial absorbida en la superficie de las burbujas [Langevin, 2001; Holmberg, 2003]. Así, la presencia de un mínimo en la elasticidad superficial del sistema mixto a una concentración de surfactante justo bajo la cmc, encajaría perfectamente con la aparición de un mínimo en la estabilidad de la espuma formada por el mismo sistema (ver Figura 6.14).

De acuerdo con Mackie y col. debido a la ausencia de interacción electrostática, la interacción esperada entre proteínas y surfactantes no iónicos es de tipo hidrófoba. Ahora bien, si el surfactante ocupa los sitios hidrófobos de la proteína, la adsorción global del sistema se ve afectada negativamente, que es lo contrario de lo que se observa en la Figura 6.1. En el caso que nos ocupa, es

probable que al añadir tween 20 a concentraciones por debajo de la cmc, éste ocupe un lugar en la superficie junto a la proteína contribuyendo al aumento de la presión superficial. Esto podría ocurrir por la fragilidad de la interacción intermolecular que presenta esta proteína debido a la flexibilidad de su estructura [Mackie, 2005]. Por el contrario, el caseinato posee moléculas de cisteína entre sus fracciones α_2 -caseína y κ -caseína, que pueden formar fuertes puentes disulfuro entre ellos [Turhan, 2003; Benjamins, 2001]. Esta interacción podría oponerse a la solubilización de la proteína por el tween 20. Así pues, es probable que en los sistemas mixtos se produzca más bien una coexistencia con estas fracciones del caseinato en la superficie. La presencia de tween 20 en la capa de caseinato afectaría significativamente a la elasticidad de la capa superficial y esto afectaría a la estabilidad de la espuma, de acuerdo con los resultados experimentales.

6.5 RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este capítulo, dedicado al comportamiento de las mezclas proteína/surfactante, se ha realizado una caracterización de dos sistemas mixtos diferentes haciendo uso de diversas herramientas en función de los requisitos particulares de cada uno de ellos. Las mezclas se han realizado manteniendo fija la concentración de proteína a 0.1 g/l en los dos sistemas y variando la concentración de surfactante en el medio.

El primer sistema mixto evaluado es la mezcla de tween 20 con β -caseína, una proteína modelo que se encuentra bien caracterizada en el capítulo anterior. Las propiedades superficiales de este sistema ya sugieren que el surfactante desplaza a la β -caseína de la superficie. La aplicación de un modelo teórico verifica y cuantifica

este desplazamiento inferido de las curvas experimentales. Finalmente, el comportamiento de la espuma formada con una mezcla de β -caseína y surfactante confirma estas predicciones. La espuma formada por la disolución mixta se comporta como la de la proteína a bajas concentraciones de surfactante, y como la del surfactante solo a altas concentraciones del mismo.

El comportamiento de la mezcla caseinato/tween 20 se presenta algo más complicado de interpretar. Ya en la caracterización superficial de la mezcla se sugiere la formación de una capa superficial mixta. Concretamente, la actividad superficial del tween 20 se manifiesta en la aparición de una concentración de agregación crítica en la isoterma de presión superficial de la mezcla. Estos resultados apuntan a un diferente tipo de interacción entre el tween 20 y las diversas fracciones que componen el caseinato. Dado que la naturaleza heterogénea del caseinato no permite la aplicación del modelo teórico, se busca otro dispositivo experimental con el fin obtener más información acerca del comportamiento de este sistema mixto. El análisis de las películas líquidas formadas por los sistemas individuales y los sistemas mixtos proporcionan una valiosa información estructural de los sistemas. Con respecto al caseinato solo, se encuentra la formación de películas más delgadas que las que forma la β -caseína. Este resultado es clave, más adelante, en la comprensión de las diferencias entre las espumas formadas por la β -caseína y el caseinato, respectivamente. Con respecto a la estructura de las películas líquidas del sistema mixto, la coexistencia de la proteína y el surfactante, apuntada por las propiedades interfaciales de la mezcla, se ve confirmada por esta otra técnica. En una mezcla con poco tween 20, se observa la formación de una estructura de bajo espesor y poca estabilidad mientras que, cuando aumenta la concentración de este en la mezcla por encima de su cmc, se forma

una película muy estable y más gruesa que la correspondiente al tween 20 solo. Finalmente, la curva de estabilidad de la espuma obtenida para la mezcla, en función de la cantidad de tween 20, reproduce perfectamente este comportamiento. Así pues, la espuma se desestabiliza con concentraciones de tween 20 cercanas a la cmc del surfactante, pero por debajo de ésta, y se reestabiliza al superar la misma. Como consecuencia, esta reestabilización del sistema se relaciona con un aumento de la elasticidad superficial de la película debido a la presencia de micelas en la estructura y se concluye que el surfactante no es capaz de desplazar a todas las fracciones que componen el caseinato por completo de la superficie, de tal manera que éstas contribuyen de manera decisiva a la estabilidad de la espuma.

Como última conclusión cabe destacar que a la vista de los resultados presentados en este capítulo, la estabilidad de las espumas depende fundamentalmente del comportamiento superficial de los sistemas. De ahí la necesidad de realizar una caracterización interfacial e investigar las propiedades y características de estas películas con el fin de diseñar espumas con un comportamiento definido de aplicación en los diferentes ámbitos tecnológicos.

Capítulo 7

SUMMARY AND CONCLUSIONS

7.1 INTRODUCTION

This research work has been performed by Julia Maldonado-Valderrama in the Department of Applied Physics, University of Granada in Spain under the supervision of Professor Miguel A. Cabrerizo-Vílchez, Dr. M. José Gálvez-Ruiz and Dr. Antonio Martín-Rodríguez. It is entitled:

INTERFACIAL CHARACTERISATION OF PROTEINS AND SURFACTANTS: APPLICATION TO FOOD DISPERSIONS.

Due to the amphiphilic nature of food emulsifiers, they tend to place themselves at interfaces. Concretely, they adsorb at the air-water interface, in the case of foams, or at the oil-water interface, in the case of emulsions. Therefore, the structure and properties of these interfacial layers are crucial in the understanding of the behaviour of food dispersions, such as foams and emulsions. Due to the many complex phenomena occurring in these systems, the question still remains unclear.

Accordingly, the main objective of this research work is the characterisation of interfacial layers composed by food emulsifiers, such as proteins and surfactants. In particular, an experimental and theoretical study of whole casein, β -casein and tween 20 at the air-water and the tetradecane-water interface is presented.

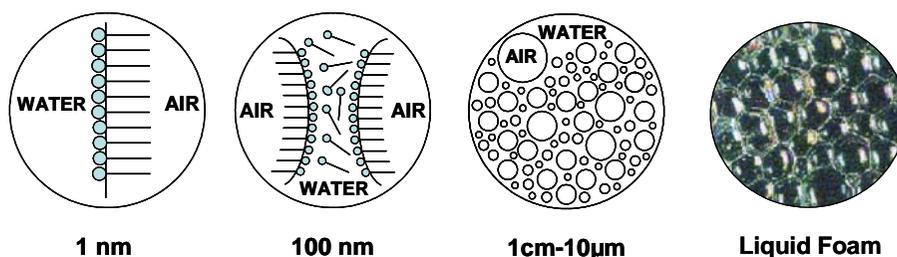


Figure 7.1: Structure of a liquid foam analogue to an emulsion

The thesis is organised as follows. Firstly, a brief revision of some basic concepts regarding the interfacial properties of proteins and surfactant layers is presented. Therein, the structures shown in Figure 7.1 are defined independently by following the same order of appearance; from the microscopic (interfacial layer) to the macroscopic (foam or emulsion). Hence, firstly, the surface tension is defined. Secondly, the main characteristics of protein and surfactant monolayers are shown along with the basis of the scaling theory used in the interpretation of these experimental results [Douillard, 2003]. Subsequently, the process of adsorption of proteins and surfactants onto fluid interfaces is described [Miller, 2000]. Also, the definition of surface dilatational elasticity of protein and surfactants adsorption layers is presented [Lucassen-Reynders, 1981]. Next, a brief depiction of thin liquid films is given [Bergeron, 1999]. Finally, the major characteristics of foams and emulsions are given along with their relationship to the properties of their adsorbed layers [Langevin, 2000; Holmberg, 2003].

Once these concepts are clear, the next chapter is devoted to the presentation of the theoretical model used along the work. Due to the complex behaviour shown by proteins adsorbed at fluid interfaces, a thermodynamic model is used in order to further interpret the experimental results. The model has been developed by Fainerman and co-workers and it is described in detail in reference [Fainerman, 2003]. This theoretical formalism deals with the adsorption of proteins onto fluid interfaces and has been recently extended to account for the dynamics of adsorption, for the surface elasticity of protein adsorbed layers and for the *equilibrium* adsorption behaviour of mixed systems composed of protein/surfactants adsorbed at fluid interfaces. All of these treatments are briefly explained in this chapter. Moreover, in order to implement the theory, three computer programs have been

developed by using an iterative technique. Namely, the adsorption of surfactants, the adsorption of proteins and the adsorption of mixed systems onto fluid interfaces have been numerically solved in this manner. The rest of the fitting programs, relating to the dynamics and the elasticity were performed by E. Aksenenko and kindly provided by Dr. R. Miller from the *Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung, Golm, Germany*.

The next chapter contains all the information concerning the experimental systems employed along the research work. In this sense, the materials and the experimental techniques are described separately. On one hand, the protein used in this study is a very commonly used in the stabilisation of dairy products: whole casein from bovine milk. This protein is composed of many fractions and one of the purified fractions was also chosen in this study: β -casein. This is a model protein that enables the application of the theoretical treatment. The oil phase chosen for the measurements performed at liquid-liquid interfaces and its relationship to emulsion stability is n-tetradecane. Finally, the study regarding the mixed systems was made by evaluating the properties of another very common surfactant in the food industry: tween 20. This is a soluble, non-ionic surfactant, whose properties on its own have been widely studied in the literature. On the other hand, due to the number of different phenomena considered, several experimental techniques have been utilized in this research work. Let us just enumerate them: The interfacial characterisation, including monolayers and adsorption behaviour, has been made by means of a Pendant Drop Film Balance, especially designed in the *University of Granada (Spain)* and described in detail elsewhere [Cabrerizo-Vilchez, 1999]. The dilatational rheology experiments were performed in the *Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung, Golm, (Germany)* by means of a PAT1, Drop

Profile Tensiometer (Sinterface Technologies, Germany) [Sinterface]. The characterisation of the thin liquid films, and the stability of foams formed by proteins and surfactants were both performed in the *Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris XI (France)*. The former was accomplished by means of a Thin Film Balance, fully described in [Bergeron, 1992] while the latter was done by evaluating the volume of foam in time. Finally, the experiments regarding the emulsion stability have been performed in the *University of Granada (Spain)* using a Turbiscan Classic MA2000®.

With regard to the exposition of the results obtained in this research work, they have been organized in two main sections. The first is dedicated to a complete characterisation of β -casein at the liquid-fluid interface. In this sense, the monolayer behaviour, the adsorption process and the dilatational behaviour is thoroughly analysed both, experimentally and theoretically at the air-water and the oil-water interfaces. In the final part of this section, the results obtained in this manner for the protein adsorbed layer at these two interfaces are related to the formation and stability of the protein foams and emulsions. The second chapter is devoted to the interfacial behaviour of mixed systems composed by proteins and non-ionic surfactant. Two mixed systems are analysed in this chapter β -casein/tween and whole casein/tween 20. On one hand, the adsorption behaviour of β -casein/tween 20 is studied theoretically and experimentally at the air-water interface. The conclusions arising from such analysis enable the comprehension of the behaviour of the foam formed by the mixed system. On the other hand, the adsorption behaviour, the drainage of thin liquid films and the foam stability of the system formed by whole casein/tween 20 is fully described. Let us evaluate in more detail each of the chapters separately.

7.2 INTERFACIAL BEHAVIOUR OF PROTEINS AT LIQUID-FLUIDS INTERFACES, IN FOAMS AND IN EMULSIONS.

As indicated above, this first part of the thesis contains a full characterisation of the interfacial properties of β -casein layers adsorbed at two different fluid interfaces. Many of these results are described in detail in several publications that are listed below, however a brief explanation of the main features will be given at this point. Let us analyse separately the main conclusions attained.

First of all, a detailed comparative study of the interfacial behaviour of β -casein monolayers at the air-water and the tetradecane-water interface is performed. Concretely, the analysis of the π - A isotherms suggests important differences in the interfacial structure adopted by the protein at each interface. These differences are explained in terms of several factors acting altogether; a cohesive interaction between the hydrophobic segments and the non-polar phase, the improved solvation of these parts in the liquid phase and a further unfolded state attained by the protein at the tetradecane-water interface. Furthermore, the theoretical analysis performed to the experimental curves indicates that the interfacial layers formed by β -casein at the two interfaces undergo two analogue different regimes, respectively. The scaling arguments provide a detailed picture of the processes undertaken by the protein at both interfaces which is completely consistent with the experimental findings. In addition, the model is subsequently applied to literature data of β -casein monolayers at different oil interfaces that seemed to be not in agreement with those presented in this research work. As a result, these discrepancies are theoretically elucidated in terms of the nature of the oil in which the interfacial tension appears as a key factor. Moreover, a relationship between the interfacial tension of each of the liquid and the interfacial structure of the protein is directly observed.

Namely, the degree of interfacial unfolding attained by the protein increases with the interfacial tension.

Secondly, the adsorption behaviour of β -casein at the same two interfaces is thoroughly analysed, by means of the application of the thermodynamic model developed by Fainerman et al. to the experimental results. In this sense, a procedure of analysis of protein adsorption isotherms at liquid interfaces is proposed in terms of the surface pressure isotherms (π - c curves). Comparison of the experimental data for β -casein adsorption at the air-water and the tetradecane-water interfaces suggest that the nature of the interface significantly affects the adsorption process. In particular, a further penetration of the adsorbing protein into the oil phase can be assumed at higher bulk concentrations, and a further unfolded configuration at the tetradecane-water interface as compared to that at the air-water interface. These findings correlate with the results obtained in the monolayer behaviour of the same system above. However, this analysis of the experimental isotherms does not provide quantitative information on this feature. The theoretical fitting of the data provides a change in the interfacial area parameters at both interfaces that completely corroborates the experimental findings as well as the monolayer behaviour. Furthermore, by means of this procedure, the protein unfolding extent is quantified at both interfaces. In addition, the effect of the nature of the interface on the protein unfolding process was also evaluated. As was done above with the monolayer behaviour, the cited theory is applied to Graham and Phillips results for β -casein at the toluene-water interface. As a result, a relationship between the interfacial tension and the interfacial unfolding, which corroborates that found by the monolayer technique is obtained and similarly, the procedure enables the clarification of the apparent

discrepancies found on the adsorption of β -casein at different liquid interfaces.

Subsequently, a similar procedure is used in the fitting of the dynamic adsorption curves obtained for each protein concentration. The parameters in this fitting are essentially those from the equilibrium isotherm except for the maximum partial molar area of the protein. In this manner, the theory not only corroborates a well known model of protein adsorption in which the interfacial reorganisation process depends on the interfacial coverage, but it also quantifies this process. As a final point, a relation between the degree of interfacial unfolding attained by the protein and the bulk concentration is derived.

To finish with the interfacial characterisation of β -casein at these two fluid interfaces, the dilatational behaviour is very acutely analysed both experimentally and theoretically. The presence of a non-polar phase has an important effect on the rheological properties of β -casein adsorption layers, and the two dilatational parameters are discussed separately.

On one hand, the interfacial elasticity of the protein layer at the air-water interface appears particularly dependent on the oscillating frequency. Let us only comment the findings relating the interfacial elasticity obtained at the highest frequencies, displayed in Figure 7.2. It can be seen how the maximum is displaced to higher interfacial pressures at the tetradecane-water interface. Hence, at low interfacial coverage, the lower elasticity values obtained at the tetradecane-water interface suggest a further unfolded state attained by the protein due to the higher cohesive interaction between oil and molecules. As the interfacial coverage increases, this interaction results in a higher amount of protein adsorbed and a certain resistivity of the layer to collapse. The shift of the maxima to higher interfacial pressures at the

tetradecane interface with respect to that at the air-water interface strongly supports this interpretation.

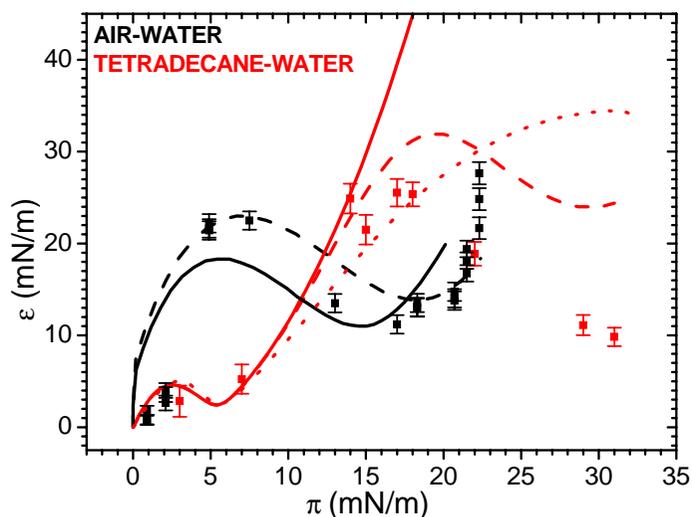


Figure 7.2. Experimental interfacial elasticity values at 0.1-0.2 Hz for β -casein at the air-water (black) and tetradecane-water (red) interfaces. Theoretical curves corresponding to the monolayer model (solid lines), the bilayer adsorption (dashed lines) and the compressibility in the state with minimal area (dotted line).

On the other hand, the viscous behaviour of the interfacial layer is mainly present at low oscillating frequencies (not shown). In particular, it shows a very steep increase at sufficiently high interfacial coverage for the two interfaces studied. The onset of the viscous behaviour in the interfacial layer indicates the presence of relaxation phenomena. Accordingly, the relaxation detected at both interfaces is probably caused by the exchange of interfacial molecules between successive interfacial layers but appears lower at the tetradecane-water interface probably due to the higher affinity of the protein to the nonpolar phase. Differently, at low interfacial coverage, the viscous

behaviour is more noticeable at the tetradecane-water interface. The relaxation phenomena detected in this case are clearly related to reorganisation of the protein within the interfacial layer. The higher values obtained for the tetradecane-water interface completely match the higher interaction between molecules and the non-polar interface and the further unfolded state attained by the protein upon contact with oil reported before.

Briefly, the dilatational deformation detects an intrinsically softer film formed at low interfacial coverage at the oil interface as compared to that at the air-water interface. Conversely, as the interfacial coverage increases, the resulting film appears more resistant (elastic) at the oil interface than that at the air-water interface. However, the concrete mechanisms happening at the interface remain somehow unclear with a too simplified interpretation of the experimental curves. Moreover, the observed features cannot be clarified by the application of the theoretical model to the adsorption data only. Therefore, a consequent application of theoretical models to adsorption isotherms combined with elasticity data provides a remarkable improvement in the interpretation of the experimental findings. The former provides a quantification of the interfacial unfolding undertaken by the protein at each of the interfaces. The latter offers an accessible test of the incidence of an interfacial relaxation mechanism in the adsorption layer. To be precise, the formation of a second protein layer arises as the predominant mechanism occurring upon collapse of the protein layer as can be observed in Figure 7.2. Certainly, this procedure enables the extraction of important information hidden in the experimental elasticity and constitutes a promising tool in the understanding of the interfacial behaviour of proteins.

The final part of this section contains a small study of the formation and stability of the foams formed by β -casein and the emulsions made with tetradecane in aqueous solution of β -casein. In these, the interfacial coverage of bubbles and drops was kept in the same order of magnitude as the dilatational experiments so that the phenomena could be related.

Concerning the properties of the foam, the steep increase seen in the viscous behaviour is completely reproduced in a steep increase in the foam capacity of β -casein within the same range of concentration. Likewise, the stability of the foam increases in a completely analogue manner as does the elasticity of the surface layer shown in Figure 7.2, being more stable as the interfacial coverage of the bubbles increases. As regards the properties of the emulsions, the size of the oil drops increased as the content of oil increased in the emulsion. However, the creaming velocity was higher for the emulsion formed with less amount of oil; higher interfacial coverage. This behaviour can be understood in terms of the interfacial elasticity of the adsorbed layer of β -casein shown in Figure 7.2. In this figure, it can be appreciated that this magnitude diminishes with the interfacial coverage within this range of concentration at the tetradecane-water interface.

The interrelation between the interfacial properties of proteins and its foaming/emulsifying capacity or the stability of the foam/emulsion formed is one of the main challenges of the actual food technology. Therefore, this final remark linking the dilatational properties of the adsorbed layers to the stability of foams and emulsions formed by the same system appears a main novelty with very promising results. Another remarkable aspect of this work lies in the fact that, to our knowledge, it is the first application of a theoretical model to equilibrium adsorption, dynamic adsorption and

Gibbs limiting elasticity of protein layers at liquid interfaces. In consequence, the treatment given in this work to the experimental data offers many possibilities in the clarification of the adsorption of proteins onto liquid interfaces. Considering relatively simple experiments, the application of the model in the proposed manner provides quantitative information of the structure adopted by the protein at the interface, as well as on the interaction with the non-polar phase.

7.3 SURFACE BEHAVIOUR, THIN LIQUID FILMS AND FOAM STABILITY OF MIXED PROTEIN/SURFACTANT SYSTEMS.

In real food systems proteins, surfactants, lipids and emulsifiers coexist and due to their amphiphilic nature compete for the available interfacial area. The competition between very different molecules results in a very complex behaviour of the mixed interfaces. Proteins form viscoelastic structures that stabilize dispersions owing to a strong and immobile interfacial network. Conversely, low molecular weight surfactants form mobile interfacial structures that stabilize the resulting dispersion due to the Gibbs-Marangoni mechanism [Mackie, 2005]. Once these two kinds of molecules coexist at the interfaces, the two mechanisms also compete and it could happen that none of them can operate correctly. Therefore, the understanding of the interactions between components and the structure of the mixed interfacial layers play a key role in the correct elaboration of food dispersions. This section is dedicated to the analysis of the surface layers of two mixed systems. The main conclusions obtained are briefly summarised.

The adsorption behaviour of the mixed system formed by β -casein/tween 20 is easily interpreted in terms of a displacement of the

surface protein by the low molecular weight surfactant, previously reported in the literature for other model systems. In this sense, the adsorption isotherm completely matches that of β -casein at the air-water interface whereas coincides with that of the tween 20. Moreover, the critical micelle concentration (cmc) of the surfactant does not seem to be affected by the presence of the protein in the bulk solution. These features strongly account to a lack of interaction between β -casein and tween 20. The application of the theoretical model importantly verifies and quantifies this feature. Namely, the interaction parameter accounts for the lack of interaction and the theoretical predictions show how degree of surface coverage of the protein diminishes while that of the surfactant increases. According to these predictions, once the surfactant concentration is high enough, no protein remains at the surface. These results are completely in agreement with the behaviour reported for the foam of the mixed system. Figure 7.3 shows the evolution of the half-life of the foam with increasing surfactant concentration. The half-life of the foam is defined as the time in which the foam reduces its total volume to the half. Regarding the tween 20, it can be seen how the half time of the foam increases with the concentration within the range considered. Conversely, the foam formed by the mixture of β -casein/tween 20 shows a very stable behaviour in the absence of surfactant whereas decisively approaches the behaviour of the tween 20 as its concentration in the mixture increases. Hence, the behaviour inferred from the surface pressure isotherms is completely reproduced in the behaviour of the foam.

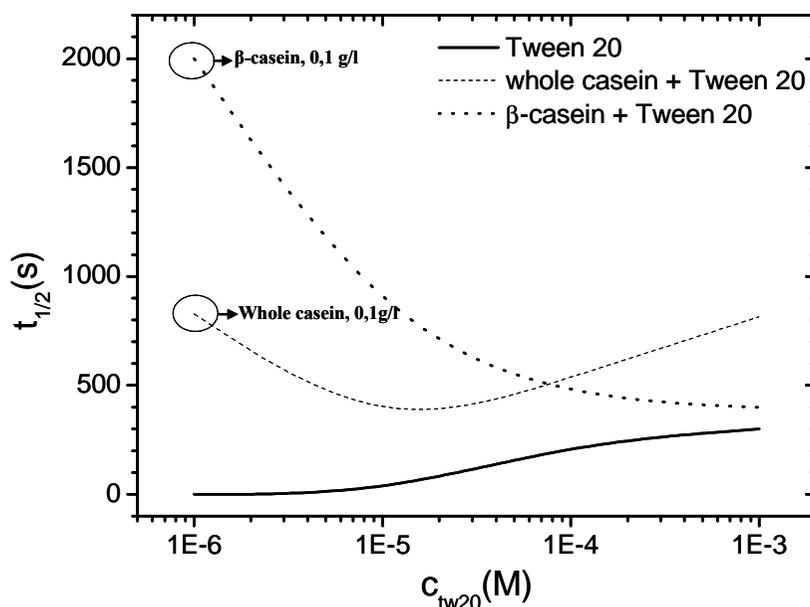


Figure 7.3: Evolution of the half life of the foam of tween 20 and that of the mixtures with β -casein and whole casein.

The final part of the thesis relates to the mixed behaviour of a system composed by whole casein and tween 20. A complex behaviour of this mixture is directly deduced from the surface pressure isotherm obtained for the mixed system. Concretely, the isotherm is displaced to smaller surfactant concentrations and a critical aggregation concentration appears in the isotherm. This feature strongly suggests the formation of a mixed surface layer, that might be an indication of the different interaction occurring between the surfactant and the different fractions that compose the protein. Due to the inhomogeneous nature of whole casein, the application of the theoretical model is clearly discouraged. Therefore, in order to further understand the encountered behaviour, the properties of the thin liquid films formed by the same systems are evaluated. These experiments

provide valuable structural information of the surface layers. As regards the whole casein, the thin films appear substantially thinner than those reported in the literature for β -casein. This feature perfectly correlates with the significantly higher half-life encountered for the foam formed by β -casein as compared to that of whole casein displayed in Figure 7.3. Concerning the behaviour of the mixed system, the equilibrium thickness, and the resulting stability of the film is importantly diminished for concentrations lower, but of the same order of magnitude than the cmc of the surfactant. Conversely, as the concentration of surfactant in the mixture increases, the film thickness and stability appears higher than that found for the sole surfactant at concentrations higher than the cmc. This behaviour is completely reproduced in the stability of the foam formed by the mixed system. Figure 7.3 shows how the half-life of the mixed foam shows a minimum, located precisely at a concentration lower, but of the same order of magnitude than the cmc of the surfactant. This behaviour is discussed in detail taking into account also results from the literature. From this, an explanation to the phenomena is finally proposed. The β -casein is a flexible protein that forms relatively fragile surface layers, which could be easily displaced from the surface by tween 20. Conversely, another two fractions of the whole casein, namely α_2 -casein and κ -casein has cystein molecules in its structure that enables them to form disulfide bridges upon surface denaturation. These surface structures might resist the presence of the surfactant and provide a mixed surface film according to the experimental results previously described.

This global correspondence found between several experimental and theoretical techniques that extend on various length scales is completely original. Furthermore, it involves a full

characterisation of such a complex phenomenon as foam from various points of view and might present direct technological applications.

To end up with, it should be noted that important part of this work was performed during short stays in two well known research centres in Europe under the direction of two major scientists. Dr. Reinhard Miller, was in charge of the stay performed in the *Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung (Golm, Germany)* whereas Dr. Dominique Langevin was in charge of the stay performed in the *Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris XI (Paris, France)*. The work performed all through the PhD has brought several publications about, which are listed below. The majority of them are directly related to the topic of the PhD, but also some are the result of parallel collaborations.

Comparative study of adsorbed and spread β -casein monolayers at the air-water interface with the pendant drop technique. Maldonado-Valderrama, J.; Wege, H. A.; Rodríguez-Valverde, M. A.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Langmuir*, **2003**, *19*, 8436-8442.

Adsorbed and spread β -casein monolayers at oil-water interfaces. Maldonado-Valderrama, J.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Langmuir*, **2004**, *20*, 6093-6095.

β -casein adsorption at liquid-fluid interfaces: Theory and Experiment Maldonado-Valderrama, J.; Martín-Molina, A.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *J. Phys. Chem: B*, **2004**, *108*, 12940-12945.

Dynamics of protein adsorption at the oil-water interface: comparison with a theoretical model. Maldonado-Valderrama, J.; Fainerman, V. B.; Aksenenko, E.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Miller, R. *Colloids Surfaces A*, **2005**, *261*, 85-92

Experimental Studies on the Desorption of Adsorbed Proteins from Liquid Interfaces. Miller, R.; Grigoriev, D.O.; Krägel, J.; Makievski, A.V.; Maldonado-Valderrama, J.; Leser, M.; Michel, M.; Fainerman, V. B. *Food Hydrocolloids*, **2005**, *19*, 479-783.

A scaling analysis of β -casein monolayers at liquid-fluid interfaces. Maldonado-Valderrama, J.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Colloids Surfaces A*, **2005**, *270/271*, 323-328.

Dilatational Rheology of β -casein adsorption layers at liquid-fluid interfaces Maldonado-Valderrama, J.; Fainerman, V. B; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Miller, R. *J. Phys Chem. B* **2005**; *109*, 17608-17616.

Surface Characterization of Human Serum Albumin and Sodium Perfluorooctanoate Mixed Solutions by Pendant Drop Tensiometry and Circular Dichroism. Messina, P.; Prieto, G.; Doderó, V.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Maldonado-Valderrama, J.; Ruso, J. M.; Sarmiento, F. Accepted in *Biopolymers*

Structural, electrokinetic and interfacial characterisation of soy protein isolate. Santiago, L. G.; Maldonado-Valderrama, J.; Martín-Molina, A.; Haro-Pérez, C; García-Martínez, J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Gálvez-Ruiz, M. J. *Submitted to Biomacromolecules.*

Apéndice I.

TEORÍA DE ESCALADO DE POLÍMEROS

La filosofía de la teoría de escalado en el estudio de cadenas de polímeros en disolución consiste en tratar al sistema desde un punto de vista global, estudiando la dependencia de propiedades macroscópicas con la longitud de la cadena, su concentración o con una serie de parámetros de interacción. En este tipo de estudios (experimentales y teóricos) se pretende deducir una serie de propiedades físicas que pueden considerarse universales, puesto que son aplicables al comportamiento de la mayoría de polímeros en disolución y que, se agrupan bajo el término de leyes de escalado [De Gennes, 1979].

Cuando una macromolécula polimérica se disuelve en un exceso de disolvente es posible despreciar las interacciones intermoleculares; sin embargo, los múltiples grados de libertad de la cadena permiten un elevado número de conformaciones. En la literatura aparecen tres situaciones límite:

- a) *Estado compacto*. En esta situación se encuentran minimizados los contactos con el disolvente. Un ejemplo de estos polímeros son las proteínas globulares en su estado nativo. La ley de escalado se expresa en términos del radio de giro R_G y de la masa molecular M :

$$R_G \propto M^{0.33} \quad (\text{I.1})$$

- b) *Configuración lineal*. Debido a la formación de estructuras helicoidales tipo ADN, ciertos polímeros pueden adoptar esta conformación en la que el escalado sigue la ley

$$R_G \propto M \quad (\text{I.2})$$

- c) *Ovillo estadístico*. La mayoría de los polímeros y proteínas desnaturalizadas se encuentran incluidas en esta categoría. En

esta situación el exponente de escalado varía entre 0.33 y 1, es decir entre las dos situaciones anteriores.

Desde el punto de vista del escalado es indiferente utilizar el radio de giro o la distancia entre los extremos (esta última lógicamente mayor), frente a la masa molecular o número de monómeros.

Desde el punto de vista teórico se han tratado de justificar las relaciones anteriores. El modelo más simple, y a la vez más intuitivo, consiste en aplicar al polímero la estadística random walk (paseo al azar) de forma que, la conformación del polímero se construye partiendo de un extremo en un origen arbitrario y colocando el siguiente átomo a una distancia a , de tal manera que todas las orientaciones son igualmente probables [Orr, 1947]. En este modelo la entropía asociada con las posibles conformaciones de una cadena, cuyo origen se encuentre en $\mathbf{r} = 0$ y su otro extremo se encuentra en \mathbf{r} , está relacionado con el número de distintos caminos $\mathfrak{R}(r)$ para alcanzar \mathbf{r} desde 0 en N pasos (que corresponderían a los N enlaces entre los $N+1$ monómeros).

El número total de conformaciones resulta ser:

$$\mathfrak{R}_N = z^N \quad (\text{I.3})$$

siendo z el número de coordinación de la red.

Es fácilmente deducible que para este modelo la distancia cuadrática media entre los extremos de la cadena es proporcional a Na^2 y que la función de distribución en \mathbf{r} resulta ser gaussiana. Este tipo de cadena o molécula polimérica, en la que no se han considerado las interacciones entre los monómeros, se denomina ideal.

El siguiente paso para considerar una molécula de una forma más realista, es tener en cuenta las interacciones entre monómeros que se encuentran en posiciones cercanas en la secuencia de la cadena

polimérica (por ejemplo, la interacción del monómero i con los $i + 1$, $i + 2$, $i + p$, siendo p un número fijo y finito). La descripción teórica implica una correlación entre los monómeros cercanos, y es posible demostrar que la distribución que se obtiene es gaussiana, con idéntica distancia cuadrática media entre los extremos que en el caso anterior. Por lo tanto, esta consideración de interacciones entre monómeros vecinos conduce también a una cadena ideal, siempre que el número de monómeros sea suficientemente elevado.

Un nuevo incremento de la complejidad consiste en eliminar las posibles intersecciones de la cadena consigo misma. En la bibliografía este aspecto se denomina efecto del volumen excluido y requiere la utilización de métodos numéricos nada triviales y se obtienen las siguientes principales características de la cadena:

- El número total de conformaciones resulta ser

$$\mathfrak{R}_N = cte \bar{z}^N N^{\gamma-1} \quad (\text{I.4})$$

el valor de \bar{z} es inferior al número de coordinación z que aparecía en el modelo de cadena lineal. En contraste con el parámetro anterior, que depende del tipo de red elegida en el modelo, el exponente γ se considera universal al depender sólo de la dimensionalidad, así, por ejemplo en dos dimensiones $\gamma = \gamma_2 = 7/6$ y en tres $\gamma = \gamma_3 = 4/3$.

- El radio de la macromolécula, denominado radio de Flory, se escala ahora de tal manera que

$$R_G \approx a N^\nu \quad (\text{I.5})$$

donde ν es otro exponente universal ($\nu_3 = 3/5$, $\nu_2 = 3/4$, $\nu_1 = 1$).

Las previsiones de este modelo concuerdan bastante bien con los resultados experimentales obtenidos cuando los polímeros se

disuelven en ciertas condiciones (una de las más importantes es la temperatura) de “buena solvencia” o “buen disolvente”, que a nivel molecular implican una interacción atractiva entre las moléculas del polímero y del disolvente.

La relación teórica que existe entre el exponente ν y la dimensión en la que se encuentra el polímero (d) en un buen disolvente es

$$\nu = \frac{3}{2+d} \quad (\text{I.6})$$

Esta relación fue obtenida por Flory [Flory, 1969] considerando la existencia de una energía de interacción repulsiva proporcional a la concentración de monómeros y al parámetro ν (denominado volumen excluido) y un término atractivo que corrige el efecto desfavorable que es provocado en el sistema, por disminuir la entropía, al aumentar la longitud.

En la notación utilizada por Flory este parámetro se expresa como

$$\nu = (1 - 2\chi) a^d \quad (\text{I.7})$$

donde a^d representa el volumen del monómero (en la dimensión d) y χ , el parámetro de interacción que tiene en cuenta las interacciones entre monómeros y monómero-disolvente, y que es inferior a 0,5 en un buen disolvente. Por lo tanto el parámetro ν es una medida del grado de compactación de la molécula del polímero.

Cuando las interacciones entre los monómeros y el disolvente no son favorables, se considera al disolvente un “mal disolvente” en el las interacciones predominantes son las monómero-monómero y la relación entre el exponente de escalado y la dimensionalidad viene dada por:

$$\nu = \frac{1}{d} \quad (\text{I.8})$$

En la transición entre ambas situaciones se define al disolvente θ como aquel en el que $\chi = 0.5$ y se cumple:

$$\nu = \frac{2}{d+1} \quad (\text{I.9})$$

Otro aspecto que resulta fundamental en las propiedades macroscópicas de las disoluciones de polímeros es su concentración. En función de esta, las interacciones intermoleculares juegan un papel muy importante. En los párrafos precedentes no se han considerado estas interacciones, es decir se han considerado propiedades de disoluciones en el régimen denominado diluido. En esa situación las propiedades macroscópicas de la disolución pueden considerarse como resultado de las contribuciones de las moléculas de polímero de manera independiente.

La mayoría de las disoluciones con interés práctico se encuentran en el denominado *régimen semi-diluido*, en el cual las moléculas comienzan a interactuar aunque el disolvente exceda en peso a la cantidad de polímero. En este régimen, numerosas investigaciones de polímeros en interfaces líquido-fluido han demostrado la existencia de dos leyes de escalado equivalentes:

Por un lado la relación que existe entre presión interfacial y área toma la forma [Leclerc, 1997; Aguié-Béghin, 1999]:

$$\pi \propto A^{-\gamma} \quad (\text{I.10})$$

También se ha demostrado la existencia de una relación de escalado entre el módulo de elasticidad de Gibbs ε y la presión interfacial [Aguié-Béghin, 1999]:

$$y = \frac{\varepsilon}{\pi} \quad (\text{I.11})$$

En ambos casos, existe una relación entre el parámetro y con el parámetro ν , según la dimensión d . Esta relación viene dada por:

$$y = \frac{d \nu}{d \nu - 1} \quad (\text{I.12})$$

Apéndice II

TÉCNICA AXISYMMETRIC DROP SHAPE ANALYSIS (ADSA)

II. 1 SUPERFICIE DE GIBBS

La descripción de sistemas físicos heterogéneos en los que existen dos fases en equilibrio deberá incluir las propiedades físicas del seno de cada fase así como los efectos de frontera entre fases o *interfaz*. Se define la interfaz como la estrecha región a través de la cual las propiedades varían de forma continua desde la fase condensada a la de vapor.

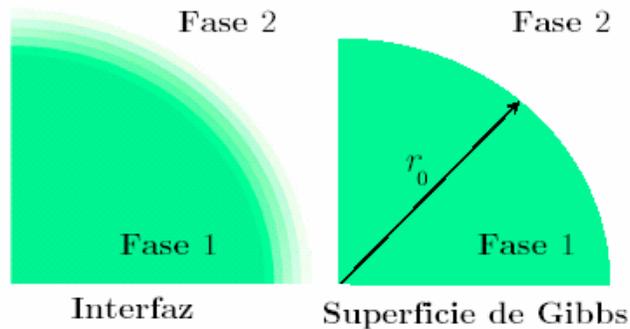


Figura I.1: Aplicación del modelo de superficie de Gibbs

[Rodríguez-Valverde 2002]

Una interfaz es una región tridimensional no uniforme entre dos fases. Con el fin de estudiar sus propiedades, uno de los enfoques más extendido es el de superficie de Gibbs. Se define la *superficie de Gibbs* o *superficie divisora* como aquella superficie de espesor nulo que guarda la misma forma que la interfaz y que se encuentra situada en una posición r_0 entre las fases (Figura II.1)

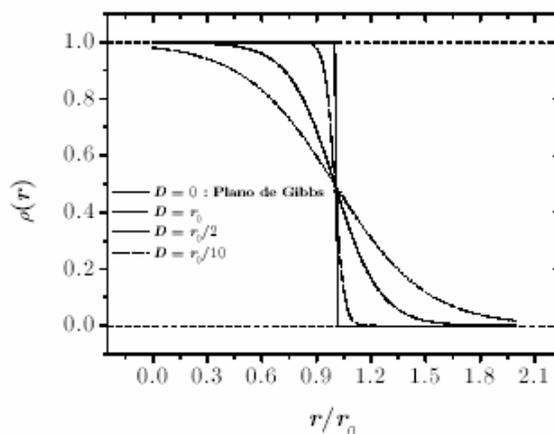


Figura II.2 Perfil de densidad [Rodríguez-Valverde 2002]

La densidad del sistema formado por una fase de densidad ρ_1 y otra de densidad ρ_2 vendrá dada por (Figura II.2):

$$\rho_{Gibbs}(r) = \rho_1 + (\rho_1 - \rho_2) U(r - r_0) \tag{II.1}$$

Donde U es la función escalón. La posición r_0 debe ser tal que la densidad superficial en la interfaz coincida con la correspondiente a la superficie de Gibbs:

$$\sigma = \sigma_{Gibbs} \Rightarrow \int_{-\infty}^{\infty} \rho(r) dr = \int_{-\infty}^{\infty} \rho_{Gibbs}(r) dr \tag{II.2}$$

Y a partir de la teoría del gradiente se deduce que un posible perfil de densidades a lo largo de una interfaz es de la forma:

$$\rho(r) = \rho_1 + \frac{1}{2}(\rho_2 - \rho_1) \left(1 - \tanh \left[\frac{2(r - r_0)}{D} \right] \right) \tag{II.3}$$

donde $D = \frac{\rho_1 - \rho_2}{(d\rho/dr)_{r=r_0}}$ y se observa cómo en el límite $D = 0$ el

comportamiento es idéntico a la superficie de Gibbs.

II.2. ECUACIÓN DE YOUNG-LAPLACE

La forma de una interfaz líquido-fluido (homogéneos e inmiscibles) viene determinada por la *ecuación de Young-Laplace* que relaciona diferencia de presión a lo largo de la interfaz con la tensión interfacial y con la geometría de la interfaz. Dicha ecuación tiene la forma:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (\text{II.4})$$

donde $\Delta P = P_1 - P_2$ es la diferencia de presión a largo de la interfaz, R_1 y R_2 son los radios de curvatura de la superficie definida por la interfaz y γ es la tensión interfacial. Los radios principales son el máximo y el mínimo del radio de curvatura normal, por lo que sus respectivas circunferencias osculadoras son ortogonales y se cumple que la presión en la cara cóncava es mayor que en la convexa, siempre y cuando exista una cierta curvatura en la interfaz.

La ecuación de Young-Laplace describe la forma de una interfaz cualquiera. Ahora bien, en la práctica, las interfaces están sometidas a un campo gravitatorio (terrestre) y pueden adoptar configuraciones que guardan simetrías muy ventajosas para un posterior análisis.

Según la hidrostática, la diferencia de presión en un campo gravitatorio varía con la altura (z) como:

$$\Delta P = \Delta P_0 \pm \Delta \rho g z \quad (\text{II.5})$$

donde ΔP_0 es la diferencia de presión entre el líquido y el fluido en un punto de referencia de la interfaz como podría ser el ápice, $\Delta \rho$ es la diferencia de densidad de las fases y g la aceleración local de la

gravidad. El signo +/- depende de la orientación de la interfaz ya que puede estar orientada con su parte cóncava en el sentido de la gravedad o viceversa.

En general los radios de curvatura varían de una posición a otra sobre la interfaz, sin embargo es muy común que líquidos en equilibrio posean simetría axial. Aplicando un formalismo de superficies de revolución a los radios principales y sustituyendo la ecuación (II.5) en la ecuación de Young-Laplace se obtiene:

$$\frac{1}{\left[1 + \left(\frac{dz}{dr}\right)^2\right]^{\frac{3}{2}}} \frac{d^2 z}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{dz}{dr}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}} \frac{dz}{dr} = \frac{\Delta P_0}{\gamma} \pm \frac{\Delta \rho g}{\gamma} z \quad (\text{II.6})$$

La ecuación (II.6) es una ecuación diferencial de segundo orden, no lineal, sin solución analítica salvo ciertos casos.

En este trabajo se hace uso de interfaces laplacianas de revolución, sometidas a un campo gravitatorio, que únicamente necesiten una condición de contorno para encerrar un volumen dado (una superficie plana o un capilar cilíndrico). Dentro de estas existen dos configuraciones principales con sus dos configuraciones complementarias:

- Gota *pendiente* (signo -) en aire o en un líquido menos denso que el líquido de la gota. La configuración complementaria es una burbuja de aire o gota *pendiente invertida* inmersa en un líquido más denso que el líquido de la gota (signo +).
- Gota *sésil* (signo +) sobre una superficie sólida o líquida inmiscible en aire o inmersa en un líquido menos denso que el líquido de la gota. La configuración complementaria es una burbuja de aire o gota *cautiva* contra una superficie sólida

inmersas en un líquido más denso que el líquido de la gota (signo +).

Para mayor detalle acerca del tratamiento matemático se puede consultar la referencia [Rodríguez-Valverde 2002]

Soluciones laplacianas

Dada la complejidad de la ecuación (II.6), ésta se puede transformar en un sistema de ecuaciones más simples. Parametrizando el perfil o curva generatriz de la superficie mediante la longitud de arco s , medida desde el ápice, y utilizando el ángulo Φ que forma la tangente a la curva en un punto (r, z) respecto de la tangente en el ápice, se tiene que:

$$\frac{dr}{ds} = \cos \Phi, \quad \frac{dz}{ds} = \text{sen} \Phi \quad (\text{II.7})$$

Los radios de curvatura principales se reducen a [Rodríguez-Valverde, 2002]:

$$\frac{1}{R_1} = \frac{d\Phi}{ds}, \quad \frac{1}{R_2} = \frac{\text{sen} \Phi}{s} \quad (\text{II.8})$$

Con lo cual la ecuación II.6, queda como:

$$\frac{d\Phi}{ds} = \frac{\Delta P_0}{\gamma} \pm \frac{\Delta \rho g}{\gamma} z - \frac{\text{sen} \Phi}{r} \quad (\text{II.9})$$

Así, el sistema de ecuaciones diferenciales simultáneas de primer orden cumple las condiciones iniciales: $r(o) = z(o) = \Phi(o)$.

Definiendo los siguientes parámetros adimensionales:

$$R \equiv \frac{r}{r_0}, \quad Z \equiv \frac{z}{r_0}, \quad S \equiv \frac{s}{r_0} \quad (\text{II.10})$$

donde r_0 es el radio en el ápice, que es el único vértice de aquellas interfaces laplacianas cuya curva generatriz corta el eje de revolución (gotas y burbujas), y dado que en el ápice las curvaturas coinciden, se tiene que:

$$\frac{1}{r_0} = \frac{\Delta P_0}{2\gamma} \quad (\text{II.11})$$

Con las definiciones dadas se puede describir el sistema de ecuaciones como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR}{dS} = \cos \Phi \\ \frac{dZ}{dS} = \text{sen} \Phi \\ \frac{d\Phi}{dS} = 2 \pm \frac{\Delta \rho g r_0^2}{\gamma} Z - \frac{\text{sen} \Phi}{R} \end{array} \right. \quad (\text{II.12})$$

Dos magnitudes importantes en la descripción de sistemas interfaciales son la *longitud de capilaridad* λ y el *factor de forma* β :

$$l_0 \equiv \sqrt{\frac{\gamma}{|\Delta \rho| g}}; \beta \equiv \pm \frac{\Delta \rho g r_0^2}{\gamma} = \pm \frac{\Delta \rho}{|\Delta \rho|} \left(\frac{r_0}{l_0} \right)^2 \quad (\text{II.13})$$

El factor de forma es un parámetro característico de cada interfaz y es positivo para el caso de gota sésil y burbuja cautiva y negativo para la gota pendiente y burbuja “pendiente invertida”.

La ecuación de Young-Laplace se resuelve conociendo los parámetros intrínsecos del perfil: l_0 y r_0 , así como una condición de contorno que dé idea del tamaño de la interfaz a generar y de la altura de la gota real o bien de su volumen V_0 o bien de su área interfacial:

$$V_0 = \int_0^h \pi r^2 dz, \quad A_0 = \int_0^h 2\pi r \sqrt{1 + \left(\frac{dr}{dz}\right)^2} dz \quad (\text{II.14})$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones II.12., normalmente mediante el método de Runge-Kutta, se obtiene finalmente la forma teórica de una interfaz axisimétrica laplaciana.

II.3 A.D.S.A.

Axisymmetric drop shape analysis (ADSA) es una técnica orientada a la medida de la tensión interfacial, ángulo de contacto, área interfacial y volumen que encierra una interfaz a partir de la geometría de una gota o burbuja con simetría axial, bien en forma de perfil (ADSA-P) o de máximo contorno radial (ADSA-D). Se basa en la minimización de una función que dependerá de datos geométricos experimentales, de la correspondiente solución laplaciana y de las variables físicas. Dado que el fundamento de esta metodología se basa en la forma geométrica de una interfaz, lo idóneo es tomar imágenes y extraer de estas el correspondiente perfil o contorno. Actualmente, la técnica de digitalización es automática a través de un apropiado hardware y programas informáticos desarrollados para tal fin que tratan y analizan las imágenes. El desarrollo que se ha producido en los últimos años en el campo de análisis de imágenes de video así como de cálculo numérico hacen que la medida de tensión superficial y ángulo de contacto con esta técnica produzca resultados con una precisión muy por encima de los métodos convencionales.

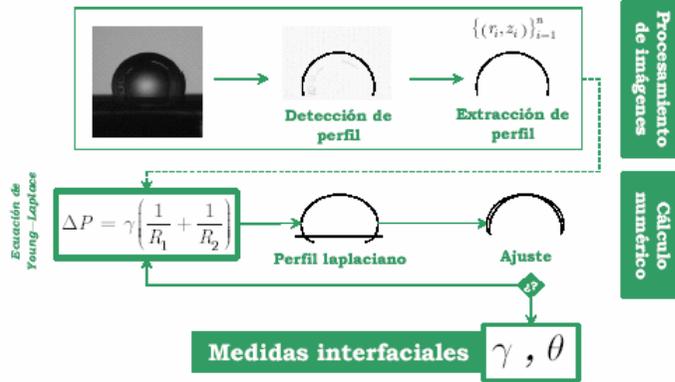


Fig II.3: Fundamento de ADSA-P. [Rodríguez-Valverde 2002]

El método ADSA consiste básicamente en hallar el perfil teórico (r_0, l_0) cuyos parámetros coinciden con los medidos o conocidos $(r_{máx}, V_0, r_{máx}...)$ (Figura II.3). Una vez aplicado el calibrado al perfil experimental de la gota detectado, se obtienen las coordenadas físicas del mismo. A continuación, se superponen las mitades para obtener la curva generatriz, que será la que guarde toda la información de la interfaz a la vez que sirve como comprobación de la hipótesis de simetría axial. Los puntos se desplazan hasta hacer coincidir el ápice con el origen de coordenadas y con el eje z dirigido hacia el interior de la gota/burbuja, quedando finalmente el conjunto de puntos experimentales $\{(r_i, z_i)\}_{i=1}^n$ sobre los que se aplicará el proceso de optimización, por mínimos cuadrados, que tratará de ajustarlos al meridiano laplaciano (discretizado) según la fórmula:

$$\left\{ \left(r_0 R_{teo} \left[S_j, \frac{r_0^2}{l_0^2} \right], r_0 Z_{teo} \left[S_j, \frac{r_0^2}{l_0^2} \right] \right) \right\}_{j=1}^{m>n} \quad (II.15)$$

dicho meridiano, se asocia a los valores l_0 y r_0 propuestos, y con una longitud $S_{máx}$ estimada a partir de del perímetro experimental $s_{máx}$. Dicho proceso se subdivide en dos; el primero de ellos se encarga

de encontrar el punto teórico más cercano a un punto i -ésimo experimental, esto es, minimizar la distancia con respecto a S_j :

$$d_{ij}^{(1)}(r_o, l_o; S_j) \equiv \frac{1}{2} \left(r_o R_{teo} \left[S_j, \frac{r_o^2}{l_o^2} \right] - r_i \right)^2 + \left(r_o Z_{teo} \left[S_j, \frac{r_o^2}{l_o^2} \right] - z_i \right)^2 \quad (\text{II.16})$$

$$\min d_{ij}^{(1)}(r_o, l_o; S_j) = d_{ik}^{(1)}(r_o, l_o; S_k) \quad (\text{II.17})$$

El segundo paso para completar el proceso de optimización se encarga de minimizar la suma de los cuadrados de las distancias entre puntos próximos, $d_i^{(2)}$, con respecto a r_o y l_o :

$$d_i^{(2)}(r_o, l_o) \equiv d_{ik}^{(1)}(r_o, l_o; S_k) \quad (\text{II.18})$$

$$\min_{r_o, l_o} \sum_{i=1}^n d_i^{(2)}(r_o, l_o) \quad (\text{II.19})$$

Toda iteración requiere unos apropiados valores iniciales que en este caso podrían ser los correspondientes a la situación física de $l_o^{(0)} \rightarrow \infty$, es decir, la ausencia de gravedad, donde la gota sería esférica.

Los parámetros geométricos iniciales se estiman a partir del ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales, antes de superponer las mitades, a una elipse genérica:

$$\frac{(r_{elip} - x_c)^2}{a^2} + \frac{(z_{elip} - y_c)^2}{b^2} = 1 \Rightarrow \begin{cases} r_{ap}^{(0)} = x_c \\ z_{ap}^{(0)} = y_c - b \\ r_o^{(0)} = \frac{a^2}{b} \end{cases} \quad (\text{II.20})$$

con idea de hacer extensible este método a gotas voluminosas (elipsoidales). La técnica ADSA-P consiste en determinar la curva laplaciana que mejor se ajuste al perfil experimental y, a partir de ésta, hallar los parámetros puramente geométricos como área, volumen,

ángulo de contacto, altura, radio ecuatorial, etc..., y las magnitudes físicas como la tensión superficial/interfacial

La técnica ADSA-P se puede encontrar descrita con mayor detalle en cualesquiera de las siguientes referencias [del Río, 1997; Holgado-Terriza, 2002; Rodríguez-Valverde 2002].

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

[Aguié-Béghin, 1999] Aguié-Béghin, V.; Leclerc, E.; Daoud, M.; Douillard, R. *J. Colloid Interface Sci*, **1999**, *214*, 143-155.

[Ahluwalia, 1991] Ahluwalia, A.; De Rossi, D.; Monici, M.; Schirone, A. *Biosens. Bioelectron.*, **1991**, *6*, 33-

[Ahluwalia, 1992] Ahluwalia, A.; Ristori, C.; Schirone, A.; Serra, G. *Biosens. Bioelectron.*, **1992**, *7*, 183-

[Anderson, 2000] Anderson, R.; Pande, V. S.; Radke, C. *J. Chem. Phys.*, **2000**, *112*, 9167-9185.

[Bantchev, 2004] Bantchev, G. B.; Schwartz, D. K. *Langmuir*, 2004, *20*, 11692-11697.

[Benjamins, 1996] Benjamins, J.; Cagna, A.; Lucassen-Reynders, E. H. *Colloids Surf. A*, **1996**, *114*, 245-254.

[Benjamins, 1998] Benjamins, J.; Lucassen-Reynders, E. H. In *Proteins at liquid interfaces*. Eds: Möbius, D.; Miller, R. Elsevier Science, Amsterdam, **1998**.

[Benjamins, 2000] Benjamins, J. *Tesis Doctoral*. Universidad de Wageningen, Holanda, **2000**.

[Bergeron, 1992] Bergeron, V.; Radke, C. *Langmuir*, **1992**, *8*, 3020-3026.

[Bergeron, 1999] Bergeron, V. *J. Phys.: Condens. Matter*, **1999**, *11*, R215-R238.

[Beverung, 1999] Beverung C.J., Radke C.J., Blanch H.W. *Biophys. Chem.*, **1999**, *81*, 59-80.

- [Bhattacharyya, 2000] Bhattacharyya, A.; Monroy, F.; Langevin, D.; Argillier, J. F. *Langmuir*, **2000**, *16*, 8727-8732.
- [Birdi, 1997] Birdi, K. S. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry* (Cap 4). CRC Press, Boca Ratón, **1997**.
- [Bos, 2003] Bos, M. A.; Dunnewind, B. Van Vliet, T. *Colloids Surfaces B*. **2003**, *31*, 95-105.
- [Cabrerizo-Vílchez, 1998] Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. Número: P9801626, prioridad: 7/30/1998.
- [Cabrerizo-Vilchez, 1999] Cabrerizo-Vilchez, M. A.; Wege, H. A.; Holgado-Terriza, J. A.; Neumann, A. W. *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 2438-2444.
- [Callen, 1985] Callen, H. B. *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*, Wiley, Nueva York, **1985**.
- [Carrera-Sánchez, 2005] Carrera-Sánchez, C.; Rodríguez-Patino, J. M. *Food Hydrocolloids*, **2005**, *19*, 407-416.
- [Casçao-Pereira, 2003] Casçao-Pereira, L. G.; Johanson, C.; Radke, C. J.; Blanch, H. W. *Langmuir*, **2003**, *19*, 7503-7513.
- [Cascao-Pereira, 2003] Cascao-Pereira, L. G.; Johansson, C.; Radke, C. J.; Blanch, H. *Langmuir*, **2003**, *19*, 7503-7513.
- [Chanamai, 2000] Chanamai, R.; McClements, D. J. *Colloids Surfaces A*, **2000**, *172*, 79-86.
- [Chipot, 1998] Chipot, C.; Pohorille, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11912-11924.
- [Cicuta, 2001] Cicuta, P.; Hopkinson, I. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 8659-8670.

- [Cornec, 1996] Cornec, M; Mackie, A. R.; Wilde, P. J.; Clark, D. . *Colloids Surfaces A*. **1996**, *114*, 237-244.
- [de Gennes, 1979] de Gennes, P. G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. University Press. Ithaca, Nueva Cork, **1979**.
- [del Rio, 1997] del Río, O. I.; Neumann, A. W. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *196*, 136-147.
- [Dickinson, 1993] Dickinson, E.; Horne, D. E.; Phipps, J. S. Richardson, R. M. *Langmuir*, **1993**, *9*, 242-248.
- [Dickinson, 1998] Dickinson, E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1998**, *94*, 1657-1669.
- [Dimitrova, 2001] Dimitrova, T. D.; Leal-Calderón, F.; Gurkov, T. D.; Campbell, B. *Langmuir*, **2001**, *17*, 8069-8077.
- [Douillard, 1999] Douillard, R.; Aguié-Beghin, V. *Colloids Surfaces A*, **1999**, *149*, 285-290.
- [Douillard, 2003] Douillard, R.; Daoud, M.; Aguié-Béghin, V. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2003**, *8*, 380-386.
- [Durand, 1999] Durand, M.; Martinoty, G.; Langevin, D. *Phys. Rev. E*. **1999**, *60*, R6307-R6308.
- [Durand, 2003] Durand, A.; Franks, G. V.; Hosken, R. W. *Food hydrocolloids*, **2003**, *17*, 671-678.
- [Fainerman, 1994] Fainerman, V. B.; Makievski, A. V.; Miller, R. *Colloid Surfaces A* **1994**, *87*, 61-75.
- [Fainerman, 1996] Fainerman, V. B.; Miller, R.; Wüsteck, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *183*, 26-34.

[Fainerman, 1998a] Fainerman, V. B.; Miller, R. In *Proteins at liquid interfaces*, 51-102, Eds: Möbius, D.; Miller, R. Elsevier Science, Amsterdam, **1998**.

[Fainerman, 1998b] Fainerman, V. B.; Lucassen-Reynders, E. H.; Miller, R. *Colloids Surfaces A*. **1998**, *143*, 141-165.

[Fainerman, 1999] Fainerman, V. B.; Miller, R. *Langmuir*, **1999**, *15*, 1812-1816.

[Fainerman, 2001] Fainerman V. B.; Miller, R. In *Surfactants - Chemistry, Interfacial Properties and Application*. Studies in Interface Science, vol 13, 99-188. Eds: Fainerman, V. B.; Möbius, D.; Elsevier, Amsterdam, **2001**.

[Fainerman, 2002] Fainerman, V. B.; Miller, R.; Kovalchuk, V. I. *Langmuir*, **2002**, *18*, 7748-7752.

[Fainerman, 2002b] Fainerman, V. B.; Miller, R.; Möhwald, H. J. *Phys. Chem. B.*, **2002**, *106*, 809-819.

[Fainerman, 2003] Fainerman, V. B.; Lucassen-Reynders, E. H.; Miller, R. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2003, *106* 237-259.

[Fainerman, 2003b] Fainerman, V. B.; Miller, R.; Kovalchuk, V. I. *J. Phys. Chem B.*, **2003**, *107*, 6119-6121.

[Fainerman, 2004a] Fainerman, V. B.; Kovalchuk, V. I. ; Aksenenko, E. V.; Michel, M.; Leser, M. E. ; Miller, R.; *J. Phys. Chem. B.*, **2004**, *108*, 13700-13705.

[Fainerman, 2004b] V. B. Fainerman, V. B.; Zholob, S. A.; Leser, M.; Michel, M.; Miller, R. *J. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *274*, 496-501.

[Lucassen-Reynders, 1981] Lucassen-Reynders, E. H. In *Anionic Surfactants, Physical Chemistry of surfactant action*. Ed: Lucassen-Reynders, E. H.; Marcel Dekker, inc. Nueva York, **1981**.

- [Foegeding, 2006] Foegeding, E. A.; Luck, P. J.; Davis, J. P. *Food Hydrocolloids*. **2006**, *20*, 284-292.
- [Fragneto, 1995] Fragneto, G.; Thomas, R. K.; Rennie, A. R.; Penfold, J. *Science*, **1995**, *267*, 657-660.
- [Freer, 2004] Freer, M. E.; Yin, K. S.; Fuller, G. C.; Radke, C. J. *J. Phys. Chem.*, **2004**, *108*, 3835-3844.
- [Frumkin, 1925] Frumkin A. *Z Phys Chem Leipzig*, **1925**, *116*, 466-484.
- [Gaines, 1966] Gaines, G. L. Jr. *Insoluble monolayer at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers, Nueva York, **1966**.
- [Galgoci, 2004] Galgoci, E. C.; Chan, S. Y.; Yacoub, K. *Air Products and Chemicals, Inc.*, **2004**, Pub. No. 120-05-017-GLB.
- [Gálvez-Ruiz, 1999] Gálvez-Ruiz, M. J.; Birdi, K. S. *Colloid Polym. Sci.* **1999**, *277*, 1083-1096.
- [Goebel, 1997] Goebel, A.; Lunkenheimer, K. *Langmuir*, **1997**, *13*, 369-372.
- [Graham, 1979a] Graham, D. E.; Philips, M. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *70*, 403-414.
- [Graham, 1979b] Graham, D. E.; Philips, M. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *70*, 415-426. [Graham, 1979c] Graham, D. E.; Philips, M. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, *70*, 427-439.
- [Grigoriev, 2002] Grigoriev, D. O.; Fainerman, V. B.; Makievski, A. V.; Krägel, J.; Wüstneck, R.; Miller, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253*, 257-264.
- [Hambardzumyan, 2004] Hambardzumyan, A.; Aguié-Béghin, V.; Daoud, M.; Douillard, R. *Langmuir*, **2004**, *20*, 756-763.

[Hambarzumyan, 2003] Hambarzumyan, A.; Anguié-Béghin, V.; Panaiotov I.; Douillard, R. *Langmuir*, **2003**, *19*, 72-78.

[Hardy, 2005] Hardy, J.

http://ull.chemistry.uakron.edu/genobc/chapter_11/. **2005**

[Harzalla, 1990] Harzalla, B.; Anguié-Béghin, V.; Douillard, R.; Bosio, L. *Int. J. Biol. Macrom.*, **1990**, *23*, 73-...

[Holgado-Terriza, 2002] Holgado Terriza, J. A. Universidad de Granada. *Tesis Doctoral* 2002.

[Holmberg, 2003] Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in aqueous solutions*. 2nd ed., Wiley, Chichester, **2003**.

[Horne, 2002] Horne, D. *Curr. Opp. Colloid Interface Sci.*, **2002**, *7*, 456-461.

[Husband, 1997] Husband, F. A.; Wilde, P. J.; Mackie, A. L. Garrood, M. J. *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, *195*, 77-85.

[Israelachvili, 1991] Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, San Diego, **1991**.

[Joos, 1991] Joos, P.; Serrien, G. *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, *145*, 291-294.

[Koppel, 1972] Koppel, D. E. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 4814-4820.

[Krägel, 1999] Krägel, J.; Grigoriev, D. O.; Makievski, A. V.; Miller, R., Fainerman, V. B.; Wilde, P. J.; Wüstneck, R. *Colloids Surfaces B.* **1999**, *12*, 391-397.

[Krägel, 1999] Krägel, J.; Wüstneck, R.; Husband, F.; Wilde, P. J.; Makievski, A. V.; Grigoriev, D. O.; Li, J. B. *Colloids Surfaces B.* **1999**, *12*, 399-407.

-
- [Kwok, 1995] Kwok, D. Y.; Hui, W.; Lin, R.; Neumann, A. W. *Langmuir*, **1995**, *11*, 2669-2673.
- [Langevin, 2000] Langevin, D. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *88*, 209-222.
- [Leclerc, 1997] Leclerc, E.; Calmettes, P. *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, *78*, 150-153.
- [Leclerc, 1997] Leclerc, E.; Daoud, M. *Macromolecules*, **1997**, *30*, 293-300.
- [Liu, 2005] Liu, J.; Xu, G.; Liu, J.; Xin, X.; Luan, Y. *J. Dispersion Sci. Tech.*, **2005**, *26*, 559-564.
- [Loglio, 2001] Loglio, G.; Pandolfini, P. Miller, R.; Makievski, A. V.; Ravera, F.; Ferrari, M.; Liggieri, L. In *Novel Methods to Study Interfacial Layers*, 439-483. Eds: Möbius, D.; Miller, R., Elsevier, Amsterdam, **2001**.
- [Lucassen-Reynders, 2004] Lucassen-Reynders, E. H.; Fainerman, V. B.; Miller, R. *J. Phys. Chem. B*, 2004, *108*, 9173-9176.
- [Mac Ritchie, 1990] Mac Ritchie, F. *Chemistry at interfaces*. Academic Press, San Diego **1990**.
- [Mackie, 2004] Mackie, A. R. *Current Opin. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *9*, 357-361.
- [Mackie, 2005] Mackie, A.; Wilde, P. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2005**, *117*, 3-13.
- [Makievski, 1997] Makievski, A. V.; Fainerman, V. B.; Miller, R.; Bree, M.; Liggieri, L.; Ravera, F. *Colloids Surfaces A.*, **1997**, *122*, 269-273.

[Makievski, 1998] Makievski, A. V.; Fainerman, V. B.; Bree, M., Wüsteck, R.; Krägel, J.; Miller, R. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 417-425.

[Maldonado-Valderrama, 2003] Maldonado-Valderrama, J.; Wege, H. A.; Rodríguez-Valverde, M. A.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Langmuir*, **2003**, *19*, 8436-8442.

[Maldonado-Valderrama, 2004a] Maldonado-Valderrama, J.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Langmuir* **2004**, *20*, 6093-6095.

[Maldonado-Valderrama, 2004b] Maldonado-Valderrama, J.; Martín-Molina, A.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *J. Phys. Chem. B.*, **2004**, *108*, 12940-12945.

[Maldonado-Valderrama, 2005a] Maldonado-Valderrama, J.; Fainerman, V. B.; Aksenenko, E.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Miller, R. *Colloids Surf. A*, **2005**, *261*, 85-92.

[Maldonado-Valderrama, 2005b] Maldonado-Valderrama, J.; Fainerman, V. B.; Galvez-Ruiz, M. J.; Martin-Rodriguez, A.; Cabrerizo-Vilchez, M. A.; Miller, R. *J. Phys. Chem. B.*, **2005**, *109*, 17608-17616.

[Maldonado-Valderrama, 2005c] Maldonado-Valderrama, J.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M. A. *Colloids Surf. A*, **2005**, *270-271*, 323-328.

[Marquez Beltrán, 2003] Marquez Beltrán, C.; Guillot, S. Langevin, D. *Macromolecules*, **2003**, *36*, 8506-8512.

[Márquez Beltrán, 2004] Márquez Beltrán, C. Université Paris XI, Orsay. *These* 2004.

- [Martin, 2002] Martin, A. H.; Grolle, K.; bos, M. A.; Cohen-Stuart, M. A.; van Vliet, T. J. *Colloid Interface Sci.*, **2002**, 254, 175-183.
- [McMahon, 1998] McMahon, D. J.; McManus, W. J. *Dairy Sci.*, **1998**, 81, 2985-2993.
- [McRitchie, 1990] McRitchie, F. *Chemistry at Interfaces*, Academia Press, San Diego, **1990**.
- [Mellema, 1998] Mellema, M.; Clark, D. C.; Husband F. A.; Mackie, A. R. *Langmuir*, **1998**, 14, 1753-1758.
- [Miller, 2000] Miller, R.; Fainerman, V. B.; Makievski, A. V.; Krägel, J.; Grigoriev, D. O.; Kazakov, V. N.; Sinyachenko, O. V. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, 86, 39-82.
- [Miller, 2001] Miller, R.; Aksenenko, E. V.; Fainerman, V. B.; Pison, U. *Colloids Surfaces A.*, **2001**, 183/185, 381-390
- [Miller, 2004] Miller, R.; Fainerman, V. B. ; Leser, M. E. ; Michel, M. *Colloids Surfaces B.* **2004**, 233, 39-42.
- [Miller, 2004] Miller, R.; Fainerman, V. B.; Aksenenko, E. V.; Leser, M. E.; Michel, M. *Langmuir* **2004**, 20, 771-777.
- [Min, 1998] Min. D. J.; Winterton, L.; Andrade J. D. *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, 197, 43-47.
- [MSDS Database] MSDS Database, <http://physchem.ox.ac.uk/>
- [Murray, 1996] Murray, B. S.; Nelson, P. V. *Langmuir*, **1996**, 12, 5973-5976.
- [NEM, 2001] Dairy chemistry and Physics
<http://www.cip.ukcentre.com/chem1.htm>
- [Oh, 1991] Oh, S. G.; Shah, D. O. *Langmuir*, **1991**, 7, 1316-1318.
- [Orr, 1947] Orr, W. J. *Trans. Faraday Soc.*, **1947**, 43, 12-27.

- [Poon, 2001] Poon, S.; Clarke, A. E.; Schultz, C. J. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 281-286.
- [Rodríguez-Niño, 1998] Rodríguez-Niño, M. R.; Wilde, P.; Clark, D. C.; Rodríguez-Patino, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2177-2184.
- [Russev, 2000] Russev, S. C.; Arguirov, T. V.; Gurkov, T. D. *Colloids Surf. B*, 2000, *19*, 89-100.
- [Sánchez, 2000] TESIS DE PEPE SANCHEZ
- [Sánchez-González, 1999] Sánchez-González, J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Gálvez-Ruiz, M. *Colloids Surfaces B*. **1999**, *12*, 123-138.
- [Sánchez-González, 2001] Sánchez-González, J.; Cabrerizo-Vílchez, M. A.; Gálvez-Ruiz, M. *Colloids Surfaces B*. **2001**, *21*, 17-27.
- [Scheludko, 1967] Scheludko, A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1967**, *1*, 397-
- [Sengupta, 1998] Sengupta, T.; Damodaran S. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *206*, 407-415.
- [Sengupta, 1999] Sengupta, T.; Razumovsky, L.; Damodaran, S. *Langmuir*, **1999**, *15*, 6991-7001.
- [SIGMA-ALDRICH] Product information. <http://www.sigma-aldrich.com/>
- [Sinterface] <http://www.sinterface.com/>
- [Sonin, 1993] Sonin, A. A.; Langevin, D. *Europhys. Lett.*, **1993**, *22*, 271-277.
- [Stauffer, 1999] Stauffer, C. In *Emulsifiers*. Eagan Press Handbook Series, **1999**, Cap. 3.

[Tripp, 1995] Tripp, B. C.; Magda, J. J.; Andrade, J. D. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *173*, 16-27.

[Trurnit, 1960] Trurnit, H. J. *J. Colloid Interface Sci.* **1960**, *15*, 1-13.

[Tuinier, 2002] Tuinier, R.; de Cruif, C. G. *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*, 1290-1295.

[Turhan, 2003] Turhan, K. N.; Barbano, D. M.; Etzel, M. R. *J. Food Sci.*, **2003**, *68*, 1578-1583.

[Ward, 1946] Ward, A. F. H.; Tordai, L. *J. Phys. Chem.* **1946**, *14*, 453-461.

[Weast, 1974] Weast, R. C.; Selby, S. M.; Long, J. W.; Sunshine, I. In *Handbook of Chemistry and Physics*, 55th ed, CRC Press Inc, Cleveland, OH, **1974**.

[Wege, 2002] Wege H.A. Universidad de Granada. *Tesis Doctoral* **2002**.

[Wilde, 1997] Wilde, P.; Rodriguez-Niño, M. R.; Clark, D. C.; Rodriguez-Patino, J. M. *Langmuir*, **1997**, *13*, 7151-7157.

[Wilde, 2000] Wilde, P. J. *Curr. Opp. Colloid Interface Sci.*, **2000**, *5*, 176-181.

[Wilde, 2004] Wilde, P.; Mackie, A. R.; Husband, F.; Gunning, P.; Morris, V. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *108-109*, 63-71.

[Williams, 1996] Williams, A.; Prins, A. *Colloids Surfaces A.* **1996**, *114*, 267-275.

[Wüstneck, 1996] Wüstneck, R.; Krägel, J.; Miller, R.; Wilde, P.J.; Sarker, D. K.; Clark, D.C. *Food Hydrocolloids.* **1996**, *10*, 395-405.

[Wüstneck, 1999] Wüstneck, R.; Moser, B.; Muschiolick, G. *Colloids Surface B.* **1999**, *15*, 263-273.

[Wüstneck, 1999] Wüstneck, R.; Moser, B.; Muschiolik, G. *Colloids Surfaces B*. **1999**, *15*, 263-273.