

VISCOELASTICIDAD LINEAL DE EMULSIONES ALIMENTARIAS O/W ESTABILIZADAS CON GELATINAS

LORENZO, G.^{1,2}; CHECMAREV, G.; ZARITZKY, N.^{1,2}; CALIFANO, A.¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CCT La Plata - CONICET. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 116, La Plata (1900). Argentina; ² Área Departamental de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.

e-mail: lorenzogabriel@gmail.com

Resumen

Se realizó un estudio reológico sobre emulsiones o/w de bajo contenido lipídico (15%) empleando gelatina comestible de distintos pesos moleculares (60, 80 y 120 kDa) como emulsificante (3%). Los ensayos dinámicos mostraron un comportamiento de gel fuerte en todos los sistemas estudiados. Se modeló el efecto del peso molecular de la proteína sobre la viscosidad compleja, obteniéndose parámetros estructurales que permitieron caracterizar los sistemas. Se aplicó el principio de superposición sobre el tiempo de almacenamiento, en las emulsiones estabilizadas con gelatina de 120 kDa. La teoría de “rubber elasticity” permitió la vinculación de la variación en el módulo de almacenamiento (G') con el incremento del número de entrecruzamientos de la matriz proteica. El empleo de alta cizalla durante la emulsificación permitió obtener un sistema gelificado sin incrementar la temperatura. Esta característica, sumada a la capacidad de las proteínas de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de su oxidación, tornan estos sistemas como potenciales vehículos de sustancias termolábiles en la fase lipídica.

1. Introducción

Las emulsiones aceite en agua (o/w) se utilizan en numerosos procesos industriales y son la base de muchos productos alimenticios. Dado que el contacto entre el aceite y las moléculas de agua es energéticamente desfavorable, las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables (McClements, 1999). En sistemas de reducido contenido lipídico esta inestabilidad se hace mayor y resulta imprescindible el agregado de emulsificantes y/o agentes espesantes para lograr emulsiones cinéticamente estables. Los emulsificantes pueden ser proteínas con capacidad de adsorción sobre la superficie de las gotas de aceite, disminuyendo la tensión superficial, previniendo el acercamiento de las gotas, e impidiendo, así, su agregación. (Dickinson, 2003; McClements, 2004).

La gelatina es la proteína más ampliamente estudiada debido a sus diversas aplicaciones en distintos campos, principalmente la industria alimenticia. La materia prima de este producto es el colágeno extraído de los tejidos conectivos presentes en huesos, pieles y cueros que la tornan una fuente abundante y fácilmente disponible. La estructura del tropocolágeno (componente principal de la fibra de colágeno) está conformada por tres cadenas polipeptídicas que se enrollan formando una hélice levógira debido al elevado impedimento estérico causado por el alto contenido de residuos pirrolidínicos presentes en las moléculas. En la producción de gelatina el tropocolágeno pierde esa estructura de varilla rígida que resulta imposible de regenerar totalmente. En esta tendencia de

regeneración de la triple hélice se fundamenta el poder de gelificación que tiene la gelatina (Eluk, 2007; Harrington y Rao, 1970)

En la literatura se ha estudiado la capacidad de la gelatina para actuar como emulsificante (Lobo y Svereika 2003; Muller y Hermel, 1994). Sin embargo, algunos autores informan que usualmente produce un tamaño de gota relativamente grande durante la homogeneización de la emulsión (Dickinson y Lopez, 2001).

Una de las ventajas más significativas de emplear proteínas como agentes emulsificantes es su habilidad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de su oxidación (Hu y col, 2003). Esta característica sumada a su capacidad de gelificar, convierten a la gelatina en una alternativa interesante para ser empleada en sistemas emulsionados que sirvan como vehículo de vitaminas liposolubles.

La reología resulta una herramienta imprescindible a la hora de caracterizar las emulsiones alimenticias, que permite la vinculación de atributos de calidad con el comportamiento del sistema a nivel microestructural (Barnes, 1994; Lorenzo y col., 2008a; Quintana y col., 2007).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de gelatinas de distinto peso molecular empleadas como estabilizantes en emulsiones o/w de bajo contenido lipídico, sobre las características viscoelásticas y microestructurales y su evolución durante el almacenamiento.

2. Metodología

Se prepararon emulsiones de bajo contenido lipídico (15% o/w) a partir de fases continuas conteniendo gelatina bovina comestible (3%) de tres pesos moleculares diferentes (60, 80 y 120 kDa), proporcionadas por PB Leiner, Argentina. Las mismas fueron previamente hidratadas durante 24 horas a 25°C. Para evitar el desarrollo de microorganismos se agregó 0.01% de azida sódica en todos los sistemas en estudio. La emulsificación se realizó en dos etapas. Una pre-emulsificación en un equipo Ultra Turrax T25 (Ika, Alemania), a 11500 rpm durante 4 min, a temperatura ambiente. Luego, la pre-emulsión se hizo circular 4 veces por un homogeneizador a válvula de alta presión usando dos válvulas reguladas en 40 y 4 MPa.

Se realizaron ensayos reológicos dinámicos a distintos tiempos del almacenamiento, en un reómetro de esfuerzo controlado RS600 (Haake, Alemania), con una geometría plato-plato rugoso ($d=35\text{mm}$), evaluándose los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia, previa determinación del rango de viscoelasticidad lineal mediante ensayos de barridos de esfuerzo a una frecuencia constante de (6.28 rad/s). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se colocaron dos alícuotas de cada emulsión ensayada en probetas de 25 ml de modo de seguir visualmente su estabilidad. Las probetas fueron almacenadas a 20°C en un cuarto de temperatura controlada y observadas periódicamente. De manera complementaria se observaron alícuotas de las distintas formulaciones, diluidas previamente (1:20), en un microscopio óptico provisto de una cámara digital (Leica DC100).

3. Resultados

3.1. Estabilidad

La estabilidad de las emulsiones estuvo significativamente relacionada con el peso molecular de la proteína estudiada, detectándose la aparición de una interfase a los 8 días en las emulsiones estabilizadas con la gelatina de 60 kDa y a los 20 días en aquellas que se empleó gelatina de 80 kDa. Las emulsiones que contenían gelatina de 120 kDa

permanecieron estables por más de 6 semanas. En la micrografía (Fig 1) se observa que las emulsiones presentaron una distribución de tamaño de gotas con una media por debajo de $1\mu\text{m}$.

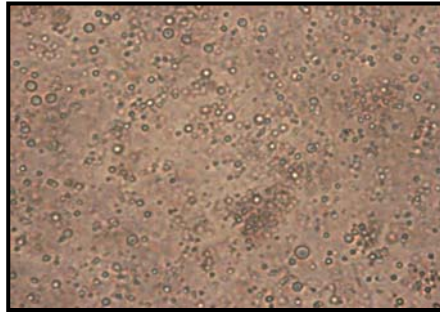


Fig 1. Micrografía de una emulsión 15% aceite en agua con 3% de gelatina de 120 kDa en la fase continua (dilución 1:20; aumento 1000x).

3.2. Efecto del peso molecular

Los ensayos oscilatorios (G' y G'' vs. frecuencia) mostraron en todos los casos un comportamiento cualitativamente similar. La evolución del módulo de almacenamiento (G') fue prácticamente independiente de la frecuencia (región “plateau”). En sistemas poliméricos, la aparición de una región “plateau” para G' o de un mínimo en G'' en la dependencia de los módulos con la frecuencia se atribuye a la formación de una estructura tridimensional tipo gel originada por entrecruzamientos físicos entre las cadenas de polímeros. En la Fig 2 se muestra este comportamiento para las emulsiones o/w estabilizadas con las tres gelatinas estudiadas.

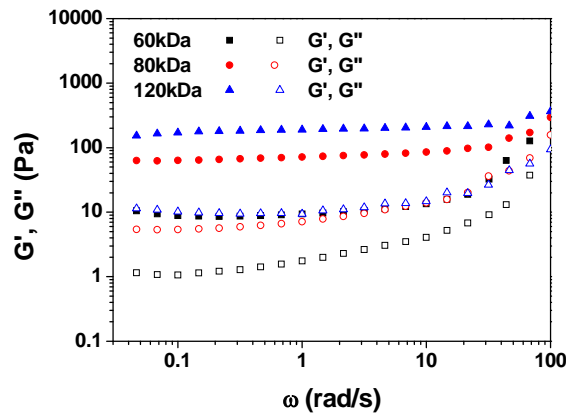


Fig 2. Evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') con la frecuencia (ω) para emulsiones estabilizadas con gelatinas de distintos pesos moleculares

El incremento en el peso molecular de la proteína utilizada como estabilizante se vio reflejado en un aumento tanto en el módulo de almacenamiento como en el módulo viscoso. El incremento en la viscosidad compleja (η^*) puede ser modelado de acuerdo con la teoría de Friedrich y Heymann (1988). En la zona de altas frecuencias (“gel point”), η^* puede expresarse de acuerdo con la siguiente ecuación (Lorenzo y col., 2008b):

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \frac{\sqrt{G'^2 + G''^2}}{\omega} \approx A_\alpha \omega^{(\alpha-1)} \quad (1)$$

Donde α es el orden de la función de relajación y A_α representa una medida de la resistencia del material, asociada a la fuerza de los entrecruzamientos de la matriz polimérica. En la Fig 3 se observa el ajuste para cada caso. Los valores de α estuvieron por debajo de 0.1 para las tres formulaciones relacionados con un comportamiento de gel fuerte (Steffe, 1996). Por otro lado, se observó un significativo incremento ($P < 0.05$) de A_α con el peso molecular con valores de 10.8, 77.4 y 190.8 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^\alpha$) para las formulaciones conteniendo gelatina de 60, 80 y 120 kDa, respectivamente.

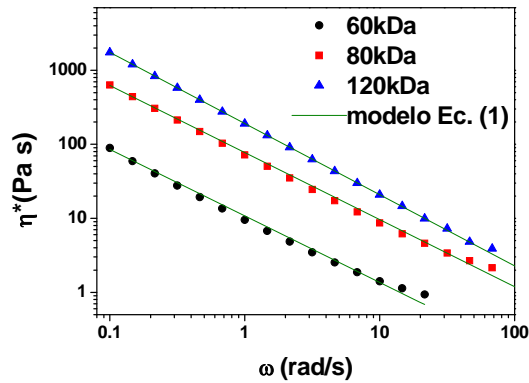


Fig 3. Efecto del peso molecular del estabilizante (gelatina) sobre la viscosidad compleja (η^*) de emulsiones o/w de bajo contenido lipídico y el modelado de las mismas de acuerdo con la teoría de Friedrich y Heymann (1988)

En estos sistemas, el espesor del film interfacial resulta crítico tanto para la estabilidad como para las características reológicas expuestas (Olijve y col., 2001). Cuando la gelatina está compuesta por las moléculas más pequeñas (60 kDa), el espesor del film interfacial se vuelve muy delgado resultando insuficiente para proveer protección estérica contra la desestabilización, lo cual se traduce en un menor valor de A_α .

Cabe destacar que, a pesar de no incrementar la temperatura de la emulsión por encima de los 25°C, los altos esfuerzos de corte a los que es sometida la muestra producen la gelificación de la emulsión por desnaturalización de la proteína, como se ve mediante los ensayos oscilatorios. Esto resulta de gran importancia dado que la velocidad de oxidación de los PUFA se incrementa sustancialmente con la temperatura.

3.3. Efecto del tiempo de almacenamiento

Dada la alta estabilidad evidenciada por las emulsiones que contenían gelatina de 120 kDa, se evaluó el comportamiento viscoelástico de las mismas durante su almacenamiento. Se observó un marcado incremento de G' y G'' con el tiempo de almacenamiento de las emulsiones, manteniendo en todos los casos un comportamiento de G' independiente de la frecuencia de oscilación en el rango analizado (Fig 4a).

De acuerdo con las características de las curvas, se empleó para el análisis un principio empírico de superposición en función del tiempo de almacenamiento. Como factor de normalización se utilizó el módulo "plateau" G_0 , que corresponde al valor de G' a la frecuencia en que se encuentra un mínimo en la evolución de la tangente de pérdida ($\tan \delta = G''/G'$). La curva maestra de superposición se muestra en la Fig 4b.

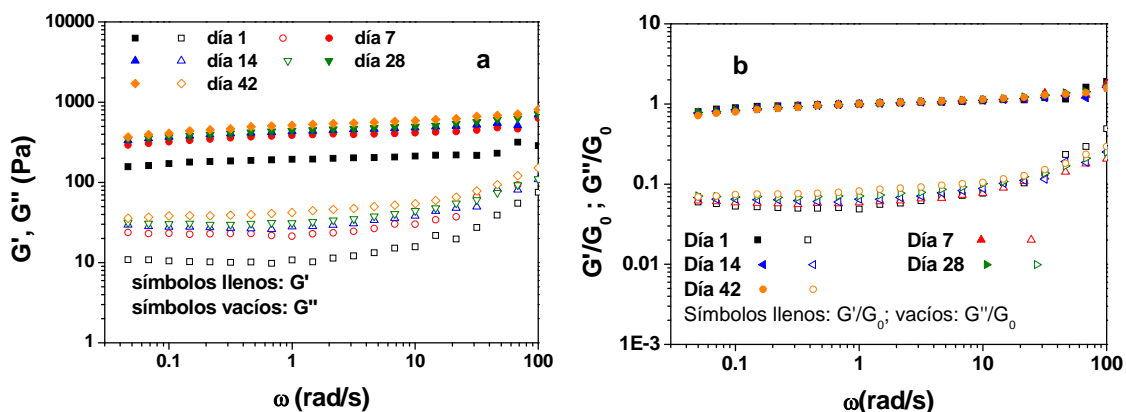


Fig 4. a Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') para emulsiones o/w con 15% de aceite estabilizadas con gelatina de 120 kDa. **b** Curva maestra de superposición para las emulsiones estabilizadas con gelatina 120 kDa en función del tiempo de almacenamiento.

Este parámetro (G_0) puede considerarse como una medida de la cantidad de entrecruzamientos entre moléculas poliméricas y se ha relacionado con la formación de una red estructural en emulsiones o/w debido a los enlaces entre las moléculas de proteínas situadas en la interfase aceite-agua (Ferry, 1980). En este caso se observa un marcado incremento del módulo “plateau” con el tiempo de almacenamiento derivado de un continuo incremento en el número de uniones entre moléculas de gelatina produciendo una red más elástica con el tiempo de maduración del gel (Tabla 1).

Tabla 1. Módulo “plateau” para distintos tiempos de almacenamiento de emulsiones o/w estabilizadas con gelatina 120 kDa.

Tiempo (días)	1	7	14	28	42
G_0 (Pa)	193.6	344.1	433.0	441.8	496.1

Debido a que el comportamiento viscoelástico de este tipo de emulsiones alimenticias es de tipo gel fuerte, la evolución temporal de la microestructura puede analizarse mediante la teoría de “rubber elasticity” (Flory, 1953; Nakamura y col., 1987), considerando que la estructura tridimensional del sistema se debe exclusivamente a las interacciones entre las cadenas proteicas, y que las gotas de aceite actúan como esferas inertes que rellenan la matriz polimérica.

$$G' = \frac{CRT}{M_c} \quad (2)$$

Donde: G' es el módulo de almacenamiento; C es la concentración de gelatina; R la constante de los gases ideales; T es la temperatura absoluta y M_c es el peso molecular promedio de los segmentos de cadenas poliméricas ubicadas entre dos entrecruzamientos adyacentes de las cadenas proteicas.

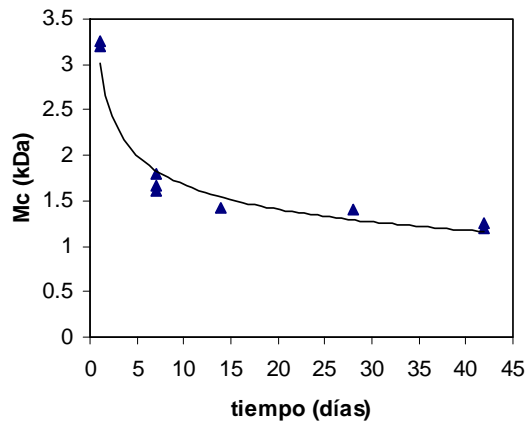


Fig 5. Evolución del peso molecular promedio de los segmentos poliméricos entre zonas de uniones intermoleculares (Mc) con el tiempo de almacenamiento en emulsiones estabilizadas con gelatina 120 kDa

Como se observa en la Fig 5, a medida que transcurre el almacenamiento el peso molecular de los segmentos poliméricos entre dos entrecruzamientos adyacentes disminuye. Este efecto puede asociarse con la tendencia de las cadenas polipeptídicas de retornar a una estructura más ordenada, ya sea por el crecimiento de las zonas de unión existentes o por la formación de nuevos enlaces tanto intermoleculares como intramoleculares (Ledward, 1986).

Conclusiones

Se obtuvieron emulsiones estables de bajo contenido lipídico, con características de gel fuerte. Se observó un incremento en el parámetro de resistencia del material (A_0) a medida que aumenta el peso molecular de la proteína. El efecto fue adjudicado al incremento en el espesor del film interfacial que se traduce en una mayor protección estérica y un incremento en el carácter sólido del sistema.

A lo largo del almacenamiento, el aumento del carácter elástico de la emulsión fue analizado mediante el principio de superposición. El incremento en módulo “plateau” fue modelado con la teoría de la “rubber elasticity”, reflejando un incremento en el número de entrecruzamientos inter e intramoleculares.

Dado que durante su preparación no fue necesario incrementar la temperatura para obtener la formación del gel, este tipo de emulsiones resulta una adecuada alternativa para sistemas que contengan productos termolábiles en la fase lipídica, tales como vitaminas A, D y E.

Referencias

- Barnes, H.A. (1994). Rheology of emulsions - a review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 89-95.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Dickinson, E., & Lopez, G. (2001). Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial milk proteins. *Journal of Food Science*, 66, 118–123.
- Eluk, D. (2007). Modelado reocinético de la maduración de soluciones de gelatina en flujo de corte. Mg. Tesis. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers*. John Wiley & Sons. New York.
- Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Friedrich, C.H.R.; Heymann, L. (1988). Extension of a model for crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 32 (3), 235-241.
- Harrington, W.F.; Rao, N.V. (1970). Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 19(19), 3714-3724.
- Hu, M.; McClements, D. J.; Decker, E. A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1696–1700.
- Ledward, D.A. (1986). Gelation of Gelatin, In: Mitchell, J.R. & Ledward, D.A. (Eds) *Functional Properties of Food Macromolecules*. New York: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Lobo, L.; Svereika, A. (2003). Coalescence during emulsification; 2. Role of small molecule surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261, 498–507.
- Lorenzo, G.; Zaritzky, N.; Califano, A. (2008a). Modeling rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with xanthan/guar mixtures. *Food Research Internacional*, 41(5), 487-494.
- Lorenzo, G.; Zaritzky, N.; Califano, A. (2008b). Optimization of non-fermented gluten-free dough composition based on rheological behavior for industrial production of “empanadas” and pie-crusts. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 224-231.
- McClements D.J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 305–313.
- Muller, H. J.; Hermel, H. (1994). On the relation between the molecular mass distribution of gelatin and its ability to stabilize emulsions. *Colloid and Polymer Science*, 272, 433–439.
- Nakamura, T.; Koo, S.J.; Pradipasena, P.; Rha, C.; Sinskey, A.J. (1987). Solution properties of polysaccharide flocculant produced by “*Zoogloea ramigera*”(pp 399-413). In: Atia, Y.A. (ed), *Flocculation in biotechnology and separation systems*. New York: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Olijve, J.; Mori, F.; Toda, Y. (2001). Influence of the Molecular-Weight Distribution of Gelatin on Emulsion Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 243, 476–482.
- Quintana, J.M.; Lorenzo, G.; Zaritzky, N.E.; Califano, A.N. (2007). Hydrocolloids as o/w emulsion stabilizers: Effect of the structural features during storage (pp 1-22). In: Lupano, C.E. (ed), *Functional Properties of Food Components*. Kerala, India: Research Signpost.
- Steffe, J.F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. East Lansing: Freeman Press.