

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



T 543 P618.  
R 5509  
F 14.5.99.

**ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE LA DESESTABILIZACIÓN DE MICELAS  
DE CASEÍNA BOVINA EN SUSPENSIÓN DURANTE LA COAGULACIÓN  
ENZIMÁTICA DE LA LECHE**

**Miryam Susana Pires**

**DIRECTOR DE TESIS  
Prof. Dr. Carlos A. Gatti**

543  
P618

1998



***A Darki, Darío y Pablo***



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### PUBLICACIONES

### TABLA DE ABREVIATURAS

### CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

|                                                                       |               |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1. Importancia del tema. Objetivos generales</b>                   | <b>1</b>      |
| <b>1.1 La leche. Resumen de composición, estructura y propiedades</b> | <b>3</b>      |
| 1.1.1 Composición                                                     | 3             |
| 1.1.2 Estructura y propiedades                                        | 5             |
| <b>1.2 Proteínas lácteas. Generalidades</b>                           | <b>7</b>      |
| <b>1.3 Micelas de caseína: composición, estructura y propiedades</b>  | <b>10</b>     |
| 1.3.1 Composición y estructura                                        | 10            |
| 1.3.2 Propiedades                                                     | 15            |
| 1.3.3 Estabilidad frente a la agregación                              | 18            |
| <b>1.4 Coagulación enzimática</b>                                     | <b>27</b>     |
| 1.4.1 Hidrólisis enzimática                                           | 27            |
| 1.4.2. Floculación de las M <sub>p</sub> C                            | 29            |
| 1.4.3. Formación y desarrollo del gel                                 | 30            |
| 1.4.4. Aspectos cinéticos de la floculación                           | 32            |
| <b>1.5 Objetivos de la tesis</b>                                      | <b>39</b>     |
| <br><b>APÉNDICE: Estabilidad coloidal</b>                             | <br><b>41</b> |
| <br>A.1 Coloides. Generalidades                                       | <br>41        |
| A.2 Fuerzas atractivas                                                | 48            |
| A.3 Fuerzas electrostáticas repulsivas                                | 49            |
| A.4 Teoría D.L.V.O.                                                   | 52            |
| A.5 Estabilidad estérica                                              | 60            |
| A.5.1 Generalidades. Definición                                       | 60            |
| A.5.2 Punto $\theta$ de moléculas de polímeros                        | 63            |
| A.5.3 Implicancia del punto $\theta$ en la estabilidad estérica       | 65            |
| A.5.4 Bases termodinámicas de la estabilidad estérica                 | 65            |
| A.5.5 Teoría de Flory-Huggins                                         | 68            |



|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| A.5.6 Teoría de los volúmenes libres                            | 70 |
| A.5.7 Orígenes microscópicos de la estabilización estérica      | 72 |
| A.5.8 Dispersiones con desvíos frente al comportamiento general | 73 |
| A.6 Cinética de floculación                                     | 75 |

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1 MATERIALES</b>                                                                    | <b>82</b> |
| 2.1.1 Preparación de micelas de caseína                                                  | 82        |
| 2.1.2 Preparación de micelas de caseína modificadas                                      | 83        |
| 2.1.3 Preparación de buffers                                                             | 84        |
| 2.1.4 Preparación de la enzima                                                           | 85        |
| 2.1.5 Reactivos utilizados                                                               | 86        |
| 2.1.6 Equipos utilizados                                                                 | 87        |
| <b>2.2 MÉTODOS</b>                                                                       | <b>89</b> |
| 2.2.1 Determinación de la concentración de proteínas totales y caseínas                  | 89        |
| 2.2.2 Determinación de caseinomacropéptidos                                              | 91        |
| 2.2.3 Determinación del radio promedio de las micelas de caseína por medidas de turbidez | 93        |
| 2.2.4 Evaluación del estado de las micelas por medidas de turbidez                       | 95        |
| 2.2.5 Determinación de la velocidad de agregación                                        | 100       |
| 2.2.6 Determinación del índice de refracción de las micelas de caseína                   | 109       |
| 2.2.7 Estimación de la dimensión fractal de los agregados de MpC                         | 111       |
| 2.2.8 Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ por absorción atómica        | 112       |

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Estudios sobre micelas de caseína sin modificaciones***

|                                                  |            |
|--------------------------------------------------|------------|
| <b>3.1 Efecto de la concentración de caseína</b> | <b>114</b> |
| 3.1.1 Resultados                                 | 114        |
| 3.1.2 Discusión                                  | 118        |
| <b>3.2 Efecto de la temperatura</b>              | <b>123</b> |
| 3.2.1 Resultados                                 | 123        |
| 3.2.2 Discusión                                  | 126        |
| <b>3.3 Efecto de la viscosidad del medio.</b>    | <b>129</b> |
| 3.3.1 Resultados                                 | 129        |

|                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.2 Discusión                                                        | 131        |
| <b>3.4 Efecto de la concentración y naturaleza de distintos iones.</b> | <b>135</b> |
| 3.4.1 Resultados                                                       | 135        |
| 3.4.2 Discusión                                                        | 137        |

### *Estudios sobre micelas de caseína con y sin modificaciones*

|                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3.5 Efecto de la concentración de caseína. Estudio comparativo entre MC y MCM</b>                     | <b>143</b> |
| 3.5.1 Resultados                                                                                         | 143        |
| 3.5.2 Discusión                                                                                          | 146        |
| <b>3.6 Efecto de la temperatura. Estudio comparativo entre MC y MCM</b>                                  | <b>151</b> |
| 3.6.1 Resultados                                                                                         | 151        |
| 3.6.2 Discusión                                                                                          | 154        |
| <b>3.7 Efecto de la viscosidad del medio. Estudio comparativo entre MC y MCM</b>                         | <b>159</b> |
| 3.7.1 Resultados                                                                                         | 159        |
| 3.7.2 Discusión                                                                                          | 162        |
| <b>3.8 Efecto del pH. Estudio comparativo entre MC y MCM</b>                                             | <b>167</b> |
| 3.8.1 Resultados                                                                                         | 167        |
| 3.8.2 Discusión                                                                                          | 169        |
| <b>3.9 Efecto de la concentración de <math>\text{Ca}^{2+}</math>. Estudio comparativo entre MC y MCM</b> | <b>174</b> |
| 3.9.1 Resultados                                                                                         | 174        |
| 3.9.2 Discusión                                                                                          | 177        |
| <b>3.10 Conclusiones generales</b>                                                                       | <b>181</b> |

## **CAPITULO IV: RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>4.1 Resumen</b>         | <b>187</b> |
| <b>4.2 Agradecimientos</b> | <b>193</b> |
| <b>4.3 Bibliografía</b>    | <b>194</b> |

NSP



## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I

#### INTRODUCCIÓN

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.1.</b> Composición aproximada de la leche                                         | 3  |
| <b>Tabla 1.2.</b> Composición salina de la leche                                             | 5  |
| <b>Tabla 1.3.</b> Algunas propiedades de los principales elementos estructurales de la leche | 6  |
| <b>Tabla 1.4.</b> Concentración de las proteínas lácteas                                     | 9  |
| <b>Tabla 1.5.</b> Distribución de algunos componentes inorgánicos entre las MC y el suero    | 13 |
| <b>Tabla 1.6.</b> Causas de agregación en las micelas de caseína                             | 19 |

#### APÉNDICE

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla A.1.</b> Características diferenciales entre coloides liófilos y liófilos                         | 43 |
| <b>Tabla A.2.</b> Combinaciones posibles de los componentes termodinámicos de la estabilización estérica   | 66 |
| <b>Tabla A.3.</b> Contribuciones microscópicas a la energía libre de interacción para dispersiones acuosas | 72 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 3.1.</b> Turbidez específica y radios promedios de las MC a diferentes concentraciones de caseína                | 115 |
| <b>Tabla 3.2.</b> Índices de refracción de las MC a diferentes temperaturas                                               | 123 |
| <b>Tabla 3.3.</b> Turbidez y radios promedios de las diluciones de las MC a diferentes temperaturas                       | 124 |
| <b>Tabla 3.4.</b> Índices de refracción del medio en las diluciones con diferente contenido de glicerol                   | 129 |
| <b>Tabla 3.5.</b> Turbidez y radios promedios de las diluciones de micelas de caseína a diferentes viscosidades del medio | 130 |
| <b>Tabla 3.6.</b> Turbidez a 400nm y $\alpha$ de las MC en presencia de distintos iones                                   | 135 |
| <b>Tabla 3.7.</b> Concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en los sobrenadantes de la ultracentrifugación.                       | 136 |
| <b>Tabla 3.8.</b> $D_f$ de los agregados en presencia de los distintos iones                                              | 137 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

#### INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1.** La leche observada a diferentes aumentos. (A) a 500 x, gotas esferoidales de grasa flotando en el plasma (turbio). (B) a 500 x, el plasma contiene partículas proteicas, micelas de caseína. El suero restante es todavía opalescente, por lo tanto debe contener otras partículas). 5
- Figura 1.2.** Esquema de la sección transversal de una micela de caseína.<sup>2</sup> 11
- Figura 1.3.** Esquema simplificado de la interacción entre dos micelas de caseína. Configuración de los "pelos" y su carga en la superficie micelar.<sup>2</sup> 23
- Figura 1.4.** Propiedades de las micelas de caseína a pH fisiológico en función de la temperatura. Potencial electrocinético:  $\psi_\zeta$  o  $\zeta$ . Porcentaje de  $\beta$ -caseína soluble en el sobrenadante luego de una centrifugación a alta velocidad. Voluminosidad ( $v$ ) de las micelas. 25
- Figura 1.5.** Esquema de las etapas de la coagulación de la leche. Porcentajes del grado de escisión o hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína (H) y de la agregación de las micelas de paracaseína en función del tiempo transcurrido luego de adicionada la renina. Varias procedencias. 29
- Figura 1.6.** Ilustración de las etapas de la coagulación enzimática de la leche. 1. Suspensión 2. Floculación 3. Gelación. 4. Entrecruzamiento 5. Sinéresis. 32
- Figura 1.7.** Perfil ilustrativo del potencial atractivo y repulsivo entredos partículas en función de la distancia. 36

#### APÉNDICE

- Figura A.1.** Fracción del potencial de la doble capa en función de la distancia de acuerdo a la aproximación de Debye-Hückel. (A) Curvas para un electrolito 1-1 a tres concentraciones diferentes. (B) Curvas para electrolitos simétricos a una dada concentración (0.001M) con tres valencias diferentes. 52
- Figura A.2.** Perfil ilustrativo del potencial atractivo y repulsivo entredos partículas en función de la distancia. 54
- Figura A.3.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) en función de la distancia. Curvas obtenidas con diferentes valores de  $\psi_0$  manteniendo valores constantes de  $\kappa$  ( $10^7 \text{ cm}^{-1}$ ) y  $A$  ( $2 \times 10^{-12}$  ergios). Unidades de la ordenada: múltiplos de  $k_B T$  a  $25^\circ \text{C}$ . 56

**Figura A.4.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) en función de  $s$  (separación entre las superficies), para dos esferas de igual radio. Curvas obtenidas con diferentes valores de  $\kappa$  manteniendo valores constantes de  $A$  ( $10^{-12}$  ergios) y  $\psi_0$  (25,7mV). 57

**Figura A.5.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) en función de la distancia. Curvas con diferentes valores de  $A$  manteniendo valores constantes de  $\psi_0$  (103mV) y de  $\kappa$  ( $10^7 \text{cm}^{-1}$ ). Unidades de la ordenada: múltiplos de  $k_B T$  a  $25^\circ\text{C}$ . 59

**Figura A.6.** Representación esquemática de la estabilización estérica por un copolímero anfipático. 61

**Figura A.7.** La presión osmótica reducida de un polímero en solución en función de su concentración en distintos solventes. Bueno, pobre y  $\theta$  solventes. 64

**Figura A.8.** Representación esquemática de diferentes tipos de estabilización estérica sobre un diagrama entalpía-entropía. 67

**Figura A.9.** Representación esquemática de los orígenes microscópicos de la estabilización entálpica. 73

**Figura A.10.** Representación esquemática de la formación de dobletes por floculación de dos partículas esféricas uniformes. 76

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Figura 2.1.** Ejemplo de la obtención de los valores de  $\alpha$  para una suspensión de micelas de caseína. Pendiente = -2,91(2) y  $r^2 = 0,99$ . 99

**Figura 2.2.** Cambios de la turbidez ( $\tau$ ) en función del tiempo durante las distintas etapas de la coagulación enzimática de las micelas de caseína. 102

**Figura 2.3.** Cambios de la turbidez ( $\tau$ ) en función del tiempo durante la segunda etapa de la coagulación enzimática de las micelas de caseína de la leche. 103

**Figura 2.4.** Liberación de CMP, agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo y  $(\partial\tau/\partial t)_0$ . (●): Concentración de CMP liberado expresado como  $A$  a 750nm. (○):  $\tau$  expresada como  $A$  a 600nm. (—): derivada máxima de la turbidez respecto al tiempo. 108

**Figura 2.5.** Ejemplo de la determinación del índice de refracción de las micelas de caseína  $n_1$ . Ecuación:  $n_0\sqrt{\tau} = -1,723(6) n_0 + 2,821(7)$ .  $n_1 = 1,631$  110



## CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Figura 3.1.** Liberación de CMP y agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo. (●): Concentración de CMP expresado como A a 750nm. (○):  $\tau$  expresada como A a 600nm. Concentración de caseína: 0,30 g/L. Temperatura: 35°C. 116
- Figura 3.2.** Desaparición de partículas primarias para formar dobletes en función de la concentración de caseína al cuadrado. Temperatura: 35°C 117
- Figura 3.3.**  $\ln k_2$  y W en función de la inversa de la temperatura. (●):  $\ln k_2$  y (○): W. Concentración de caseína: 0,30g/L. 125
- Figura 3.4.** La constante de velocidad de agregación ( $k_2$ ) en función de la inversa de la viscosidad relativa ( $1/\eta$ ). Buffers: (○) 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10mM imidazol-HCl, pH 6,4; (●) 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10mM imidazol-HCl, pH 6,4 más el agregado apropiado de glicerol. Temperatura 35°C. Concentración de caseína: 0,30g/L. 133
- Figura 3.5.** Velocidad inicial de incremento de la turbidez en función de la concentración de catión adicionado. Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones. Máx. desvío estándar: 0,003. 139
- Figura 3.6.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la concentración de caseína. Temperatura : 35°C. 144
- Figura 3.7.** Liberación de CMP y agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo. (●, ■): Concentración de CMP expresado como A a 750nm. (○, □):  $\tau$  expresada como A a 600nm. MC: (●,○) y MCM: (■,□) Concentración de caseína: 0,30g/L Temperatura: 35°C. 145
- Figura 3.8.**  $(1/\tau_0) (\partial\tau/\partial t)_0$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la concentración de caseína. MpC (●) y las MpCM (■) temperatura: 35°C. Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones, máx desvío: 0,003 148
- Figura 3.9.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la temperatura. Concentración de caseína: 0,30g/L. 152
- Figura 3.10.**  $(1/\tau_0) (\partial\tau/\partial t)_0$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la temperatura. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Máx. desvío: 0,003, n=5. 153
- Figura 3.11.** Turbidez ( $\tau$ ) de las MC (A) y de las MCM (B) en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas. 160

**Figura 3.12.**  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  de las MC (A) y de las MCM (B) en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas. 161

**Figura 3.13.**  $(1/\tau_0) (\partial \tau / \partial t)_0$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas. Concentración de caseína: 0,30g/L. Máx. desvío estándar: 0,003, n=5. (A): MpC (B): MpCM. 164

**Figura 3.14.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función del pH del medio. Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C 167

**Figura 3.15.**  $(1/\tau_0) (\partial \tau / \partial t)_0$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función del pH del medio. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura 35°C. 169

**Figura 3.16.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado al medio. Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C. 175

**Figura 3.17.**  $(1/\tau_0) (\partial \tau / \partial t)_0$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C. 176

## PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo de tesis fueron presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas:

XVIII, XXI y XII Congreso Argentino de Química.

XVII, XXIV y XXV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica

VIII, IX y X Congreso Argentino de Fisicoquímica

X, XI, XII, XIII, XIV, XV y XVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario

y dieron lugar a las siguientes publicaciones:

### ***En el tema de la tesis:***

\* Carlos A. Gatti and Miryam S. Pires. "The effect of monovalent cations on the kinetics of renneted milk coagulation". *Journal of Dairy Research* **1995**, 62, 667-672

\* Carlos A. Gatti, Miryam Pires, Gabriela Orellana and Javier Pereyra. "Kinetics Evidence for Steric Destabilization of Casein by Rennet Enzyme Activity" *J. Chem. Soc., Faraday Transactions*. **1996**, 92 (14), 2575-2578.

\* Pires, Miryam, Gatti, Carlos, Orellana, Gabriela and Pereyra, Javier. "Rennet Coagulation of Casein Micelles: Importance of Steric Stabilization after  $\kappa$ -Casein Proteolysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997** (45) 4446-4451

\* Pires, Miryam S., Orellana, G. A. and Gatti, Carlos A. "Rennet Coagulation of Casein Micelles and Heated Casein Micelles: Action of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH ". *Food Hydrocolloids* 1998 (enviado a publicar)

*y relacionadas con el tema:*

\* Carlos A. Gatti, Patricia H. Risso and Miryam S. Pires. "Spectrofluorimetric study on surface hydrophobicity of bovine casein micelles". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995, 43, 2339-2344.

\* Miryam S. Pires, Adriana Alessi and Carlos A. Gatti. "Estudio de laboratorio del efecto de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y caseína, el pH y la temperatura sobre la incorporación de proteínas lácteas al coágulo obtenido por acción enzimática ". *Química Nova*. 1998 (enviado a publicar)



## TABLA DE ABREVIATURAS

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| <b>MC</b>     | micelas de caseína                    |
| <b>MCC</b>    | micelas de caseína modificadas        |
| $\psi_z$      | potencial zeta o electrocinético      |
| $\psi_0$      | potencial superficial electrostático. |
| $\mu$         | fuerza iónica.                        |
| $\eta$        | viscosidad                            |
| $\lambda$     | longitud de onda                      |
| $\Phi$        | energía potencial                     |
| $\kappa^{-1}$ | longitud de Debye                     |
| <b>T</b>      | temperatura                           |
| <b>v</b>      | voluminosidad                         |
| $\tau$        | turbidez                              |
| <b>MpC</b>    | micelas de para caseína               |
| <b>MpCM</b>   | micelas de para caseína modificadas   |
| <b>CMP</b>    | caseinomacropéptidos.                 |
| <b>GMP</b>    | glicomacropéptidos                    |
| <b>A</b>      | constante de Hamaker                  |







## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1. Importancia del tema. Objetivos generales.

La coagulación de la leche es el proceso básico más importante en la manufactura del queso. Influye en la economía de la fabricación de los mismos en tres aspectos:

1) la velocidad de este proceso determina la velocidad a la cual las plantas elaboradoras pueden procesar la leche para fabricar queso; 2) las características de la coagulación determinan el rendimiento en la producción de queso a partir de leche y 3) la coagulación juega un rol predominante en la determinación de la calidad del queso producido.

Aunque la producción de quesos es un arte practicado desde hace muchísimos años, las bases fisicoquímicas de este proceso permanecen, aún hoy, poco claras. Así por ejemplo, la cinética de las varias etapas involucradas en la transformación de la leche hasta dar un queso firme no están totalmente descriptas en términos matemáticos. Conocer los aspectos fisicoquímicos del proceso de coagulación de la leche es esencial para el desarrollo científico y tecnológico ya que permitiría predecir y planificar mejor el funcionamiento de las plantas modernas, no sólo para la fabricación de queso sino también de otros productos lácteos (yogurts, cremas, concentrados de suero, etc.).

La leche está constituida por una gran cantidad de componentes: proteínas, minerales, grasas, etc. De la fracción proteica, las *micelas de caseína* constituyen el elemento fundamental sobre el que se basa el proceso de coagulación. Son

estructuras aproximadamente esféricas con un diámetro entre 20-300nm Están formadas por varios tipos de caseína:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Esta última, muy hidrofílica se ubicaría en la superficie de estas estructuras asegurando la estabilidad del sistema por proyección de su porción hidrofílica al entorno acuoso.

La coagulación enzimática de la leche comprende una serie de etapas. El agregado de quimosina, contenida en el cuajo, cataliza la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína de las micelas mencionadas, luego sobreviene la agregación de las micelas así modificadas y finalmente el proceso de formación y afirmado del gel. Cada una de estas etapas tiene características diferentes e igualmente fundamentales para la obtención de un queso con alto rendimiento y calidad.

En este trabajo de tesis se planteó, a través del estudio de las propiedades fisicoquímicas de las micelas de caseína, aportar y/o reforzar evidencias acerca de las variables y características fisicoquímicas que conducen la etapa de agregación.

La técnica seleccionada para realizar los estudios no permite trabajar en las condiciones de las plantas elaboradoras, o sea con leche pura, sino con diluciones de las mismas. No obstante se plantearon las experiencias a la temperatura de las plantas elaboradoras y se estudiaron fundamentalmente las variables que las mismas manejan durante la fabricación de quesos, como por ej. concentración de caseínas, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , pH, concentración de sales. Para completar algunos aspectos fisicoquímicos se estudiaron otras variables como la viscosidad y la temperatura.

## 1.1 La leche. Resumen de composición, estructura y propiedades.

### 1.1.1 Composición:

La leche es un líquido complejo que contiene gran variedad de componentes en diferentes estados de dispersión. La composición determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades. La Tabla 1.1. muestra sus principales componentes y los porcentajes aproximados de los mismos.

**Tabla 1.1. Composición aproximada de la leche <sup>a</sup>**

| Componente           | Contenido medio en<br>Porcentaje (P/P) |
|----------------------|----------------------------------------|
| Agua                 | 87.3                                   |
| Lactosa              | 4.6                                    |
| Grasa                | 3.9                                    |
| Proteínas            | 3.25                                   |
| -Caseínas            | 2.6                                    |
| Sustancias minerales | 0.65                                   |
| Ácidos orgánicos     | 0.18                                   |
| Varios               | 0.14                                   |

<sup>a</sup>Datos de la leche holandesa de las razas tipo: Rojo Danesa, Holstein, Ayrshire.<sup>1</sup>

Los componentes principales son los que se encuentran en mayor proporción. Sin embargo hay otros, las vitaminas por ej., que se encuentran en concentraciones pequeñas y son nutritivamente muy importantes, o las enzimas que son catalizadores de las reacciones deteriorantes, o algunos componentes menores que contribuyen mucho al sabor de la leche.

La lactosa es el azúcar característico de la leche; le da un sabor ligeramente dulce y constituye la principal fuente de carbono de la mayoría de los microorganismos que crecen en ella. Posee también otros hidratos de carbono pero en cantidades mucho menores.

La grasa de la leche la forman numerosos lípidos diferentes; los triglicéridos constituyen más del 98% de la grasa láctea. Entre los otros lípidos presentes se encuentran el colesterol, ácidos grasos libres, fosfolípidos y cerebrósidos.

Existen diversos tipos de proteínas lácticas que se clasifican generalmente en caseínas y proteínas del suero. Las primeras representan aproximadamente el 80% de las proteínas lácteas. La leche contiene numerosas “proteínas menores”, especialmente enzimas, que son despreciables por su peso pero no por su actividad. Respecto a la fracción proteica de la leche volveremos a referirnos en la sección 1.2.

Los minerales de la leche son principalmente sales inorgánicas, algunas se encuentran ionizadas y otras en forma de sales complejas. Una porción importante de la materia inorgánica (como los fosfatos) se encuentra unida a las proteínas. La Tabla 1.2. muestra la composición salina total de la leche sin detallar la distribución en los distintos elementos estructurales de la misma; sobre este punto volveremos a referirnos en la sección 1.3.

En la leche hay muchos otros componentes distintos; a medida que mejoran las técnicas analíticas se van identificando más componentes.



**Tabla 1.2. Composición salina de la leche.**

| <i>Cationes</i>         | mmol/k | <i>Aniones</i>             | mmol/k |
|-------------------------|--------|----------------------------|--------|
| Sodio (23) <sup>a</sup> | 17-28  | Cloruro (35.5)             | 22-34  |
| Potasio (39.1)          | 31-43  | Carbonato (60)             | ~2     |
| Calcio (40.1)           | 26-32  | Sulfatos (96.1)            | ~1     |
| Magnesio (24.3)         | 4-6    | Fosfatos <sup>b</sup> (95) | 19-23  |
| Aminas                  | ~1.5   | Citrato (189)              | 7-11   |
|                         |        | Ácidos orgánicos           | ~2     |
|                         |        | Esteres fosfóricos         | 2-4    |

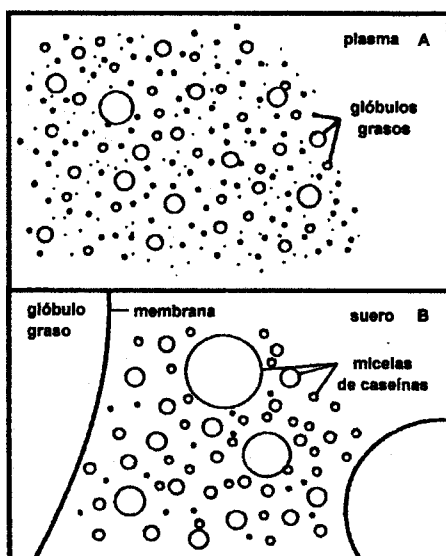
*Nota:* Dentro de los datos se incluyen la mayoría de los datos bibliográficos. Están excluidos los datos del calostro, leche final de lactación y leches mastíticas. Las leches de vacas individuales presentan mayor variación.

<sup>a</sup> Entre paréntesis se da el peso atómico o el del radical.

<sup>b</sup> Sólo el inorgánico.

### 1.1.2 Estructura y propiedades:

Las propiedades de un producto biológico no se establecen totalmente con su composición y la leche no es una excepción; también es conveniente conocer la distribución de sus componentes. Además, son importantes las fuerzas que interactúan entre sus componentes ya que son las responsables de la integridad de todo el sistema bajo diversas condiciones.



**Figura 1.1.** La leche observada a diferentes aumentos. (A) a 500 x, gotas esféricas de grasa flotando en el plasma (turbio). (B) a 500 x, el plasma contiene partículas proteicas, micelas de caseína. El suero restante es todavía opalescente, por lo tanto debe contener otras partículas).

Los principales elementos estructurales se muestran esquemáticamente en la Figura 1.1 Están a escala microscópica o submicroscópica.

En la Tabla 1.3 se muestran en forma simplificada algunas propiedades de los elementos estructurales de la leche.

**Tabla 1.3. Algunas propiedades de los principales elementos estructurales de la leche.**

|                          | Plasma          |                       |                         |                          |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
|                          | Glóbulos grasos | Micelas de caseína    | Suero                   |                          |
|                          |                 |                       | Proteínas globulares    | Partículas lipoproteicas |
| Componentes principales  | Lípidos         | Caseínas, agua, sales | Proteínas del suero     | Lípidos, proteínas       |
| Considerado como:        | Emulsión        | Fina dispersión       | Solución coloidal       | Dispersión coloidal      |
| Diámetro de la partícula | 100-1000 nm     | 20-300 nm             | 3-6 nm                  | ~10 nm                   |
| Visible con:             | Microscopio     | Ultramicroscopio      | Microscopio electrónico | Microscopio electrónico  |
| Separable con:           | Desnatadora     | Ultracentrífuga       | Filtración por gel      | Filtración por gel       |

Exceptuando los glóbulos grasos, todos los demás componentes constituyen el *plasma de la leche*; es similar pero no idéntico a la leche descremada ya que la separación (o descremado) nunca es completa.

Las llamadas *micelas de caseína* se componen de agua, caseínas, compuestos inorgánicos (fundamentalmente fosfato, calcio, magnesio, citrato) y algunos componentes menores, incluidos lipasa y proteinasa; existen vestigios de caseínas que están en solución sin formar parte de esta estructura.

El *siero de la leche* se define como el plasma desprovisto de las micelas de caseína. La eliminación de las micelas de la leche descremada, coagulándolas con renina, origina un líquido que no equivale exactamente al suero lácteo (Tabla 1.3.) fundamentalmente porque contiene algunos polipéptidos derivados de la caseína por acción de la renina: es el llamado *siero de queso*. No obstante, las principales proteínas de ambos sueros son proteínas globulares que se presentan como tales o como pequeños oligómeros.

Las partículas lipoproteicas, llamadas a veces microsomas de la leche, varían en cantidad, composición y forma; están constituidas por restos de membranas celulares, micropelillos, etc.

## **1.2 Proteínas lácteas. Generalidades.**

La leche de vaca contiene ~5.3 g de nitrógeno por kg; a veces el "contenido proteico" se calcula multiplicando el nitrógeno total por cierto factor. Sin embargo sólo un 95% del nitrógeno está en forma de proteínas (~32 g/kg), el 5% restante corresponde a moléculas pequeñas y se lo denomina nitrógeno no proteico. Las proteínas lácteas fundamentales son las *caseínas* y las *proteínas de suero*.

**Caseínas:** Alrededor del 80% de las proteínas lácteas (~26 g/kg) son caseínas; este grupo de proteínas es difícil de definir; la propiedad común que poseen es su baja solubilidad a pH 4.6 y esto permite una clasificación conveniente y operativa. Son además específicas de la leche y con alto contenido de fosfato. Casi toda las caseínas de la leche están formando parte de las llamadas *micelas de caseínas*.

Bajo la denominación de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas llamadas caseínas:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$ , además de algunos derivados formados por la proteólisis de estas cadenas ( $\gamma$ ). Estas cadenas tienen características distintas, todas en general tienden a autoasociarse en las condiciones de pH y fuerza iónica de la leche aunque presentan ciertas diferencias frente a los niveles de calcio y a la temperatura del medio. La caseína- $\alpha_{s1}$  presenta dos regiones predominantemente hidrofóbicas y una polar muy cargada. La caseína- $\alpha_{s2}$  presenta una estructura dipolar. La caseína- $\beta$  presenta un N-terminal muy negativo, el resto no presenta carga neta, es similar a un detergente aniónico: cabeza negativa y cola sin carga, esencialmente hidrofóbica. La característica llamativa de esta cadena es la dependencia de su autoasociación con la temperatura (con o sin calcio). Por ejemplo a 4°C es un monómero y a temperatura ambiente forma polímeros de 20-24 monómeros. La caseína- $\gamma$  es en realidad la porción C-terminal de la caseína- $\beta$  resultante de la acción de la plasmina; los fragmentos más pequeños forman parte de la fracción proteosa-peptona. La caseína- $\kappa$  es una cadena con alto contenido de carbohidratos aunque 1/3 de la misma carece de ellos; se han identificado por lo menos tres oligómeros glicosilados distintos. La porción C-terminal es muy hidrofílica, con una carga negativa considerable, esta característica es clave para mantener estable en solución la porción proteica correspondiente a caseínas.

**Proteínas de suero:** Las proteínas que permanecen en solución a pH 4.6 corresponden a un 19.5- 20% de las proteínas lácteas (~6 g/kg) y se llaman *proteínas del suero de queso* (o *proteínas del suero lácteo*); están constituidas por

un grupo variado de proteínas en el que se incluyen principalmente la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina del suero (sanguíneo) bovino, inmunoglobulinas y péptidos de bajo peso molecular procedentes de la proteólisis de algunas caseínas.

Además, el suero lácteo contiene cierto número de las llamadas proteínas menores y algunas enzimas; en la membrana de los glóbulos grasos se localizan otras proteínas y enzimas que constituyen unos 0.35 g/kg de leche.

La proporción aproximada de cada una de las proteínas lácteas se encuentra esquematizado en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4. Concentración de las proteínas lácteas**

|                                                | Concentración<br>(g/kg) | Porcentaje<br>(P/P) |
|------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Proteína total                                 | 33.0                    | 100.0               |
| Caseína total                                  | 26.0                    | 79.5                |
| - caseína $\alpha_{s1}$                        | 10.0                    | 30.6                |
| - caseína $\alpha_{s2}$                        | 2.6                     | 8.0                 |
| - caseína $\beta$                              | 9.3                     | 28.4                |
| - caseína $\gamma$                             | 0.8                     | 2.4                 |
| - caseína $\kappa$                             | 3.3                     | 10.1                |
| Proteínas del suero                            | 6.3                     | 19.3                |
| $\alpha$ -lactoalbúmina                        | 1.2                     | 3.7                 |
| $\beta$ - lactoglobulina                       | 3.2                     | 9.8                 |
| Albúmina sérica bovina                         | 0.4                     | 1.2                 |
| Inmunoglobulinas                               | 0.7                     | 2.1                 |
| Proteínas de la membrana del<br>glóbulo graso. | 0.4                     | 1.2                 |
| Varias (incluidas proteosa-peptona)            | 0.8                     | 2.4                 |

*Nota:* Valores medios aproximados de varias fuentes<sup>1</sup>



### 1.3 Micelas de caseína: composición, estructura y propiedades

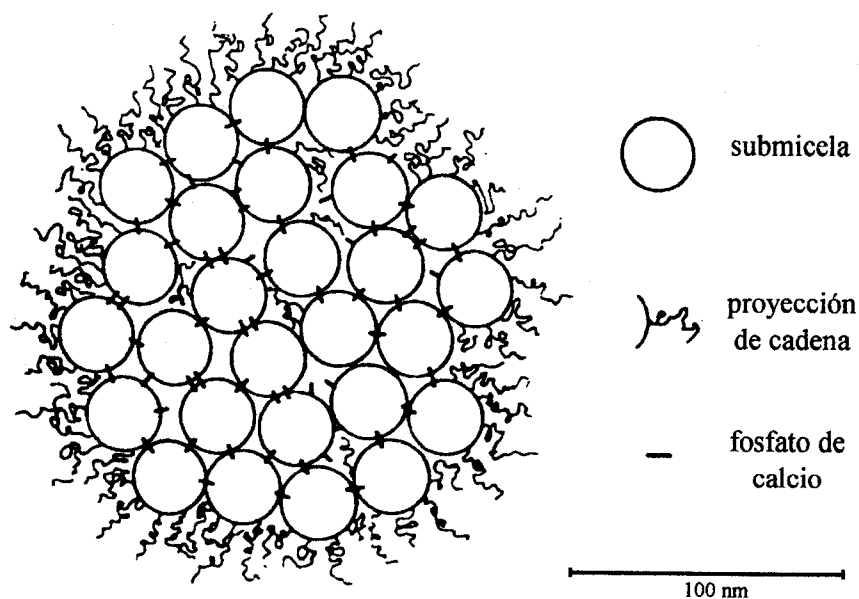
#### 1.3.1 Composición y estructura:

**Composición:** En la leche casi todas las caseínas se presentan como partículas más o menos esféricas, con un diámetro de 20-300nm, que comprenden de 20 a 150.000 moléculas de caseína, son las llamadas *micelas de caseína* (MC). Contienen además, materia inorgánica, principalmente fosfato cálcico (~ 8g por 100 g de caseína). Estas partículas son voluminosas, contienen más agua que caseínas e incluyen también otras proteínas menores como enzimas lácteas (lipasa y plasmina) y parte de la proteosa-peptona.

**Estructura:** La Figura 1.2 ilustra la estructura de las micelas de caseína.<sup>2</sup> Este modelo se ha desarrollado con los años y con la contribución de varios autores<sup>3,4,5</sup> especialmente Schmidt<sup>6</sup> y Schmidt y Payens.<sup>7</sup>

Ya nos referimos a la propiedad de autoasociarse que tienen las caseínas (sección 1.2.), pero muchos estudios: microscopía electrónica, difracción de rayos X,<sup>8</sup> difracción de neutrones,<sup>9</sup> han demostrado que también son capaces de coasociarse formando pequeños agregados de distintos tipos de caseínas, aún en ausencia de calcio. Estos agregados tienen una porción central densa e hidrófoba en la que se sumergen la mayoría de las porciones hidrofóbicas de las distintas caseínas y una capa hidrófila, externa, no tan densa y que contiene la mayoría de los grupos ácidos (carboxílicos y fosfóricos) y algunos de los básicos. No existe acuerdo sobre el tamaño de estas unidades, habiéndose señalado diámetros de 10-15 nm y pesos

moleculares de  $2.5 \times 10^5$ - $2.0 \times 10^6$ , de aquí que contengan entre 15 y 25 moléculas de caseína. La asociación de las caseínas en tales agregados se mantiene por uniones hidrofóbicas, puentes hidrógenos y también por puentes salinos internos.<sup>6</sup> Presentan un equilibrio entre las moléculas libres y las asociadas. Estos pequeños agregados de caseínas se denominan habitualmente *submicelas* y contienen diversas moléculas de caseína.



**Figura 1.2.** Esquema de la sección transversal de una micela de caseína.<sup>2</sup>

Las caseínas se organizan en estas *submicelas* cuando la concentración de las distintas caseínas, pH y fuerza iónica son las de la leche, y la actividad de calcio es menor a la normal ( $<2,5\text{mM}$ ). Al aumentar la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta considerablemente la posibilidad de asociación entre submicelas. Pero las submicelas no son idénticas en composición, básicamente se presentan dos grupos de submicelas: uno rico en caseína- $\kappa$  y otro con poca cantidad de la misma.

Ya hicimos referencia a que la porción C-terminal de la caseína- $\kappa$  es muy hidrofílica, especialmente aquellas que contienen carbohidratos, y que tiene una carga negativa considerable. Esta porción de la molécula se extiende al medio que la rodea como un *pelo* flexible, comportándose como una cadena polimérica enrollada al azar. Existen evidencias de esto a través de estudios hidrodinámicos<sup>10,11,12,13</sup> y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protones en D<sub>2</sub>O los cuales señalan que la  $\kappa$ -caseína tiene una considerable libertad de movimiento.<sup>14,15</sup>

Por lo tanto una *submicela* con alto contenido de caseína- $\kappa$  exhibirá repulsión (estérica y electrostática), al menos en parte de su superficie, y la posibilidad de asociación con otra submicela en tal zona estará dificultada e incluso impedida.

Bajo las condiciones que se dan en la leche (en particular la presencia de fosfato y calcio) las *submicelas* se agregan para dar *micelas*. (La palabra *micela* se está usando en un sentido amplio, como un pequeño agregado de moléculas y no en el sentido estricto de la ciencia de los coloides). El fosfato cálcico actúa como un agente cementante o puente pero se desconoce aún qué enlaces están implicados. Estudios de RMN de protón en D<sub>2</sub>O muestran que las submicelas sueltas tienen una gran libertad de movimiento y en presencia de fosfato de calcio esa libertad se pierde por completo.<sup>15</sup>

Si no hubiera caseína  $\kappa$ , que actúa como coloide protector, la agregación continuaría hasta la formación de un gel o un precipitado. La presencia de una repulsión estérica y electrostática debida a la caseína- $\kappa$  superficial hace que la agregación de las submicelas continúe sólo hasta que la superficie de la micela esté

más o menos cubierta de caseína-κ. Esto no significa que sólo haya caseína-κ en la superficie, está localizada también en el interior entrecruzada con otras caseínas.

Mediante esta estructura la fracción proteica correspondiente a las caseínas se mantiene estable en solución. Sobre este punto volveremos a referirnos (sección 1.3.3.)

**Tabla 1.5. Distribución de algunos componentes inorgánicos entre las MC y el suero.**

| Componentes          | mg por 100g<br>de leche | Porcentaje<br>en el suero | mg por 100g<br>de suero | mg por g de<br>caseína<br>desechada |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Na <sup>+</sup>      | 48                      | 95                        | 49                      | 0.9                                 |
| K <sup>+</sup>       | 143                     | 94                        | 145                     | 3.3                                 |
| Mg <sup>2+</sup>     | 11                      | 66                        | 8                       | 1.5                                 |
| Ca <sup>2+</sup>     | 117                     | 32                        | 40                      | 31.0                                |
| Fosfato <sup>a</sup> | 203                     | 53                        | 116                     | 37.0                                |
| Citrato              | 175                     | 92                        | 173                     | 5.6                                 |

*Nota:* Media de los datos de distintas procedencias.<sup>1</sup>

<sup>a</sup> Fosfato inorgánico, como PO<sub>4</sub>

La fracción mineral dentro de la estructura micelar es muy importante. La Tabla 1.5 muestra la distribución aproximada de esta fracción entre el suero y las micelas.

Las MC contienen una porción importante de fosfato cálcico (sin disolver) y una porción menor de citrato. El primero se denomina habitualmente *fosfato de calcio coloidal* (PCC) no porque se encuentre como tal sino porque forma parte de partículas coloidales; está involucrado en los puentes de unión entre las distintas submicelas que originan las micelas. La composición del PPC ha sido y es aún hoy motivo de mucha controversia. El Ca<sup>2+</sup> también formaría puentes entre las

submicelas.<sup>16</sup> El  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se asocian además, al igual que el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , a las porciones negativas de las proteínas.

Un parámetro muy útil para caracterizar a las MC es la voluminosidad ( $v$ ). Se define como el cociente entre el volumen de las partículas (con el agua asociada) y la masa de las mismas. Ha sido motivo de estudio de muchos investigadores.<sup>17,18</sup> Hay una gran variedad de valores en la literatura (1,5-7,1 ml/g de caseína). Las diferencias radican, fundamentalmente, en cómo se considera la capa pilosa de las micelas. Considerando el volumen de las partículas sin capa pilosa las microfotografías electrónicas indican que la voluminosidad es de aproximadamente 2 ml por gramo de caseína. Aproximadamente la mitad de ese volumen puede corresponder a las submicelas; el resto (situado entre las submicelas) es agua o estrictamente suero. En el interior de las micelas el suero está desprovisto de parte de las moléculas de gran tamaño, ya que el espacio entre submicelas es de unos pocos nanómetros, permitiendo el fácil acceso a muchas moléculas pequeñas de soluto pero impidiéndoselo a las proteínas. Si se toma en consideración la capa pilosa externa la voluminosidad de la micela es mayor, aproximadamente 4 ml por gramo de caseína que es lo determinado por medidas hidrodinámicas (como por ejemplo, coeficiente de difusión, viscosidad intrínseca).

Los pelos son flexibles y tendrían movimiento browniano permanente, aunque son demasiados finos para observarse por microscopía electrónica. El espesor efectivo de la capa pilosa es de al menos 7 nm.

Este modelo de la estructura micelar es el que más concuerda con las observaciones realizadas sobre las propiedades y estabilidad de las MC, incluida la coagulación. Muchos aspectos del mismo son admitidos por todos los investigadores del tema, pero existen otros que son todavía motivo de debate. En los últimos años han surgido otros aportes, por ejemplo la caseína- $\beta$  podría estar involucrada en la formación de puentes (además del PPC y  $\text{Ca}^{2+}$ ) entre las distintas submicelas.<sup>16</sup>

### **1.3.2 Propiedades:**

De la descripción de las MC no resulta sorprendente inferir que no son estáticas, entre las micelas y su entorno se pueden admitir tres equilibrios dinámicos:

1. Entre las moléculas de caseínas libres y las submicelas; una parte muy pequeña de la caseína está en solución verdadera, pero se desconoce exactamente cuánta porque no resulta fácil su separación. El equilibrio depende mucho de la temperatura.

2. Entre el calcio (disuelto y coloidal) y el fosfato. La existencia de este equilibrio dinámico es un prerequisite para el punto 3.

3. Entre las submicelas libres y las micelas. El equilibrio de asociación de las submicelas y, por lo tanto, la distribución de tamaño de las micelas depende principalmente de la cantidad relativa de caseína  $\kappa$ , pero también lo afectan otros factores, especialmente el contenido de fosfato cálcico.

Las micelas de caseína son muy variables, sobre todo si provienen de la leche de vacas diferentes; la composición de caseína cambia, la proporción de caseína  $\kappa$



oscila por ejemplo entre el 9-15%, y esto se refleja en cambios del tamaño medio y voluminosidad de las micelas. Estas variaciones se deben también a la variación del contenido de material inorgánico; varía de 6 a 9 g por 100g de caseína seca.

**Integridad micelar:** Las MC se dispersan a unidades más pequeñas con cualquier tratamiento que, a pH constante, disuelva una porción considerable del fosfato de calcio. Por ejemplo el agregado de agentes quelantes como el citrato o el ácido etilendiaminotetracético (E.D.T.A.), o la diálisis frente a una solución libre de calcio. Las disminuciones pequeñas de PCC no ocasionan cambios significativos del tamaño micelar, aunque pueden ocasionar tanto una desintegración parcial como un aumento de la voluminosidad de las micelas, dejando prácticamente igual su tamaño medio.

La adición de NaCl (un aumento de la proporción  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y de la fuerza iónica) también produce una desintegración parcial, todos estos cambios revierten al llevar la leche a su composición original.

El aumento de pH, da lugar a la precipitación de fosfato de calcio y a la desintegración parcial de las micelas.

Cuando la leche se somete a grandes presiones (por ejemplo, 100MPa durante 1 hora) las micelas se dispersan en submicelas, esta desintegración es irreversible y puede originarse al formarse hidroxiapatita a partir del fosfato cálcico.

Las MC también se disolverán al disociarse las submicelas. Las moléculas de éstas se mantienen unidas debido principalmente a la interacción hidrofóbica y a los enlaces H del interior hidrofóbico de la submicela. En consecuencia el agregado de

grandes cantidades de caotrópicos como urea o cloruro de guanidinio disuelve las micelas, al igual que el agregado de dodecil sulfato de sodio. Las interacciones electrostáticas (es decir los puentes salinos internos) también participan en la unión de las submicelas, y no pueden romperse si no es disolviendo el fosfato cálcico. Los reactivos que rompen las uniones -S-S- no desintegran las micelas por completo.

La disminución de temperatura (por ejemplo a 5°C) afecta mucho a las micelas de caseína; las interacciones hidrofóbicas se debilitan y parte de la caseína, en especial la  $\beta$ -caseína, se disocia de las micelas. La voluminosidad de las mismas aumenta, en parte, debido al aumento de pilosidad ya que las cadenas de caseína  $\beta$  sobresalen de la superficie micelar.<sup>2,19</sup> Una pequeña porción del fosfato de calcio se disuelve. Estos cambios serían los responsables de la desintegración parcial de las MC al bajar la temperatura; a pesar del aumento de voluminosidad su tamaño medio disminuye levemente.

El aumento de temperatura también afecta la estructura micelar pudiendo llegar incluso a la agregación térmica (hecho no explicado muy claramente, desde el punto de vista fisicoquímico, con las teorías propuestas hasta el momento). Dependiendo del valor de temperatura a la que es sometida la leche y del tiempo de exposición a la misma son distintos los efectos producidos sobre las micelas.<sup>1,20</sup>

Para nuestro trabajo resulta interesante conocer lo que sucede al calentar la leche a temperaturas  $> 70^{\circ}\text{C}$ . Si bien las caseínas son bastante estables térmicamente, esta temperatura permite la desnaturalización gradual de las proteínas del suero (especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina). Estas proteínas desnaturalizadas se unen a la

$\kappa$ -caseína de la superficie micelar formando complejos y modificando ampliamente la superficie de la misma y en consecuencia su estabilidad.<sup>21,22</sup> En la formación de estos complejos estarían implicadas uniones por puente -S-S-,<sup>22,23</sup> aunque también jugarían un rol importante las interacciones hidrofóbicas en los estadios iniciales de la formación de estos complejos.

Las modificaciones causadas por la temperatura en las MC afectan la coagulación enzimática de la leche, por esto la acción del calentamiento previo es motivo de innumerables investigaciones.<sup>24,25</sup>

### 1.3.3 Estabilidad de las MC:

En base a la descripción de las MC realizadas hasta este punto y con lo desarrollado en el Apéndice I respecto de los coloides en general se puede inferir que la estructura de las MC no se corresponde con la de un coloide liofóbico estricto. Sin embargo, la teoría electrostática aplicada a la estabilidad de los mismos (teoría D.L.V.O.) es útil y ha sido ampliamente utilizada por muchos investigadores para analizar la estabilidad de las MC.<sup>26</sup>

Existen varios tipos de agregación:

- 1) Simple **floculación**, como ocurre en partículas liofóbicas que llevan eventualmente a la formación de un gel.
- 2) **Fusión** de micelas floculadas en micelas más grandes. En este caso aparecen partículas visibles y probablemente sedimentan.

3) **Adsorción**, por parte de las micelas, de material (macromolecular) que conecte unas con otras y lleva a la formación de un gel.

**Tabla 1.6. Causas de agregación en las micelas de caseína**

| Causa                                       | Agregación reversible? | Agregación a baja temperatura? |
|---------------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 1. Largo tiempo (gelación al envejecer)     | No                     | No                             |
| 2. Alta temperatura (coagulación por calor) | No                     | ...                            |
| 3. Acidez (pH = 4.6)                        | Sí                     | No                             |
| 4. Exceso de Calcio, etc.                   | Sí                     | Sí                             |
| 5. Frizado                                  | Parcialmente           | ...                            |
| 6. Etanol                                   | No                     | ?                              |
| 7. Enzimática                               | No                     | No                             |
| 8. Algunos polímeros                        | Principalmente         | Sí                             |

El primer tipo es el más común en las MC. La fusión se puede observar en la coagulación enzimática y también en la coagulación por alta temperatura.

La Tabla 1.6. muestra una lista de las posibles causas de floculación de las MC, expone además si serán o no reversibles y cómo las afecta la temperatura.

Las causas 1.y 2. no tienen una explicación clara.

La causa 3. corresponde a la precipitación de las caseínas a un pH cercano al punto isoeléctrico.

La causa 4. se puede comparar con un salting out, aunque no completamente. Una alta concentración de PCC lleva a la fusión de micelas; aparentemente los factores responsables de la estabilidad son contrarestados cuando se deposita gran cantidad de PCC. Este hecho ocurre espontáneamente en las leches con la "anormalidad de Utrecht", es decir leches con bajo contenido de citrato y alta actividad de calcio.

La causa 5. es un verdadero salting out que se produce por el aumento de la fuerza iónica ( $\mu$ ), debido al congelamiento del agua. Es prácticamente irreversible, se produce una modificación del PCC que impide su redispersión luego de descongelar.

La causa 6., muy estudiada por Horne y colaboradores,<sup>12,26,27,29,30</sup> es la que llevó a confirmar que la capa peluda es esencial para proveer estabilidad estérica a las MC aunque el efecto electrostático también está presente. El etanol disminuye la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) lo que se traduce en una disminución de la repulsión electrostática, y además disminuye la solubilidad de la porción macropeptídica de la  $\kappa$ -caseína en el medio de dispersión. Este último hecho, sumado a la posibilidad de interactuar que tienen los grupos negativos, causa un enrollamiento de los pelos que finalmente colapsan.

Respecto a la causa 7. la trataremos en detalle (sección 1.3.4.) por ser motivo de este trabajo de tesis.

Notar que a baja temperatura, aún cuando las MC ya han sido modificadas (por acción enzimática, calor, deshidratación, etc.), se manifiestan estables frente a la agregación. Esta estabilidad sería cinética, no necesariamente estabilidad termodinámica. (Apéndice I: estabilidad de coloides)

La teoría D.L.V.O. explica muchas situaciones del comportamiento de las MC, aunque no todas. Hay que tener en cuenta que las MC no cumplen todas las suposiciones de la teoría, por ejemplo no son perfectas esferas homogéneas. Además tienen una estructura muy dinámica frente a los cambios en el medio.

Analizaremos algunas predicciones de la teoría D.L.V.O. aplicadas a las MC.(Apéndice I)

1. A mayor diámetro de las partículas mayor es la energía libre de interacción y las partículas deberían ser más estables. Esto no siempre se cumple en las MC.
2. A altos valores del potencial electrostático superficial ( $\psi_0$ ), o sea a mayor carga superficial, se debiera observar mayor estabilidad. Esto concuerda con lo observado para las MC (al menos en algunos casos).
3. Un aumento de la  $\mu$  produciría una pérdida de la estabilidad (Apéndice I: interacciones electrostáticas). En las MC no siempre es así; el agregado de iones produce disolución del calcio micelar con aumento de la voluminosidad y este hecho promueve mayor estabilidad.

Este punto (contrapuesto a la teoría D.L.V.O.) es el presentado en la literatura como el “más grave” de solucionar para considerar a las MC un coloide liofóbico.<sup>26</sup> La regla de Schulze-Hardy predice que las MC deberían coagular a concentraciones de sales  $\sim 50\text{mM}$  para electrolitos 1-1 y a  $\sim 1\text{mM}$  para electrolitos 2-1.<sup>31</sup> Esto no sucede con la leche donde la concentración libre de  $\text{Ca}^{2+}$  es  $\sim 2,5\text{ mM}$  y la  $\mu$  total es  $\sim 0.075\text{M}$ , es decir que las concentraciones de electrolito para coagular a las MC es mucho mayor que la que predice la teoría D.L.V.O. para un coloide liofóbico estricto.

4. A constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) bajas se debiera producir cierta pérdida de la estabilidad ya que esto causa una disminución de la repulsión electrostática

(Apéndice I). Esto podría ser la explicación para el efecto desestabilizante de los alcoholes en las MC (causa 6. de la Tabla 1.6.)

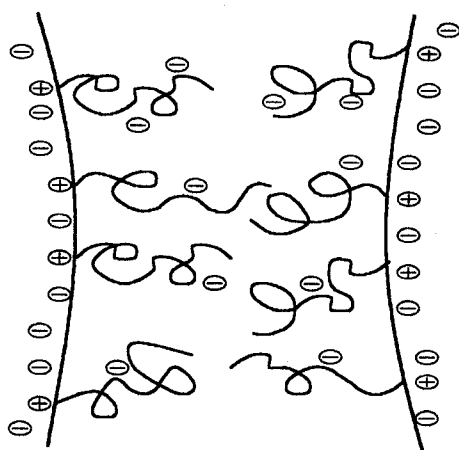
5. Un valor alto de la constante de Hamaker (A) originaría pérdida de la estabilidad (Apéndice I: fuerzas atractivas). Esta constante es una propiedad material y da una medida de las fuerzas atractivas de van der Waals que actúan entre las partículas. Mide la diferencia en propiedades de las partículas y la fase continua (el solvente). Si las MC tienen alta voluminosidad, es decir contienen más solvente, la diferencia entre ellas y el solvente se hace menor, esto origina una A menor que se acompaña con mayor estabilidad. Esto concuerda con la observación general de que la alta voluminosidad de las micelas va acompañada con un aumento de estabilidad.<sup>32</sup>

No obstante haberse señalado algunos acuerdos con la teoría D.L.V.O., hay una serie de observaciones que indican que debe existir un mecanismo adicional para proveer estabilidad a las MC.<sup>26</sup> Se trata de una repulsión estérica causada por los pelos de la  $\kappa$ -caseína.<sup>10,13,27,28,33-35</sup> En la repulsión estérica pueden distinguirse dos mecanismos. Si la presencia de una segunda partícula restringe el libre movimiento de los pelos flexibles sobre la superficie de las partículas, esto siempre causará repulsión. Es el llamado término de *restricción de volumen* y su magnitud es proporcional a la densidad de pelos. Si las capas de pelos de dos partículas se superponen, interpenetran, la calidad del solvente sobre la solubilidad de los mismos determinará que sucederá: si es buen solvente, el llamado término de *mezclado* será repulsivo (repulsión osmótica) y si es un solvente pobre, el término puede ser atractivo. A menudo el término de mezclado es predominante y su



magnitud es proporcional a la densidad al cuadrado de los pelos. Teorías para el cálculo de la repulsión estérica, a diferencia con la teoría D.L.V.O., no están aún disponibles y además son aún muchas las incertidumbres que aparecen al tratar de aplicarlas a las MC. (Ver Apéndice I: repulsión estérica)

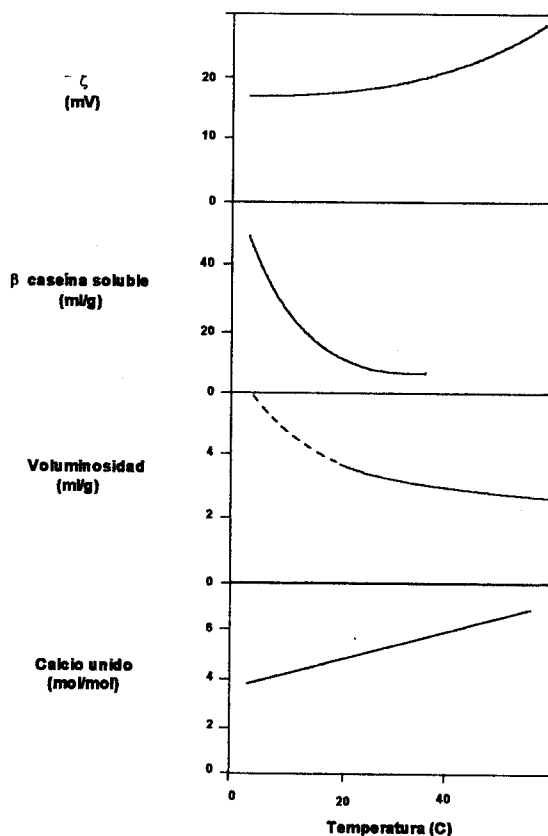
No obstante, hay evidencias de esta repulsión y debe ser importante para explicar por ejemplo que al centrifugar a las MC a alta velocidad, donde los pelos se compactan, empaquetan y deforman materialmente unos contra otros, las MC pueden resuspenderse. Esto no podría explicarse si no hubiese un fuerte componente estérico. Teniendo en cuenta los tres componentes: atractivos (van der Waals), repulsivos (electrostáticos) y estérico se pueden explicar gran cantidad de situaciones de las MC.



**Figura 1.3.** Esquema simplificado de la interacción entre dos micelas de caseína. Configuración de los "pelos" y su carga en la superficie micelar.<sup>2</sup>

La Figura 1.3 representa la superficie micelar sumamente simplificada. Los pelos en sí mismos están cargados, además de la carga propia de la micela (sería un efecto electroestérico: ver Apéndice I) y esto tiene dos efectos. Primero: la repulsión electrostática se extiende a una distancia mayor de la superficie micelar que en el caso de que los pelos no fueran cargados o no estuvieran. El espesor de la doble capa eléctrica, es decir la distancia sobre el cual el potencial electrostático disminuye (debido a la protección de los contraiones) a  $1/e$  de su valor en la superficie, es en la leche cerca de 1.1 nm (en presencia de pelos no cargados o en ausencia de ellos)<sup>32</sup> mientras que el espesor de la capa peluda es más amplia, no menos de 7 nm. Segundo: la carga afecta la conformación de los pelos en sí misma. A valores altos de pH la carga de los pelos es predominantemente negativa y esto provoca un estiramiento de los mismos extendiéndose a mayor distancia de la superficie micelar. A valores bajos de pH se producen más cargas positivas, quedan menos cargas negativas y esto produce un enrollamiento de los pelos. Al pH isoeléctrico no hay capa peluda cargada.<sup>2</sup>

La temperatura es una variable interesante para analizar en relación a la estabilidad de las MC ya que introduce evidencias importantes del componente estérico.



**Figura 1.4.** Propiedades de las micelas de caseína a pH fisiológico en función de la temperatura. Potencial electrocinético:  $\psi_\zeta$  o  $\zeta$ . Porcentaje de  $\beta$ -caseína soluble en el sobrenadante luego de una centrifugación a alta velocidad. Voluminosidad ( $v$ ) de las micelas

La Figura 1.4 muestra que a bajas temperaturas la voluminosidad de las micelas es alta y esto presumiblemente se debe a una proyección hacia el exterior de la caseína  $\beta$  que provee una repulsión estérica adicional.<sup>13</sup> La alta voluminosidad se puede traducir en una baja constante de Hamaker y todo contribuye a una mayor estabilidad a bajas temperaturas.

El valor absoluto del potencial electrocinético ( $\psi_\zeta$ ) (estimación de  $\psi_0$ ) es más bajo a bajas temperaturas. Si analizamos esto con la teoría D.L.V.O. se podría

predecir una pérdida de la estabilidad. Sin embargo, nos encontramos con un aumento de estabilidad (aunque sea cuestionable la medición de potencial en estas condiciones) y una adsorción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  disminuída. La explicación probable radica en el hecho de que el espesor de la capa de pelos produce que el plano de corte donde se mide el potencial esté más allá de la superficie micelar, es decir a una distancia donde ya ha decaído considerablemente el valor del mismo.

Considerando nuevamente la información de la Tabla 1.6 respecto al marcado efecto de la temperatura sobre la velocidad de agregación de las MC bajo ciertas condiciones, es necesario señalar que esto no indica que las uniones hidrofóbicas son las responsables de mantener unidas a las micelas luego del contacto. Es indudable que la fuerte repulsión estérica que se produce a bajas temperaturas por la proyección de los pelos de la  $\beta$ -caseína tienen su origen en las uniones hidrofóbicas que ligan a la  $\beta$ -caseína y que en estas condiciones se encuentran debilitadas; pero eso causa un aumento de la energía libre de activación para la agregación y no una débil energía de unión entre micelas. Esto se evidencia muy bien al observar los valores del módulo de corte para geles obtenidos por acción enzimática o ácida, los cuales aumentan considerablemente a bajas temperaturas.<sup>37,38</sup> Si las uniones hidrofóbicas fueran las responsables de mantener unidas a las micelas en los geles estos módulos disminuirían e incluso los geles podrían disolverse.

En la sección 1.3.2. (Integridad micelar) se describieron los cambios superficiales producidos por tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 70°C. Los complejos formados entre la  $\beta$ -lactoglobulina desnaturalizada y la  $\kappa$ -caseína de las

MC producen cambios superficiales que modifican el componente estérico de las mismas. Este punto será analizado en este trabajo de tesis.

#### 1.4 Coagulación enzimática:

Una de las causas de agregación planteadas en la Tabla 1.6, específicamente la causa 7., corresponde a la acción enzimática sobre las MC. Desarrollaremos esta causa (con sus aspectos cinéticos) como parte de un proceso más complejo y muy importante, cual es la coagulación enzimática de la leche.

La coagulación enzimática involucra tres procesos:

- 1) *Hidrólisis enzimática*: la quimosina u otra enzima proteolítica escinde la porción macropeptídica de la  $\kappa$ -caseína y genera micelas de para caseína (MpC).
- 2) *Floculación* de las recién formadas MpC.
- 3) *Formación y desarrollo de la estructura de gel*.

##### 1.4.1 Hidrólisis enzimática:

La hidrólisis enzimática es la primera etapa en la coagulación de la leche. La reacción involucra la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína para formar *micelas para caseína* (MpC) y caseinomacropéptidos (CMP). La velocidad de la reacción enzimática se determina por la liberación de los CMP solubles<sup>39</sup> o por la formación de *para caseína* luego del agregado de enzima.<sup>40</sup>

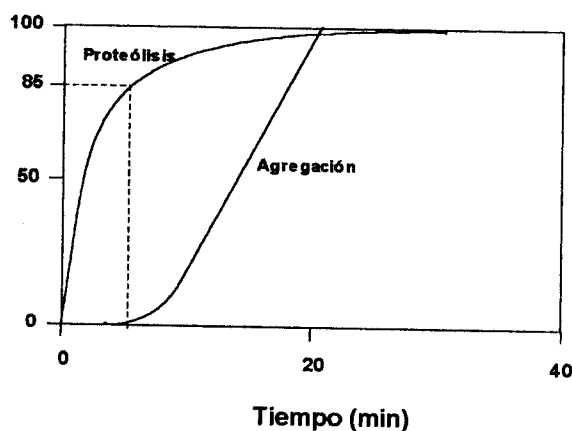
La enzima habitualmente usada es la quimosina (a veces llamada renina), una endopeptidasa que constituye el principio activo de la renina. Se sintetiza en el

abomaso (cuarto estómago) de los terneros jóvenes como un precursor denominado proquimosina o prorenina. La quimosina, al igual que otras endopeptidasas, escinde especialmente el enlace Phe-Met de la caseína  $\kappa$ , es decir el enlace entre el resto 105 de la fenil alanina y el 106 de la metionina. Es una reacción relativamente rápida, también se escinden los péptidos más pequeños que tienen ese mismo enlace pero lo hacen a mucho menor velocidad. La *para caseína* es insoluble en el suero lácteo aún en ausencia de calcio, pero las *micelas de para caseína*, es decir en presencia de las otras caseínas, pueden mantenerse en suspensión. Los CMP en cambio son muy solubles y no forman asociaciones; en el suero se presentan como una estructura extendida casi como un rollo al azar. Los CMP son muy heterogéneos en cuanto a su contenido glucídico. A los macropéptidos ricos en grupos glucídicos se los denomina *glicomacropéptidos* (GMP); se han planteado técnicas analíticas para diferenciarlos del otro grupo pobre en componentes glucídicos.

La reacción de hidrólisis ha sido interpretada por una cinética de Michaelis-Menten. La energía de activación de esta reacción se encontró alrededor de 10 kcal/mol.<sup>39</sup> La velocidad es pH dependiente y alcanza un máximo cerca del pH 5.6. La ecuación de velocidad no es sencilla debido a que la enzima reacciona o se une a otros péptidos.

### 1.4.2 Floculación de las micelas de para caseína (MpC):

Luego de la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína se produce la floculación de las MpC. Estas micelas “peladas” han perdido la acción estabilizante de la  $\kappa$ -caseína. No obstante, la acción enzimática no destruye las micelas aunque cambie algunas de sus propiedades: la voluminosidad media se reduce ampliamente, el valor absoluto del  $\psi_\zeta$  disminuye aproximadamente en un 40%.<sup>39</sup> Estos cambios disminuyen la repulsión entre micelas; ahora pueden aproximarse mucho entre sí y flocular.



**Figura 1.5.** Esquema de las etapas de la coagulación de la leche. Porcentajes del grado de escisión o hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína y de la agregación de las micelas de paracaseína en función del tiempo transcurrido luego de adicionada la renina. Varias procedencias.

Como se observa en la Figura 1.5 solamente floculan cuando se ha escindido la mayor parte de la  $\kappa$ -caseína. Esto concuerda con lo postulado por Walstra respecto a que aún la presencia de un pelo puede causar repulsión, por lo tanto es necesario escindir la mayoría (~ 60-85%) para que la floculación ocurra.<sup>2</sup> El % es variable de

acuerdo a los autores y a las técnicas utilizadas para detectar el avance de la hidrólisis enzimática.<sup>1,40</sup>

Las fuerzas involucradas en mantener juntas las MpC floculadas no serían sólo las de van der Waals, éstas serían muy débiles en las micelas pequeñas (Ver Apéndice I: fuerzas atractivas). Existen pruebas de que estarían involucradas interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivamente que quedan expuestos luego de la hidrólisis; el bloqueo de esos grupos evita la coagulación.<sup>19</sup> Podrían estar involucrados enlaces hidrofóbicos por la dependencia que existe con la temperatura de la velocidad de coagulación, pero sólo parcialmente (recordar lo planteado en el último párrafo de la sección 1.3.3.). Una vez que las micelas han floculado pierden su identidad, es decir se funden en unidades mayores. En la región micelar posiblemente tiene lugar una redistribución del fosfato cálcico y entre las MpC puede observarse una unión similar a la que ocurre entre las submicelas para dar las micelas de caseína.

Luego plantearemos los aspectos cinéticos de esta segunda etapa.

### **1.4.3 Formación y desarrollo del gel:**

La floculación de las MpC forma al principio agregados pequeños que tienen a menudo una forma irregular y elongada. Luego los agregados se organizan en una red con poros de unos pocos micrometros de diámetro. Los glóbulos grasos se engloban en la red pero no forman parte de ella, a menos que tengan caseínas en la superficie. Tan pronto como se organiza la red tridimensional se produce la

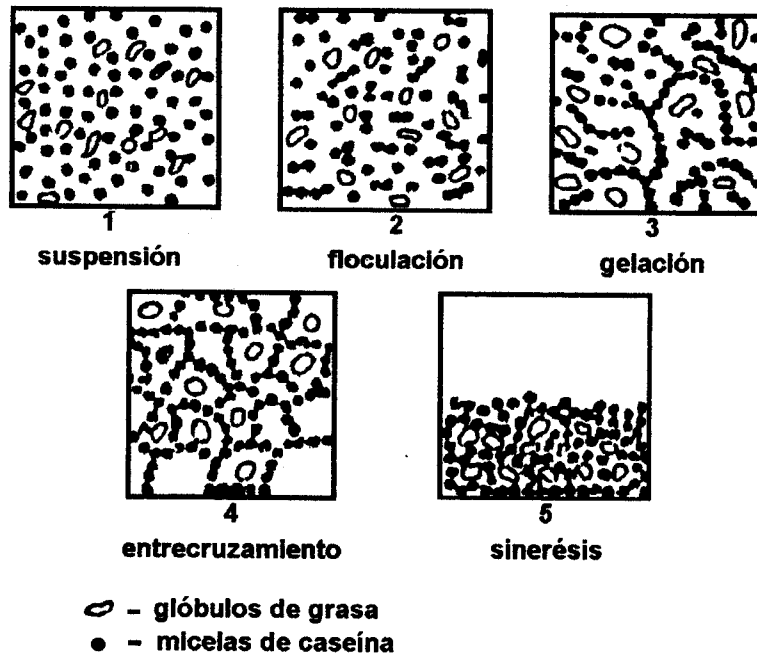


gelificación o, para utilizar un término más común, la coagulación. En poco tiempo el gel se hace más firme, lo que implica la formación de nuevos y más enlaces entre las MpC; este proceso continúa con un empaquetamiento más compacto: se ha formado el coágulo. Luego se produce la expulsión de líquido (*suero de queso*) desde el coágulo, es la denominada etapa de sinéresis.

La formación de nuevos enlaces está dificultada porque la rigidez de la red esconde o protege los lugares reactivos de las MpC impidiendo que contacten unas con otras. Probablemente antes de que se formen nuevos enlaces deben romperse otros, una prueba es la poca tendencia a la sinéresis por parte del coágulo. En la práctica se la favorece aplicando externamente gradientes de presión y cortes sobre la cuajada. No obstante el centro de la cuajada presenta poca sinéresis y lograr el equilibrio o distribución homogénea de humedad requiere de mucho tiempo.

Hay factores propios de esta etapa que decidirán las características del producto final como por ejemplo: tamaño de las cubetas que contienen la cuajada, gradientes de presión utilizados, tiempo de corte, etc.; pero hay otros factores que también influyen fuertemente y su acción comienza en las etapas anteriores (la enzimática y de floculación). Ellos son: los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH, temperatura, fosfato de calcio coloidal de las micelas, etc. Estos parámetros se encuentran muy relacionados entre sí.

En la Figura 1.6 se puede observar un esquema de las etapas de la coagulación enzimática de la leche.



**Figura 1.6.** Ilustración de las etapas de la coagulación enzimática de la leche. 1. Suspensión 2. Floculación 3. Gelación. 4. Entrecruzamiento 5. Sinéresis.

#### 1.4.4 Aspectos cinéticos de la floculación:

En 1917 von Smoluchowski presentó lo que se recuerda como la teoría original que describe la cinética de aglomeración de partículas coloidales. Esta teoría predice que la velocidad de disminución de la concentración en número de partículas independientes ( $N$ ) de una solución seguiría una cinética de segundo orden, es decir que:

$$\frac{\partial N(t)}{\partial t} = -k_2 N^2(t) \quad 1.1$$

donde  $k_2$  es constante de velocidad de segundo orden. Para el caso de partículas no cargadas, en ausencia de repulsión, no interactuantes excepto cuando hacen contacto (ver Apéndice),  $k_2$  está dada por la siguiente expresión:

$$k_2^0 = \frac{8 k_B T}{3 \eta} \quad 1.2$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad del medio. Esta es la expresión que se le asigna a la *floculación rápida* (ver apéndice) y plantea, sobre la base de un estado estacionario, la velocidad a la cual dos partículas esféricas idénticas se encuentran una con otra cuando se mueven por movimiento Browniano en un medio de viscosidad  $\eta$ . En el caso de situaciones donde no se cumplan todas las premisas planteadas como por ejemplo, partículas no esféricas o de distinto tamaño, etc. estas expresiones pueden cambiar (aunque no significativamente).

Para muchos coloides el valor de la constante de segundo orden es mucho menor que el planteado por la ec. 1.2. Este es el caso de las micelas de caseína. La diferencia se atribuye, tal cual se planteara en el Apéndice I, a la existencia de un impedimento o resistencia a la floculación que origina una barrera de energía entre las partículas y que evita el contacto de las mismas cuando difunden con movimiento Browniano. Como se demostrara en el Apéndice, la expresión de  $k_2$  para partículas esféricas en estas condiciones está dada entonces por la siguiente expresión:

$$k_2 = \frac{k_2^0}{2R \int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx} = \frac{k_2^0}{W} \quad 1.3$$

y esta expresión corresponde a la *floculación lenta*.

En esta ecuación  $R$  es el radio de la partícula,  $x$  es la distancia,  $\Phi$  es la función de energía potencial que describe la energía potencial de interacción entre las partículas y  $k_2^0$  es el valor límite de  $k_2$  cuando  $\Phi = 0$  (es decir en ausencia de barrera) y está dado por la ec. 1.2. Por otro lado  $W$  es el denominado factor de estabilidad y su valor está señalando cuánta dificultad existe para que ocurra el fenómeno de floculación; adopta el valor 1 cuando  $\Phi = 0$  (es decir cuando no hay barrera) y valores mucho mayores que 1 cuando existe una barrera de energía que se opone al proceso.

Cuando desarrollamos las teorías que explican la estabilidad de los coloides en general, para posteriormente aplicarlas a las MC, analizamos la complejidad en conocer la dependencia del  $\Phi$  con la distancia. Mediante simplificaciones y aproximaciones de la teoría electrostática D.L.V.O. se obtuvieron algunas expresiones, al menos para el potencial atractivo de van der Waals y el repulsivo electrostático. Se discutió más cualitativamente el fenómeno de la repulsión estérica debido a la presencia de pelos de  $\kappa$ -caseína que actúan como porción estabilizante. En este caso, cuando se plantea la floculación por previa acción enzimática, debemos evaluar la estabilidad de las MpC; la situación y expresiones son semejantes, excepto en algunas situaciones que iremos detallando oportunamente.

La función de energía potencial,  $\Phi$ , tiene (tal cual fuera discutido en el Apéndice) tres componentes; un potencial atractivo,  $\Phi_A$ , debido a las fuerzas atractivas de van der Waals, un potencial repulsivo electrostático,  $\Phi_R$ , debido a la presencia de una doble capa eléctrica alrededor de la partícula y por último un potencial estérico,  $\Phi_E$ , que puede ser atractivo o repulsivo de acuerdo a las condiciones y para el cual no hay una expresión que lo refleje enteramente y corresponde a los fenómenos estéricos debidos a la presencia de los pelos de la  $\kappa$ -caseína que se proyectan al medio. Se podría plantear:

$$\Phi_{\text{neto}} = \Phi_A + \Phi_R + \Phi_E \quad 1.4$$

La determinación de ese  $\Phi_{\text{neto}}$  es muy complicada en sí misma y se agrava debido al hecho de que cada componente va cambiando a medida que las partículas interactúan.

Si recordamos las expresiones de los potenciales, el atractivo resultaba así:

$$\Phi_A = -\frac{AR}{12x} \quad 1.5$$

donde A es la denominada constante de Hamaker, R es el radio de la partícula y x es la distancia de separación entre las mismas.

Para el caso de potencial repulsivo surgía:

$$\Phi_R \approx \frac{1}{2} \epsilon R \psi_0^2 \exp(-\kappa x) \quad 1.6$$

MSP

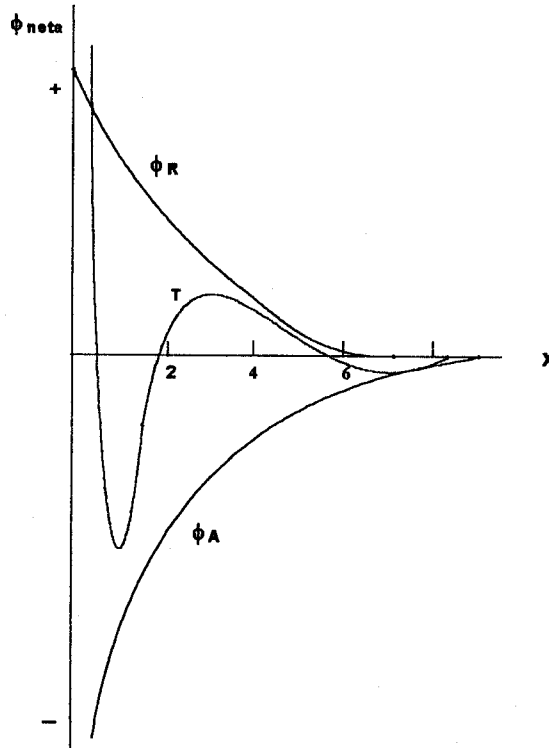
donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio,  $\psi_0$  es el potencial superficial de las partículas,  $R$  y  $x$  fueron ya definidos, y  $\kappa$  es la inversa de el "espesor" de la doble capa eléctrica y tiene la siguiente expresión:

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A \mu}{1000 \epsilon k_B T}} \quad 1.7$$

donde  $e$  es la carga del electrón,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $\mu$  es la fuerza iónica,  $k_B$  constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura. A su vez  $\mu$  se puede expresar:

$$\mu = 1/2 \sum z_i^2 M_i \quad 1.8$$

donde  $z_i$  es la carga de los iones y  $M_i$  es la concentración molar de los mismos. La Figura 1.7 muestra un perfil del potencial atractivo y repulsivo entre dos partículas en función de la distancia.



**Figura 1.7.** Perfil ilustrativo del potencial atractivo y repulsivo entre dos partículas en función de la distancia.

Para el potencial estérico no planteamos expresiones, el análisis fue amplio pero siempre cualitativo.

Por lo planteado observamos que el  $\Phi_{\text{neto}}$  depende (entre otras cosas) del  $\psi_0$ , el cual no es posible medir en forma directa, sin embargo se puede estimar con el potencial electrocinético o potencial zeta,  $\psi_\zeta$ . Este es un potencial superficial aparente de una partícula cargada cuando se mueve en un líquido dentro de un campo eléctrico. Físicamente representa el potencial eléctrico en un plano de corte en algún punto fuera de la superficie de la partícula cargada. Numericamente es menor que el  $\psi_0$  pero es útil como estimación. (ver apéndice). Existen datos de  $\psi_\zeta$  para MC y también para micelas de para  $\kappa$ -caseína que son las que nos interesan en el proceso de floculación y reflejan una disminución en el valor absoluto de  $\psi_\zeta$  de un 40% luego de la acción enzimática.<sup>41</sup> Los  $\psi_\zeta$  en el caso de micelas atacadas por enzima (MpC) no son fáciles de medir debido a que coagulan inmediatamente. Esto se evita manteniendo, durante la determinación, temperaturas bajas ( $< 10^\circ\text{C}$ ) donde las MpC no coagulan, pero como el potencial también depende de la temperatura no permite comparar con los valores correspondientes a las MC a otras temperaturas; son sólo estimaciones y tendencias.

El  $\Phi_{\text{neto}}$  también depende de la  $\mu$  del medio. Un aumento de la misma produce una disminución del espesor de la doble capa eléctrica alrededor de la partícula, esto permite un acercamiento mayor de las mismas y las fuerzas atractivas actuando a corto rango producen la floculación de las mismas. En principio esta sería la forma

de actuar de la  $\mu$  en los coloides liófilos, pero las MC y las MpC sufren cambios ante el agregado de sales, hay cierta proyección de la  $\beta$ -caseína hacia el medio, disolución del calcio micelar etc., hechos que indudablemente causan un aumento de la voluminosidad lo que implica una disminución de la A (constante de Hamaker) y en consecuencia disminución de las fuerzas atractivas promoviéndose mayor estabilidad. Si habrá o no estabilidad depende de los valores de la  $\mu$ , de la sal utilizada para conseguir esos valores, etc., estas cuestiones serán evaluadas en este trabajo de tesis.

El  $\Phi_{\text{neto}}$  también depende de las diferencias entre el solvente y las partículas, esto se refleja en los valores de la A y en consecuencia en el componente atractivo. También depende de la calidad de solvencia del medio sobre los pelos lo que puede analizarse a través de la estabilidad estérica y puede traducirse en repulsión o atracción entre las partículas.

Si las MC o MpC serán estables en un determinado medio depende de una serie de interacciones que deben considerarse en cada caso en un intento por aclarar cuál de ellas predomina .



### **1.5. Objetivos de la tesis:**

El objetivo general fue estudiar, dentro de las propiedades fisicoquímicas, la estabilidad de las *micelas de caseína* bovina luego de la acción enzimática.

Se plantea realizar el estudio a través de medidas de la velocidad de agregación (segunda etapa de la coagulación enzimática) y utilizando la turbidimetría como técnica.

Para realizar lo propuesto se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Poner a punto técnicas que permitan verificar la separación de la etapa proteolítica de la de agregación.
2. Desarrollar y optimizar técnicas que permitan caracterizar a las micelas de caseína, antes de la acción enzimática, en todas las condiciones propuestas para el estudio. Estas técnicas incluyen estimar tamaño, forma, concentración, etc.
3. Optimizar el uso de técnicas cinéticas que permitan obtener valores de la velocidad de agregación por medidas de turbidez.
4. Comprobar si la teoría de von Smoluchowski para la agregación de partículas coloidales limitada por difusión (DLA) se cumple en este sistema. Se plantea evaluar la velocidad de agregación frente a la concentración de caseína, temperatura y viscosidad del medio.
5. Preparar micelas de caseínas modificadas superficialmente y posteriormente verificar si la teoría de von Smoluchowski se cumple en este nuevo sistema. Las micelas de caseínas modificadas se plantea obtenerlas por calentamiento.

6. Estudiar la velocidad de agregación de las micelas con y sin modificación frente a otras variables que permitan obtener información de los mecanismos estabilizantes de las mismas luego de la acción enzimática. Se plantea evaluar:

\*El efecto de iones monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ).

\*El efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio.

\*El efecto del pH del medio.

## APÉNDICE: Estabilidad coloidal.

### A.1 Coloides. Generalidades.

**Definición:** Definir un coloide no es simple. En una **solución homogénea o verdadera** existe una mezcla de especies diferentes que se dispersan como moléculas individuales y donde el tamaño molecular de los materiales es comparable y generalmente no mayor a 1nm. Sin embargo, hay una gran cantidad de sistemas donde una fase es dispersada en otra en unidades mucho mayores que las unidades moleculares (clásicos soles) o sistemas donde el tamaño molecular del material dispersado es mayor que el de la fase continua (por ej. una macromolécula en agua). Tales sistemas se denominan *coloides*.

En general es un sistema consistente en una sustancia (la fase dispersada: sólida, líquida o gaseosa) "finamente dividida" y distribuida en una segunda sustancia (el medio de dispersión o fase continua: sólida, líquida o gaseosa).

No hay un acuerdo total con respecto al tamaño de la fase dispersada para establecer si se trata de un coloide. La bibliografía establece, en base a los casos, para la expresión "finamente dividida" un rango de 1-1000nm, sin embargo hay sistemas de tamaños mayores a 1000nm y son coloides por sus características.

Hay moléculas de soluto que tienen dimensiones por sí misma mayores a 1000nm (por ej. macromoléculas) y que dispersadas en un disolvente forman un coloide, a estos se los denomina: *coloides obligados*.

Hay otros, llamados *coloides de asociación* que consisten en un gran número de unidades o moléculas que se asocian en un sistema dinámico constituyendo al mismo tiempo un sistema coloidal y una solución, por ejemplo las micelas, bicapas, vesículas.

Ultimamente la definición en uso sería "*Si parece un coloide y actúa semejante a un coloide es un coloide, despreciando cualquier otra restricción*".<sup>42</sup>

Hay otros tipos de coloides y también coloides múltiples (sistema con varios tipos de coloides) en los que la complejidad crece de acuerdo al número de coloides que lo constituyen.

**Clasificación:** De acuerdo a la estructura de las fases surgen clasificaciones útiles en el campo de los coloides.

La primera es la originada por la naturaleza de las fases: *aerosoles* (sólidos o líquidos dispersados en gas), *emulsiones* (líquidos dispersados en líquidos), *dispersiones coloidales* (sólidos dispersados en líquidos), *espumas* (gases dispersados en líquidos o sólidos), *geles* (líquidos en sólidos) y las *suspensiones sólidas* (sólidos dispersados en sólidos).

Otra clasificación muy conveniente es la establecida por Freundlich que clasifica a los coloides de acuerdo a la afinidad de la fase dispersada por la fase continua. Cuando no tienen afinidad por la fase continua se denominan *coloides liófilos* y cuando presentan dicha afinidad *coloides liófilos*. Si la fase continua es agua se denominan *hidrófobos* e *hidrófilos* respectivamente. Estos últimos podrían ser

soluciones homogéneas o dispersiones coloidales (aquí toma importancia el tamaño de las unidades dispersadas).

**Tabla A.1.** Características diferenciales entre los coloides liófilos y liófilos.

| LIOFILOS                                                                                                              | LIOFÓBOS                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Admiten altas concentraciones de fase dispersa.                                                                       | Estables sólo a pequeñas concentraciones de fase dispersa.         |
| No son afectados por altas concentraciones de electrolitos. Desestabilizados por altas concentraciones (salting out). | Facilmente precipitados por bajas concentraciones de electrolitos. |
| Estables a la diálisis (remoción de electrolitos)                                                                     | Inestables a la remoción de electrolitos por diálisis.             |
| Se dispersan reversiblemente luego del secado por evaporación.                                                        | Coagulan irreversiblemente por desecación.                         |
| Coagulan dando geles.                                                                                                 | Coagulan dando gránulos.                                           |
| Efecto Tyndall y dispersión de la luz débiles.                                                                        | Efecto Tyndall y dispersión de la luz fuertes.                     |
| Tensión superficial menor que la del medio dispersante.                                                               | Tensión superficial similar a la del medio dispersante.            |
| Viscosidad muy aumentada respecto de la del medio dispersante.                                                        | Viscosidad poco aumentada respecto de la del medio dispersante.    |

**Estabilidad:** La etapa siguiente a la definición de un coloide es establecer que se entiende por estabilidad e inestabilidad del mismo.

En este punto es útil la clasificación en liófilos y liófilos. A estos últimos Kruyt (1952) los denominó **reversibles** debido a la fácil redispersión que presentaban en el caso de una separación de fases. A los liófilos en cambio los denominó **irreversibles** por presentar el efecto opuesto, es decir no se redispersan facilmente una vez separados. Esto está indicando que la dispersión de un coloide liófilo es espontánea mientras que la de un liófilo no lo es. En términos termodinámicos, un

sistema espontáneamente tenderá a alterar su condición (química y/o física) en un esfuerzo por llegar a la condición de mínima energía libre total. Esto sin mencionar la rapidez con que ocurrirá la transformación o si el sistema pasará por estados intermedios o de configuración metaestable.

**Estabilidad de coloides liófilos:** La dispersión de un coloide liófilo o reversible en un disolvente adecuado implica una disminución de la energía libre (proceso espontáneo) para obtener un sistema (coloidal) que será **termodinámicamente estable**. En este caso son importantes las interacciones de las moléculas de la sustancia dispersada (alguna macromolécula por ej.) con las del dispersante en el seno de la solución.

Estos sistemas suelen estudiarse, desde el punto de vista termodinámico, con enfoques similares a los utilizados para soluciones verdaderas. Los cambios de energía libre, entalpía y entropía que se producen en el proceso de solubilización de una macromolécula en un disolvente dado pueden calcularse de diversas maneras.<sup>43,44,45,46,47</sup> Varias teorías (del desarrollo del virial, de Flory y Huggins, etc.) desarrollan el cálculo de  $\mu_0$  y  $\mu_1$ , potenciales químicos del disolvente y del soluto respectivamente, a través de distintos modelos propuestos para la disolución. Para concentraciones en las que  $\mu_0 < \mu_0^0$ , donde  $\mu_0^0$  es el potencial químico del disolvente puro en las condiciones de trabajo, la macromolécula será soluble dando una solución coloidal estable. Para concentraciones en las que  $\mu_0 \geq \mu_0^0$  el exceso de

soluto por encima de una concentración  $S_1$  se separará como soluto sólido.  $S_1$  es la llamada solubilidad de la macromolécula en el disolvente considerado.

La solubilidad es función del *sistema disolvente*, constituido por el disolvente mismo y otros solutos tales como sales desnaturalizantes, etc., denominados *cosolventes*. Timasheff y colaboradores expresan la calidad del sistema disolvente a través del parámetro de **interacción preferencial**.<sup>48,49</sup>

Cuando los valores de este parámetro son negativos, es decir que el agregado de cosolvente está provocando un aumento de  $\mu_0$ , ese cosolvente será excluido de la superficie proteica con la consiguiente hidratación preferencial de la misma. Estos cosolventes en alta concentración son utilizados como precipitantes de las proteínas globulares (salting out). Los ejemplos para este caso lo constituyen los azúcares (glucosa, sacarosa), glicerol y otros polioles, aminoácidos, sales neutras (en concentraciones de 1 hasta 4M). La exclusión puede deberse a distintas causas que dependen de si el cosolvente es inerte con respecto a la superficie proteica (exclusión estérica o por efectos sobre la tensión superficial del agua) o si reconoce sitios químicamente particulares en la superficie de la cual es rechazado (efecto solvofóbico o por repulsión de cargas). Los cosolventes precipitantes de las proteínas globulares presentan la característica común de que a bajas concentraciones producen, debido a la mencionada hidratación preferencial, una estabilización de las estructuras nativas de las mismas.

Cuando los valores del parámetro de interacción preferencial son cercanos a cero o pequeños, es decir que el agregado de cosolvente no provoca cambios importantes

de  $\mu_0$ , ese cosolvente no produce separación de fases, más bien colabora (aún a concentraciones bajas) con la solubilización de la proteína (salting in). Ejemplos de este grupo son el KSCN,  $\text{MgCl}_2$ .

**Estabilidad de coloides liófilos:** En el caso de un coloide liófilo o irreversible la dispersión se lleva a cabo con un aumento de energía libre. La asociación de sus partículas o separación de fases progresa con disminución de la energía libre (proceso espontáneo). Esta asociación puede ser no deseada y se puede prevenir imponiendo (por algún mecanismo) una barrera que evite la transformación de manera que el sistema permanezca en un estado metaestable por algún tiempo que resulte útil o vital para alguna aplicación.

En un coloide liófilo, la energía necesaria para la transformación de estados está dada por las colisiones al azar de las partículas coloidales o moléculas en el medio de dispersión, este es el denominado movimiento browniano. La energía traslacional promedio (por partícula) debida a este mecanismo es  $\frac{3}{2} k_B T$ , siendo  $k_B$  la constante de Boltzman y  $T$  la temperatura, resultando la energía a temperatura ambiente (298K) para una partícula promedio de  $\sim 5 \times 10^{-21}$  J. Para dos partículas colisionando la energía promedio involucrada es  $\sim 10^{-20}$  J.

Si entre las partículas existe una barrera de energía equivalente a unos  $n k_B T$ , la probabilidad de colisiones con suficiente energía como para superar la barrera estará en relación al valor de  $n$ , es decir, a mayor valor de  $n$  menor es la probabilidad de que dos partículas hagan contacto. A los fines prácticos, un valor



de  $n=10$  es habitualmente citado como representante de un coloide considerado estable. Por el contrario, si una barrera es disminuida a un valor de  $n$  cercano a uno sera inducida la inestabilidad.

Hasta ahora las definiciones fueron en términos de estados energéticos sin considerar los tiempos, es decir la cinética de los procesos.

A los fines prácticos el término metaestable puede confundir. Habitualmente se describe a un coloide como **estable** si permanece en un estado energéticamente metaestable por un tiempo arbitraria o funcionalmente fijado y se considera **inestable** si el sistema comienza a perder propiedades coloidales (por ejemplo grado de dispersión o tamaño, etc) antes que el tiempo predeterminado haya pasado. No necesariamente tiene que llegar al estado termodinámicamente estable que sería la separación de fases e íntimo contacto entre las unidades dispersadas.

Pero estos términos también son relativos y deben ser utilizados en el contexto de una aplicación. Es decir, un coloide puede mantener sus características por 2 días y ser considerado estable mientras que otra aplicación puede requerir un mínimo sin cambios de 2 años y ser por lo tanto inestable en el caso anterior.

En este punto es necesario establecer cómo está formada la barrera de energía que permitirá establecer la estabilidad de un coloide liofóbico. Son dos los componentes principales que deciden la intensidad de la barrera y ellos son las fuerzas atractivas y las fuerzas repulsivas.

## A.2 Fuerzas atractivas:

Dos partículas coloidales de la misma composición se atraen entre sí por una serie de interacciones que en forma general se denominan fuerzas atractivas de Van der Waals. Las principales interacciones involucradas en estas fuerzas son las siguientes: dipolo permanente-dipolo inducido (ecuación de Debye), dipolo permanente-dipolo permanente (ecuación de Keesom) y dipolo inducido-dipolo inducido (ecuación de London). Tienen siempre signo negativo y la intensidad de las mismas depende de la distancia con la inversa de la sexta potencia. Cuando la distancia entre los centros de las dos partículas es igual al diámetro de las mismas toman importancia fuerzas repulsivas, de signo positivo, cuya intensidad depende de la distancia con la inversa de una potencia variable entre la 9-15 y que por razones matemática se usa con la doceava potencia. El efecto combinado de las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas repulsivas a distancias atómicas se puede expresar por la ecuación de Lennard-Jones.<sup>50</sup>

$$F_A = \xi x^{-12} - \beta x^{-6} \quad A.1$$

Si consideramos dos esferas iguales de radio R separadas a una distancia x, siendo  $x \ll R$ , la energía de atracción asociada a estas fuerzas varía con la distancia de separación entre las mismas con la siguiente expresión:

$$\Phi_A = -\frac{AR}{12x} \quad A.2$$

siendo A la constante de Hamaker. Esta constante puede expresarse así:

$$A = \left( \frac{\rho N_A \pi}{M} \right)^2 \beta \quad A.3$$

Siendo ( $\rho N_A/M$ ) el número de moléculas en la partícula por  $\text{cm}^3$  y  $\beta$  una constante que representa la suma de varias constantes de las ecuaciones de Debye, Keeson y London que son las tres interacciones principales englobadas dentro de la denominación de Van der Waals. Obtener el valor de  $A$  no es fácil, sí se puede evaluar cuáles son las interacciones que más predominan (Debye, Keeson y/o London), estimar la polarizabilidad y obtener ciertas aproximaciones útiles. Es un parámetro propio de la partícula en el medio dispersante en estudio.

Si la energía de atracción planteada es del orden de  $kT$  o menor, el movimiento browniano es suficiente para mantener separadas las partículas, pero si la atracción es mucho más fuerte debe existir una barrera energética, originada por alguna fuerza de repulsión, que evite el contacto permanente entre las partículas para asegurar la estabilidad del sistema.

### A. 3 Fuerzas electrostáticas repulsivas:

La adsorción de iones o la ionización de los grupos de la superficie de una partícula le proporcionan carga eléctrica, la superficie posee entonces un potencial electrostático  $\psi_0$ . Esto determina una fuerza de repulsión entre las partículas que tienen un  $\psi_0$  del mismo signo, la fuerza aumenta al hacerlo el valor absoluto de  $\psi_0$ . La repulsión previene un acercamiento demasiado íntimo de las partículas. La carga, al igual que el  $\psi_0$  y las fuerzas de repulsión, depende en gran parte del pH.

La fase acuosa que rodea a las partículas contiene siempre iones y los de carga opuesta a la partícula (contraiones) se acumulan cerca de la superficie protegiendo

la carga. Cuanto mayor es la proximidad a la superficie mayor es la concentración de contraiones, esta capa se denomina doble capa eléctrica o capa difusa. Son muchas las teorías que explican la dependencia del potencial eléctrico con la distancia a través de esta capa hasta el seno de la solución, sin embargo se podría considerar en este caso la aproximación de Debye-Hückel que surge de la ecuación de Poisson-Boltzmann y que tiene la siguiente expresión:<sup>50</sup>

$$\psi = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad \text{A.4}$$

siendo  $\psi$  el potencial,  $\psi_0$  el potencial en la superficie de la partícula,  $x$  la distancia y  $\kappa$  el denominado parámetro de Debye que luego ampliaremos. Esta aproximación se utiliza sólo a potenciales bajos, lo que representa para un ión monovalente y a 25°C un valor más o menos cercano a 25 mV. Esta expresión satisface dos situaciones límites importantes que son: cuando  $x \rightarrow 0$  (superficie de la partícula)  $\psi \rightarrow \psi_0$  y cuando  $x \rightarrow \infty$  (seno de la solución)  $\psi \rightarrow 0$ .

De la aproximación de D-H surge un parámetro importante:  $\kappa$ . De acuerdo a la ecuación A.4 se puede deducir que siendo  $(\kappa x)$  adimensional  $\kappa$  debe tener unidades inversas de longitud, por lo tanto  $\kappa^{-1}$  tiene unidades de longitud y es el denominado en forma imprecisa "espesor" de la doble capa, este parámetro es muy importante y todas las distancias son juzgadas en función de si son mayores o menores que  $\kappa^{-1}$ .

Sabiendo que  $\kappa$  tiene la siguiente expresión:

$$\kappa = \sqrt{\frac{4\pi e^2 \sum z_i^2 n_{i0}}{\epsilon k_B T}} \quad \text{A.5}$$

siendo  $e$  la carga del electrón,  $z_i$  la carga del electrolito,  $n_{i0}$  el número de iones en el seno de la solución,  $\epsilon$  la constante dieléctrica,  $k_B$  la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura, es muy importante analizar la dependencia de  $\kappa$  con la concentración e incluso con la valencia de los electrolitos en solución. Esta expresión puede reescribirse si relacionamos  $n_i$  con la concentración molar de electrolito de acuerdo a la siguiente expresión:

$$n_i = \frac{M_i N_A}{1000} \quad \text{A.6}$$

siendo  $M_i$  la concentración molar de electrolito y  $N_A$  el número de Avogadro, y sabiendo además que la fuerza iónica ( $\mu$ ) tiene la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 M_i \quad \text{A.7}$$

la ecuación A.5 resulta

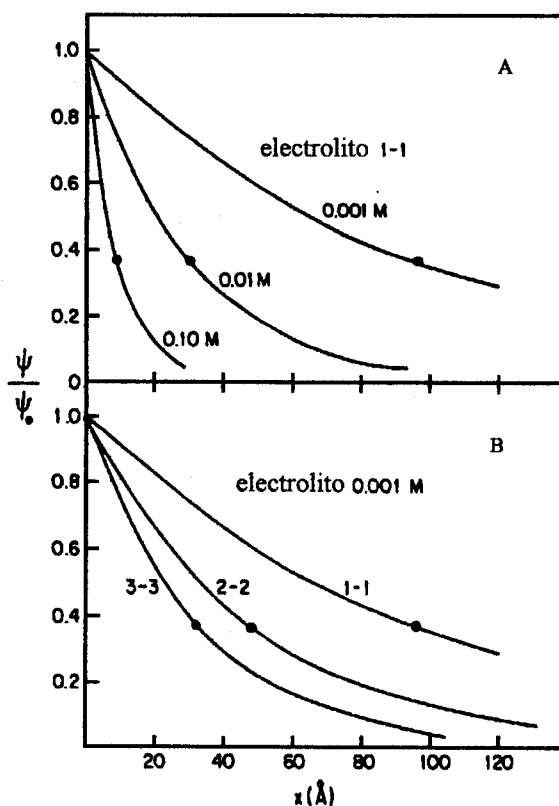
$$\kappa = \sqrt{\frac{4\pi e^2 N_A \sum_i z_i^2 n_{i0}}{1000 \epsilon k_B T}} = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A \mu}{1000 \epsilon k_B T}} \quad \text{A.8}$$

Esta expresión muestra la relación entre el "espesor" de la doble capa y la  $\mu$  del medio (concentración y valencia de los iones). La Figura A.1 muestra estas relaciones.

El "espesor" varía inversamente con la valencia de los iones ( $z_i$ ) e inversamente con la concentración de los mismos. Estas conclusiones serán luego analizadas en el contexto del trabajo a desarrollar.

La fuerza iónica ( $\mu$ ) se determina habitualmente con facilidad, pero no el potencial superficial ( $\psi_0$ ). Sí puede medirse el potencial electrocinético o potencial

zeta ( $\psi_z$ ) dejando que las partículas se muevan en un campo eléctrico, pero al moverse toman parte de solvente y el plano de deslizamiento al que se mide el potencial está a una distancia desconocida de la superficie, por eso el  $\psi_z$  resulta menor que el  $\psi_0$ , no obstante suele usarse como una estimación teniendo en cuenta sus limitaciones.



**Figura A.1.** Fracción del potencial de la doble capa en función de la distancia de acuerdo a la aproximación de Debye-Hückel. (A) Curvas para un electrolito 1-1 a tres concentraciones diferentes. (B) Curvas para electrolitos simétricos a una dada concentración (0.001M) con tres valencias diferentes

#### A. 4 Teoría D.L.V.O:

Hasta aquí se plantearon por separado los dos tipos de fuerzas involucradas en la estabilidad de un coloide liófilico. La teoría D.L.V.O. (Deryagin, Landau, Verwey

y Overbeek ) estudia los efectos combinados de la repulsión electrostática y de la atracción de Van der Waals.

En esta teoría se calcula la energía necesaria para acercar dos partículas desde el infinito hasta una dada separación entre ambas. Nuevamente nos encontramos con una

gran número de expresiones, en este caso, del potencial de interacción, de acuerdo a si se trata a la partícula como un carga puntual, un plano o una esfera.

Teniendo en cuenta lo expuesto en fuerzas repulsivas, para valores bajos de potencial, dos esferas de radio  $R$  y a una separación  $x$  entre partículas tal que  $x \ll R$ , la energía de interacción electrostática tendría la siguiente expresión:

$$\Phi_R \approx \frac{1}{2} \epsilon R \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad \text{A.9}$$

En las mismas condicione, la energía atribuible a la atracción de Van der Waals es (ecuación A.2.):

$$\Phi_A = -\frac{AR}{12x}$$

Analizando cada expresión de  $\Phi$  surge lo siguiente:

Cuando  $x \rightarrow 0$  (superficie de la partícula)  $\Phi_R \rightarrow \text{constante}$  y  $\Phi_A \rightarrow -\infty$

Cuando  $x \rightarrow \infty$  (seno de la solución)  $\Phi_R$  y  $\Phi_A \rightarrow 0$  con  $\Phi_R$  disminuyendo más rápidamente. Esto muestra que la atracción predomina a muy corta y largas separaciones y en situaciones intermedias deben ser considerado las dos contribuciones.

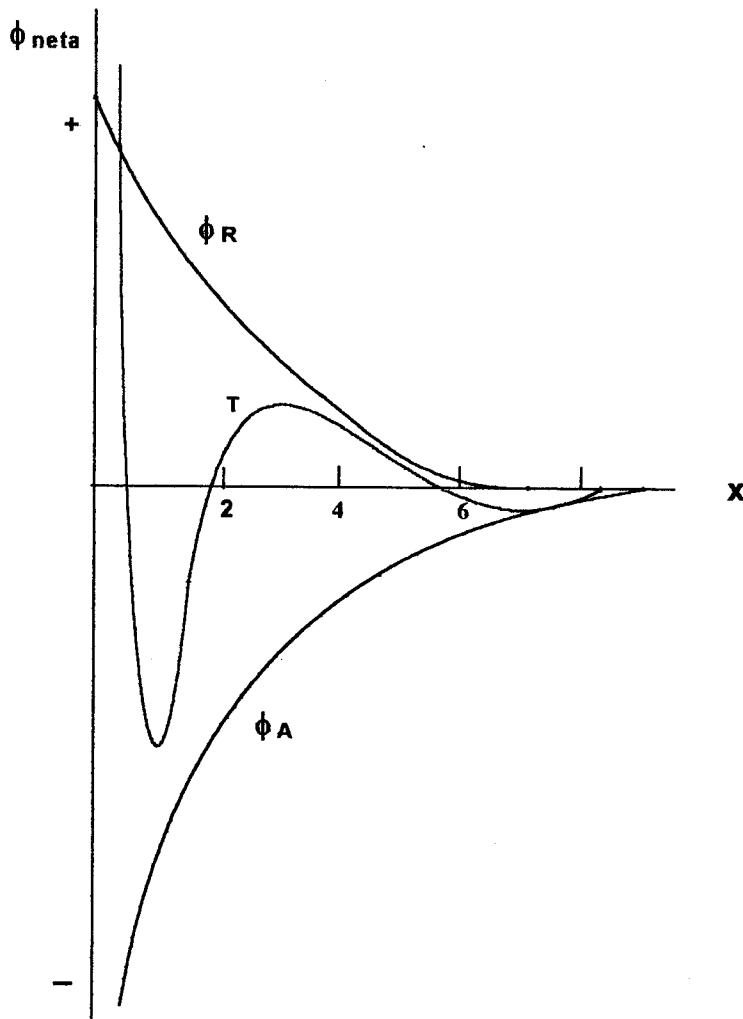
La interacción neta será:

$$\Phi_{\text{neta}} = \Phi_R + \Phi_A \quad \text{A.10}$$

Reemplazando en la ecuación A.10 las expresiones de las ecs. A.9 y A.2 resulta:

$$\Phi_{\text{neta}} = \frac{1}{2} \epsilon R \psi_0^2 \exp(-\kappa x) - \left( \frac{AR}{12x} \right) \quad \text{A.11}$$

Esta expresión está representada en la Figura A.2 en forma cualitativa.



**Figura A.2.** Perfil ilustrativo del potencial atractivo y repulsivo entre dos partículas en función de la distancia.



Puede observarse un máximo y dos mínimos, aunque alguno de estos puede a veces ser imperceptible si hay un amplio predominio de alguna de las contribuciones.

La altura del máximo (medido desde  $\Phi = 0$ ) representa la barrera de energía. El mínimo más profundo es el llamado mínimo primario y el menos profundo mínimo secundario. La profundidad se mide desde  $\Phi = 0$ . La atracción predomina a grandes separaciones, es decir que el mínimo secundario, aunque generalmente está presente, este suele ser poco profundo.

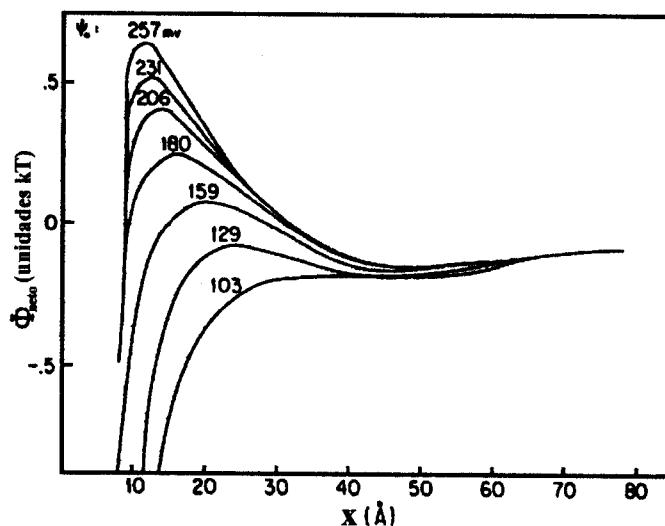
Ahora podemos considerar las implicancias de la curva de energía potencial (Figura A.2) sobre dos partículas que se aproximan una con otra por medio de la difusión:

1. Si la barrera no está presente o su altura es despreciable comparada con la energía térmica ( $kT$ ) las partículas "caerán" al mínimo primario, es decir contactarán y permanecerán juntas. El sistema ha floculado y es inestable.
2. Si la altura de la barrera de energía es apreciable comparada con la energía térmica ( $\sim 10 kT$ ) las partículas no contactarán y el sistema será estable.
3. Pueden existir situaciones en los que ocurra floculación en el mínimo secundario (es decir a cierta distancia una de otra), pero los flóculos formados pueden separarse con facilidad, es decir que la floculación es reversible, esto no sucede cuando la floculación ocurre en el mínimo primario, de allí que en este último caso se la denomine *coagulación*.

4. En forma general y aproximada, la altura de la barrera determina si el coloide será estable o sufrirá floculación.

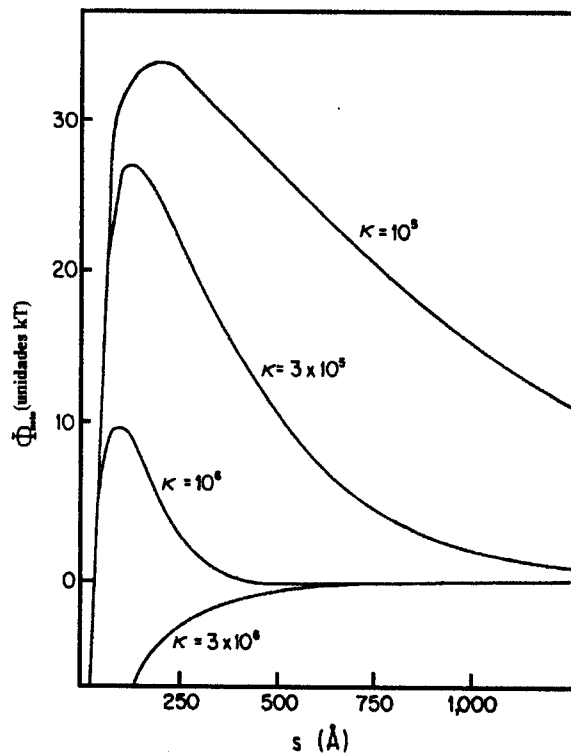
De la ecuación A.11 podemos además obtener algunas consideraciones más cuantitativas. Analizaremos los efectos del potencial superficial ( $\psi_0$ ), el contenido de electrolitos a través de  $\kappa$  y la constante de Hamaker (A).

1. Efecto del  $\psi_0$ : La Figura A.3 muestra el efecto de variación de  $\psi_0$  sobre la energía potencial total de interacción cuando el valor de A y  $\kappa$  son mantenidos constantes. La altura de la barrera incrementa con el incremento de los valores de  $\psi_0$  lo cual resulta razonable si pensamos que esto está aumentando la repulsión entre las partículas. Este parámetro es difícil de obtener, suele usarse como una estimación el valor del potencial electrocinético que como ya comentamos es numéricamente menor que  $\psi_0$ .



**Figura A.3.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{net}}$ ) en función de la distancia. Curvas obtenidas con diferentes valores de  $\psi_0$  manteniendo valores constantes de  $\kappa$  ( $10^7 \text{ cm}^{-1}$ ) y A ( $2 \times 10^{-12}$  ergios). Unidades de la ordenada: múltiplos de  $k_B T$  a  $25^\circ \text{C}$ .

2. Efecto de la concentración de electrolito: esta variable se puede evaluar a través de la fuerza iónica ( $\mu$ ) que se relaciona con el "espesor" de la doble capa ( $\kappa^{-1}$ ) por la ecuación A.8. Como ya expresáramos  $\kappa^{-1}$  depende de la concentración y la valencia de los iones inertes o indiferentes del sistema. La Figura A.4 muestra cómo afecta a la  $\Phi_{\text{neto}}$  la concentración de electrolito 1:1 cuando se mantienen constante el  $\psi_0$  y A.



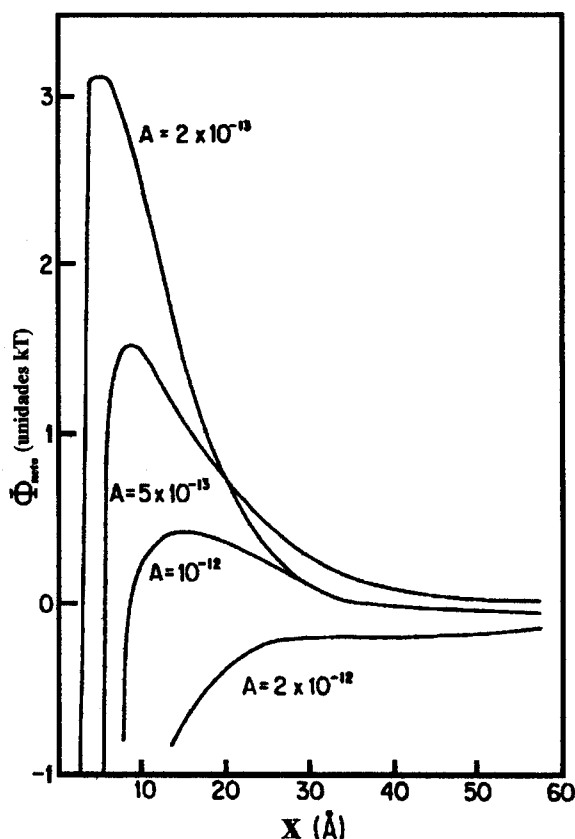
**Figura A.4.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) en función de  $s$  (separación entre las superficies), para dos esferas de igual radio. Curvas obtenidas con diferentes valores de  $\kappa$  manteniendo valores constantes de  $A$  ( $10^{-12}$ ergios) y  $\psi_0$  (25,7mV)

Para concentraciones menores que  $10^{-3}$  M ( $\kappa = 3 \times 10^5$  o mayores) existe una barrera de energía considerable, pero a concentraciones mayores (entre  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$

M), el espesor ( $\kappa^{-1}$ ) disminuye, en consecuencia disminuye considerablemente la barrera, las partículas han disminuído su repulsión y este coloide pasará de dispersión estable a coloide floculado. Esta variable es muy fácil de modificar de modo que es muy utilizada para "manejar" la estabilidad de un coloide.

La teoría D.L.V.O. tiene expresiones cuantitativas para calcular la concentración de un electrolito inerte necesaria para producir la floculación de un coloide liofóbico, es la denominada *concentración de floculación crítica* (CFC). Esta concentración está relacionada en forma inversa con la sexta potencia de la valencia de los iones. Es una regla empírica de principios de siglo y que la teoría D.L.V.O le dió formulación, la regla de Schulze-Hardy. A mayor valencia de los iones y manteniendo la concentración constante, menor es la CFC.

3. Efecto de la constante de Hamaker (A): De los parámetros variables de la ecuación de  $\Phi_{\text{neta}}$  este es uno sobre el que no se tiene demasiado control, su valor está determinado por la naturaleza química (diferente polarizabilidad) de la fase dispersada y la fase continua. Su efecto se muestra en la Figura A.5 mientras se mantiene constante los valores  $\psi_0$  y  $\kappa$ . Como era de esperar al incrementar los valores de A la altura de la barrera disminuye y la profundidad del mínimo secundario incrementa. Esto es razonable si pensamos que un valor alto de A implica mayor atracción (a corta y larga distancia) y se reflejará en un descenso de la barrera y mayor inestabilidad del coloide con respecto a la floculación.



**Figura A.5.** Potencial neto ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) en función de la distancia. Curvas con diferentes valores de  $A$  manteniendo valores constantes de  $\psi_0$  (103mV) y de  $\kappa$  ( $10^7 \text{cm}^{-1}$ ). Unidades de la ordenada: múltiplos de  $k_B T$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Por lo descripto se puede inferir que existen mecanismos para disminuir o aumentar la barrera, incluyendo cambios de temperatura, que pueden o no ser significativos dependiendo de la naturaleza de la barrera, propiedades de los solventes, composición de electrolitos, etc.

Aunque la teoría D.L.V.O. predice adecuadamente la estabilidad de muchos coloides liófilos, en el caso de las *micelas de caseína* tiene serias dificultades.

Existe un tercer componente involucrado en la estabilización de algunos coloides que no está contemplado en la teoría D.L.V.O. pero que es motivo de estudio

debido a que permite explicar gran cantidad de situaciones no contempladas por la teoría electrostática. Es especialmente útil en el caso de las *micelas de caseína* y por lo tanto lo desarrollaremos. Se trata de la estabilidad estérica.

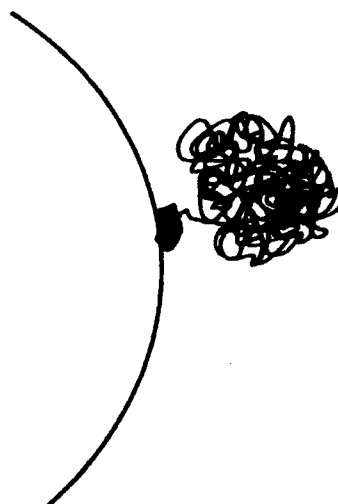
## A. 5 Estabilidad estérica:

### A.5.1 Generalidades. Definición.

La estabilización de coloides por la presencia de polímeros fue utilizada desde hace miles de años, sin embargo, aún hoy, no hay una teoría que permita calcular la energía de interacción cuando las fuerzas repulsivas tienen este origen.

La estabilidad es impartida por la presencia de cadenas moleculares poliméricas que se adsorben, o adhieren, sobre la superficie de la partícula. Si las partículas se aproximan unas con otras, por movimiento browniano, las zonas que presentan cadenas sobresalientes pueden penetrar unas en otras o comprimirse entre sí, pueden incluso reaccionar químicamente si las condiciones son favorables y esto origina una serie de interacciones que cuando son repulsivas traen como consecuencia una estabilización del sistema coloidal. Si los polímeros adheridos son polielectrolito pueden impartir estabilidad por un combinación de mecanismos electrostáticos y estéricos, es la denominada *estabilización electroestérica* muy utilizada en la industria.<sup>51</sup> La presencia de polímeros libres en solución también puede influir en la estabilidad coloidal, es la denominada *estabilización por depleción*.<sup>51</sup>

Se ha demostrado experimentalmente que los mejores estabilizadores son bloque anfipáticos o copolímeros injertados. Deben consistir en, por lo menos, dos segmentos químicos unidos, donde uno de ellos sea soluble en el medio de dispersión mientras que el otro sea insoluble. Este último haría de ancla o amarradura y sirve para sujetar la porción soluble a la superficie de la partícula. (Figura A.6). La cadena soluble que se proyecta lejos de la superficie es la responsable de la repulsión y como consecuencia de la estabilidad, de allí que se la denomine *porción estabilizante*.



**Figura A.6.** Representación esquemática de la estabilización estérica por un copolímero anfipático.

La estabilidad estérica es óptima cuando la superficie de la partícula está totalmente cubierta por el copolímero anfipático. Cuando dos partículas se aproximan por movimiento browniano y las porciones estabilizantes de una repele las porciones de la otra se observa estabilidad. Estas fuerzas repulsivas pueden ser

contrarrestadas por tres mecanismos: 1. desorción de las cadenas desde la superficie, esto es evitado si la porción que actúa de anclaje está incorporada en el polímero estabilizador anfipático. 2. movimientos laterales de las cadenas estabilizadoras. 3. uniones entre partículas a través de las cadenas estabilizantes de una en la superficie de la otra. Estos dos últimos puntos se evitan si la superficie está totalmente cubierta por el polímero. Cuando estos tres mecanismos son excluidos la estabilidad impartida por el polímero es óptima y la fuerzas generadas en la zona de interacción son contrarrestadas con la difusión de las partículas, cada una con su capa estérica asociada, y siempre distantes una de otra.

Ahora debemos analizar los factores termodinámicos que limitan esta estabilidad cuando se han cumplido las condiciones anteriores. Se ha demostrado experimentalmente que en estos casos la estabilidad se torna independiente de la naturaleza química del polímero de anclaje, de la naturaleza y tamaño de las partículas y de su concentración en número. Esto tiene excepciones, especialmente cuando se trata de partículas muy grandes con cubiertas muy delgadas.<sup>51</sup> El límite termodinámico de estabilidad estaría, en principio, relacionado con la naturaleza química de la porción estabilizante y el medio de dispersión. La inestabilidad puede ser inducida por disminución de la capacidad solvente del medio de dispersión sobre las porciones extendidas y esto puede realizarse por tres mecanismos: cambios de temperatura, incrementos de presión y agregado de un no-solvente miscible. El paso de dispersión estabilizada estéricamente a floculación ocurre bruscamente y se denomina *punto crítico de floculación* (CFP) y puede ser originado por cambios de



temperatura (CFT), por presión (CFP) o por cambio de solvente (CFV). En el caso de la temperatura, la floculación puede inducirse por aumento o descenso de la misma, surgen así un punto crítico de floculación superior (upper) e inferior (lower) respectivamente (UCFT y LCFT).

La cuestión sería poder identificar estos puntos de alguna manera. Esto se ha logrado en muchos sistemas, independientemente de cómo se induce la floculación. Ese límite termodinámico en forma práctica está dado por el *punto  $\theta$*  o *punto Flory* de la porción estabilizante libre en el medio de dispersión. Existe una gran correlación entre los puntos  $\theta$  y los puntos de floculación crítica.

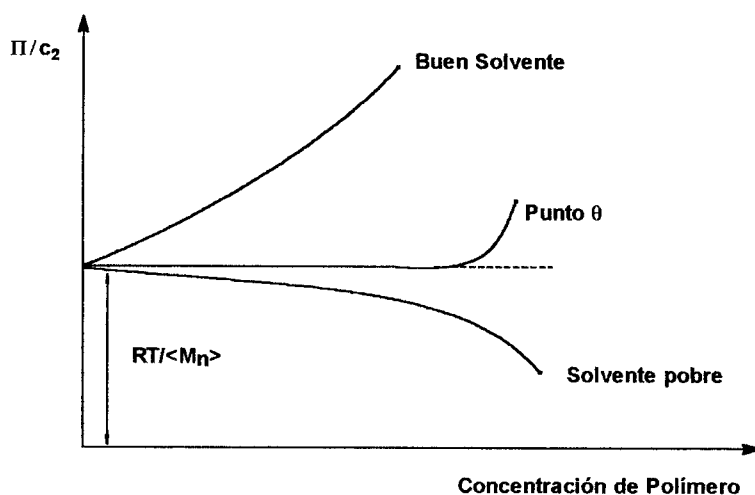
#### A.5.2 Punto $\theta$ en moléculas de polímeros:

En forma análoga a la ecuación para gases ideales se puede plantear para una solución de polímero la ecuación de van't Hoff de presión osmótica.

$$\frac{\Pi}{c_2} = \frac{RT}{\langle M_n \rangle} \quad \text{A.12}$$

siendo  $\Pi$  la presión osmótica a la concentración  $c_2$  del polímero y  $\langle M_n \rangle$  el peso molecular promedio en número. Esta ecuación se cumple para una solución de moléculas pequeñas y a dilución infinita para grandes moléculas de polímeros. Al igual que para los gases hay desvíos negativos y positivos de la idealidad. En un "buen solvente" (es decir solventes donde las interacciones entre el polímero y el solvente están muy favorecidas comparadas con los contactos solvente-solvente y polímero-polímero) las cadenas de polímero se repelen unas con otras. El volumen

excluido es finito, la concentración de cadenas es mayor que lo esperado para un volumen excluido cero y se produce una desviación positiva de la idealidad. (Figura A.7). En el caso de un "solvente pobre" donde los contactos de polímero-polímero están energicamente favorecidos se produce la asociación de las moléculas de polímeros y siendo la  $\Pi$  una propiedad coligativa, la asociación lleva a una disminución de las especies osmóticamente activas en solución y se produce un desvío negativo de la idealidad (Figura A.7) No obstante se puede encontrar una temperatura a la cual la "solvencia" sea tal que haya un comportamiento ideal de la  $\Pi$ , aunque sólo sea a concentraciones bajas del polímero. Esta es la denominada *temperatura  $\theta$* . (Figura A.7). A esta temperatura, las interacciones atractivas y repulsivas se balancean unas con otras, esto implica que las cadenas poliméricas contactan sin producirse cambios en la energía libre de Gibbs. Este punto representa la transición para la interacción segmento polimérico-solvente: los segmentos pasan de la repulsión mutua a la atracción mutua.



**Figura A.7.** La presión osmótica reducida de un polímero en solución en función de su concentración en distintos solventes. Bueno, pobre y  $\theta$  solventes.

### A.5.3 Implicancia del punto $\theta$ en la estabilización estérica:

Por lo planteado hasta este punto es razonable pensar que las porciones estabilizantes para impartir estabilidad al coloide deben necesariamente ser repulsivas y esto requiere que el medio de dispersión sea un "buen solvente". Cuando la solvencia del medio es disminuida la repulsión también disminuye. En solventes peores que los solventes  $\theta$ , las porciones "estabilizantes" llegan a ser mutuamente atractivas y son las responsables de inducir la floculación en las dispersiones coloidales estabilizadas estéricamente. Solamente cuando la capa estérica es muy delgada y las partículas son muy grandes, las fuerzas atractivas de van der Waals son las que causan la floculación.<sup>51</sup>

Finalmente vemos que los puntos  $\theta$  dependen solamente de la naturaleza química del polímero y el solvente en cuestión, esto permite inferir que serían independientes del peso molecular del polímero<sup>46</sup> y los puntos críticos de floculación también lo serían. Tanto en polímeros mono o polidispersos en peso molecular, se confirma lo expuesto, esto no significa que la magnitud de la repulsión estérica sea independiente del PM, más bien implica que los factores termodinámicos de control de la inestabilidad son insensibles al mismo.

### A.5.4 Bases termodinámicas de la estabilización estérica:

La dependencia con la temperatura de la estabilidad estérica permite plantear los factores termodinámicos que la controlan. En principio las dispersiones estabilizadas estéricamente pueden flocular por aumento o descenso de temperatura.

MaP

Cuando dos partículas estabilizadas sufren colisión Browniana hay un cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_F$ ) de las partículas que se puede plantear en términos entálpicos ( $\Delta H_F$ ) y entrópicos ( $\Delta S_F$ ) de la siguiente manera:

$$\Delta G_F = \Delta H_F - T\Delta S_F \quad A.13$$

Para que una partícula cubierta por el polímero sea estable el  $\Delta G_F$  debe ser positivo o al menos no negativo. Esto origina una serie de combinaciones que se exponen en la Tabla A.2.

Hay tres tipos de estabilización: *entálpica*, *entrópica* y *combinada* o *entálpica-entrópica*. El nombre se atribuye de acuerdo a cual es la contribución dominante en el  $\Delta G_F$ .

**Tabla A.2. Combinaciones posibles de los componentes termodinámicos de la estabilización estérica.**

| $\Delta G_F$ | $\Delta H_F$ | $\Delta S_F$ | $ \Delta H_F / T\Delta S_F $ | Tipo de estabilización         | Floculación           |
|--------------|--------------|--------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| $\geq 0$     | +            | +            | $\geq 1$                     | Entálpica                      | Calentando hasta UCFT |
| $\geq 0$     | -            | -            | $\leq 1$                     | Entrópica                      | Enfriando hasta LCFT  |
| $\geq 0$     | +            | -            | $< 1$                        | Combinada: entrópica-entálpica | no accesible          |

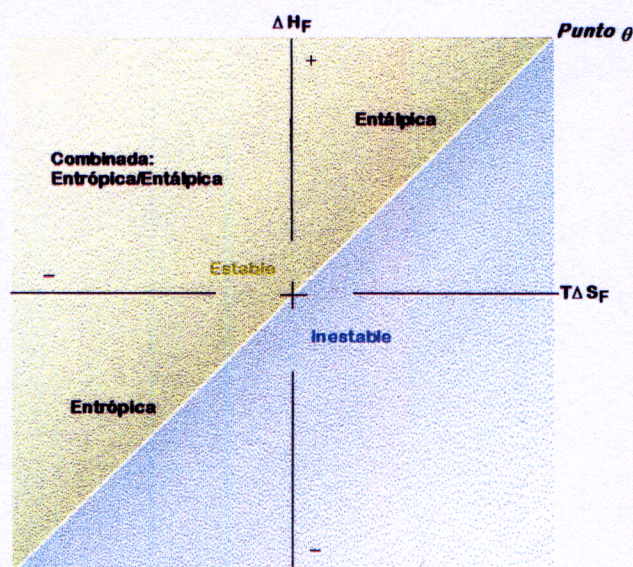
Cuando el  $\Delta G_F$  pasa de positivo a negativo la dispersión pasa de un regimen estable a una floculación incipiente. Si la temperatura es la responsable de ese cambio en el  $\Delta G_F$  se la denomina *temperatura crítica de floculación* (CFT). El



cambio puede darse por un aumento o descenso de la temperatura de acuerdo al signo de

$$\frac{\partial \Delta G_F}{\partial T} = -\Delta S_F \quad A.14$$

Si  $\Delta G_F$  es creciente con la T habrá una CFT superior (UCFT) y corresponde a una estabilización entálpica, en el caso opuesto habrá una CFT inferior (LCFT) y será una estabilización entrópica. Los coloides estabilizados por estabilización combinada no pueden ser floculados a una temperatura accesible, sin embargo los cambios de T pueden convertirla en estabilización entrópica o entálpica y hacerlos así susceptibles a la floculación. La Figura A.8 plantea un esquema de lo expuesto.



**Figura A.8.** Representación esquemática de diferentes tipos de estabilización estérica sobre un diagrama entalpía-entropía

La pendiente corresponde a  $\Delta G_F = 0$  y representa por lo tanto los puntos  $\theta$  de las porciones estabilizantes y el límite entre la estabilidad y la inestabilidad. Notar que



no se puede pasar de una estabilidad entálpica a una entrópica sin pasar por una combinada, de manera que un sistema que tiene UCFT y LCFT necesariamente debe tener estabilidad combinada en algún rango de temperatura.

Para entender los procesos microscópicos que generan la repulsión estérica resulta indispensable recurrir a la mecánica estadística y sus teorías que describen la termodinámica de los polímeros en solución. La teoría más utilizada en estos casos es la *Teoría de Flory-Huggins* que expondremos en forma simplificada.

#### A.5.5 Teoría de Flory-Huggins:

Al mezclar un polímero con el disolvente se puede plantear una energía libre de mezclado ( $\Delta G_M$ ) :

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad A.15$$

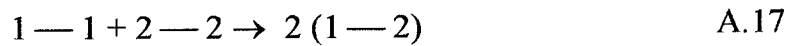
donde  $\Delta H_M$  es el término entálpico llamado de *disimilaridad de contacto* y que representa las diferencias energéticas entre los diversos contactos: 1-1, 1-2 y 2-2 (1 representa el solvente y 2 al soluto) y  $\Delta S_M$  es un *término combinatorio* que se puede calcular a partir del concepto de volumen libre.

Se puede demostrar (considerando que la fracción de volumen libre del soluto es igual a la del disolvente) que la variación combinatoria de entropía en el mezclado es:

$$\Delta S_M = -k(n_1 \ln v_1 + n_2 \ln v_2) > 0 \quad A.16$$

siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de moléculas de solvente y soluto respectivamente y  $v_1$  y  $v_2$  las fracciones de volumen respectivos.

La entalpía de mezclado se considera como una reacción cuasi química entre los contactos disimilares entre disolvente y entre segmentos de soluto:



Para estos contactos se define el parámetro  $\chi_1$  tal que  $\chi_1 kT$  es la diferencia de energía de una molécula de disolvente inmersa en polímero puro comparada con una molécula de disolvente en disolvente puro. Resulta finalmente que:

$$\Delta H_M = n_1 v_2 \chi_1 kT \quad A.18$$

y quedando

$$\Delta G_M = kT(n_1 v_2 \chi_1 + n_1 \ln v_1 + n_2 \ln v_2) \quad A.19$$

Para solventes no acuosos el término  $\chi_1$  es a menudo positivo correspondiendo a un mezclado endotérmico por lo tanto el término de disimilaridad de contacto se opone al mezclado. Los otros dos términos son negativos y promueven el mezclado. Si pensamos que el PM del polímero es muy elevado  $n_2$  resultará pequeño y el término dominante en el mezclado será  $n_1 k \ln v_1$ . Esto nos permite evidenciar que la principal razón por la cual el polímero y el disolvente se mezclan es el aumento de entropía que experimentan las moléculas del disolvente como resultado del espacio adicional del que disponen cuando se hacen accesibles los dominios de las moléculas del soluto.

Otra conclusión interesante de la teoría de F-H es que la estructura detallada del polímero sería irrelevante y podría ser tan efectiva una estructura de ovillo como una de varilla.

### A.5.6 Teoría de los volúmenes libres

Aunque la teoría de Flory-Huggins satisface muchas situaciones de la termodinámica de los polímeros en solución, ha sido incluso considerada como el “paradigma en la ciencia de los polímeros”, hay otras observaciones experimentales, sobre todo respecto a la estabilidad estérica, que demuestran ciertas limitaciones de esta teoría. La primera tiene que ver con la dependencia de  $\chi_1$  con la temperatura que permite deducir que aunque se lo considere un término entálpico, en los solventes no acuosos (principalmente) su valor positivo se debe primariamente a consideraciones entrópicas. Habría un cambio de entropía no combinatorio que se opone al mezclado que no está considerado en esta teoría. En segundo lugar se halló experimentalmente que  $\chi_1$  depende de la concentración del polímero y se hace más positivo al aumentar la misma. En tercer lugar y teniendo presente que el mezclado es un proceso entrópicamente conducido que debiera ser favorecido por el aumento de temperatura surge que la mayoría de las disoluciones de polímeros experimentan separación de fases a T cercanas al punto crítico del disolvente.

Esta última contradicción, al igual que la primera, tendría su origen en un error de la teoría de F-H que no considera la diferencia de volumen libre entre soluto y solvente. Esta diferencia está muy magnificada cerca del punto crítico del solvente donde este se comporta similar a un gas, con un gran volumen libre. Las moléculas de polímero, en contraste, presentan un incremento pequeño del volumen libre al calentarlas. Cuando las moléculas de polímero toman contacto con el solvente (similar a un gas) causan una especie de “condensación” de mismo.<sup>51</sup> Esto produce



una disminución de la entropía de las moléculas de solvente en contacto con el polímero que puede predominar sobre la entropía combinatoria de mezclado. Esta diferencia de volumen libre persiste aún a temperatura ambiente. Concluyendo, primero: la contribución entrópica a  $\chi_1$  que se opone al mezclado a temperatura ambiente estaría relacionado con la diferencia entre los volúmenes libres del solvente y el soluto, y el mezclado podría considerarse similar a la condensación de un gas (el solvente) en un medio más denso (el polímero). Segundo: el aumento de  $\chi_1$  por el aumento de la fracción de volumen del polímero estaría reflejando el mayor ordenamiento condensacional del solvente por el aumento de la concentración de segmentos de polímero. Tercero: la separación de fases de soluciones polímeros, por calentamiento cerca del punto crítico, es también una consecuencia de la disminución de entropía por mezclado que predomina sobre el entrópico combinatorio y promueve la floculación.

Flory (1970) desarrolló una nueva ecuación que incorpora los cambios en el volumen libre por el mezclado, al igual que el combinatorio y de disimilaridad de contacto. Y aunque es muy compleja, sus conceptos pueden ser adaptados para una discusión cualitativa de los procesos microscópicos que generan la estabilización estérica en dispersiones acuosas y no acuosas.

**A.5.7 Orígenes microscópicos de la estabilización estérica:**

Como se ha descripto, la energía libre de interacción estérica entre dos partículas que se acercan desde una distancia infinita tiene varios componentes que adoptan diferentes valores si se trata de una dispersión acuosa o una no acuosa.

Se ha observado que en las dispersiones no acuosas la estabilidad estaría relacionada con la disminución de entropía combinatoria que se produciría cuando al interpenetrarse las capas estabilizantes del polímero se produce la expulsión del disolvente asociado a ese polímero. Al aumentar la T esto se puede revertir.

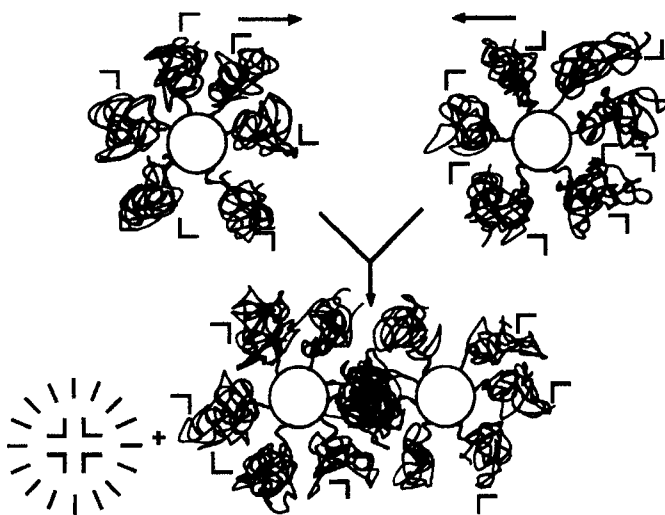
Para las dispersiones acuosas cabe señalar que no hay una teoría satisfactoria debido, principalmente, a la presencia de fuertes interacciones, tipo puente hidrógeno, entre las moléculas de agua y numerosos polímeros solubles en agua. De cualquier manera se puede plantear las distintas posibilidades de valores a asumir por los componentes del  $\Delta G_F$  y analizarlos (Tabla A.3.).

**Tabla A.3. Contribuciones microscópicas a la energía libre de interacción para dispersiones acuosas.**

| Efecto                          | Combinatorio |            | Disimilaridad de contacto |            | Disimilaridad de volumen libre |            |
|---------------------------------|--------------|------------|---------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| Parám. termodinámico            | $\Delta H$   | $\Delta S$ | $\Delta H$                | $\Delta S$ | $\Delta H$                     | $\Delta S$ |
| Signo                           | 0            | < 0        | > 0                       | > 0        | > 0                            | > 0        |
| $\Delta G_F$                    | > 0          |            | > 0                       |            | < 0                            |            |
| Promueve                        | Estabilidad  |            | Estabilidad               |            | Floculación                    |            |
| $\partial(\Delta G)/\partial T$ | > 0          |            | < 0                       |            | < 0                            |            |

Puede observarse que en este caso no sólo el término combinatorio promueve estabilidad, también lo hace el término de disimilaridad de contacto. Esto último es

una consecuencia de las interacciones específicas (tales como puente hidrógeno) que las moléculas de agua pueden establecer con porciones estabilizantes adecuadas del polímero, como por ej. grupos éter, oxidrilos, etc. Al interpenetrarse las capas estéricas las moléculas de agua son expulsadas al medio requiriendo energía para poblar nuevos grados de libertad (especialmente traslacional y rotacional) lo que genera un cambio en la entalpía de disimilaridad de contacto que se opone así a la floculación (Figura A.9). Hay también un aumento entrópico pero es compensado y superado por el entálpico. Al aumentar la T se promueve la floculación.



**Figura A.9.** Representación esquemática de los orígenes microscópicos de la estabilización entálpica.

#### A.5.8 Dispersiones con desvíos frente al comportamiento general

El comportamiento descrito hasta este punto es presentado por partículas coloidales estabilizadas estéricamente que presentan una capa relativamente “espesa” de porción estabilizante. Las partículas muy grandes y con una capa estérica relativamente delgada presentan un comportamiento diferente:

- 1) Coagulan en medios de dispersión que son significativamente mejores solventes que los  $\theta$  solventes para la porción estabilizante. Esto estaría relacionado con las fuerzas atractivas de van der Waals, que en estos casos tomarían importancia y serían dominantes.
- 2) El punto crítico de coagulación de estas dispersiones presenta una débil dependencia con la concentración de las mismas. La entropía configuracional de las partículas, aunque es pequeña, contribuye a la energía libre total. Como resultado, las dispersiones más diluídas de estas partículas serían más estables.

Otro desvío es presentado por aquellas partículas donde las porciones estabilizantes están débilmente ancladas a la superficie y/o si la superficie no está totalmente cubierta. Las dispersiones de estas partículas también coagulan en solventes mejores que los  $\theta$  solventes. Sin embargo, la coagulación ocurre por un desplazamiento de los pelos de la zona de interacción debido a la fuerza generada por la colisión browniana y luego actúan las fuerzas de van der Waals.

Existen otros casos de desvíos como la *estabilización estérica mejorada* donde las partículas son estables en medios de dispersión que son peores solventes que los  $\theta$  solventes de la porción estabilizante.

La repulsión estérica es importante para explicar la estabilidad de las *micelas de caseína*, ya que estas partículas tienen una estructura polimérica expuesta, la caseína  $\kappa$ , que constituiría la porción estabilizante de las MC (sección 1.4.1). Este efecto dependerá, en principio, de la calidad solvente de los pelos en el medio dispersante pero esto se puede modificar de varias maneras. Significa, que así como se podía

alterar la barrera de energía actuando sobre las interacciones electrostáticas y/o atractivas también se puede actuar sobre las repulsivas estéricas favoreciendo o no la estabilidad del sistema.

En el caso de las MC los pelos estabilizantes pueden estar cargados, lo cual complica más el cálculo preciso de la energía de interacción entre las partículas y hace más modificable la calidad solvente de los mismos. Esto corresponde a la estabilización electrostérica.

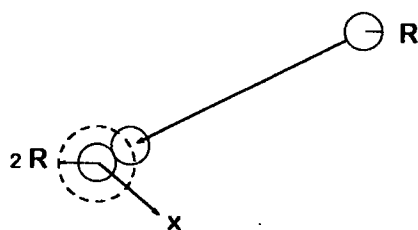
Por otra parte, los desvíos presentados en la sección A.5.8. son útiles para describir el comportamiento de las micelas de caseínas luego de ser atacadas enzimáticamente (MpC), es decir cuando parte de la porción estabilizante (caseína  $\kappa$ ) ha sido retirada.

## A. 6 Cinética de Floculación:

Consideraremos, en principio, una situación simplificada cual sería: partículas esféricas uniformes cuyo movimiento está totalmente gobernado por movimiento Browniano. Asumiremos además que las esferas no interactúan excepto cuando se tocan y allí permanecen adheridas formando un doblete. Aunque es un modelo muy simplificado permitirá luego analizar casos más realistas. La Figura A.9 muestra un esquema de la formación de doblete.

Dado que las partículas primarias se adhieren por contacto, la velocidad de formación de dobletes será igual a la velocidad a la cual las moléculas difunden a través de la superficie marcada, que corresponde a una superficie esférica de radio

$2R$  circunscripta alrededor de una esfera que por el momento consideraremos estacionaria. Luego de la floculación, el número de unidades cinéticas independientes disminuye localmente en el sitio de floculación. Por lo tanto se puede pensar en un gradiente alrededor de la partícula fija como responsable de la difusión hacia ella.



**Figura A.10.** Representación esquemática de la formación de dobletes por floculación de dos partículas esféricas uniformes

En 1917, M. Smoluchowski aplicó la teoría de difusión a esta situación para evaluar la velocidad de formación de dobletes.<sup>52</sup> En realidad hay dos etapas cinéticas: *difusión* y *reacción*. Smoluchowski supone que la etapa de difusión es más lenta que la de reacción, por lo tanto quien rige el proceso es la difusión. Las partículas al tocarse se adhieren, los choques son 100% efectivos, es la *agregación limitada por difusión* (DLA). Cuando la etapa lenta es la reacción sería la *agregación limitada por reacción* (RLA). Desarrollaremos la agregación limitada por difusión por ser de interés para este trabajo.

De acuerdo a la primera ley de Fick, el número de partículas cruzando una unidad de área hacia una partícula de referencia por unidad de tiempo,  $J$ , está dado por:

$$J = -D \frac{dN}{dx} \quad A.20$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión de las esferas y  $N$  es el número total de las mismas por unidad de volumen. El número total cruzando una superficie esférica de radio  $x$  y área  $A$  alrededor de la partícula de referencia por unidad de tiempo,  $JA$ , está dado por:

$$\text{Número total/tiempo} = JA = -D(4\pi x^2) \left( \frac{dN}{dx} \right) \quad A.21$$

Bajo condiciones de estado estacionario, flujo constante,  $JA$  es una constante y si se integra con adecuadas condiciones de borde, como por ejemplo asumiendo que  $N=N_0$  (concentración inicial de esferas) para  $x = \infty$  y  $N = 0$  para  $x = 2R$  (ya que las partículas pierden su identidad cinética por contacto), siendo  $R = \text{radio de la esfera}$ , la ecuación A.21 integrada dará:

$$JA = -8\pi R D N_0 \quad A.22$$

Esta ecuación da el número de partículas que se mueven hacia la partícula fija por unidad de tiempo. Si ahora eliminamos la restricción de que la partícula está fija debemos reemplazar el coeficiente de difusión de una partícula por el de dos, es simplemente  $2D$ , cuando las partículas son del mismo tamaño. Por lo tanto la frecuencia con la cual esferas uniformes colisionan por difusión con una esfera de referencia en movimiento está dado por:

$$(JA)' = -16\pi R D N_0 \quad A.23$$

Si ahora, en lugar de considerar una única esfera, consideramos  $N_0$  esferas inicialmente presentes como partículas de referencia, la velocidad total a la cual los dobletes son formados está dado por:

$$\text{Velocidad} = - (16 \pi R D N_0) N_0 = - k_2^0 N_0^2 \quad \text{A.24}$$

donde  $k_2^0$  es efectivamente la constante de velocidad de segundo orden en una agregación limitada por difusión (DLA). Es importante destacar que la ecuación A.24 se aplica solamente en los instantes iniciales de la floculación, cuando las partículas son  $N_0$  esferas uniformes. Esto implica que su aplicación a cinéticas experimentales está limitada a velocidades iniciales de floculación.

Por otro lado, para esferas uniformes podemos plantear que:

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad \text{A.25}$$

Si ahora reemplazamos este resultado en la ecuación A.24 resulta:

$$k_2^0 = \frac{8 k_B T}{3\eta} \quad \text{A.26}$$

Esta es la constante de velocidad *rápida* ya que las expresiones de velocidad planteadas en la ecuaciones A.24 y A.26 corresponden a la condiciones de *floculación rápida*. Esto significa que no hay barrera que interfiera en el proceso de floculación. Trabajaremos ahora el caso en los que existe barrera que es la denominada *floculación lenta*.

Si observamos atentamente la ecuación A.21 y pensamos en situaciones más realistas la misma debe incluir un término de resistencia al proceso de floculación resultando una expresión como esta:



$$J A = -4\pi D x^2 \left( \frac{dN}{dx} \right) + \text{término de resistencia} \quad A.27$$

El problema ahora es definir ese término de resistencia. Haciendo algunas consideraciones<sup>50</sup> se lo puede definir así:

$$\text{término de resistencia} = \left( \frac{4\pi x^2 N}{f} \right) \left( \frac{d\Phi}{dx} \right) \quad A.28$$

Incorporando este término a la ecuación A.27:

$$J A = -4\pi x^2 \left( D \frac{dN}{dx} + \frac{N}{f} \frac{d\Phi}{dx} \right) \quad A.29$$

Aunque esta expresión fue derivada para el caso repulsivo, nada evita que se aplique la misma expresión para el caso de energías atractivas, en tal caso el  $d\Phi/dx$  tendría signo opuesto y el flujo hacia la partícula estacionaria sería creciente.

Sustituyendo  $f$  para el caso de esferas se obtiene:

$$J A = -4\pi x^2 \left( D \frac{dN}{dx} + \frac{DN}{k_B T} \frac{d\Phi}{dx} \right) \quad A.30$$

Eliminando nuevamente la restricción de partícula de referencia estacionaria reemplazamos  $D$  por  $2D$ , resultando:

$$(J A)' = -8\pi x^2 D \left( \frac{dN}{dx} + \frac{N}{k_B T} \frac{d\Phi}{dx} \right) \quad A.31$$

o, escrita de otra forma:

$$\frac{dN}{dx} + \left( \frac{N}{k_B T} \right) \frac{d\Phi}{dx} = - \frac{(J A)'}{8\pi x^2 D} \quad A.32$$

Esta es la ecuación diferencial que se debe resolver para obtener  $N$  como una función de  $x$  para la difusión en un gradiente de energía. La solución sería:

$$N \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) = -\int \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) \frac{(JA)'}{8\pi D} x^{-2} dx + \text{constante} \quad A.33$$

Si eliminamos la constante de integración considerando que para  $x = \infty$ ,  $N = N_0$  y  $\Phi = 0$ , la ecuación A.33 resulta:

$$N_0 = -\left[\int \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) \frac{(JA)'}{8\pi D} x^{-2} dx\right] \Big|_{x=\infty} + \text{constante} \quad A.34$$

Análogamente para  $x = 2R$ ,  $N = 0$ , resulta:

$$0 = -\left[\int \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) \frac{(JA)'}{8\pi D} x^{-2} dx\right] \Big|_{x=2R} + \text{constante} \quad A.35$$

Restando la ecuación A.35 de la A.34 resulta:

$$N_0 = -\frac{(JA)'}{8\pi D} \int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx \quad A.36$$

Se puede verificar sencillamente que para  $\Phi = 0$  se obtiene la original ecuación 23.

De la misma forma que en aquel caso si multiplicamos  $(JA)'$  por  $N_0$  obtendremos la velocidad inicial de formación de dobletes:

$$\text{Velocidad} = (JA)' N_0 = \frac{-8\pi D N_0^2}{\int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx} = -k_2 N_0^2 \quad A.37$$

donde  $k_2$  es ahora la constante de velocidad para el caso de *floculación lenta*.

Si ahora comparamos la ecuación A.24 (*floculación rápida*) con la ecuación A.37 (*floculación lenta*) se puede plantear la siguiente relación :

$$k_2 = \frac{k_2^0}{2R \int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx} = \frac{k_2^0}{W} \quad A.38$$

Esta ecuación finalmente revela la disminución de la constante de velocidad de floculación por la presencia de una barrera de energía, esa disminución es en un factor  $W$  llamado habitualmente *factor de estabilidad* que tendría entonces la siguiente expresión:

$$W = 2R \int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx \quad A.39$$

Cuando  $W=1$  estamos en el caso de una *floculación rápida*, sin barrera; cuando  $W$  adopta valores  $>1$ , estamos frente a un sistema estabilizado, existe una barrera que se opone a la floculación y sería un caso de *floculación lenta*.

Como ya fue expresado en la teoría D.L.V.O. y en el caso de repulsión estérica la expresión de  $\Phi$  ( $\Phi_{neta}$ ) como una función de la distancia ( $x$ ) es muy complicada, por lo tanto la integración de la ecuación A.39 se lleva a cabo, generalmente, en forma gráfica de las curvas de energía potencial, excepto que se establezcan suposiciones y se simplifique el caso.

Existen casos en los que se puede medir el valor de  $W$  y a partir de esto sacar alguna información sobre la energía potencial de interacción. Esto no resulta sencillo por la complicada relación entre  $W$  y  $\Phi_{neta}$  pero haciendo algunas suposiciones y aproximaciones hay, sin embargo, un avance importante en este sentido.







## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 Preparación de micelas de caseína (MC):

Se utilizó leche *descremada* en *polvo*. La gran variabilidad en composición proteica y mineral de la leche, debido a la variedad de razas en las vacas, el período gestacional de las mismas y la variaciones propias de las distintas estaciones del año por pasturas, etc., no permitieron el uso de leche fresca.<sup>1</sup> El *polvo*, por obtenerse de una mezcla de leches de distintas procedencias lo que incluye distintas razas, períodos gestacionales, etc. de las vacas, permitió obtener una muestra de leche representativa y constante. Esto permitió reproducibilidad en las experiencias y la posibilidad de comparar resultados de distintas épocas del año. Se seleccionó el polvo descremado de la marca comercial MOLICO (Nestlé) por ser obtenido con tratamientos térmicos a temperaturas menores a la de desnaturalización de las proteínas del suero. La razón del uso de polvo *descremado* fue la de disminuir los inconvenientes producidos por la presencia de grasa en las lecturas de turbidez.

La preparación de las MC fue la siguiente: la leche descremada en polvo fue reconstituída al 10% P/V en una solución de  $\text{CaCl}_2$  5mM. Esta suspensión contiene micelas de caseína (MC), proteínas de suero, sales y demás componentes de la leche descremada. Luego de reconstituída se le agregó azida sódica (como preservante microbiano) en una proporción no mayor al 0.01% P/V y se guardó en heladera, por lo menos una noche, antes de ser utilizada. Antes de realizar un

experimento la leche fue retirada de la heladera. Permaneció a temperatura ambiente hasta adoptar el valor de la misma. Luego se realizaron diluciones de esta suspensión de MC en el buffer correspondiente al estudio, se colocaron en un baño termostatzado a la temperatura que luego fue realizada la experiencia (por lo general 35 °C) y se mantuvieron en el baño hasta que las lecturas de turbidez a 400 nm permanecieron constante. Esto involucró aproximadamente 2 horas y permitió el equilibrio de las MC en el nuevo medio.

Las diluciones realizadas a la leche reconstituida para originar las suspensiones de MC fueron (generalmente) 1/100 (v/v).

### **2.1.2 Preparación de micelas de caseína modificadas (MCM):**

En este caso también, al igual que para las MC, se partió de leche descremada en polvo MOLICO y se procedió de la siguiente forma: la leche descremada en polvo fue reconstituida al 10% P/V en una solución de  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Esta suspensión fue calentada a 95 °C durante 10 minutos. Luego de ser enfriada, la solución se filtró en dos oportunidades: primero a través de un papel de filtro común (con la finalidad de retirar las proteínas de suero desnaturalizadas que se insolubilizan), y luego a través de un papel de filtro de vidrio poroso (Whatmann GF/A) para retener los glóbulos de grasa y alguna porción remanente de proteínas desnaturalizadas. Estos procedimientos de filtrado se realizaron con el apoyo de una bomba de vacío. A la suspensión resultante se le repuso el volumen con agregado de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Esta suspensión contiene micelas de caseína modificadas por calentamiento (MCM). En

este caso la mayor proporción de proteínas de suero es retenida en los filtros y no forma parte de la suspensión. Luego de ser reconstituidas y posteriormente modificadas, las suspensiones de MCM fueron sometidas a los mismos procedimientos descriptos para las suspensiones de MC.

### **2.1.3 Preparación de los buffers:**

Las diluciones de las suspensiones de MC y MCM fueron realizadas en soluciones buffers. La composición de estas soluciones dependió de la experiencia a realizar. Sin embargo, se preparó una solución que se consideró como *buffer base* o de *control*, siendo su composición la siguiente: imidazol 20 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  5mM, pH = 6.4. El  $\text{Ca}^{2+}$  se adicionó como cloruro y el valor de pH se obtuvo con agregados convenientes de soluciones de HCl 0.1 M y Na(OH) 0.1M. La calibración del electrodo para el ajuste de pH de los distintos buffers se realizó teniendo en cuenta la temperatura de trabajo.

En algunos casos, de acuerdo a la variable en estudio, se modificó la constitución del buffer base. A continuación se detalla la composición de los principales buffers utilizados en este trabajo.

*Buffers para evaluar el efecto de la concentración de caseína:* Se utilizó el buffer base. En este caso se modificaron las diluciones de la suspensión de MC o MCM de tal manera que permitieran obtener el rango de concentración de caseína deseado.

*Buffers para evaluar el efecto de la temperatura:* Se utilizó el buffer base o sea imidazol 20 mM ,  $\text{Ca}^{2+}$  5mM, pH=6.4.

*Buffers para evaluar el efecto de la viscosidad:* Se prepararon los buffers con la misma composición del buffer base más los agregados convenientes de glicerina que, además de cubrir un rango de viscosidad favorable para el estudio, no resultaran inconvenientes para el ajuste de pH y las medidas de viscosidad.

*Buffers para evaluar el efecto de los distintos iones:* Se prepararon con la composición del buffer base más el agregado de las distintas sales elegidas para el estudio. Las sales fueron NaCl, KCl, LiCl y CsCl. Los agregados se realizaron de manera de cubrir los siguientes valores de concentración de cada catión: 5, 10, 15 y 25 mM.

*Buffers para evaluar el efecto de la concentración de calcio:* En este caso la composición fue igual a la del buffer base excepto en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se prepararon tantos buffers como concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se desearon evaluar. Las concentraciones finales adicionadas comprendieron el rango entre 2,5 y 12mM

*Buffers para evaluar el efecto del pH:* En este caso se usó el buffer base pero se ajustó el pH a los distintos valores deseados. El ajuste se realizó con las mismas soluciones propuestas para ajustar el buffer base, o sea soluciones de HCl 0,1 M y Na(OH) 0,1M. Los pH estudiados comprendieron el rango entre 5,1 y 6,5.

#### **2.1.4 Preparación de la enzima:**

Como enzima proteolítica se utilizó una solución de cuajo Hansen, proveniente del abomaso de terneros mamones, proporcionado por una empresa lechera regional (COTAR). Antes de ser utilizado se evaluó su poder coagulante y se comparó con el



proporcionado por la empresa comercial. Las soluciones de cuajo utilizadas en cada experiencia cinética, se obtuvieron por dilución (generalmente 1/8 v/v) de este cuajo comercial en agua destilada y fueron preparadas cada vez que se realizó una experiencia. El poder coagulante de 100  $\mu$ l de esta dilución del cuajo comercial fue el equivalente a 0,030 RU. 1 RU se define como la actividad requerida para coagular 10 mL de sustrato, es decir 10 mL de una suspensión de leche en polvo descremada reconstituida ( $\sim 10,7\%$ P/V) en  $\text{CaCl}_2$  10 mM a su pH natural ( $\sim 6,35$ ), en 100seg. bajo las condiciones especificadas en el IDF Standar 110A (1987).<sup>53</sup>

#### **2.1.5 Reactivos utilizados:**

Las drogas utilizadas en este trabajo fueron (en la mayoría de los casos) de calidad pro-análisis. Las más importantes se detallan a continuación: NaCl (Merck), LiCl (Merck), CsCl (Merck), KCl (Mallinkrodt Chemical),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mallinkrodt Chemical), imidazol (Merck),  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  (Carlo Erba), EDTA- (sal disódica del ácido etilen diamino tetracético, Mallinkrodt Chemical).

Generalmente se prepararon soluciones stock de cada una de las drogas y en los casos necesarios se procedió a valorarlas antes de ser utilizadas. La solución stock de  $\text{CaCl}_2$  (0.1M), utilizada en la preparación de los distintos buffers, fue valorada a pH=12 frente a E.D.T.A. utilizando azul de hidroxinaftol como indicador.

Las proteínas necesarias para la preparación de las soluciones de testigos se adquirieron en Sigma Chemical Co. y fueron:  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina y albúmina bovina.

Para la preparación de los buffers con diferentes viscosidades se utilizó glicerina purísima (Cicarelli) donde el glicerol constituye el 99.8 %.

### **2.1.6 Equipos utilizados:**

#### ***Medidas espectroscópicas:***

Las medidas espectrofotométricas que involucraron longitudes de onda ( $\lambda$ ) en el ultravioleta (UV) y visible (V) se realizaron en un espectrofotómetro Beckmann DU 640 equipado con un portaceldas termostatizable. Las medidas consistieron en obtención de espectros, curvas cinéticas y lecturas de absorbancia (A) y turbidez ( $\tau$ ) a una  $\lambda$  fija. Las medidas de  $\tau$  se realizaron como medidas de A y no se necesitaron correcciones en las mediciones de  $\tau$  por la luz dispersada a pequeños ángulos hacia adelante, debido a que las partículas estudiadas son comparables en tamaño con la longitud de onda, lo que implica diferencias mínimas entre las medidas de turbidez y absorbancia.<sup>54</sup>

Las determinaciones de calcio por absorción atómica se realizaron en un Metrolab 250 AA con la lámpara correspondiente.

#### ***Medidas potenciométricas:***

Las medidas de pH se realizaron utilizando un pH-metro digital Corning 125 equipado con un electrodo de membrana de vidrio selectivo a protones combinado con un electrodo de referencia de calomel saturado.

***Medidas de viscosidad:***

Los valores de viscosidad de los buffers y de las distintas diluciones de micelas se obtuvieron utilizando un viscosímetro de Cannong-Fenske. Para regular la temperatura se trabajó en una sala calefaccionada.

***Medidas de índice de refracción:***

Se realizaron utilizando un refractómetro de Abbe equipado con una celda termostatizable e iluminado mediante una lámpara de tungsteno provisto de un monocromador de red de difracción que permitió hacer las lecturas a la  $\lambda$  requerida (600nm). La temperatura fue controlada con un baño de circulación de agua que se conectó al refractómetro.

***Medidas de densidad:***

Se realizaron por picnometría. Se utilizó una sala calefaccionada para controlar la temperatura. Fueron utilizadas en el cálculo de las viscosidades del medio.

***Ultracentrifugaciones:***

Se realizaron en una ultracentrífuga refrigerada Beckamnn L-8 -80M.

***Equipos de apoyo:***

Se utilizaron entre otros, baños termostatizados, baños de circulación de agua, bomba de vacío.

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Determinación de la concentración de proteínas totales y caseína:**

Ambas fueron determinadas por el método propuesto por Kuaye, A. en el año 1994.<sup>55</sup> Este método se basa en la capacidad que tienen las soluciones alcalinas fuertes ( $\text{pH} = 13$ ) de modificar el espectro del aminoácido tirosina a  $\lambda$  altas dentro de la región UV del espectro. En la región entre 248 y 256 nm la absorbancia es una función lineal de la  $\lambda$  y la pendiente es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Lo importante en este método es la composición del testigo: debe necesariamente contener 1 g/L de proteínas en total y respetar las proporciones de los constituyentes de la muestra a medir. Por ej., para determinar la concentración de proteínas totales de la leche el testigo debe contener aproximadamente los siguientes porcentajes: 79.5-80% de caseínas, 5% de albúmina bovina, 10-11% de  $\beta$ -lactoglobulina y 3-4% de  $\alpha$ -lactoalbúmina de manera de completar el 100% en una solución de 1g/L. Para determinar la concentración de caseínas en la leche, el testigo debe contener 100 % de caseínas, es decir 1g/L de las mismas (en lo posible respetando las proporciones de las distintas caseínas en las micelas). Para determinar la concentración de proteínas de suero el testigo debe contener aproximadamente 19-20% de  $\alpha$ -lactoalbúmina, 52-53% de  $\beta$ -lactoglobulina y 25-27% de Albúmina bovina de manera de obtener una solución de 1g/L de proteínas en total.

**Técnica:** A las suspensiones de leche que contienen MC (2.1.1) se les determinó la concentración de proteínas totales y la concentración caseínas.

Para determinar la concentración de proteínas totales se realizaron las siguientes diluciones en Na(OH) 0,25M: 1/250 (v/v) para la muestra y 1/5 (v/v) para el testigo. Se registró la absorbancia de ambas diluciones a 248 y 256nm. Luego se aplicó la relación establecida por Kuaye<sup>55</sup>:

$$[\text{proteínas totales}] \text{ (g/L)} = (A_{248}^M - A_{256}^M) / (A_{248}^T - A_{256}^T)$$

donde A con los distintos subíndices representa la absorbancia a esa  $\lambda$  y el supraíndice señala si se trata de la muestra (M) o del testigo (T). La concentración obtenida corresponde a la concentración de proteínas totales en g/L.

Para determinar la concentración de caseínas en las suspensiones de MC fue necesario realizar un paso previo. Esta suspensión contiene micelas de caseínas pero también proteínas de suero. Se precipitaron las caseínas de la suspensión llevando la solución a pH 4,6 (pH isoelectrico) con ácido Acético 0,5 M. Luego se filtró y al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas de suero con el método propuesto utilizando el testigo adecuado. Las diluciones en Na(OH) 0,25M fueron nuevamente 1/250 (v/v) para la muestra y 1/5 (v/v) para el testigo. Se corrigieron los valores de concentración por la dilución producida con el agregado de ácido acético. Con los valores de la concentración de proteínas totales y proteínas de suero se obtuvo, por diferencia, la concentración de caseínas de la muestra.

A las suspensiones de MCM (2.1.2) se les determinó únicamente la concentración de caseínas. La mayor parte de las proteínas de suero fueron retiradas

MSF

en la preparación de las MCM. Las diluciones en Na(OH) 0,25M fueron 1/500 (v/v) para las muestras y 1/10 (v/v) para el testigo.

La formulación utilizada para la determinación de proteínas por el método de Kuaye es válida para los casos donde la relación (Lípidos/Proteínas)  $\leq 0,05$ . Para la leche, teniendo en cuenta el contenido de proteínas, el contenido de grasa no debe superar el 1,5% P/P para utilizar esta formulación. Para los casos que exista una relación mayor el método de Kuaye<sup>55</sup> propone una expresión alternativa que introduce un factor de corrección. En este trabajo se utilizaron leches descremadas con menor proporción de grasa que la sugerida como límite.

### **2.2.2 Determinación de caseinomacropéptidos (CMP):**

Una manera de evaluar el avance de la reacción enzimática, correspondiente a la primera etapa de coagulación, es estimar la concentración de macropéptidos liberados luego de la acción proteolítica. Como ya se describió en la Introducción existen macropéptidos con distintas proporciones de porción glucídica; todos se incluyen con la denominación de caseinomacropéptidos (CMP). Los más ricos en glicósidos se denominan glicomacropéptidos (GMP). Aunque existen métodos para diferenciar unos de otros; esto no es de interés en este trabajo, por lo tanto se utilizó una técnica que evalúa la totalidad de ellos o sea los CMP. Para ello se recurrió al ácido tricloroacético (TCA) al 3% P/V que produce la precipitación de todas las proteínas de las suspensiones de micelas, excepto de los CMP y péptidos menores.<sup>56</sup>

**Técnica:** Varios tubos conteniendo alícuotas de 3 mL de la suspensión en estudio se colocaron en un baño termostatzado a 35°C (o a la temperatura que correspondiera). Cuando los valores de  $\tau_{400}$  de las suspensiones permanecieron constantes (~ 2horas) se les agregó 100 $\mu$ l (o lo que correspondiera) de la dilución de cuajo 1/8 (v/v) a cada tubo. Se agitaron y en el mismo baño se detuvo la reacción agregando, a distintos tiempos en cada tubo, 3 mL de TCA al 6% P/V. Se agitó nuevamente y se dejaron en el baño durante 15 minutos más. Los tiempos seleccionados para el agregado de TCA fueron: 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 y 180 segundos. Las experiencias para cada tiempo se realizaron por triplicado. Se realizó un ensayo en blanco, es decir un tubo conteniendo 3ml de suspensión y 3mL de TCA (sin agregado de enzima). Este ensayo permitió evaluar los péptidos propios de la suspensión. Cuando transcurrieron los 15 min. los tubos se retiraron del baño y se centrifugaron para depositar las proteínas desnaturalizadas. Los sobrenadantes fueron inmediatamente separados y en ellos se determinó el contenido de CMP por el método de Lowry-Peterson.<sup>57</sup> Éste consiste en una modificación del método colorimétrico de Lowry original y permite estimar los péptidos solubles del sobrenadante. Como el interés no fue conocer el valor de la concentración de CMP los resultados se expresaron como  $A_{750}$ ; es decir, no se procesaron testigos de CMP en el método de Lowry-Peterson.

### 2.2.3 Determinación del radio promedio de las MC por medidas de turbidez:

La turbidez ( $\tau$ ) de una suspensión de partículas esféricas polidispersas es una función de la concentración en número de partículas y de la distribución de tamaño de las mismas. Sin embargo, la estimación de la función de distribución de tamaño por medidas de  $\tau$  no siempre es posible y esto está relacionado con los valores de índices de refracción, tamaño de las partículas y la longitud de onda utilizada.<sup>58</sup> Este es el caso de las MC en nuestras condiciones de trabajo. No obstante, para una suspensión polidispersa de partículas esféricas suficientemente diluidas y distribuidas al azar, de manera que la dispersión múltiple de la luz y las interacciones entre partículas sean despreciables, la turbidez específica ( $\tau/c$ ), definida como el cociente entre la  $\tau$  y la concentración en peso de la partícula ( $c$ ), puede relacionarse con un radio medio de las partículas ( $R_m$ ) de acuerdo a la siguiente expresión<sup>59</sup>:

$$\frac{\tau}{c} = K \int_0^\pi P(q, R_m) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad 2.1$$

En este caso,  $R_m$  de las MC es un valor numericamente igual al radio promedio en peso de la verdadera distribución de tamaño de las partículas.  $P(q, R_m)$  es el factor de forma de las partículas suspendidas y da cuenta de las interferencias de la luz dispersada por las diferentes partes de una partícula. Para partículas esféricas en la teoría de Rayleigh-Debye-Gans (RDG) este factor adopta la siguiente expresión:

$$P(q, R_m) = \left[ \frac{3}{(qR_m)^3} (\sin qR_m - qR_m \cos qR_m) \right]^2 \quad 2.2$$



$\theta$  y  $q$  son respectivamente el ángulo y el vector de la luz dispersada. Siendo la expresión de  $q$  la siguiente:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad 2.3$$

donde  $n_0$  es el índice de refracción del medio y  $K$ , de acuerdo a Kerker<sup>59</sup> puede ser expresada así:

$$K = \frac{16\pi^4 n_0^2 (n_1 - n_0)^2 R_m^3}{3\rho_1 \lambda^4} \quad 2.4$$

donde  $\rho_1$  y  $n_1$  son, respectivamente, la densidad e índice de refracción de las partículas.

Analizando los datos de la literatura, si consideramos un valor de 1,575 para  $n_1$  a 600nm<sup>60</sup> y asumiendo un diámetro promedio de 200nm para las micelas, las suspensiones de MC estarían en condiciones favorables para la aplicación de la teoría RDG<sup>59</sup> (sección 2.2.5). De esta manera se podría, con las medidas de  $\tau$  y una serie de parámetros realizar un ajuste de la ecuación 1 y obtener el valor de  $R_m$ . Luego se comprobó experimentalmente el cumplimiento de nuestro sistema con las condiciones RDG.

**Técnica:** Se registró la  $\tau$  a 600nm de las distintas diluciones de MC. Estas diluciones, previamente habían sido equilibradas a la temperatura de trabajo hasta obtener un valor constante de  $\tau$  (sección 2.1.1). Se trabajó con un portaceldas termostatizable para mantener la temperatura de trabajo. La  $\tau$  fue medida como

absorbancia (A) y luego se calculó el valor real de la misma teniendo en cuenta la relación entre ambas.<sup>61</sup>

$$\tau = 2,303 A b^{-1} \quad 2.5$$

Los valores residuales de  $\tau$  debidos a los glóbulos de grasa todavía presentes, fueron medidos luego de la disociación de las MC por adición de una solución conteniendo EDTA 0.11M, Na(OH) 0.15M y 0.1 (v/v) de solución de Tween 20 y fueron restados de los valores originales de  $\tau$ .

Con los valores de  $\tau$  y de los distintos parámetros necesarios para aplicar la ecuación 1, se procedió al ajuste por computadora de estos datos hasta obtener el valor de  $R_m$  que se correspondiera con el dato experimental de  $\tau$ . Se utilizó el programa Sigma Plot 2.0 en el entorno de Windows 3.1.

#### **2.2.4 Evaluación del estado de las MC y MCC por medidas de turbidez.**

Para obtener el valor del  $R_m$  utilizando las ecuaciones de  $\tau$  planteadas en la sección 2.2.3 es necesario conocer una serie de parámetros a los que no siempre es fácil de acceder. Por ejemplo, en el caso de las MCM hay varios parámetros desconocidos y difíciles de determinar en todas las situaciones planteadas para evaluar. En estos casos, basándonos en las teorías de turbidez, se recurrió a expresiones alternativas de la  $\tau$  que no requieran los parámetros en cuestión y que permitieran evaluar el tamaño medio de las micelas en cada situación.

En el caso de una suspensión de partículas monodispersas de masa  $M$ , concentración  $c$  y con índices de refracción cercanos a los del solvente, la  $\tau$  puede expresarse de la siguiente forma<sup>62</sup>:

$$\tau = H c M Q \quad 2.6$$

donde  $H$  es:

$$H = \frac{32\pi^3 n_0^2 \left( \frac{\partial n_1}{\partial c} \right)^2}{3 N_A \lambda^4} \quad 2.7$$

siendo  $n_0$  y  $n_1$  los índices de refracción del solvente puro y la solución respectivamente,  $(\partial n_1 / \partial c)$  el incremento específico del índice de refracción,  $N_A$  el número de Avogadro,  $\lambda$  la longitud de onda.  $Q$  es el factor de dispersión que se incorpora a la expresión de  $\tau$  cuando las partículas no cumplen con la condición de ser dimensionalmente menores que la  $\lambda$  incidente, es decir no cumplen con la aproximación de Rayleigh. Este factor da cuenta de las interferencias de la luz dispersada por diferentes partes de una misma partícula a todos los ángulos  $\theta$  (ángulo de dispersión de la luz) y es dependiente de la forma y tamaño de las mismas a través del factor de forma  $(P(q, R))$  donde  $q$  es el vector de dispersión de la luz y  $R$  el radio de la partícula. Para altos grados de agregación se debe tener en cuenta la naturaleza fractal de los agregados a través de un adecuado factor de forma.  $Q$  se puede expresar de la siguiente manera:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R_m) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad 2.8$$

Reemplazando la ecuación 2.7 en la ecuación 2.6 y derivando se obtiene un parámetro  $\alpha$ :

$$\alpha = -\left[\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda}\right] = 4 - \frac{\partial \log Q}{\partial \log \lambda} - 2 \frac{\left[\frac{\partial \log \left(\frac{\partial n_1}{\partial c}\right)}{\partial \log \lambda}\right]}{\partial \log \lambda} = 4 - \beta - \gamma \quad 2.9$$

donde  $\gamma$  tiene un valor de -0.2 para proteínas como las caseínas en el rango de 400-800 nm.<sup>63</sup>

Se ha demostrado que  $\beta$  está relacionada en forma directa con el cociente de  $R/\lambda$ . Por lo tanto se puede concluir que, a  $\lambda$  constante, si  $R$  disminuye  $\beta$  también lo hará y en consecuencia el valor absoluto de  $\alpha$  ( $|\alpha|$ ) aumentará. Es decir que  $|\alpha|$  se encuentra relacionado inversamente con el tamaño de la partícula.

En el caso de las MC y MCM no podemos tratar al sistema como monodisperso. Teniendo en cuenta la polidispersión de las suspensiones, la  $\tau$  es ahora función del peso molecular promedio en peso ( $M_p$ ) y del factor de disipación promedio  $z$  ( $Q_z$ ) que ahora depende de una función de distribución de tamaños:

$$\tau = H c M_p Q_z \quad 2.10$$

Se puede demostrar la misma relación entre  $|\alpha|$  y el tamaño de las partículas suspendidas, excepto que ahora se relaciona con un radio promedio en peso de la distribución.<sup>63</sup>

De esta forma los valores del parámetro  $\alpha$  permiten evaluar cambios en el tamaño de las micelas, y si esto se acompaña con los valores de  $\tau$  y estimaciones del

$M_p$  se pueden elaborar conclusiones sobre el estado de las micelas en las distintas condiciones de trabajo.

**Técnica:** En cubetas rectangulares (1 cm de paso óptico y 3 mL de volumen) de un portaceldas termostatizable se colocaron alícuotas de las distintas diluciones de MC o MCM (previamente equilibradas a la temperatura de trabajo) y se midió la  $\tau$  entre 400 y 600 nm. La  $\tau$  fue registrada como absorbancia (A) y los valores residuales de  $\tau$  debidos a glóbulos de grasa fueron descontados como se describió en la sección 2.2.3.

El valor de  $\alpha$  ( $= -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda}$ ) se obtuvo de la siguiente manera <sup>61</sup>

$$\tau = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) b^{-1} \quad 2.11$$

Siendo  $b$  el camino óptico,  $I_0$  e  $I$  las intensidades de luz incidente y transmitida respectivamente.

Y sabiendo que la  $A$  tiene la siguiente expresión:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad 2.12$$

La  $\tau$  resulta (ecuación 2.5):

$$\tau = 2,303 A b^{-1}$$

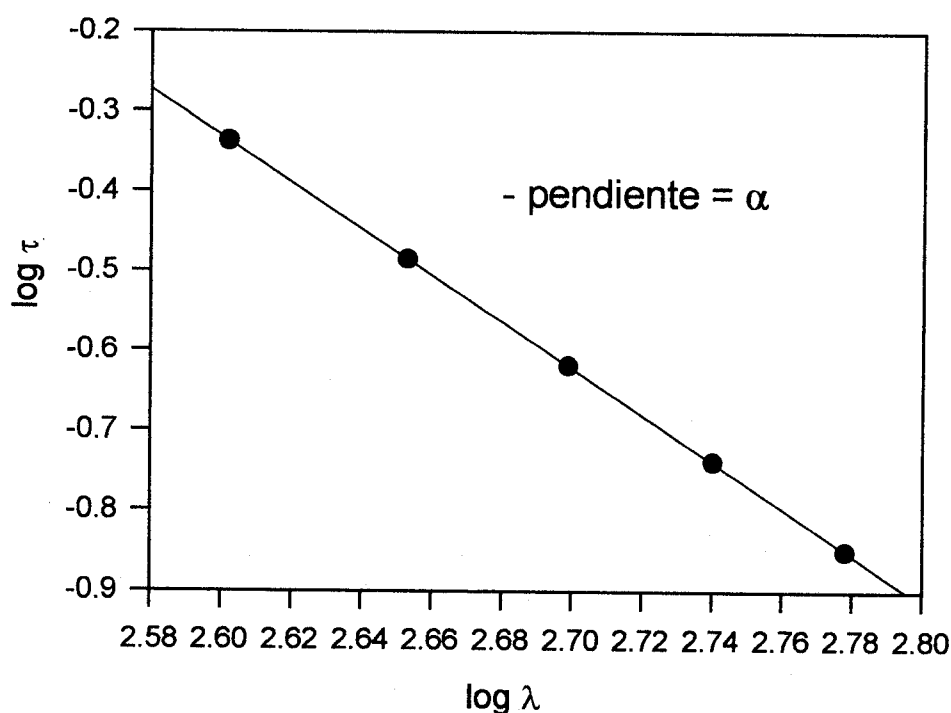
Al aplicar log  $\Rightarrow$

$$\log \tau = \log 2,303 + \log A - \log b \quad 2.13$$

Al derivar con respecto a la  $\lambda \Rightarrow$

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} \quad 2.14$$

de manera que para obtener el valor de  $\alpha$  se puede aplicar directamente el logaritmo a los valores de  $A$  y graficarlos en función del logaritmo de la longitud de onda. La pendiente de este gráfico permite obtener el valor de  $\alpha$ . La Figura 2.1 presenta un ejemplo, en ella se detalla el máximo desvío y el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) que presentó esta determinación en el presente trabajo. Con los valores de  $\alpha$  y los de la  $\tau_{400}$  se evaluó el estado inicial de las MC o MCM antes de comenzar el estudio de las cinéticas de coagulación por cuajo.



**Figura 2.1.** Ejemplo de la obtención de los valores de  $\alpha$  para una suspensión de micelas de caseína. Pendiente = -2,91(2) y  $r^2 = 0,99$ .

### 2.2.5 Determinación de la velocidad de agregación:

La velocidad de coagulación de la leche incluyendo la etapa proteolítica y de agregación, fue evaluada por muchos investigadores y por muy diferentes métodos: viscosidad, dispersión de la luz, microscopía electrónica, etc.<sup>64</sup> Varios modelos cinéticos han sido propuestos para resolver el proceso completo, incluyendo habitualmente el análisis de la etapa proteolítica por una cinética de Michaelis-Menten y la cinética de agregación de las MpC a través de la aproximación de von Smoluchowski para la agregación browniana a tiempos iniciales.<sup>26,33,35</sup>

Nuestro objetivo es separar la etapa enzimática de la de agregación y estudiar esta última por técnicas turbidimétricas basándonos en la teoría de von Smoluchowski. La hipótesis de esta teoría plantea que la desaparición de partículas primarias de una suspensión diluida de partículas homogéneas para formar dobletes sigue una cinética de segundo orden:

$$\frac{\partial N(t)}{\partial t} = -k_2 N^2(t) \quad 2.15$$

siendo  $N(t)$  la densidad en número de partículas primarias y  $k_2$  la constante de velocidad de segundo orden determinada por la velocidad de difusión de las partículas y la eficiencia de las colisiones. A tiempos iniciales donde  $N(t) \approx N_0$ , la densidad inicial en número de las MpC, la velocidad puede reescribirse:

$$\left( \frac{\partial N(t)}{\partial t} \right)_0 = -k_2 N_0^2 \quad 2.16$$

De esta expresión surge que estimando la desaparición de partículas primarias a tiempos iniciales se podría obtener información de la velocidad de agregación en distintas situaciones.

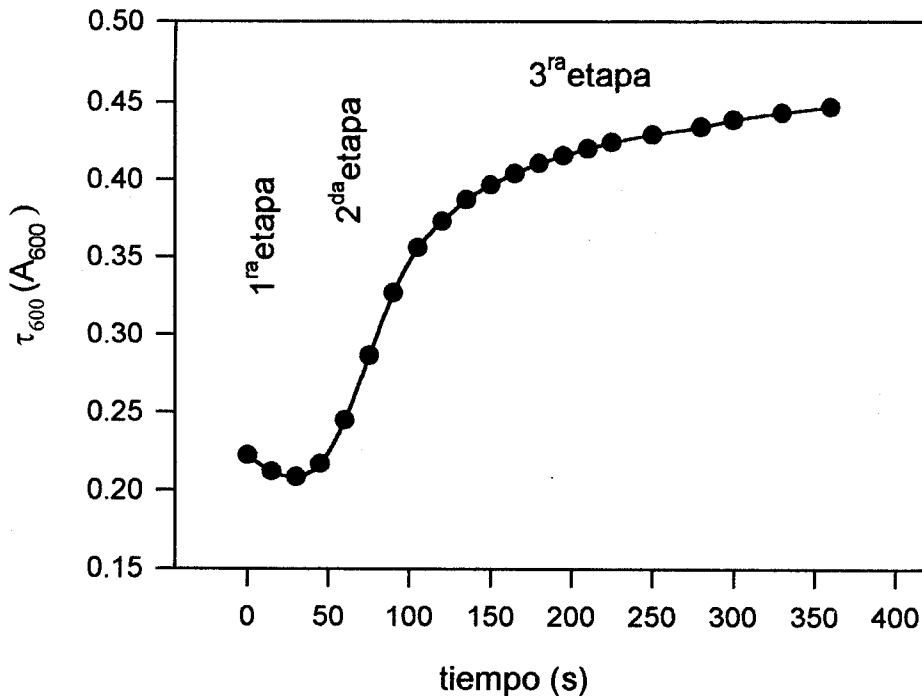
***Estimación de la  $k_2$  por medidas de turbidez:***

Varios autores han demostrado que la etapa de agregación no comienza hasta que la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína es completa o ha alcanzado altos porcentajes de conversión. Estos valores oscilan, de acuerdo a los distintos autores, entre el 60-85% del total de conversión.<sup>26,35,40,41,65</sup> Luego que se alcanzan estos porcentajes comienza la etapa de agregación y se produce una superposición de esta etapa con el final de la etapa proteolítica.

La turbidez ha sido usada para seguir la cinética de coagulación de las MpC por otros autores.<sup>66</sup> Durante la etapa proteolítica se observa una ligera disminución de la turbidez debido a la reducción de tamaño de las micelas por la pérdida de los caseinomacropéptidos (CMP). Luego la turbidez aumenta progresivamente a medida que avanza la etapa de agregación (Figura 2.2). Estos efectos están simultáneamente presente cuando el fin de la primera etapa se superpone con el comienzo de la segunda haciendo muy difícil o imposible obtener datos de turbidez a tiempos iniciales, es decir que correspondan únicamente a la agregación.

MSP

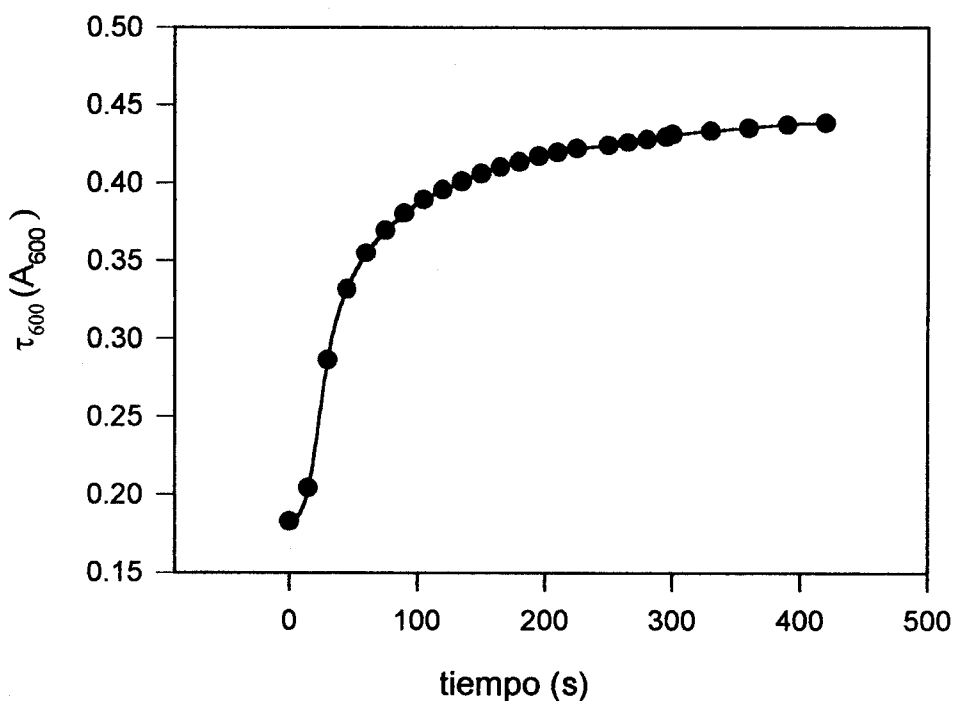




**Figura 2.2.** Cambios de la turbidez ( $\tau$ ) en función del tiempo durante las distintas etapas de la coagulación enzimática de las micelas de caseína.

En el presente trabajo se propuso separar la etapa proteolítica de la de agregación trabajando en condiciones adecuadas. Existen trabajos tendientes a lograr esta separación usando la propiedad que presenta la leche de no coagular a bajas temperaturas. En estos trabajos se realiza la proteólisis completa trabajando entre 4-10°C y luego al elevar la temperatura da comienzo la agregación; tal como fue propuesto por Dalglish.<sup>67</sup> Esta propuesta, aunque fue evaluada como posibilidad de trabajo, no pudo ser aplicada. La turbidez de las MC, al someter estas a un brusco cambio de temperatura (4-35°C), sufre un aumento debido a la reacomodación de su

estructura, proceso cuya finalización demanda tiempos del orden de horas. Por otra parte, las MC hidrolizadas en frío, al calentar comienzan a coagular con el consecuente aumento de la turbidez que se lleva a cabo simultáneamente con el aumento por los cambios estructurales impidiendo el estudio de coagulación por medidas de turbidez. Trabajando a relaciones de concentración enzima/sustrato elevadas, la primera etapa puede completarse en muy cortos tiempos (segundos) prácticamente antes de que sean detectables aumentos de  $\tau$  debidos a la agregación. Esta última propuesta fue presentada por Carlson et al.<sup>41</sup> y resultó apta para nuestros propósitos.



**Figura 2.3.** Cambios de la turbidez ( $\tau$ ) en función del tiempo durante la segunda etapa de la coagulación enzimática de las micelas de caseína de la leche.

Se evaluó (a través de la liberación de CMP, sección 2.2.1) la concentración de enzima que permitiera completar la etapa proteolítica en un corto tiempo (15-30 segundos) para cada condición en estudio. De esta forma el aumento de  $\tau$  registrado a partir de este tiempo correspondería exclusivamente al proceso de agregación (Figura 2.3.).

La teoría de Rayleigh-Debye-Gans (RDG) ha sido usada para desarrollar ecuaciones que evalúan la dispersión de la luz para partículas esféricas en proceso de agregación que podrían ser aplicada en los estados iniciales de la agregación de MpC. (Kerker, 7 de faraday)

La  $\tau$  a tiempos iniciales del proceso de agregación puede ser expresada como:

$$\tau = \tau_0 + 2 Kc \frac{N_2(t)}{N_0} \int_0^\pi P(q, R_m) \frac{\sin 2q R_m}{q R_m} (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad 2.17$$

donde solamente la formación de dobletes ha sido considerada. En este caso  $N_2(t)$  es la densidad en número de dobletes al tiempo  $t$  y  $N_0$  el número inicial de partículas. Para partículas esféricas en la teoría de RDG el  $P(q, R_m)$  adopta la expresión planteada en la ecuación 2.2. Para altos grados de agregación se debería considerar la naturaleza fractal de los agregados de MpC a través de un apropiado factor de forma, no necesario en nuestro caso.

La velocidad de incremento en la  $\tau$  estará dada por:

$$\left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right) = \left[ \frac{\partial N_2(t)}{\partial t} \right] \times \left[ 2 Kc \int_0^\pi P(q, R_m) \frac{\sin 2q R_m}{q R_m} (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \right] \quad 2.18$$

y si tenemos en cuenta la siguiente relación :

$$\frac{\partial N_2(t)}{\partial t} = -\frac{1}{2} \frac{\partial N(t)}{\partial t} \quad 2.19$$

se obtiene:

$$\frac{\partial N(t)}{\partial t} = -\left(\frac{\partial \tau}{\partial t}\right) \frac{1}{K^*} \quad 2.20$$

Donde  $K^*$  representa el segundo término entre corchetes de la ecuación 2.18.

A tiempos iniciales:

$$\left[ \frac{\partial N(t)}{\partial t} \right]_0 = -\left(\frac{\partial \tau}{\partial t}\right)_0 \frac{1}{K^*} \quad 2.21$$

De esta manera se demuestra que, siempre que el cálculo de  $K^*$  sea posible, la velocidad de incremento en la turbidez a tiempos iniciales,  $(\partial \tau / \partial t)_0$ , puede ser usada para estimar la desaparición de partículas primarias a tiempos iniciales  $([\partial N(t) / \partial t]_0)$ .

De esta forma teniendo en cuenta la ecuación 2.16 resulta la siguiente expresión:

$$-\left(\frac{\partial \tau}{\partial t}\right)_0 \frac{1}{K^*} = -k_2 N_0^2 \quad 2.22$$

Con medidas de  $(\partial \tau / \partial t)_0$ , el cálculo de  $K^*$  y expresando  $N_0$  en términos de la concentración y densidad de las partículas se puede obtener el valor de  $k_2$ .

Los parámetros para calcular  $K^*$  no siempre son fáciles de conocer a través de la literatura ni de determinar para las distintas condiciones de trabajo, sobre todo para las MC en presencia de distintos iones y para las MCM.

Una propuesta para superar estas dificultades fue seguir el proceso de agregación con los valores de turbidez relativos a la turbidez inicial, es decir  $\tau/\tau_0$  que tiene la siguiente expresión:

$$\frac{\tau}{\tau_0} = 1 + 2 \frac{N_2}{N_0} I(R_m) \quad 2.23$$

De las ecuaciones 2.1 y 2.17 resulta para  $I(R_m)$  la siguiente expresión:

$$I(R_m) = \frac{\int_0^\pi P(q, R_m) \sin 2qR_m (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi P(q, R_m) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta} \quad 2.24$$

$I(R)$  es función únicamente de  $R_m$ .

La velocidad de incremento relativo en la turbidez resulta:

$$\frac{\partial(\tau/\tau_0)}{\partial t} = \frac{2I(R_m)}{N_0} \left[ \frac{\partial N_2(t)}{\partial t} \right] \quad 2.25$$

y utilizando nuevamente la relación de la ecuación 2.19 se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{\partial(\tau/\tau_0)}{\partial t} = \frac{I(R_m)k_2}{N_0} N^2(t) \quad 2.26$$

que para tiempos iniciales

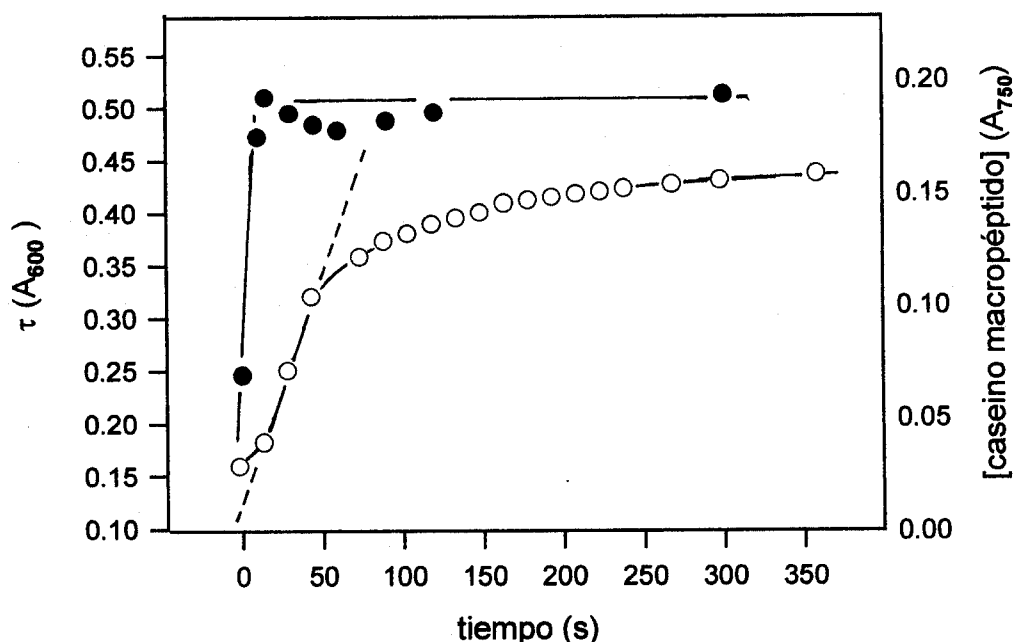
$$\frac{\partial(\tau/\tau_0)}{\partial t} = I(R_m)k_2 N_0 \quad 2.27$$

Por lo tanto, la  $(\partial\tau/\partial t)/\tau_0$  permite comparar la velocidad inicial de agregación para muestras en diferentes condiciones, siempre que las mismas tengan el mismo  $N_0$  y no presenten variaciones de tamaño.

**Técnica:** Tanto para los casos en los que se pudo calcular el valor de  $K^*$  (y en consecuencia el valor de  $k_2$ ) como en los que se estimó la velocidad de agregación por la  $(\partial\tau/\partial t)/\tau_0$  de acuerdo a la ecuación 2.27 la cinética de agregación fue estudiada siguiendo la  $\tau$  del sistema a 600 nm. Una alícuota de 3 mL de la suspensión de MC o MCM, previamente diluída y equilibrada a la temperatura de trabajo, fue transferida a una cubeta de 1 cm de paso óptico ubicada en un portacubetas termostatzado a la temperatura de trabajo. Se registró el valor inicial de la turbidez ( $\tau_0$ ) y se dió comienzo a la coagulación mediante el agregado de 100  $\mu$ L (o lo que correspondiera) de una dilución de cuajo 1/8 (v/v). La mezcla fue agitada con una varilla de teflon durante 5 s y luego se dejó evolucionar al sistema durante 5 a 10 minutos. Este tiempo dependió de la variable y el sistema en estudio. Los valores de  $\tau$  fueron registrados cada 15 seg. y luego se graficaron en función del tiempo.

La velocidad de incremento en la turbidez a tiempos iniciales  $((\partial\tau/\partial t)_0)$  fue calculada como la pendiente máxima de este gráfico para un tiempo en el cual la liberación de CMP podía considerarse completa (Figura 2.4). Con el valor de  $R_m$  obtenido según lo desarrollado en la sección 2.2.3. se calculó el valor de  $K^*$ . Se utilizó el programa Sigma Plot 2.0 bajo entorno Windows 3.1. Posteriormente aplicando la ecuación 2.22 se calculó el valor  $k_2$ .

Los valores de incremento en la turbidez relativa a tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)/\tau_0$  se calcularon de la misma forma que para  $(\partial\tau/\partial t)_0$  y luego se dividió por los valores de  $\tau_0$  correspondientes.



**Figura 2.4.** Liberación de CMP, agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo y  $(\partial\tau/\partial t)_0$ . (●): Concentración de CMP liberado expresado como A a 750nm. (○):  $\tau$  expresada como A a 600nm.(----): derivada máxima de la turbidez respecto al tiempo.

A pesar de las especulaciones de diversos autores, que llevaron en algunos casos a la propuesta de modelos especiales para la agregación de las MpC41, la forma particular de las curvas de  $\tau$  vs. tiempo no ha sido completamente explicada, especialmente en lo que respecta a su apartamiento de la linealidad luego de los tiempos iniciales. Es interesante destacar que el planteo aquí desarrollado permite, utilizando los factores de forma propuestos para trímeros, tetrameros, etc. de esferas sin interacciones, que cumplen con la teoría de RDG<sup>59</sup>, y la ecuación de conservación de masa planteado para el proceso total de agregación, la simulación de curvas  $\tau$  vs. tiempo reproducen totalmente las características de las curvas

experimentales. Es decir que dichas características son propias del proceso de agregación, no requiriendo explicaciones adicionales.

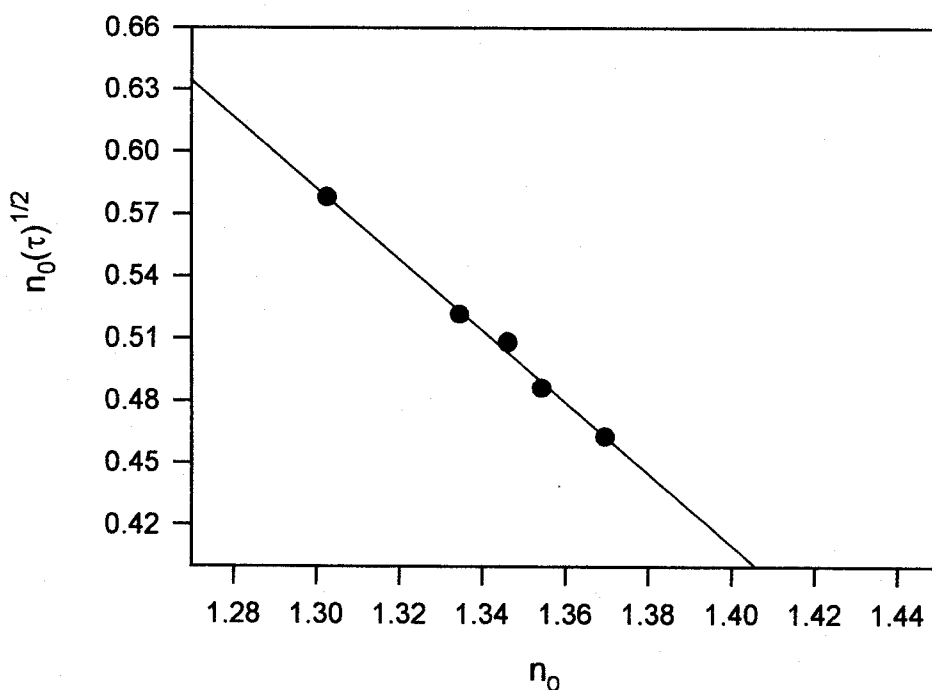
### **2.2.6 Determinación del índice de refracción de las micelas de caseína**

La aproximación de la teoría de RDG se puede aplicar a una suspensión de partículas si  $m$ , cociente entre el índice de refracción de las mismas ( $n_1$ ) y el índice de refracción del medio ( $n_0$ ) es cercano a 1, es decir  $|m-1| \ll 1$  y para esferas si  $2\alpha|m-1| \ll 1$ , siendo  $\alpha = 2\pi R/\lambda = 2\pi R n_0/\lambda_0$ , donde  $R$  es el radio de las partículas y  $\lambda_0$  y  $\lambda$  son las longitudes de onda en el vacío y en el medio respectivamente.<sup>60</sup>

Walstra mostró que para partículas que cumplen con la aproximación de RDG, si se varía el  $n_0$  manteniendo constante el valor de  $\alpha$  (con una variación adecuada de  $\lambda_0$ ) y luego se grafica  $n_0\sqrt{\tau}$  en función de  $n_0$ , siendo  $\tau$  la turbidez de la solución a la longitud de onda calculada, se puede obtener por interpolación en el eje  $x$  el valor de  $n_1$  donde el mismo se iguala a  $n_0$ .<sup>60</sup>

En el caso de las MC si consideramos  $n_1 \sim 1,5$ <sup>60</sup> y sabiendo que  $n_0 \sim 1,327$  resulta un valor de  $m \sim 1,1$ . Además si consideramos un  $R$  promedio de 100nm y  $\lambda_0 = 600\text{nm}$ , el valor de  $\alpha$  resulta  $\sim 1,38$  y el valor de  $2\alpha|m-1| \sim 0,3$ . Por lo tanto las MC cumplen con la aproximación RDG a 600nm. Se aplicó la técnica propuesta por Walstra y se utilizó glicerol para las modificaciones del índice de refracción debido a que tiene un índice de refracción mayor que el agua (1,474) y por no presentar ningún efecto sobre la distribución de tamaño de las MC.<sup>60</sup>





**Figura 2.5.** Ejemplo de la determinación del índice de refracción de las micelas de caseína  $n_1$ . Ecuación:  $n_0\sqrt{\tau} = -1,723(6) n_0 + 2,821(7)$ .  $n_1 = 1,631$

**Técnica:** Se prepararon diluciones 1/100 v/v de las MC en buffers conteniendo glicerol en distintos porcentajes (0, 5, 10, 15, 20, 30% v/v). Luego de equilibrar las suspensiones de MC durante ~ 2horas a la temperatura deseada se procedió a leer los índices de refracción de los buffers respectivos ( $n_0$ ). Se trabajó con un refractómetro termostatzado. Con el valor de  $n_0$  del buffer sin glicerol se calculó el cociente  $n_0/\lambda_0$  y con los valores de  $n_0$  de los distintos buffers (con glicerol) se calculó la  $\lambda$  a la que se debía leer la  $\tau$  de las diluciones de MC de manera de mantener constante  $n_0/\lambda_0$  y en consecuencia constante el valor de  $\alpha$  de acuerdo a lo

propuesto por Walstra.<sup>60</sup> Luego se graficó  $n_0\sqrt{\tau}$  en función de  $n_0$ , se realizó una regresión lineal por cuadrados mínimos y se obtuvo el valor de  $n_1$  para la situación de trabajo propuesta. La Figura 2.5 muestra una determinación como ejemplo y en ella se señalan los parámetros estadísticos inherente a esta determinación en las condiciones del presente trabajo.

### 2.2.7 Estimación de la dimensión fractal de los agregado de MpC:

En la sección 2.2.4. la ecuación 2.10, que expresa la  $\tau$  para suspensiones de partículas polidispersas, contiene un factor de disipación ( $-Qz$ ) que es función de un factor de forma para monómeros  $P(q,R)$ . En los casos que existe agregación debería considerarse la naturaleza fractal de los agregados con un adecuado factor de forma. Reformulando la ecuación 2.8 para estos casos, según Horne<sup>63</sup> resulta la siguiente expresión:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R_m) S(q) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad 2.28$$

Incorporando esta ecuación a la expresión de  $\tau$ , aplicando log y derivando con respecto a  $\lambda$  se obtiene un expresión similar a ecuación 2.9

$$\alpha = - \left[ \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right] = 4 - \frac{\partial \log Q}{\partial \log \lambda} - 2 \left[ \frac{\partial \log \left( \frac{\partial n_1}{\partial c} \right)}{\partial \log \lambda} \right] = 4 - \beta - \gamma$$

Puede demostrarse que  $\beta$  tiende al valor de la dimensión fractal ( $D_f$ ) cuando se han formado agregados grandes.<sup>63</sup> Para medidas de  $\tau$  entre 400-800nm un valor de  $\gamma \sim 0,02$  se considera apropiado para proteínas en general. De esta manera conociendo

el valor de  $\alpha$ , cuando las curvas de  $\tau$  en función del tiempo han llegado a un valor máximo y constante, se puede calcular la dimensión fractal ( $D_f$ ) de los agregados.

**Técnica:** Cuando las lecturas de  $\tau$  llegan a un valor constante luego del agregado de cuajo (final de la técnica para determinar velocidad de agregación) se registran los valores de  $\tau$  en función de  $\lambda$  y se procede a obtener el valor de  $\alpha$  como fuera descrito en la técnica de la sección 2.2.4. Con este valor y aplicando la ecuación 2.9 se obtuvo el valor de  $\beta$  que estima la  $D_f$  de los agregados.

#### **2.2.8 Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ por absorción atómica (AA):**

Cuando se evaluó el efecto de los distintos iones sobre la estabilidad de las MC, la determinación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  desplazados por cada una de las sales en estudio se realizaron por AA.

**Técnica:** Se realizaron diluciones de las muestras y se registraron los valores de A a la  $\lambda$  correspondiente. Para obtener la concentración, estos valores se interpolaron sobre una curva de calibración construida con testigos adecuados para tal fin. Como la muestra contiene material refractario (partículas de fosfato de calcio) las diluciones de muestras y testigos se realizaron en una solución al 1% P/V de  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ .

Condiciones:  $\lambda = 422,67\text{nm}$ ; paso de corriente: 10mA; sensibilidad: 0,050; rango de linealidad: 1-4ppm. Se utilizó una mezcla aire-acetileno.



ESTUDIOS SOBRE NICOLÁS DE CASCINA Y SU  
CONTRIBUCIÓN AL RENAJAMIENTO

### **CAPÍTULO III**



## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Efecto de la concentración de caseína

#### 3.1.1 Resultados:

El estado inicial de las MC se evaluó a través de la turbidez específica a 600nm (25°C) y de los radios aparentes en agua ( $R_a$ ) de las micelas en las diferentes concentraciones de caseína en leche (Tabla 3.1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1.

Los valores de los  $R_a$  se obtuvieron como se plantea en la sección 2.3.3. Se procedió al manejo correspondiente de la ecuación 2.4 de manera de obtener el valor de  $R_a$  que coincida el valor experimental de la  $r_{90}$  a cada concentración de caseína. Los datos necesarios para aplicar esta ecuación fueron los siguientes:

- 1) Densidad de las partículas ( $\rho_p$ ). Se utilizó un valor de 1.97 g/cm<sup>3</sup> obtenido de la literatura.<sup>24</sup>
- 2) Índices de refracción del medio ( $n_0$ ) y de las partículas ( $n_p$ ).

Estos fueron determinados experimentalmente.

El valor de  $n_0 = 1.327$  se obtuvo en forma directa a la temperatura y longitud de onda de trabajo: 35°C y 600nm respectivamente.



## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Efecto de la concentración de caseína**

#### **3.1.1 Resultados:**

El estado inicial de las MC se evaluó a través de la turbidez específica a 600nm ( $\tau_{600}/c$ ) y de los radios promedio en peso ( $R_m$ ) de las mismas en las distintas diluciones. Las diluciones, realizadas con el buffer base, comprendieron el siguiente rango de concentraciones de caseína en (g/L): 0,082-0,439. Ambos resultados son presentados en la Tabla 3.1.

Los valores de los  $R_m$  se obtuvieron como se planteara en la sección 2.2.3 Se procedió al ajuste en computadora de la ecuación 2.1 de manera de obtener el valor de  $R_m$  que satisfaga el valor experimental de la  $\tau_{600}$  a cada concentración de caseína. Los datos necesarios para aplicar esta ecuación fueron los siguientes:

1) Densidad de las partículas ( $\rho_1$ ). Se utilizó un valor de  $1,07 \text{ g/cm}^3$  obtenido de la literatura.<sup>41</sup>

2) Índices de refracción del medio ( $n_0$ ) y de las partículas ( $n_1$ ).

Ambos fueron determinados experimentalmente.

El valor de  $n_0 = 1,327$  se obtuvo en forma directa a la temperatura y longitud de onda de trabajo: 35°C y 600nm respectivamente.

El valor de  $n_1$  se obtuvo aplicando lo propuesto en M&M (sección 2.2.5). Se trabajó a una concentración de caseína constante (0,30 g/L) y a 35°C. Graficando  $n_0\sqrt{\tau}$  vs.  $n_0$  se obtuvo el valor de  $n_1$  (=1,631).

### 3) Concentración de caseína.

La concentración de caseína se determinó por el método de Kuaye descrito en la sección 2.2.1.

**Tabla 3.1. Turbidez específica y radios promedio de las MC a diferentes concentraciones de caseína.**

| [caseína] (g/L)                | 0,082 | 0,094 | 0,110 | 0,132 | 0,165 | 0,220 | 0,329 | 0,439 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $(\tau/c)^a$ ( $A_{600}/g/L$ ) | 0,395 | 0,397 | 0,406 | 0,425 | 0,447 | 0,508 | 0,546 | 0,583 |
| $R_m^b$ (nm)                   | 78,5  | 78,8  | 79,7  | 80,8  | 82,2  | 85,9  | 87,5  | 90,5  |

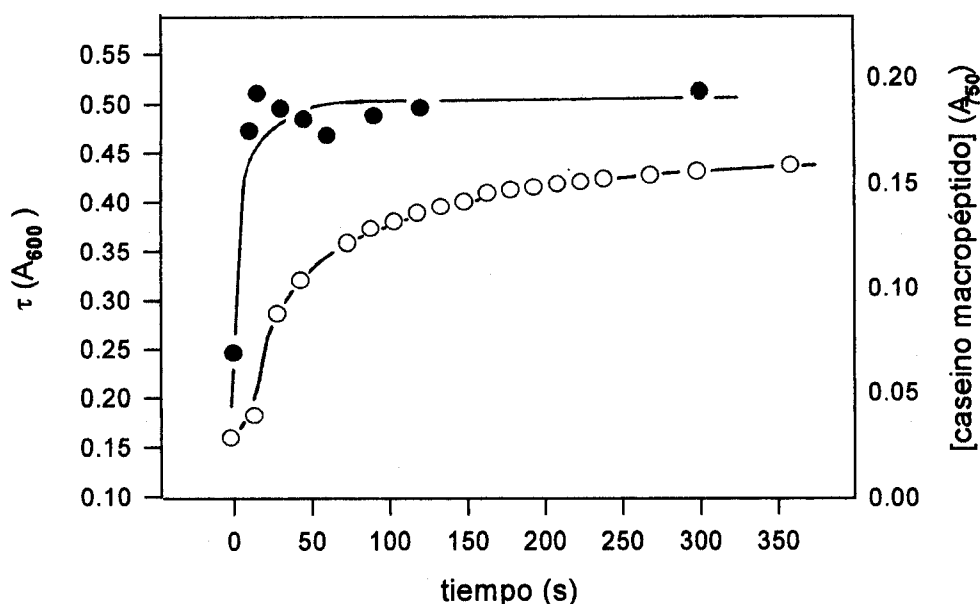
<sup>a</sup>Error máx.:  $\pm 0,005$  (95% de confianza)

<sup>b</sup>Error máx.:  $\pm 0,4$  (95% de confianza)

La Figura 3.1 muestra la liberación de CMP en función del tiempo (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática de las MC para una determinada concentración de caseína, temperatura y cantidad de cuajo.

Los CMP liberados alcanzan su valor máximo antes del incremento de  $\tau$ , indicando que la primera etapa de la coagulación (hidrólisis) se completó en los tiempos iniciales de la fase de agregación. El tiempo de finalización de la primera etapa se obtuvo de estos gráficos y fueron de 30 segundos para concentraciones entre 0,082 y 0,110 g/L y en 15 segundos para concentraciones de caseína mayores a 0,110 g/L. Los tiempos de hidrólisis descriptos se obtuvieron con el agregado de

100  $\mu$ l de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen para 3,0 ml de una dilución de MC conteniendo 0,30 g/L. En las demás concentraciones de caseína se mantuvo constante la relación de concentración enzima/sustrato.

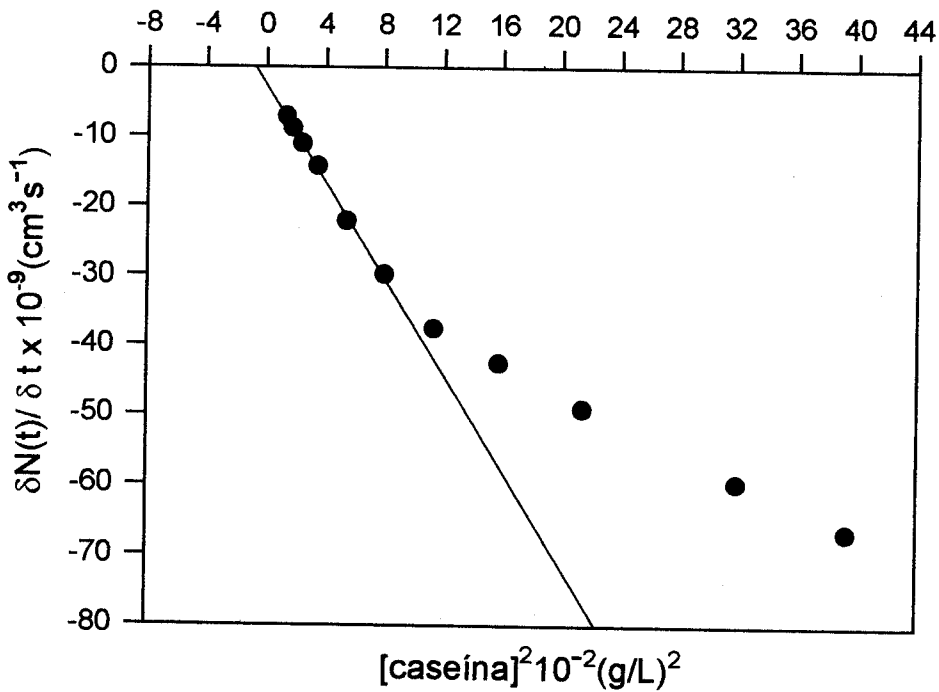


**Figura 3.1.** Liberación de CMP y agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo. (●): Concentración de CMP expresado como A a 750nm. (○):  $\tau$  expresada como A a 600nm. Concentración de caseína: 0,30 g/L. Temperatura: 35°C.

Luego de finalizado los tiempos de la hidrólisis se calculó, de los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo presentados en la Figura 3.1, el valor de la derivada máxima de la turbidez en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ . En la Figura 2.4 de M&M se presentó un ejemplo.



Con los valores de  $R_m$  se calculó el valor de  $K^*$  para cada dilución de MC mediante la ecuación 2.18. Aplicando la ecuación 2.21 se obtuvo la velocidad inicial de desaparición de partículas primarias  $[\partial N(t)/\partial t]_0$  a partir de datos experimentales de la  $(\partial\tau/\partial t)_0$ . La Figura 3.2 muestra estos valores en función de la concentración de caseína al cuadrado.



**Figura 3.2.** Desaparición de partículas primarias para formar dobletes en función de la concentración de caseína al cuadrado. Temperatura: 35°C

### 3.1.2 Discusión

#### Estado inicial de las MC

Los valores de turbidez específica ( $\tau/c$ ) de las distintas diluciones de MC muestran una ligera disminución a bajas concentraciones de caseína. Esto puede atribuirse a un proceso de disociación, lo que implica un desplazamiento de la función de distribución de tamaños hacia valores menores. La ligera disminución de los radios promedio de las MC en las mismas diluciones confirman esta suposición.

#### Estudios cinéticos

La Figura 3.2 muestra una tendencia lineal de la velocidad inicial de desaparición de partículas primarias,  $[\partial N(t)/\partial t]_0$ , con el cuadrado de la concentración de caseína a valores menores a 0,3 g/L. A concentraciones de caseína mayores a este valor se observa una evidente desviación de la linealidad.

La hipótesis planteada por von Smoluchowski para la cinética de floculación browniana de partículas coloidales a tiempos iniciales presenta la siguiente relación lineal (ecuación 2.16):

$$\left( \frac{\partial N(t)}{\partial t} \right)_0 = -k_2 N_0^2$$

y corresponde a la velocidad inicial de formación de dobletes. Una posibilidad de la desviación que presentan las MC a altas concentraciones podría ser que el sistema esté en el límite de aplicación de tal hipótesis a concentraciones superiores a 0,3g/L.

Es decir que se podrían estar formando además de dobletes, tripletes o reaccionando dobletes entre sí, etc. Dado que en el proceso de agregación juega un rol importante la difusión de las partículas agregantes, la obtención, a concentraciones de caseína superiores a 0,3 g/L, de velocidades iniciales de desaparición primarias menores que las previstas por la relación lineal se deberá a que los agregados difunden más lentamente, siendo menores las constantes cinéticas propias de su agregación. Otra posibilidad es que las desviaciones se deban a medidas imprecisas de la  $(\partial\tau/\partial t)_0$  a altas concentraciones de caseína debido a la alta velocidad inicial de floculación. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se concluye que la hipótesis planteada de una cinética inicial de segundo orden se cumple para soluciones de MC diluídas ( $\leq 0,3$  g/L) con la metodología utilizada.

La teoría de von Smoluchowski para la agregación limitada por difusión (DLA) propone la siguiente expresión para  $k_2$  en un medio de viscosidad  $\eta$  y a la temperatura T:

$$k_2 = \frac{8k_B T}{3\eta W} = \frac{k_2^0}{W}$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y W es el factor de estabilidad, es decir el cociente entre la frecuencia de colisiones a las cuales se produce agregación y la frecuencia total de colisiones entre partículas.  $k_2^0$  es la constante cinética en ausencia de barrera y tiene un valor de  $1,13 \times 10^{-11} \text{ cm}^3\text{s}^{-1}$  en nuestras condiciones ( $T=35^\circ\text{C}$ ). Un valor promedio de  $3,0 \times 10^{-14} \text{ cm}^3\text{s}^{-1}$  fue obtenido para  $k_2$  en la región lineal de la Figura 3.2. El valor de  $k_2 < k_2^0$  está indicando un proceso de *floculación*

*lenta*, es decir con la presencia de una barrera de energía a superar. Para  $W$  se obtuvo un valor promedio de 380. Este valor concuerda con el determinado por otros autores usando técnicas diferentes.<sup>2</sup>

Un valor de  $W > 1$  demuestra la presencia de cierta estabilidad por parte de las micelas de  $p$ -caseína (MpC), es decir de las micelas de caseína que han sido desprovistas de cierta porción de  $\kappa$ -caseína de su superficie.  $W$  está relacionada con la energía potencial entre dos partículas que se acercan a través de la ecuación A.38

$$k_2 = \frac{k_2^0}{2R \int_{2R}^{\infty} \exp\left(\frac{\Phi}{k_B T}\right) x^{-2} dx} = \frac{k_2^0}{W}$$

La teoría clásica de Deryagin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO) establece expresiones para el cálculo de tal energía potencial ( $\Phi_{\text{neto}}$ ) basadas en la suma de dos tipos de fuerzas: electrostáticas repulsivas y atractivas de Van der Waals. El potencial resultante es atractivo a larga y corta distancia y en las posiciones intermedias existe una barrera de energía repulsiva. (sección 1.4.4.) El corte de la capa de pelos de  $\kappa$ -caseína reduce al 60% la carga eléctrica de las MpC con respecto a las MC.<sup>41</sup> Esto se traduce en una reducción de  $\psi_0$  (potencial eléctrico superficial) con la consecuente disminución de la repulsión eléctrica. La barrera repulsiva debiera disminuir con un aumento de la inestabilidad. Esto sucede, es decir se produce la floculación pero a una velocidad menor a  $k_2^0$  lo que sugiere la presencia de un factor estabilizante en las MpC, no contemplado por la teoría D.L.V.O. Por

otra parte, la aplicación de la teoría DLVO produce resultados no reales ya que la barrera resultante luego de la acción enzimática permitiría un acercamiento de las partículas a distancias atómicas donde otras fuerzas atractivas, además de las van der Waals estarían presentes y serían de considerable importancia. Resulta entonces cuestionable la aplicación de esta teoría no sólo a las MC<sup>26</sup>, sino también a las MpC.

La magnitud de W, relacionada con la altura de la barrera de energía, podría ser mejor atribuida a la presencia de un importante componente estérico. Este tercer término (repulsivo en este caso) podría adicionarse a la expresión de potencial entre partículas.<sup>26,68</sup> (sección 1.4.4.)

La estabilidad estérica es habitualmente considerada como la suma de dos contribuciones. Cuando la presencia de una partícula restringe el libre movimiento de los pelos flexibles superficiales de otra partícula surge la contribución entrópica o de restricción de volumen. Cuando los pelos superficiales de dos partículas interpenetran unos con otros surge una contribución de mezclado cuya magnitud y efecto está relacionado con la capacidad de disolución de los pelos en el medio de dispersión. Esta segunda contribución es despreciable cuando la densidad de pelos es baja.<sup>2</sup>

El hecho, ampliamente descripto, de que la agregación de las MpC no comienza hasta que un cierto porcentaje (60-80%) de la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína se ha producido podría explicarse por el factor estérico: la permanencia de algunos pelos en la superficie micelar produciría una repulsión estérica entre las MpC. También

MSD

podría deberse a que para lograr un íntimo contacto entre ellas necesitan estar con zonas totalmente libres de pelos. En estas condiciones, el valor de  $kT \ln W$  puede considerarse representante de la energía de activación del sistema para la agregación<sup>2</sup> y tiene un valor de  $6kT$  en nuestro sistema. Este valor es claramente menor que  $10kT$ , considerado como el mínimo valor necesario de la altura de la barrera de energía para considerar cinéticamente estable a un sistema.

### 3.2 Efecto de la temperatura

#### 3.2.1 Resultados

El estado inicial de las MC se evaluó a través de la turbidez a 600nm ( $\tau_{600}$ ) y de los radios promedio en peso ( $R_m$ ) de las diluciones de MC a las distintas temperaturas. Las diluciones de MC se realizaron en el buffer base y la concentración de caseína se mantuvo constante para cada una de las temperaturas propuestas. Los resultados son presentados en la Tabla 3.3.

Los valores de los  $R_m$  se obtuvieron de acuerdo a lo planteado en la sección 2.2.3. Se procedió al ajuste por computadora de la ecuación 2.1 hasta obtener el valor de radio que satisfaga el valor experimental de la  $\tau_{600}$  a las distintas temperaturas. Ese valor de radio fue el  $R_m$ . Los datos necesarios para aplicar dicha ecuación fueron los siguientes:

1) El índice de refracción del medio ( $n_0$ ) y de las partículas ( $n_1$ ).

El valor del  $n_0$  fue determinado a 35°C y a 600nm. Se consideró constante en el rango de temperatura utilizado en los estudios.  $n_0 = 1,327$

El  $n_1$  fue determinado a todas las temperaturas de la experiencia de acuerdo a lo descrito en M&M. La Tabla 3.2. presenta los valores obtenidos.

**Tabla 3.2: Índices de refracción de las MC a diferentes temperaturas**

| T(°C)⇒               | 17    | 28    | 30    | 33    | 35    | 40    | 43    | 45    |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $n_1$ <sup>a</sup> ⇒ | 1,514 | 1,586 | 1,599 | 1,618 | 1,631 | 1,664 | 1,684 | 1,697 |

<sup>a</sup>Error máx.:  $\pm 0,005$  (95% de confianza)

2) Densidad de las partículas ( $\rho_1$ ). Por la imposibilidad de determinar u obtener por la literatura la densidad de las MC a las distintas temperaturas se la reemplazó en la ecuación correspondiente por la siguiente expresión:

$$\rho_1 = \frac{M_m}{4/3\pi R_m^3 N_A} \quad 3.1$$

El valor de  $M_m$  se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$M_m = \left( \frac{R_m}{3,2} \right)^3 2,35 \times 10^4 \text{ g/mol} \quad 3.2$$

Donde el primer término corresponde al número de caseínas por micela y el segundo término es el peso molecular promedio de las caseínas.<sup>62</sup> Este valor se calculó utilizando el valor de  $R_m$  de las micelas de caseínas a una concentración de caseína de 0,329 g/L a una dada temperatura (35°C). El valor de  $M_m$  resultó  $4,8044 \times 10^8 \text{ g/mol}$

3) Concentración de caseína. Se mantuvo constante en las diluciones a las distintas temperaturas.  $c = 0,30 \text{ g/L}$

**Tabla 3.3. Turbidez y radios promedio de las diluciones de MC a diferentes temperaturas**

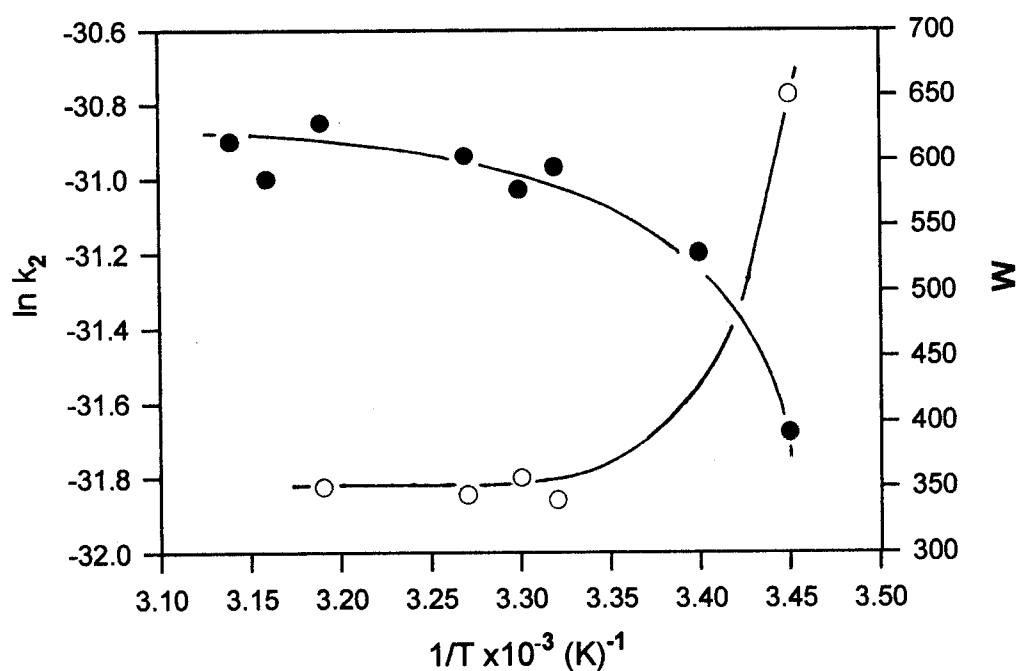
| T (°C)⇒                | 17    | 28    | 30    | 33    | 35    | 40    | 43    | 45    |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\tau^a$ ( $A_{600}$ ) | 0,163 | 0,170 | 0,182 | 0,198 | 0,197 | 0,210 | 0,221 | 0,234 |
| $R_m^b$ (nm)           | 100,2 | 90,8  | 90,3  | 89,4  | 88,0  | 86,2  | 85,3  | 84,9  |

<sup>a</sup> Error máx.:  $\pm 0,005$  (95% de confianza)

<sup>b</sup> Error máx.:  $\pm 0,4$  (95% de confianza)



Se obtuvieron gráficos similares al presentado en la Figura 3.1 para la liberación de CMP en función del tiempo (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática de las MC a una determinada temperatura, concentración de caseína y cantidad de cuajo. Se realizaron para las siguientes temperaturas: 17, 35 y 45°C. Se utilizó en todos los casos 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen para 3,0 mL de una dilución de MC conteniendo 0,30 g/L obteniéndose los siguientes tiempos de finalización de la primera etapa a las distintas temperaturas: 15 segundos para 45°C, 30 segundos para 35°C y 45 segundos para 17°C.



**Figura 3.3.**  $\ln k_2$  y  $W$  en función de la inversa de la temperatura. (●):  $\ln k_2$  y (○):  $W$ . Concentración de caseína: 0,30g/L.

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ .

Con los valores de  $R_m$  se calculó  $K^*$ , con este valor y el dato experimental de  $(\partial\tau/\partial t)_0$  se aplicó la 2.23 obteniéndose el valor de  $k_2$  para cada temperatura en estudio. Aplicando la ecuación 1.3 se obtuvo el valor de  $W$ . Los valores de  $k_2$  y  $W$  son presentados en la Figura 3.3 .

### **3.2. 2 Discusión**

#### **Estado inicial de las MC**

Los datos presentados en la Tabla 3.3. muestran un aumento de la  $\tau_{600}$  al aumentar la temperatura en las diluciones de MC. Este aumento de la  $\tau_{600}$  podría estar indicando una contracción de las micelas. Los valores de  $R_m$ , obtenidos aplicando las teorías de dispersión de la luz, confirman esta hipótesis. Por otra parte otros autores han informado un aumento de la voluminosidad ( $v$ ) de las MC con el descenso de la temperatura.<sup>13</sup> Este aumento de  $v$  es atribuido a una proyección de la  $\beta$ -caseína hacia el exterior de la micela por el debilitamiento de las uniones hidrofóbicas, las cuales mantienen la mayor parte de esta proteína en el interior de la estructura micelar.<sup>2</sup> Un aumento de la  $v$  se traduce en una constante de Hamaker ( $A$ ) menor con la consecuente disminución de las fuerzas atractivas de van der Waals y esto implica una estabilidad adicional de las MC (a bajas temperaturas) antes de ser sometidas a la acción del cuajo.

### **Estudios cinéticos**

Los datos presentados en la Figura 3.3 muestran un gráfico de Arrhenius curvo confirmando resultados previamente informados por Dalglish<sup>67</sup> y sugiriendo un aumento de la energía de activación a bajas temperaturas.

Si tenemos en cuenta que el potencial  $\psi_\zeta$ , una medida de  $\psi_0$ , de las MpC disminuye con la disminución de temperatura<sup>67</sup>, el incremento en la barrera de energía para la agregación no puede ser explicado por un aumento de la repulsión electrostática.

Analizando las fuerzas atractivas, dependientes de la magnitud de la constante de Hamaker, en este caso estarían disminuídas. Si el aumento en la  $v$  de las MC proviene de una proyección de la  $\beta$ -caseína<sup>2</sup>, la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína por acción del cuajo no cambiaría esta situación y en consecuencia las MpC presentarían, al igual que las MC, una estabilidad adicional a bajas temperaturas.

El análisis, a través de la teoría D.L.V.O., sugiere asignar la estabilidad de las MpC a bajas temperaturas a la disminución del  $\Phi_A$  y su contribución al  $\Phi_{\text{neto}}$ . Luego de los estudios sobre micelas de caseína modificadas (MCM) esto podría resultar incorrecto o al menos insuficiente (sección 3.6).

La estabilidad estérica, representada en este caso por el término de restricción de volumen, muestra una disminución con la disminución de temperatura atribuible a una disminución del efecto repulsivo de la contribución entrópica. Sin embargo, en este caso se observa el efecto opuesto. El incremento de la  $v$  observado en las MC a bajas temperaturas por proyección de la  $\beta$ -caseína permitiría incrementar el espesor

de la capa de pelos de las MpC, produciendo un incremento del término de restricción de volumen. El término de mezclado, por otra parte podría también ser incrementado, pero su dependencia opuesta con la temperatura podría ser superada por el incremento en el espesor de la capa peluda y el efecto de contribución entrópica.

Los valores de  $W$  (siempre  $> 1$ ) obtenidos frente a los cambios de temperatura ofrecen la misma información que el valor de  $k_2$ . A bajas temperaturas hay un brusco incremento de la estabilidad. Por lo razonado anteriormente, esto estaría muy relacionado con el componente estérico pero también con el disminuído componente atractivo de la teoría D.L.V.O. Es interesante notar que en los casos como los de las MpC o sea partículas de gran tamaño y capa peluda pequeña las fuerzas responsables de producir la agregación son las fuerzas atractivas de van der Waals<sup>51</sup> y son las que en este caso estarían disminuídas.

### 3.3 Efecto de la viscosidad del medio

#### 3.3.1 Resultados

Los datos de turbidez a 600nm ( $\tau_{600}$ ) de las diluciones de MC en buffers con distinto contenido de glicerol y el valor de los radios promedios ( $R_m$ ) de las MC en tales diluciones son presentados en la Tabla 3.5. El contenido de glicerol se expresó en términos de la viscosidad ( $\eta$ ) resultante en cada solución buffer. La temperatura de trabajo: 35°C.

Para obtener los valores de  $R_m$  de acuerdo a lo planteado en la sección 2.2.3 se necesitaron los siguientes datos:

- 1) Los índices de refracción  $n_0$  y  $n_1$ , del medio y de las partículas respectivamente.

A las soluciones buffers con distinto contenido de glicerol se les determinó el  $n_0$  a 35°C. Los resultados se presentan en la Tabla 3.4

Tabla 3.4. Índices de refracción del medio en las diluciones con diferente contenido de glicerol

| $\eta^a_{relativa}$ | 1<br>(sin glicerol) | 1,181 | 1,291 | 1,615 | 1,750 | 2,182 |
|---------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $n_0^b$             | 1,327               | 1,334 | 1,338 | 1,346 | 1,354 | 1,370 |

<sup>a</sup>Relativa al buffer base  
<sup>a</sup>Error máx.: ± 0,003 (95% de confianza)  
<sup>b</sup>Error máx.: ± 0,003 (95% de confianza)

El  $n_1$  fue determinado de acuerdo a la técnica planteada en M&M. Su valor se consideró constante en todas las diluciones. La técnica de determinación involucra diluciones de MC en medios con agregados de glicerol y esto no afecta el valor del  $n_1$ .<sup>60</sup> ( $n_1 = 1,631$ )

2) Concentración de caseína. Se mantuvo constante en todas las diluciones.

$c = 0,30 \text{ g/L}$

3) Densidad de las partículas ( $\rho_1$ ). Se utilizó un valor de 1,07 g/mL obtenido de la literatura<sup>41</sup> y se consideró constante en todas las diluciones.

Tabla 3.5. Turbidez y radios promedio de las diluciones de MC a diferentes viscosidades del medio

| $\eta_{\text{relativa}}$ | 1     | 1,181 | 1,291 | 1,615 | 1,7501 | 2,182 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| (sin glicerol)           |       |       |       |       |        |       |
| $\tau^a (A_{600})$       | 0,180 | 0,204 | 0,206 | 0,188 | 0,186  | 0,176 |
| $R_m^b \text{ (nm)}$     | 88,0  | 76,0  | 76,8  | 75,9  | 77,4   | 79,2  |

<sup>a</sup>Error máx.:  $\pm 0,004$  (95% de confianza)

<sup>b</sup>Error máx.:  $\pm 0,4$  (95% de confianza)

Gráficos similares a los presentados en la Figura 3.1. se obtuvieron para la liberación de CMP en función del tiempo (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática de las MC variando la viscosidad del medio y manteniendo constante la temperatura, concentración de caseína y cantidad de cuajo.

El agregado de 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen a 3,0 mL de una dilución de MC conteniendo 0,30 g/L permitió obtener los siguientes tiempos de finalización de la primera etapa a las distintas viscosidades relativas: 15 segundos para  $\eta < 1,615$  y 30 segundos par  $\eta \geq 1,615$ .

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ .

Con los valores de  $R_m$  se calculó  $K^*$ , con este valor y el dato experimental de la  $(\partial\tau/\partial t)_0$  se aplicó la 2.22 obteniéndose el valor de  $k_2$  para cada dilución en estudio.

Aplicando la ecuación 1.3

$$k_2 = \frac{8k_B T}{3\eta W} = \frac{k_2^0}{W}$$

se obtuvo el valor de  $k_2^0$  para cada valor de viscosidad del medio y con este valor y el de  $k_2$  se calculó el valor de  $W$  resultando este último prácticamente constante en todo el rango de viscosidades (380-400).

La Figura 3.4 muestra los valores de  $k_2$  en función de la inversa de la viscosidad relativa ( $1/\eta$ ); se utilizó la inversa, siguiendo la expresión de von Smoluchoski, para observar más directamente el efecto inverso de la viscosidad sobre la constante de velocidad.

### 3.3.2 Discusión

#### Estado inicial de las MC

La Tabla 3.5 muestra una disminución de la  $\tau$  a 600 nm ( $A_{600}$ ) con el incremento de la  $\eta$  que podría atribuirse a un incremento del índice de refracción del medio ( $n_0$ ). No obstante, el valor de la  $\tau$  para la dilución de MC en buffer sin agregado de glicerol o sea en el buffer de control muestra un valor menor que el presentado para el primer agregado de glicerol ( $\eta = 1,181$ ). Esto estaría indicando alguna interacción entre el glicerol y las MC. En este sentido podría pensarse que el glicerol (en

mínima cantidad) produciría cierto colapso de los pelos de la capa superficial que explicaría el leve aumento de la  $\tau_{600}$  acompañado por el leve descenso del  $R_m$ . Este efecto se saturaría rápidamente y a mayor concentración de glicerol predominaría el efecto de la viscosidad sobre el índice de refracción y en consecuencia sobre los valores de turbidez.

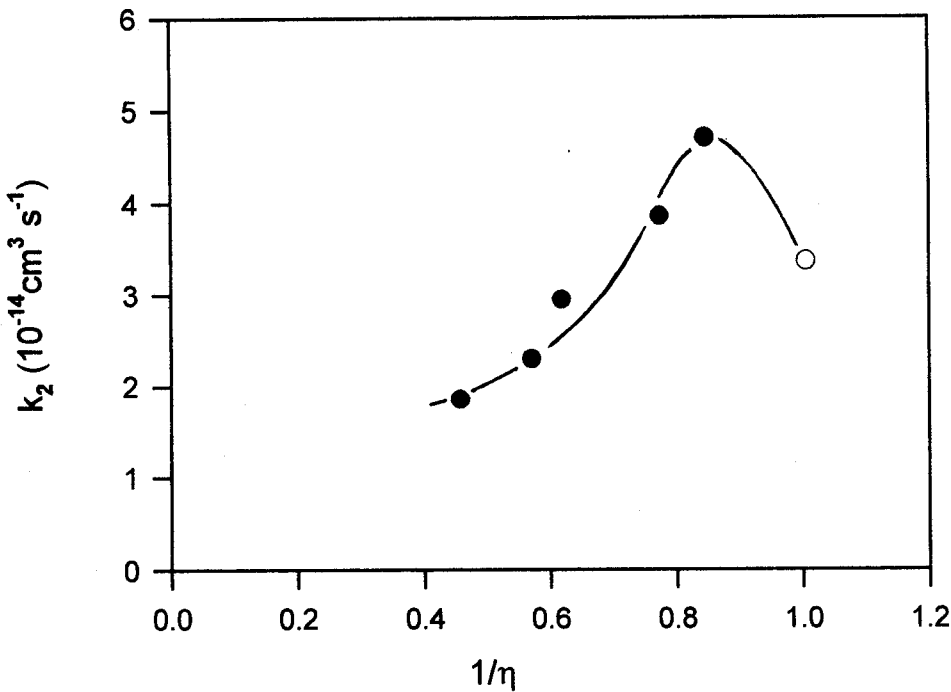
El análisis de los  $R_m$  indican que no habría cambios apreciables en el tamaño medio de las MC en presencia de glicerol, lo cual coincide con lo sugerido por Ambrose Griffin and Griffin<sup>60</sup> quienes afirmaron que el glicerol no produce cambios en la distribución de tamaño de las MC. Este hecho es, además, el que permitió determinar el índice de refracción de las partículas ( $n_1$ ) en las demás variables.

A muy altas concentraciones de glicerol podría pensarse que este interactúa con la superficie micelar como en una solución de proteína globular causando una leve hidratación preferencial de la misma. Es decir, reforzaría uniones de puente hidrógeno con el agua y migraría hacia el seno de la solución excluyéndose de la superficie proteica.<sup>48,49,69</sup> Esto produciría cierta expansión de las MC con un aumento de tamaño. Este efecto si bien podría iniciarse ante el primer agregado de glicerol recién podría comenzar a evidenciarse (en nuestro caso) a la mayor viscosidad del medio (~ 30% P/V de glicerol) donde el  $R_m$  comienza a aumentar levemente (79,2nm).



**Estudios cinéticos**

La Figura 3.4 muestra un leve incremento de la constante cinética ( $k_2$ ) con el primer agregado de glicerol al medio y luego una regular disminución de la misma con el incremento de la concentración de glicerol.



**Figura 3.4.** La constante de velocidad de agregación ( $k_2$ ) en función de la inversa de la viscosidad relativa ( $1/\eta$ ). Buffers: (○) 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10mM imidazol-HCl, pH 6,4; (●) 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10mM imidazol-HCl, pH 6,4 más el agregado apropiado de glicerol. Temperatura 35°C. Concentración de caseína: 0,30g/L.

El probable colapso de los pelos de la capa superficial podría causar dificultad al ataque enzimático, sin embargo la cantidad de enzima agregada permitió la liberación de CMP en los tiempos descriptos. Las MpC obtenidas podrían presentar

aún, cierto colapso de los pelos remanentes causando una ligera disminución de la estabilidad estérica que produce un leve aumento de la velocidad de agregación. También podría pensarse en una interacción electrostática entre el glicerol y la superficie micelar. Esta hipótesis será nuevamente planteada en el estudio comparativo entre las micelas con y sin modificaciones superficiales. (sección 3.7)

A altas concentraciones de glicerol sin embargo predomina el efecto de incremento de la  $\eta$ , mostrando una relación lineal de la  $k_2$  con la  $1/\eta$  tal cual lo expresado en la ecuación de von Smoluchowski para la agregación de partículas limitadas por difusión.

El valor obtenido para  $W$  en el rango de viscosidad usado, permanece prácticamente constante y similar a los valores obtenidos en ausencia de glicerol ( $\sim 400$ ). Esto sugiere que los cambios introducidos por el glicerol en el mecanismo responsable de la estabilidad de las  $MpC$  son mínimos.

### 3.4 Efecto de la concentración y la naturaleza de distintos iones.

#### 3.4. 1 Resultados.

Los parámetros necesarios para la determinación de los radios promedio en peso ( $R_m$ ) no pudieron ser determinados ni obtenidos de la literatura, en presencia de todos los iones a estudiar, por esto (de acuerdo a lo expresado en M&M) el estado inicial de las MC en presencia de distintas concentraciones de los distintos iones fue evaluado a través de  $\alpha$  ( $-\partial \log \tau / \partial \log \lambda$ ) y la turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ). Los valores obtenidos son presentados en la Tabla 3.6. Concentración de caseína: 0,30 g/L.

Temperatura: 35°C

**Tabla 3.6: Turbidez a 400nm y  $\alpha$  de las MC en presencia de distintos iones.**

| Conc. del catión<br>adicionado(mM) | Sin agregado | 5 mM  | 10 mM | 15mM  | 25mM  |
|------------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Sin agregado adicional</b>      |              |       |       |       |       |
| <sup>a</sup> $\alpha$              | 2,82         | -     | -     | -     | -     |
| $\tau_{400}$                       | 0,512        | -     | -     | -     | -     |
| <b>Na<sup>+</sup></b>              |              |       |       |       |       |
| $\alpha$                           | -            | 2,80  | 2,87  | 2,91  | 2,93  |
| $\tau_{400}$                       | -            | 0,462 | 0,421 | 0,382 | 0,291 |
| <b>Li<sup>+</sup></b>              |              |       |       |       |       |
| $\alpha$                           | -            | 2,80  | 2,80  | 2,79  | 2,82  |
| $\tau_{400}$                       | -            | 0,471 | 0,472 | 0,471 | 0,434 |
| <b>K<sup>+</sup></b>               |              |       |       |       |       |
| $\alpha$                           | -            | 2,81  | 2,86  | 2,83  | 2,96  |
| $\tau_{400}$                       | -            | 0,462 | 0,401 | 0,394 | 0,333 |
| <b>Cs<sup>+</sup></b>              |              |       |       |       |       |
| $\alpha$                           | -            | 2,76  | 2,79  | 2,79  | 3,09  |
| $\tau_{400}$                       | -            | 0,463 | 0,502 | 0,521 | 0,242 |

<sup>a</sup>Error máx.:  $\pm 0,004$  (95% de confianza)

<sup>b</sup>Error máx :  $\pm 0,02$  (95% de confianza)

A distintas alícuotas de leche (preparada según lo indicado en M&M) se le adicionaron sales de los distintos iones en cantidad necesaria para lograr una concentración final de cada uno de ellos igual a 25mM. Estas muestras se incubaron durante dos horas a 25°C y luego se ultracentrifugaron a 100.000g durante una hora a la misma temperatura. A los sobrenadantes resultantes al igual que a la muestra de leche original se les determinó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta última dió 32,9 mM. en la leche original. Los resultados de los sobrenadantes se presentan en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7. Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los sobrenadantes de la ultracentrifugación**

| Catión adicionado                    | Sin agregado | $\text{Na}^+$ | $\text{K}^+$ | $\text{Li}^+$ | $\text{Cs}^+$ |
|--------------------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| $[\text{Ca}^{2+}]$ (mM) <sup>a</sup> | 13,1         | 14,8          | 14,1         | 14,5          | 14,3          |

<sup>a</sup>Error máx. =  $\pm 0,3$  (95% de confianza)

Los resultados de la velocidad de agregación, estimada por la derivada máxima de la turbidez a 600 nm ( $\tau_{600}$ ) (según lo explicado en M&M) con respecto al tiempo  $(\partial\tau/\partial t)_0$ , son presentados en la Figura 3.5.

Los resultados de la dimensión fractal de los agregados ( $D_f$ ) estimada por intermedio de la  $(\partial\log\tau/\partial\log\lambda)$  se presentan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8:  $D_f$  de los agregados en presencia de distintos iones.

| Concentración del catión (mM)<br>adicionado<br>$D_f^a$ | Sin agregado<br>adicional | 5 mM | 10 mM | 15mM | 25mM |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|------|-------|------|------|
|                                                        | 2,39                      | -    | -     | -    | -    |
| $\text{Na}^+$                                          | -                         | 2,39 | 2,41  | 2,41 | 2,35 |
| $\text{Li}^+$                                          | -                         | 2,37 | 2,35  | 2,36 | 2,35 |
| $\text{K}^+$                                           | -                         | 2,39 | 2,39  | 2,39 | 2,40 |
| $\text{Cs}^+$                                          | -                         | 2,38 | 2,41  | 2,34 | 2,37 |

<sup>a</sup> Error máx.:  $\pm 0.03$  (95% de confianza)

### 3.4.2 Discusión

#### Efecto de los cationes sobre el estado de las MC:

Los valores de  $\alpha$  en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  aumentan, indicando una disminución del diámetro promedio de las micelas. Esta aparente contracción de la estructura micelar sin cambio en el peso promedio de la partícula debería estar acompañado con un leve aumento de la turbidez debido a un incremento en el factor de disipación promedio.<sup>28</sup> Se observa en cambio, una disminución de la  $\tau$  en aproximadamente un 20% para estos dos iones a 25mM lo que estaría indicando una disociación de las micelas de caseína.

En presencia de  $\text{Li}^+$ , los valores de  $\alpha$  y  $\tau$  permanecen constantes sugiriendo que no se producen variaciones de tamaño ni disociaciones de las MC, al menos detectables por esta metodología.

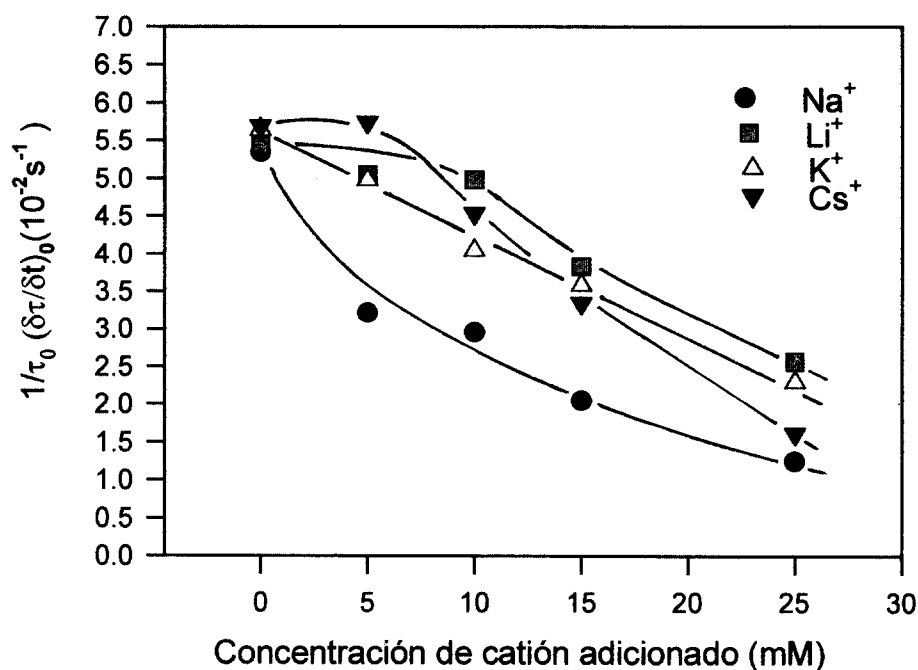
El comportamiento del  $\text{Cs}^+$  fue similar al del  $\text{Li}^+$  hasta una concentración  $\sim 15\text{mM}$ . A una concentración de  $25\text{mM}$  presentó un brusco descenso de la  $\tau$  acompañado con un aumento de  $\alpha$  lo que estaría indicando una disociación de las MC.

Las MC no siguieron el mismo comportamiento frente a la concentración de los distintos iones sugiriendo que los cambios ocasionados a las MC por variación en la fuerza iónica ( $\mu$ ) del medio no pueden englobarse en forma genérica, es necesario distinguir que ión es el responsable de la misma y analizarlo por separado. A diferencia con un coloide típico los electrolitos responsables de modificar la  $\mu$  del medio no se comportan en forma inerte e interactúan mediante distintos equilibrios con la estructura micelar.<sup>16,34</sup>

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la fase micelar por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  podría indicar una ruptura de las uniones de fosfato de calcio coloidal (PCC) y/o de puentes caseína-calcio<sup>16</sup> causando la disociación de las MC. El  $\text{Li}^+$  sin embargo, libera  $\text{Ca}^{2+}$  pero no altera el tamaño micelar. Esta observación indicaría la presencia de un efecto opuesto probablemente relacionado con la acción ordenadora del agua estructurada que presenta el  $\text{Li}^+$  (cosmotrópico) que promueve la formación de uniones hidrofóbicas.<sup>70</sup> Por otro parte el  $\text{Cs}^+$  libera  $\text{Ca}^{2+}$  sugiriendo un comportamiento similar al  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y tiene además una acción caotrópica que induce la ruptura de uniones hidrofóbicas. Esto explicaría que su acción sea la más marcada sobre el estado inicial de las MC.

### Efecto de los cationes sobre la cinética de agregación de las MpC:

Trabajando a una concentración inicial de partículas agregantes constante y sin cambios de tamaño de las mismas la velocidad de agregación puede ser estimada a través de la velocidad inicial de incremento de la turbidez,  $(\partial\tau/\partial t)_0$ , como fuera descrito en M&M.



**Figura 3.5.** Velocidad inicial de incremento de la turbidez en función de la concentración de catión adicionado. Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones. Máximo desvío estandar: 0,003.

La presencia de  $K^+$  no produjo cambios de tamaño de las MC en el rango de concentraciones utilizadas de manera que los valores de la  $(\partial\tau/\partial t)_0$  constituyen una buena estimación de la  $k_2$ . Para el caso de los demás iones puede ser cuestionable el

uso de la  $(\partial\tau/\partial t)_0$  a 25mM, por la disociación de las MC que presentan, sobre todo el  $\text{Cs}^+$ . Sin embargo, el comportamiento similar entre  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$  permite suponer que los cambios de tamaño no son los responsables de la modificación de los valores de  $(\partial\tau/\partial t)_0$  y serán utilizados como estimación de la  $k_2$  (Figura 3.5)

La  $(\partial\tau/\partial t)_0$  disminuye al aumentar la concentración de todos los cationes utilizados indicando una inhibición general del proceso de agregación.

En los resultados de la sección 3.1 en ausencia de cualquier aditivo se observó una acción estabilizante en las MC que permanecen aún luego de la acción enzimática y se atribuyó a la presencia de una repulsión estérica por los pelos que permanecen en la superficie micelar. Al trabajar en presencia de distintos iones (aumentando la fuerza iónica) podría esperarse un aumento de la velocidad de agregación porque si bien el componente estérico permanece se estaría disminuyendo el componente repulsivo electrostático por disminución del espesor de la doble capa y el predominio de las fuerzas atractivas. Sin embargo, la acción enzimática sobre las MC produce la agregación de las mismas pero el aumento de  $\mu$  no produce un aumento en la velocidad. Esto permitiría sugerir que tampoco las MpC podría ser interpretadas como un coloide liofóbico estricto y que habría cierta acción estabilizante (ya observada en las MpC en ausencia de cualquier aditivo (sección 3.1)) y que se acentúa en presencia de estos iones.

Este comportamiento general puede analizarse en relación a las interacciones que mantienen unidas a las micelas luego de la acción enzimática. Teniendo en cuenta las características de los distintos iones y comparando el comportamiento similar de



$\text{Li}^+$  y  $\text{Cs}^+$  surge que las interacciones hidrofóbicas no están especialmente involucradas en esta acción estabilizante de las MpC.

El efecto observado en este caso frente a los distintos iones y coincidente con lo informado para  $\text{Na}^+$  por Hooydonk<sup>34</sup> sugiere que las interacciones electrostáticas atractivas y formación de puentes iónicos sí podrían estar involucradas en los estados iniciales de la agregación. Si los cationes presentes deterioran tales interacciones por protección de los grupos cargados se pierde la efectividad en las colisiones entre MpC con la consecuente reducción de la velocidad de floculación.

La mayor acción estabilizante presentada por la presencia de  $\text{Na}^+$  podría relacionarse con la proyección de cadenas de caseínas (especialmente  $\beta$ -caseína) desde el interior de las micelas provocando un incremento del espesor de la capa externa de pelos que se traduce en un aumento de la repulsión estérica entre las partículas agregantes.<sup>34</sup> Podría pensarse también en un aumento de la  $v$  con la consecuente influencia sobre la  $A$  y las fuerzas atractivas. Sin embargo, en los resultados presentados sobre el estado inicial de las MC no se detectó un aumento de tamaño del diámetro medio de las mismas en presencia de  $\text{Na}^+$ , probablemente porque se encuentre solapado con el proceso de disociación que se produce simultáneamente.

Los valores de la  $D_f$  ( $\sim 2,40$ ) observados para todos los cationes utilizados están de acuerdo con los resultados reportados por Horne.<sup>63</sup> Aunque el significado real de este parámetro en el contexto del mecanismo de agregación no está totalmente claro, su constancia a las diferentes concentraciones de los cationes puede interpretarse

como que la presencia de los aditivos usados no afectan el mecanismo de agregación en sí mismo, es decir que en todos los casos el mecanismo seguiría siendo el de una DLA (agregación limitada por difusión).



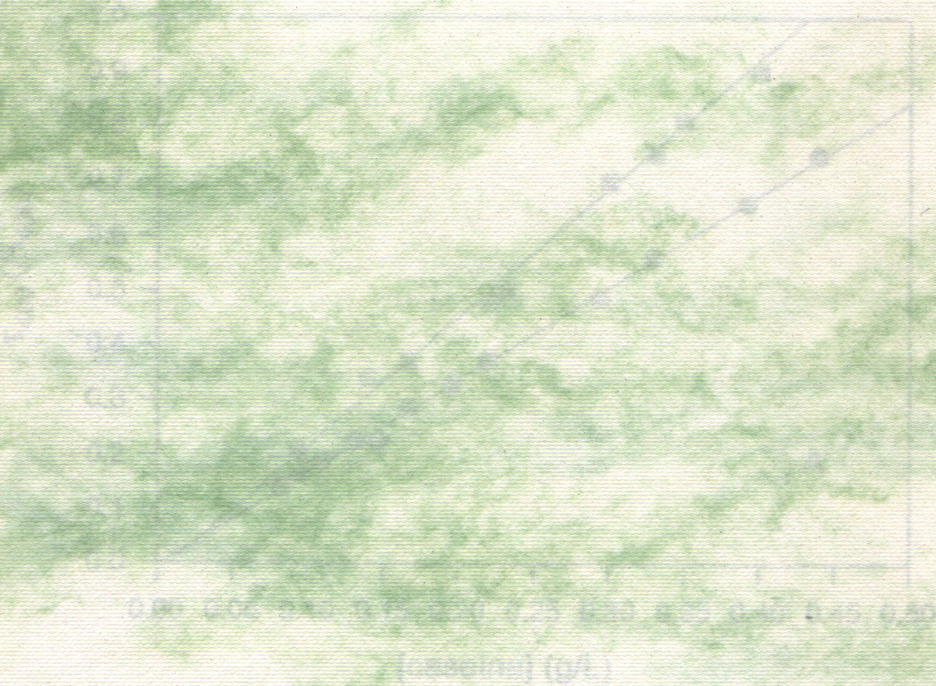
### 3.5 Efecto de la concentración de caseína. Estudio comparativo entre las MC y MCM

#### 3.5.1 Resultados:

Los resultados de la turbidez a 400nm de las soluciones de caseína a 0.05 y 0.10% (p/v) de las diferentes de ambos tipos de micelas (MC y MCM) en el buffer base se presentaron en la Figura 3.6 (A y B).

Los valores de  $n$  se obtuvieron de la pendiente del gráfico de  $\log_{10} \tau$  vs  $\log_{10} C$  (ver

## ESTUDIOS SOBRE MICELAS DE CASEÍNA CON Y SIN MODIFICACIONES (MC Y MCM)



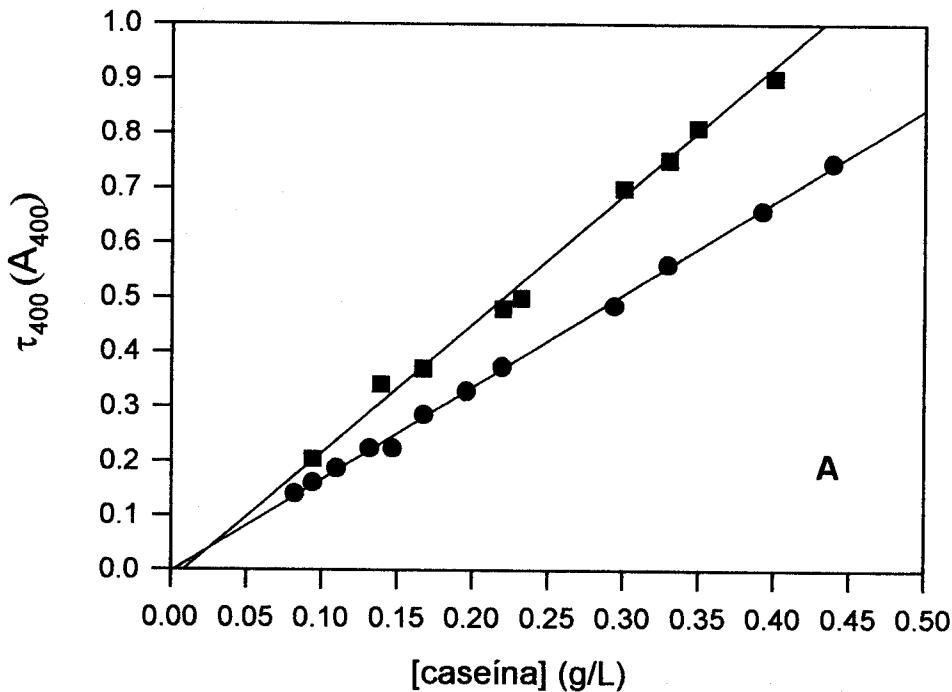


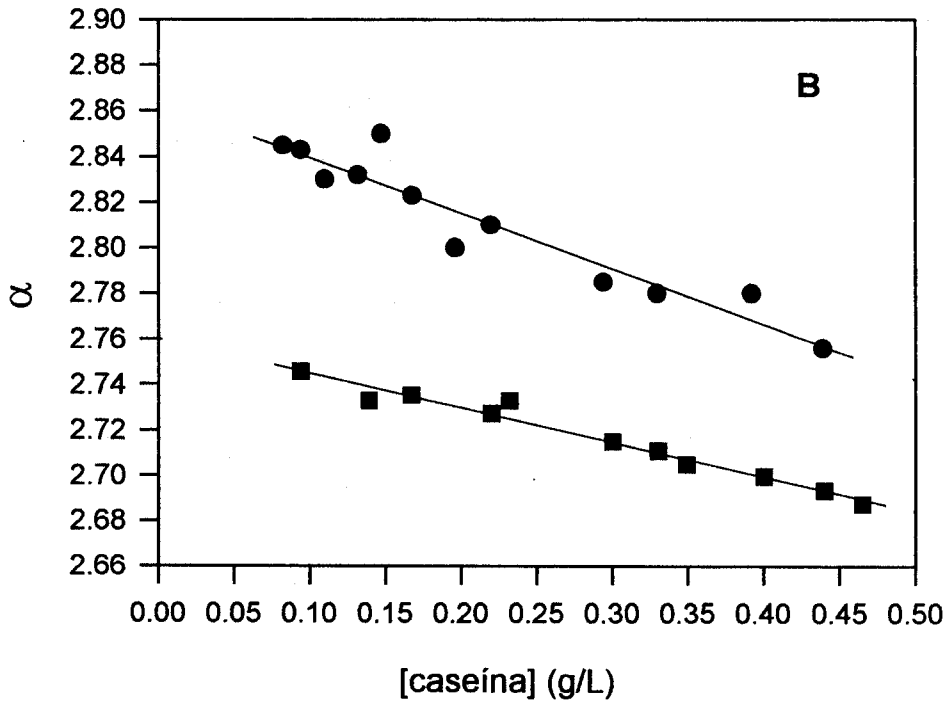
### 3.5 Efecto de la concentración de caseína. Estudio comparativo entre las MC y MCM.

#### 3.5.1 Resultados:

Los resultados de la turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ) y del valor calculado de  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  de las diluciones de ambos tipos de micelas (MC y MCM) en el buffer base son presentados en la Figura 3.6 (AyB)

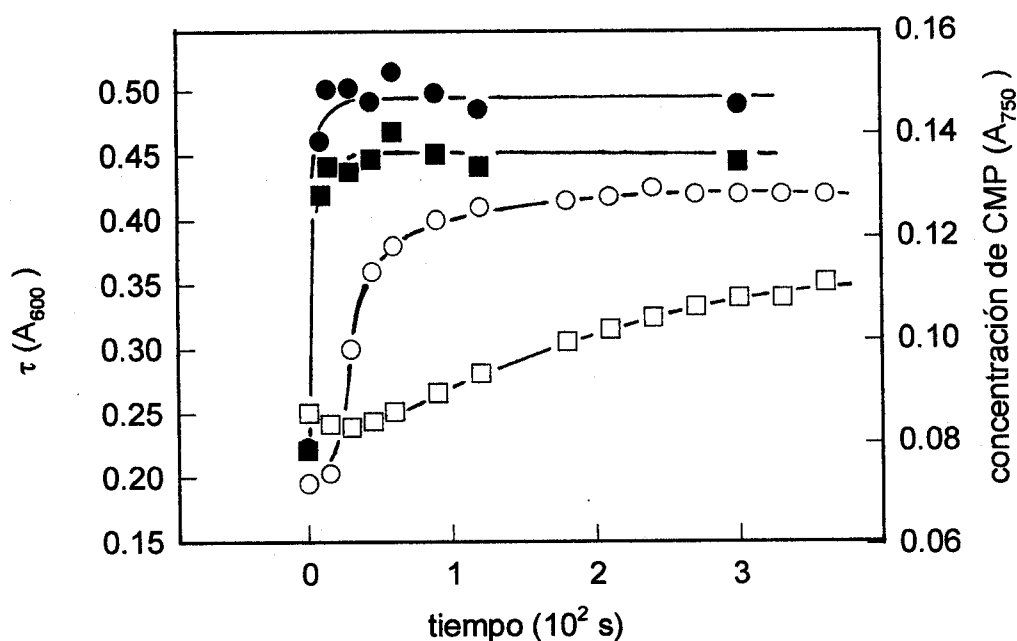
Los valores de  $\alpha$  se obtuvieron de la pendiente del gráfico de  $\log \tau$  vs  $\log \lambda$  (Ver M&M sección 2.2.4). El rango de  $\lambda$  fue de 400-600.





**Figura 3.6.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la concentración de caseína. Temperatura : 35°C

La Figura 3.7 muestra la liberación de CMP de las MC y MCM en función del tiempo (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática para una determinada concentración de caseína manteniendo constante la temperatura y la viscosidad del medio.



**Figura 3.7.** Liberación de CMP y agregación de MC por acción de cuajo en función del tiempo. (●, ■): Concentración de CMP expresado como A a 750nm. (○, □):  $\tau$  expresada como A a 600nm. MC: (●,○) y MCM: (■,□) Concentración de caseína:0,30g/L Temperatura: 35°C.

El máximo valor de CMP liberado fue alcanzado antes del incremento de  $\tau$ , para ambos tipos de micelas, mostrando que la etapa proteolítica de la coagulación se completó en los tiempos iniciales de la fase de agregación. El agregado de 100  $\mu$ L de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen a 3,0 mL de una dilución de MC (o MCM) conteniendo 0,30 g/L permitió obtener el tiempo de finalización de la primera etapa en 15 segundos. De manera similar se obtuvieron los tiempos de la hidrólisis para las demás diluciones de MC (o MCM) con diferentes concentraciones de caseína, resultando en 30 segundos para concentraciones menores a 0,1 g/L y en 15

segundos para concentraciones de caseína mayores a 0,1 g/L. En las diluciones de MC o MCM con concentraciones de caseína diferentes a la presentada en la Figura 3.7 se mantuvo la misma relación de concentración enzima/sustrato.

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ .

Con el valor inicial de la  $\tau$  a 600nm ( $\tau_0$ ), registrada antes del agregado de cuajo, se calculó el incremento relativo de la turbidez  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$  para cada dilución de ambos tipos de micelas. Estos resultados se muestran en la Fig. 3.8 en función de la concentración de caseína.

### **3.5.2 Discusión**

#### **Estado inicial de las MC y MCM**

Los valores de turbidez de las suspensiones de ambos tipos de micelas ( $\tau$ ) en el rango de 0,08 a 0,44 g/L de concentración de caseína mostraron un incremento lineal mientras que los valores de  $\alpha$  disminuyeron levemente para el mismo rango de concentración. Estos resultados estarían indicando que un proceso muy leve de disociación se estaría produciendo en este rango de concentraciones y sería coincidente con los valores de  $R_m$  obtenidos para diluciones de MC (Tabla 3.1)

Comparando los valores de  $\tau$  y  $\alpha$  para ambos tipos de micelas se observa que la  $\tau$  a 400nm para las MCM fue mayor que el valor de las MC a la misma concentración de caseína y con un menor valor de  $\alpha$ . Estos resultados estarían reflejando un

aumento del tamaño medio en las MCM. El calentamiento al que es sometida la leche para obtener las MCM (sección 2.1.2.) produce la desnaturalización de cierta porción de las proteínas del suero y posteriormente la formación de complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas que permanecen solubles, especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina.<sup>21,71,72,73</sup> Estudios por m.e. de micelas de caseína sometidas a tratamientos térmicos muestran un aspecto rugoso de la superficie micelar y un aumento del tamaño medio.<sup>74</sup> El calentamiento produce además la precipitación de fosfato de calcio coloidal<sup>75</sup>, esto provoca un cambio en el índice de refracción de las micelas con el consecuente aumento de turbidez.

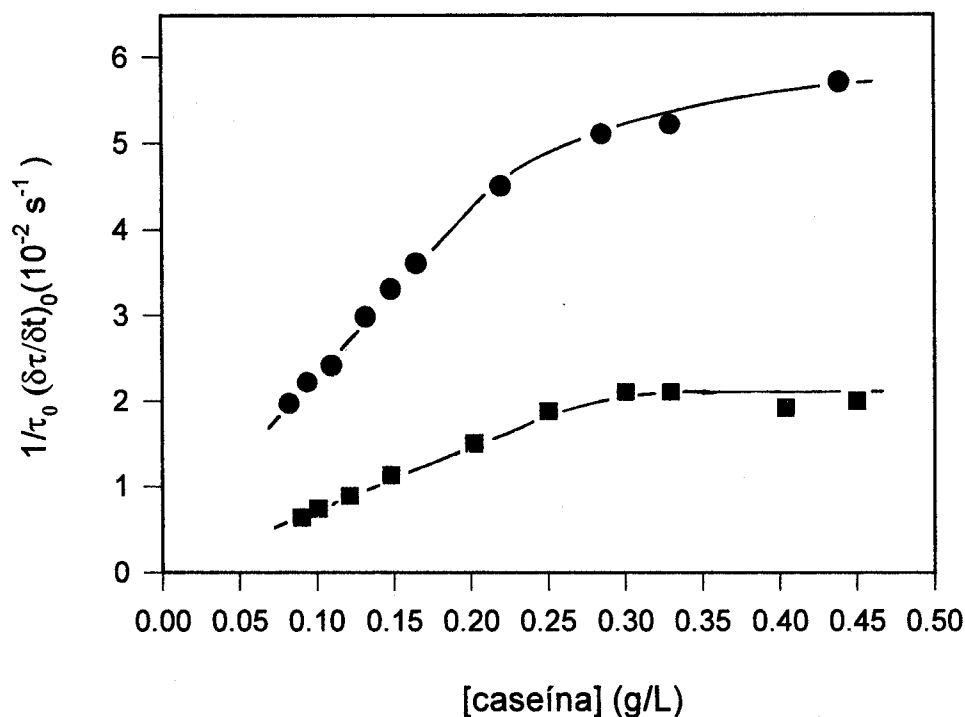
No obstante, utilizando los desarrollos teóricos propuestos en la sección 2.2.5. puede considerarse que las modificaciones de  $I(R_m)$  para las  $MpC$  y  $MpCM$  son despreciables, permitiendo entonces considerar que  $1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0$  es proporcional a  $k_2$  para ambos tipos de micelas.

### **Estudios cinéticos**

La Figura 3.8 muestra que la velocidad de agregación es menor para las  $MpCM$  que para las  $MpC$  en todo el rango de concentración. Ambas presentan a su vez un aumento lineal con la concentración hasta ciertos valores de concentración. Para las  $MpC$  se confirman los datos y conclusiones presentados en la sección 3.1. respecto a que la agregación de las  $MpC$  sigue una cinética de segundo orden, de acuerdo a la teoría de von Smoluchoski para la agregación browniana. Esto también se observa



para las MpCM indicando que los cambios estructurales producidos en las micelas por el tratamiento térmico no afectarían el mecanismo del proceso.



**Figura 3.8.**  $(1/\tau_0 (\delta\tau/\delta t)_0)$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la concentración de caseína. MpC (●) y las MpCM (■) temperatura: 35°C. Cada punto es la media de al menos cinco determinaciones. Máx desvío: 0.003.

A altas concentraciones de caseína el apartamiento del modelo en ambos tipos de micelas es evidente. Esto puede indicar que deja de cumplirse la hipótesis de formación inicial de dobletes propuesta para soluciones diluídas en la agregación browniana. Otra posibilidad, planteada también en la sección 3.1, es que las desviaciones se deban a las limitaciones del método propuesto para medir la  $(\partial\tau/\partial t)_0$

a altas concentraciones de caseína debido a la alta velocidad inicial de floculación. Esta posibilidad, sin embargo podría descartarse en este momento debido a que en el caso de las MCM las velocidades son mucho menores y sin embargo presentaron el mismo comportamiento. La hipótesis que permanece sería el incumplimiento de los supuestos planteados por von Smoluchowski para la cinética de agregación a tiempos iniciales; tal vez se produzcan agregaciones de dobletes entre sí, etc. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se concluye que para ambos tipos de micelas la hipótesis de una cinética inicial de segundo orden se cumple con el método usado, sólo hasta 0,30g/L.

Para explicar la aumentada estabilidad de las MpCM, con respecto a las MpC, debemos analizar las implicancias de los cambios producidos en las MCM por el tratamiento térmico. La formación de complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas desnaturalizadas y la precipitación de PCC no pueden producir cambios importantes en la carga neta de las micelas, de manera que el componente electrostático repulsivo de la teoría D.L.V.O. no sería el responsable del incremento de estabilidad de las MpCM. Los cambios superficiales tampoco modificarían apreciablemente el componente atractivo de dicha teoría.

La Figura 3.7 muestra que a igual concentración de caseína en ambas suspensiones de micelas, las MCM liberaron menor cantidad de CMP. Esto se observa siempre, independientemente de la variable en estudio. Los complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas dificultarían el ataque enzimático del cuajo impidiendo la liberación de CMP. Esto permitiría atribuir la

enzimático del cuajo impidiendo la liberación de CMP. Esto permitiría atribuir la disminuída velocidad de agregación de las MCM a una hidrólisis incompleta. Sin embargo, se realizaron las determinaciones de CMP de manera de estar en igualdad de condiciones entre ambos tipos de micelas para el comienzo de la agregación, es decir que al menos el 80% de la  $\kappa$ -caseína hidrolizable de ambos tipos de micelas haya sido hidrolizado en los primeros 30 segundos luego de agregado el cuajo. Concluyendo: la estabilidad de las MC luego de la acción enzimática ( $MpC$ ) se atribuyó a un componente estérico repulsivo por la presencia de algunas porciones de la  $\kappa$ -caseína (pelos) que quedan sin hidrolizar y que permanecen en la superficie dificultando la colisión o el contacto; en el caso de las  $MpCM$  esas porciones de  $\kappa$ -caseína podrían ser mayores y además estarían formando complejos con las proteínas del suero desnaturalizadas, es decir que el impedimento estérico sería mayor aún que para las  $MpC$ . El término de restricción de volumen de la estabilidad estérica estaría aumentado y permitiría explicar el aumento de estabilidad de las  $MpCM$  con respecto a las  $MpC$ .

### **3.6 Efecto de la temperatura. Estudio comparativo entre las MC y MCM.**

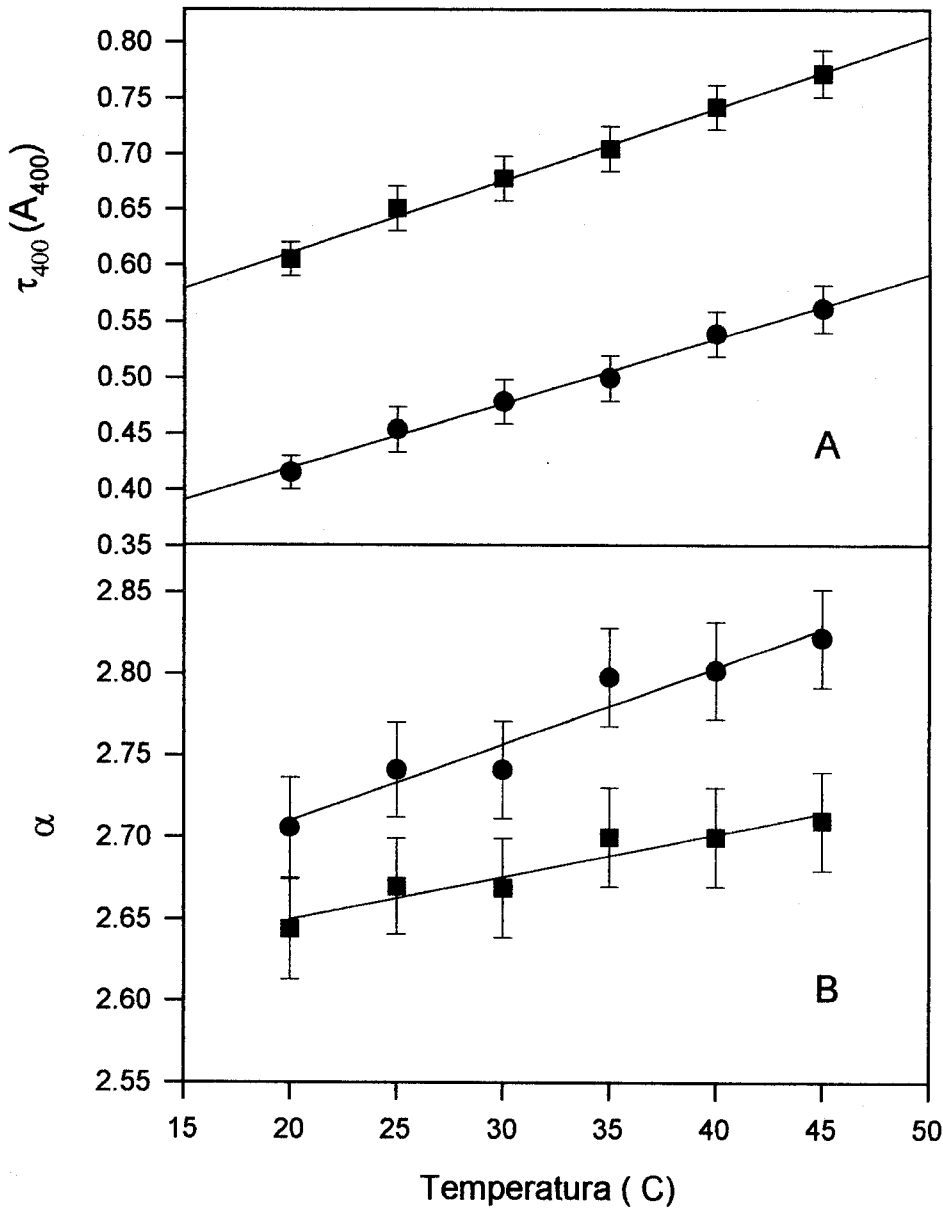
#### **3.6.1 Resultados:**

El estado inicial de las MC y MCM se evaluó a través de los resultados de la turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ) y el cálculo de  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  en las diluciones de ambos tipos de micelas a distintas temperaturas. Ambos resultados son presentados en la Figura 3.9 (A y B)

Rango de temperatura estudiado (°C): 17-45.

De gráficos similares al presentado en la Figura 3.7 se obtuvo el tiempo de finalización de la primera etapa para las temperaturas en estudio para ambos tipos de micelas. Los tiempos resultaron en 15 segundos para temperaturas entre 40-45°C, en 30 segundos para temperaturas entre 35-28°C y en 45 segundos a 17°C, independientemente del tipo de micelas.

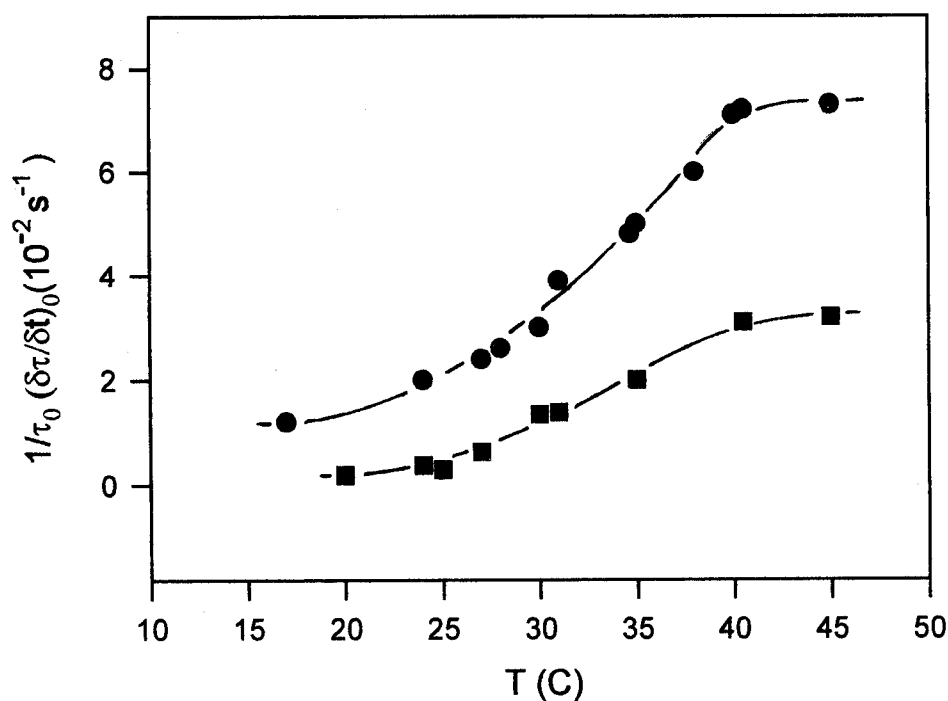
La cantidad de cuajo que permitió obtener estos tiempos de hidrólisis fue: 100μL de una dilución 1/8 v/v del cuajo Hansen para 3,0 mL de una dilución conteniendo 0,30 g/L para ambos tipos de micelas.



**Figura 3.9.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la temperatura. Concentración de caseína: 0,30g/L

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ .

Con el valor inicial de la  $\tau$  a 600nm ( $\tau_0$ ), registrada antes del agregado de cuajo, se calculó el incremento relativo de la turbidez  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$  para cada dilución de ambos tipos de micelas. Estos resultados se muestran en la Figura 3.10 en función de la temperatura.



**Figura 3.10.**  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la temperatura. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Máx. desvío : 0,003, n=5.

### 3.6.2 Discusión

#### Estado inicial de las MC y MCM

La Figura 3.9 muestra un incremento de la turbidez ( $\tau$ ) para ambos tipos de micelas al aumentar la temperatura. Los valores de  $\alpha$  también aumentan para ambas, pero el aumento para las MCM es muy leve. Esta disminución de tamaño fue atribuida (para las MC) a una disminución de la  $v$ .<sup>13,76</sup> El aumento de  $v$  a bajas temperaturas estaría relacionado con la proyección de la caseína- $\beta$  por debilitarse las uniones hidrofóbicas que la mantienen unidas en el interior micelar.<sup>2</sup> El tratamiento térmico dificulta esta proyección por la presencia de los complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas desnaturalizadas del suero.<sup>19</sup> Este impedimento sería parcial para las MCM y en ambos casos (MC y MCM) persistiría una estabilidad adicional a bajas temperaturas explicados a través de una disminuida constante  $A$ .

Por otra parte, las MCM presentan mayor  $\tau$  y menor  $\alpha$ , en todo el rango de temperatura, con respecto a las MC. Estos resultados serían producidos por el calentamiento: aumento del  $n_1$  y formación de complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas desnaturalizadas del suero (especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina)<sup>75,64,21</sup>. No obstante el comportamiento general es el mismo para ambos tipos de micelas. Los valores de  $\alpha$  presentan una variación no mayor a 1,2% entre MCM y MC. Esto permitiría asumir que las variaciones de tamaño de las micelas, producidas por el aumento de temperatura, producirían diferencias despreciables en el  $I(R_m)$  pudiendo

considerarse los valores de  $1/\tau_0(\partial\tau/\partial t)_0$  como proporcionales a  $k_2$  (sección 2.2.5.) y además permitiendo la comparación del comportamiento de ambos tipos de micelas frente a la temperatura.

### **Estudios cinéticos:**

La Figura 3.10 muestra la velocidad inicial de agregación de las MpCM y las MpC y aunque los valores para estas últimas son mayores en todo el rango de temperatura estudiado, la forma de la curva es de características similares para ambas. Una extrapolación de los valores experimentales a bajas temperaturas señalan que ambas llegan a un valor nulo a temperaturas entre 10-15°C indicando ausencia de coagulación a bajas temperaturas. Este hecho ha sido ampliamente observado y documentado para las suspensiones de MpC y es conocido como el “efecto Berridge”.<sup>2</sup> Los resultados obtenidos indican que las MpCM también presentarían este efecto.

Como se discutiera anteriormente, los valores de  $\psi_\zeta$  para las MpC (disminuyen al disminuir la temperatura) no permiten asignar su estabilidad al componente electrostático repulsivo de la teoría D.L.V.O. En el caso de las MpCM no hay datos bibliográficos de las variaciones del  $\psi_\zeta$  a diferentes temperaturas, sin embargo las modificaciones producidas por el tratamiento térmico permiten inferir que no habría grandes cambios de la carga superficial, por lo tanto tampoco podría asignarse la estabilidad de las MpCM a un componente repulsivo electrostático.



Analizando el componente atractivo, ambos tipos de micelas de *p*-caseína, a bajas temperaturas producirían una expansión de la capa externa por la proyección de la  $\beta$ -caseína, observada para el caso de MC y parcialmente para las MCM.<sup>2,19</sup> Esto disminuiría la constante *A* y en consecuencia el componente atractivo. La comparación entre ambos tipos de micelas permite sugerir que esta expansión se sumaría a otros efectos pero nunca podría ser la única responsable de la no coagulación a bajas temperaturas porque en ese caso debieran observarse ciertas diferencias en la curvas de la Figura 3.10 para las MpCM quienes tienen parcialmente dificultada la proyección de las cadenas de  $\beta$ -caseína por los complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas. Esto sólo explicaría la menor diferencia de velocidad entre los 17-45°C de las MpCM con respecto a la diferencia presentada por las MpC en el mismo rango de temperatura.

La estabilidad podría sí relacionarse con la presencia de una estabilidad estérica que permanece luego de la proteólisis enzimática a bajas temperaturas.<sup>67</sup>

La temperatura mínima a la cual ocurre la agregación de las MpC o MpCM puede interpretarse como una temperatura crítica de floculación superior (UCFT). Esta temperatura crítica aparece en soluciones acuosas de dispersiones coloidales estabilizadas por una capa externa de polímeros solubles en agua y es usualmente asociada a una estabilidad estérica de naturaleza entálpica.<sup>51</sup> En este caso, el factor con mayor contribución a la estabilidad estérica o sea a la energía libre de interpenetración de las capas externas de dos partículas, sería el componente entálpico positivo del término de disimilaridad de contacto, es decir el componente

entálpico del parámetro  $\chi_1$  de la teoría de Flory-Huggins de polímeros en solución, aplicado a la interacción de polímeros superficiales (estabilizantes) con el medio de dispersión. Este término positivo, como consecuencia de interacciones específicas (tipo puente hidrógeno por ej.) de moléculas de agua con porciones polares estabilizantes contribuyen a hacer positiva la energía libre de floculación dando en consecuencia estabilidad a la suspensión.<sup>51</sup>

Al aumentar la temperatura por encima de 15°C se produce una pérdida de estabilidad de ambos tipos de suspensiones que finaliza en la coagulación, con un aumento progresivo de la velocidad inicial de agregación. Este comportamiento podría ser el resultado de dos efectos, la disminución del componente entálpico del término de disimilaridad de contacto, con un aumento simultáneo del valor absoluto de la contribución entrópica negativa que promueve la floculación,<sup>51</sup> y la contracción de la capa externa estabilizante por la retracción de las cadenas de  $\beta$ -caseína por el progresivo fortalecimiento de sus uniones hidrofóbicas.<sup>19</sup> Ambos efectos parecen saturarse a temperaturas cercanas a 40°C. Sin embargo la máxima velocidad de agregación es menor que la esperada por von Smoluchowski para una coagulación rápida, indicando que permanece un factor estabilizante (estérico) aún a altas temperaturas.<sup>67</sup>

Además del efecto de la temperatura sobre ambos tipos de micelas surge otro punto de la Figura R.10. Aún cuando las curvas de ambas suspensiones de micelas presentan una forma similar, sugiriendo que el efecto de la temperatura sobre la agregación de ambas suspensiones es similar, los valores de la velocidad inicial de

agregación para las MpCM son siempre menores que los observados para las MpC en todo el rango de temperatura. Teniendo en cuenta lo expuesto en la sección 3.2 con respecto a que los efectos del tratamiento térmico (precipitación del fosfato de calcio coloidal y formación de complejos entre la  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina) no introducen marcadas variaciones en la carga, la alta estabilidad de las MpCM no puede ser atribuida a un incremento de la repulsión electrostática. Tampoco se afectaría el componente atractivo. Esto podría sí relacionarse con una estabilidad estérica debido a los cambios estructurales superficiales de las MCM. Estudios de microscopía electrónica permitieron detectar una superficie rugosa con apéndices proyectándose desde la superficie micelar en el caso de las MCM,<sup>74</sup> y serían las características estructurales responsables de la incrementada estabilidad de las mismas comparadas con las MC. Luego de la acción enzimática persistirían estas diferencias entre ambos tipos de micelas y podrían explicar las diferencias de estabilidad entre las MpC y las MpCM.

### **3.7 Efecto de la viscosidad. Estudio comparativo entre las MC y MCM**

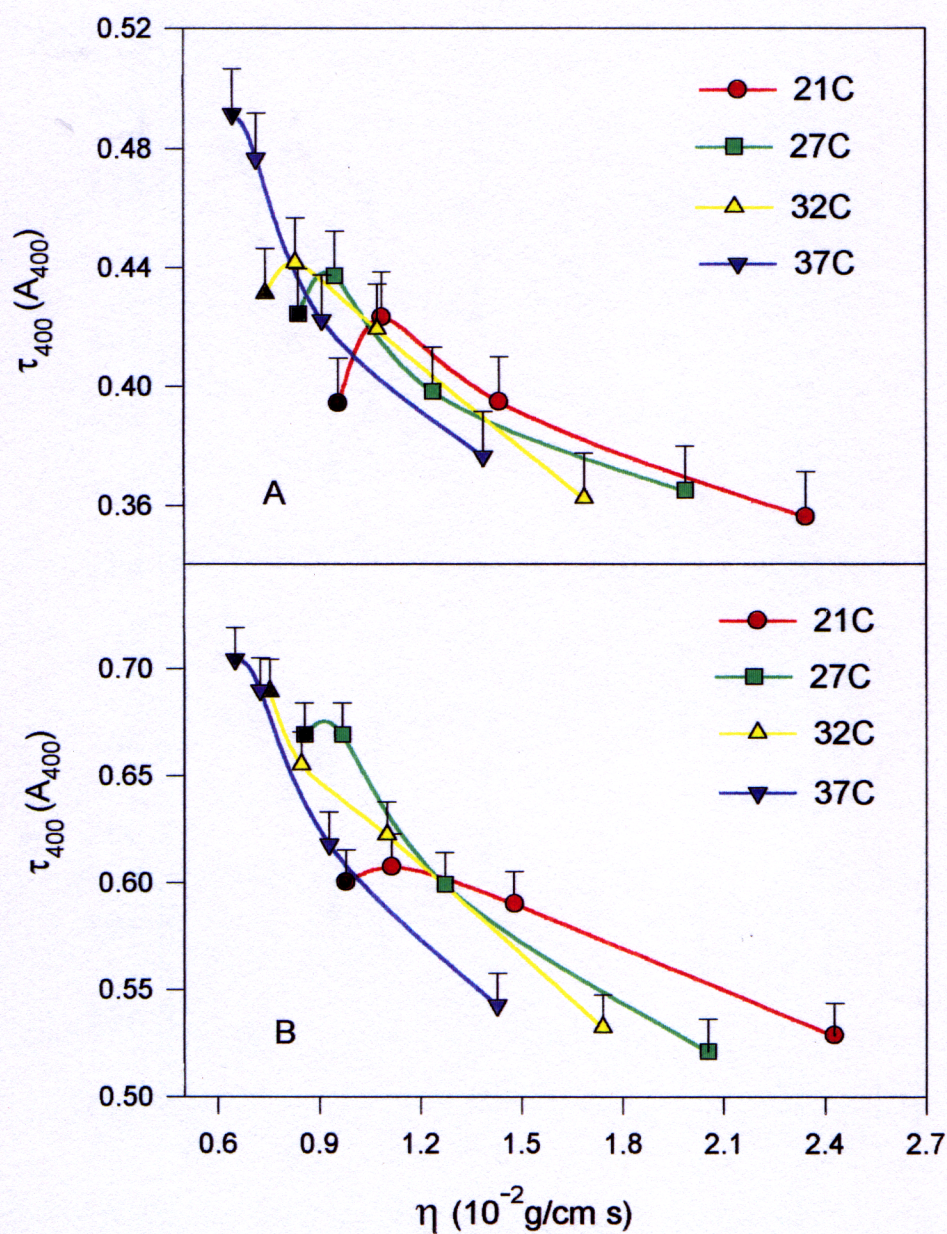
#### **3.7.1 Resultados:**

Los resultados de turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ) de las diluciones de MC y MCM en buffers conteniendo distintos porcentajes de glicerol y el valor de  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  de ambos tipos de micelas en tales diluciones y a diferentes temperaturas son presentados en la Figuras 3.11 y 3.12.

Se obtuvieron gráficos similares a los presentados en la Figura 3.7 para la liberación de CMP (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de la  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática de las MC y MCM variando la viscosidad del medio y manteniendo constante la temperatura y la concentración de caseína. Esto se realizó a las distintas  $\eta$  y a la máxima (37°C) y mínima temperatura (21°C) en estudio. Se modificó la cantidad de cuajo de manera de obtener tiempos de hidrólisis no mayores a 45 segundos.

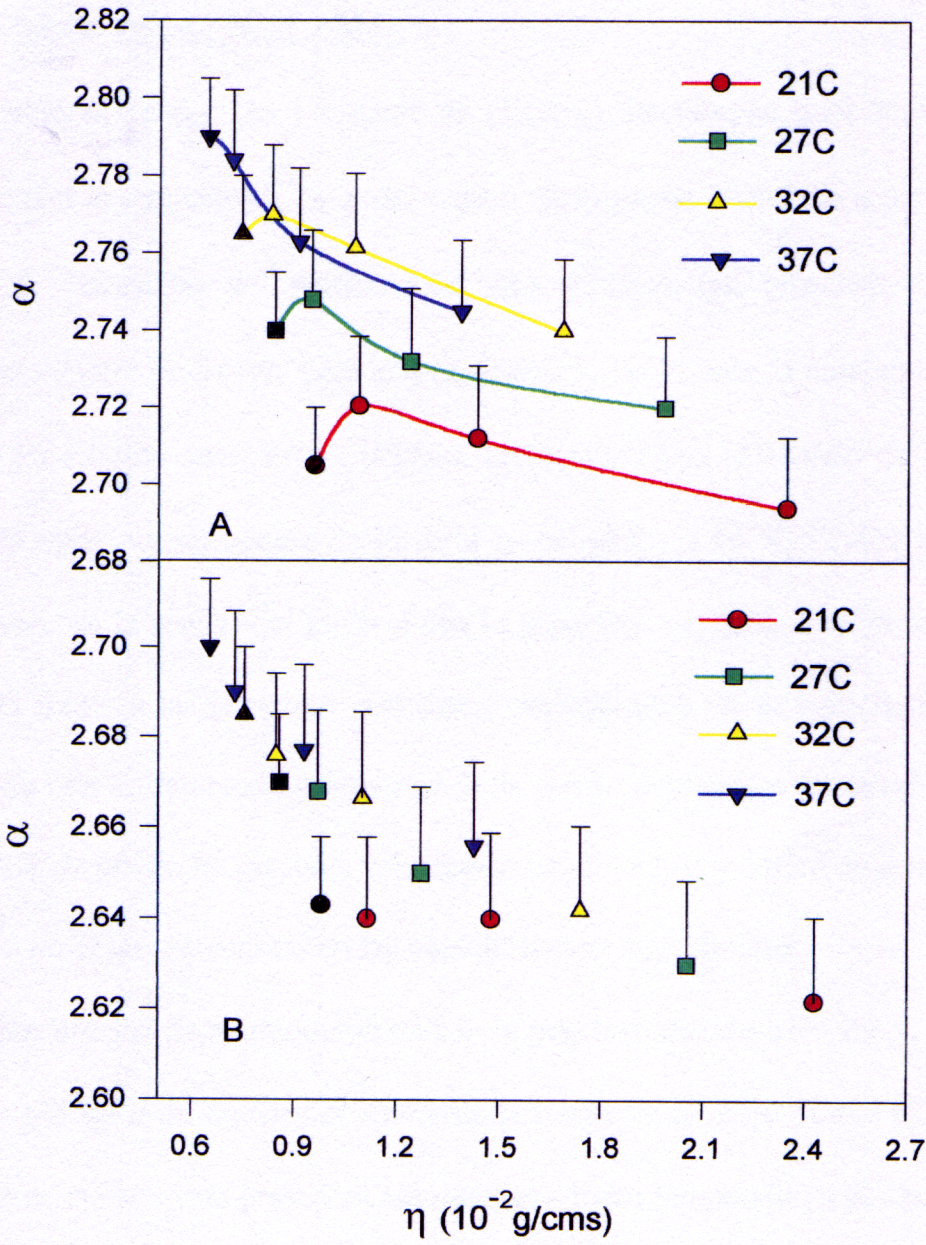
Descontando el tiempo de finalización de la hidrólisis en cada dilución de los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo se obtuvo la velocidad de incremento de la turbidez en el momento inicial  $(\partial \tau / \partial t)_0$ . Con el dato de  $\tau_{600}$  antes del agregado de cuajo se obtuvieron los valores de  $1/\tau_0(\partial \tau / \partial t)_0$  que en función de la  $1/\eta$  a las distintas temperaturas de trabajo son presentados en la Figura 3.13.





**Figura 3.11.** Turbidez ( $\tau$ ) de las MC (A) y de las MCM (B) en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas.





**Figura 3.12.**  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  de las MC (A) y de las MCM (B) en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas.

### **3.7.2 Discusión**

#### **Estado inicial de las MCM y MC**

Los valores de  $\tau_{400}$  (en presencia de glicerol) disminuyen para ambos tipos de micelas con el aumento de la  $\eta$  del medio. Esto puede atribuirse a un cambio del índice de refracción del medio. Los valores de  $\alpha$  (en presencia de glicerol) disminuyen muy levemente para ambos tipos de micelas con el aumento de la  $\eta$  del medio. Este ligero aumento de tamaño, confirmado con el cálculo de  $R_m$  para las MC a la máx. concentración de glicerol en estudio y a 35 °C (Tabla 3.5.), podría explicarse por la acción del glicerol con la superficie proteica, similar al efecto que presenta frente a las proteínas globulares excluyéndose de la superficie proteica y causando una hidratación preferencial de la misma con el consiguiente aumento de tamaño. Este efecto no presenta diferencias entre las MC y MCM sugiriendo que no influyen en él las diferencias en las características superficiales.

Ambos efectos (la disminución de  $\tau$  y la más leve disminución de  $\alpha$ ) se acentúan para ambos tipos de micelas al aumentar la temperatura. Esto podría explicarse por el aumento de la  $v$  que presentan las micelas a bajas temperaturas por la proyección de la  $\beta$ -caseína,<sup>19</sup> lo que produce un aumento de tamaño ( $\alpha$  menores) con disminución de la turbidez.

Comparando el comportamiento de las MC y MCM en ausencia de glicerol (símbolos negros) con el primer agregado de glicerol (~ 5%P/V) surge lo siguiente :

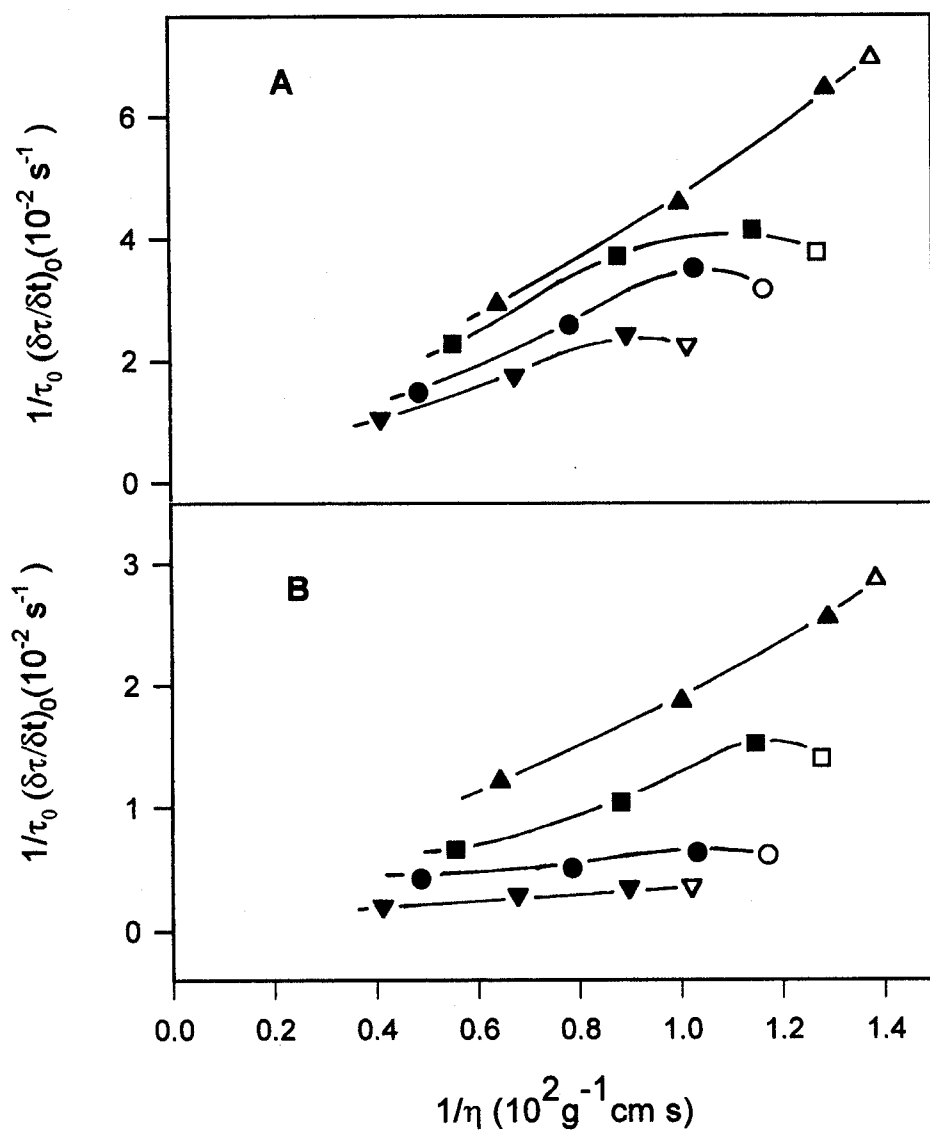


para ambos tipos de micelas se produce un aumento de la  $\tau$  (muy leve para las MCM) (Figura 3.11). Esto se acompaña con un aumento de  $\alpha$  en el caso de las MC y un valor constante para las MCM (Figura 3.12). Esto estaría indicando una contracción, especialmente para las MC, coincidente con lo observado en la sección 3.3 con el cálculo del  $R_m$ . La interacción responsable de este efecto estaría impedida o al menos dificultada en el caso de las MCM. Podría relacionarse con los impedimentos estéricos producidos por el tratamiento térmico, es decir la presencia de los apéndices observados por m.e.,<sup>74</sup> debido a los complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas (especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina).

Otra información que surge de este efecto inicial del glicerol es que no se presenta (o es mínimo) a altas temperaturas. Esto sugiere que además de tratarse de una reacción exotérmica podría plantearse que en la interacción participa la porción de  $\beta$ -caseína que se proyecta a la superficie desde el interior micelar,<sup>13,77</sup> que sería más importante a temperaturas bajas. Esto explicaría que las MCM presenten este efecto muy levemente, ya que tienen dificultada esta proyección de  $\beta$ -caseína.

Las variaciones de tamaño son muy leves y pueden ser consideradas despreciables para introducir cambios en el  $I(R_m)$  lo que permite usar los valores de  $1/\tau_0(\partial\tau/\partial t)_0$  como directamente proporcional a  $k_2$ .





**Figura 3.13.**  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la viscosidad del medio y a distintas temperaturas. Concentración de caseína: 0,30g/L. Máx. desvío estándar: 0,003,  $n=5$ . (A):  $M_{pC}$  (B):  $M_{pCM}$

**Estudios cinéticos:**

La Figura 3.13 presenta los valores de  $1/\tau_0(\partial\tau/\partial t)_0$  en función de la  $1/\eta$  para evaluar el efecto de la viscosidad sobre la velocidad de agregación de las MC (Figura 3.13A) y MCM (Figura 3.13B).

El primer agregado de glicerol aumenta la velocidad inicial de agregación para las MpC. Para las MpCM la velocidad permanece constante. Posteriores agregados de glicerol producen una disminución gradual de la velocidad alcanzando a altas concentraciones de glicerol valores menores que en ausencia de glicerol. La expresión de la velocidad de agregación browniana lenta puede expresarse de acuerdo a von Smoluchowski según la siguiente ecuación:

$$k_2 = \frac{8k_B T}{3\eta W} = \frac{k_2^0}{W}$$

Si las variaciones observadas fueran debidas únicamente a cambios en la  $\eta$  del medio debiera observarse un aumento lineal de  $1/\tau_0(\partial\tau/\partial t)_0$  con el aumento de  $1/\eta$ . La forma de las curvas de la Figura 3.13 sugieren que otro efecto estaría involucrado entre el glicerol y la estructura micelar para explicar las variaciones de la velocidad de ambos tipos de micelas. Estos efectos sobre las MpC y MpCM estarían relacionado con lo descrito para las micelas antes de la acción enzimática. Para las MpC la interacción inicial del glicerol con las micelas produce una disminución del tamaño micelar, como el sugerido por los valores de  $\alpha$  y  $\tau_{400}$ , para MC, produciendo un aumento de la velocidad. Este efecto a su vez, es levemente más pronunciado a bajas temperaturas, lo que indicaría una interacción exotérmica

que podría ser electrostática entre el glicerol y la superficie micelar. Esta interacción parece ser más intensa entre las cadenas poliméricas de la superficie micelar de las MpC que de las MpCM. El glicerol podría ser atraído por grupos carboxilos, aminos o hidroxilos y formar uniones con las proteínas superficiales a través de múltiples uniones de puente hidrógeno reemplazando agua estructurada que se encontraba unida a las proteínas.<sup>77</sup> Estas acciones pueden probablemente ocasionar cambios estructurales en las proteínas superficiales de la capa externa llevando a una modificación de la estabilidad estérica y tal vez del componente electrostático. Estas interacciones no serían predominantes en las MpCM tal vez por impedimentos estéricos en la superficie.

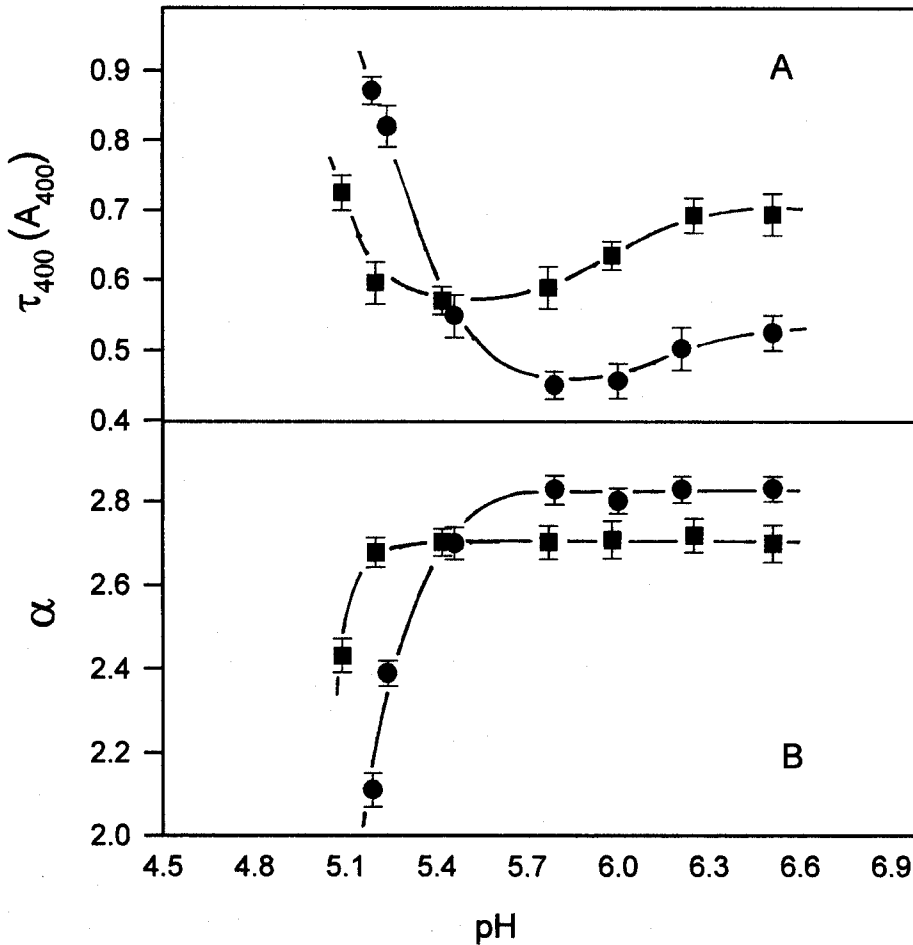
Cuando la interacción entre el glicerol y las micelas se satura, la acción del glicerol se traduce en un efecto neto de viscosidad, o al menos es el efecto que predomina, produciendo una reducción de la velocidad de agregación con el incremento de la  $\eta$  y variando en forma inversa tal cual lo expresado en la ecuación

5.

### 3.8. Efecto del pH. Estudio comparativo entre MC y MCM.

#### 3.8.1 Resultados:

Los resultados de la turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ) y del valor calculado de  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$  de las diluciones de ambos tipos de micelas (MC y MCM) en los buffers con distintos valores de pH son presentados en la Figura 3.14.



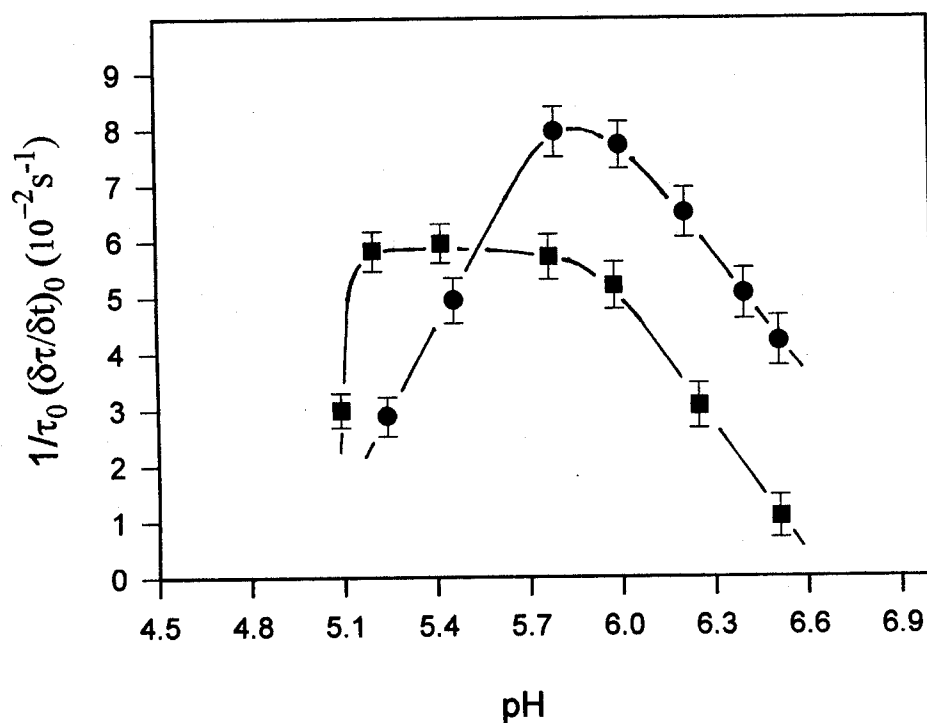
**Figura 3.14.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función del pH del medio. Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C

Se obtuvieron gráficos similares al presentado en la sección 3.5. para la liberación de CMP de las MC y MCM en función del tiempo (medidos como  $A_{750}$ ) y el aumento de  $\tau_{600}$  durante la coagulación enzimática para un determinado pH en cada caso y manteniendo constante la concentración de caseína, la temperatura y la viscosidad del medio.

El agregado de 100  $\mu$ L de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen a 3,0 mL de una dilución de MC (o MCM) conteniendo 0,30 g/L fue suficiente para obtener el tiempo de finalización de la primera etapa en 30 segundos para  $\text{pH} < 5,7$  y en 15 segundos para  $\text{pH} \geq 5,7$ .

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial\tau/\partial t)_0$ .

Con el valor inicial de la  $\tau$  a 600nm ( $\tau_0$ ), registrada antes del agregado de cuajo, se calculó el incremento relativo de la turbidez  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$  para cada dilución de ambos tipos de micelas. Estos resultados se muestran en la Figura 3.15 en función del pH del medio.



**Figura 3.15.**  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función del pH del medio. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura 35°C.

### 3.8.2 Discusión

#### Estado inicial de las MC y MCM

Los valores de turbidez a 400nm de las suspensiones para ambos tipos de micelas en el rango de pH estudiado disminuyeron levemente desde pH 6,6 hasta llegar a un mínimo alrededor de pH 5,7 para las MC y de pH 5,4 para las MCM. Los valores de  $\alpha$  permanecieron constante en ese mismo rango, extendiéndose hasta 5,15 para las

MCM. A valores de pH menores que 5,7 para las MC ó 5,15 para las MCM los valores de  $\tau_{400}$  aumentaron y los de  $\alpha$  disminuyeron (Figura 3.14 A y B). Los cambios fueron más acentuados para las MC.

La disminución de pH produce la disociación de los componentes minerales (principalmente el fosfato de calcio coloidal: PCC) y la proyección y posterior liberación de cadenas de caseínas, especialmente la  $\beta$ -caseína.<sup>78,79</sup> A pH 5,3 la proyección de caseínas sería máxima y todo el PCC estaría disuelto, permaneciendo en la estructura micelar cierta cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$ ; esto se acompañaría con un valor máximo de la  $v$ .<sup>78</sup> Las micelas mantendrían el esqueleto estructural.<sup>80</sup> A valores de pH menores a 5,3 la micela ya no mantendría ningún tipo de estructura<sup>80</sup> y la  $v$  disminuiría bruscamente por producirse la desintegración de la estructura micelar.<sup>78</sup>

En nuestro sistema, los valores constantes de  $\alpha$  (hasta pH 5,45 para MC y 5,15 para MCM) indicarían que estas pérdidas no introducen cambios importantes en el tamaño de las partículas confirmando las observaciones para MC de varios autores (18 y 19) y permitiendo sugerir el mismo comportamiento para las MCM aún hasta pH 5,15.

La disminución de los valores de  $\alpha$ , presentada por ambos tipos de micelas, los cuales sugieren un aumento de tamaño, podría estar asociado con el “hinchamiento” de las micelas coincidente con la máxima  $v$  informada por Hooydonk y col.<sup>78</sup> y con los estudios por m.e. a pH cercanos a 5,3 que muestran una superficie micelar rugosa, indicando probablemente que las submicelas más superficiales estarían siendo desprendidas de las micelas.<sup>81</sup>

En esta zona el aumento de turbidez podría deberse a una incipiente precipitación por la cercanía al punto isoeléctrico.

Otro punto que surge de los gráficos de  $\alpha$  y  $\tau$  para ambos tipos de micelas es el siguiente: las MCM se manifiestan menos lábiles frente a la acidificación del medio que las MC. Por ej., la constancia de tamaño, evidenciada a través de los valores de  $\alpha$ , se extiende hasta 5,1 para las MCM y hasta 5,4 para las MC y el mínimo de  $\tau$  se mantiene durante un rango mayor de unidades de pH ( $\sim 0,6$  unidades) para las MCM mientras que para las MC es de  $\sim 0,3$  unidades. Esto puede relacionarse con las características superficiales de las MCM producidas por el tratamiento térmico que dificultarían la proyección y posterior liberación de caseínas.<sup>82</sup>

### **Estudios cinéticos:**

La constancia de tamaño hasta pH 5,7 para las MC y hasta 5,1 para las MCM permite interpretar a  $\frac{1}{\tau_0} \left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right)_0$  como una medida de la velocidad de agregación de las MpC y las MpCM en ese rango de pH, es decir desde 6,6 hasta 5,7 para las MC y hasta 5,1 para las MCM. La Figura 3.15 muestra que la velocidad de agregación aumenta regularmente con el descenso del pH en este rango, manteniendo cierto paralelismo entre las curvas de las MpC y las MpCM. Los dos sistemas alcanzan un valor máximo cerca de pH 6,0 y permanecen constante hasta pH 5,8 para las MpC y hasta 5,1 para las MpCM. Por otra parte, a valores de pH menores  $\frac{1}{\tau_0} \left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right)_0$  no puede ser utilizada como una estimación de la velocidad de agregación por estar



produciéndose cambios de tamaño en ambos tipo micelas. Este parámetro estaría siendo modificado simultáneamente por las variaciones de la velocidad de agregación y el incremento de tamaño evidenciado por los cambios en los valores de  $\alpha$ .

El paralelismo observado en el comportamiento de las MpC y las MpCM frente a la disminución de pH desde 6,6 a 6,0 permite sugerir que los cambios ocasionados por la acidificación actúa en ambos casos en el mismo sentido. En el caso de la leche (MC), la acidificación produce la protonación de algunos grupos proteicos y ha sido informada como la causa de la disminución de la carga negativa neta.<sup>78,81</sup> Esto produciría una disminución del  $\psi_0$  (medido a través de  $\psi_\zeta$ ) con la consecuente disminución del componente repulsivo electrostático de la teoría D.L.V.O. Por otra parte, los pelos de las MC y los que permanecen luego del ataque enzimático están cargados negativamente, de manera que también se protonarán con el descenso del pH, esto producirá un colapso de los pelos con disminución del componente estérico (estabilidad electroestérica).<sup>51</sup> La acidificación también produce liberación de material mineral (principalmente PCC) con el consiguiente aumento de la concentración de estos iones en el seno de la solución. Los agregados de  $\text{Ca}^{2+}$  que se realizan en las plantas elaboradoras de queso producen aumento de la velocidad de coagulación de la leche, se le asigna entonces al  $\text{Ca}^{2+}$  libre la responsabilidad de esos aumentos.<sup>67,83</sup> En nuestro caso, sin embargo, al trabajar con un sistema diluido, la reserva de  $\text{Ca}^{2+}$  que puede ser solubilizado por la acidificación no puede producir cambios significativos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La disminución del  $\psi_\zeta$  y el

colapso de los pelos de la capa superficial por la protonación de los residuos proteicos sí pueden ser razones válidas para explicar la pérdida de estabilidad mostrada por las MpC y las MpCM.

La diferencia de estabilidad entre las MpC y las MpCM persiste con el descenso de pH, al igual que en las demás variables, sugiriendo que los cambios en el componente estérico (responsable de las diferencias entre ambas micelas) son similares. Además, el hecho de que ambas partículas con claras diferencias superficiales presenten el mismo comportamiento frente al descenso de pH sugiere que los cambios sobre la estabilidad estérica fueron similares o al menos menos importantes que las variaciones de carga.

### **3.9 Efecto de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ . Estudio comparativo entre MC y MCM.**

#### **3.9.1 Resultados:**

Los resultados de la turbidez a 400nm ( $\tau_{400}$ ) y del valor calculado de  $\alpha \left( -\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \right)$

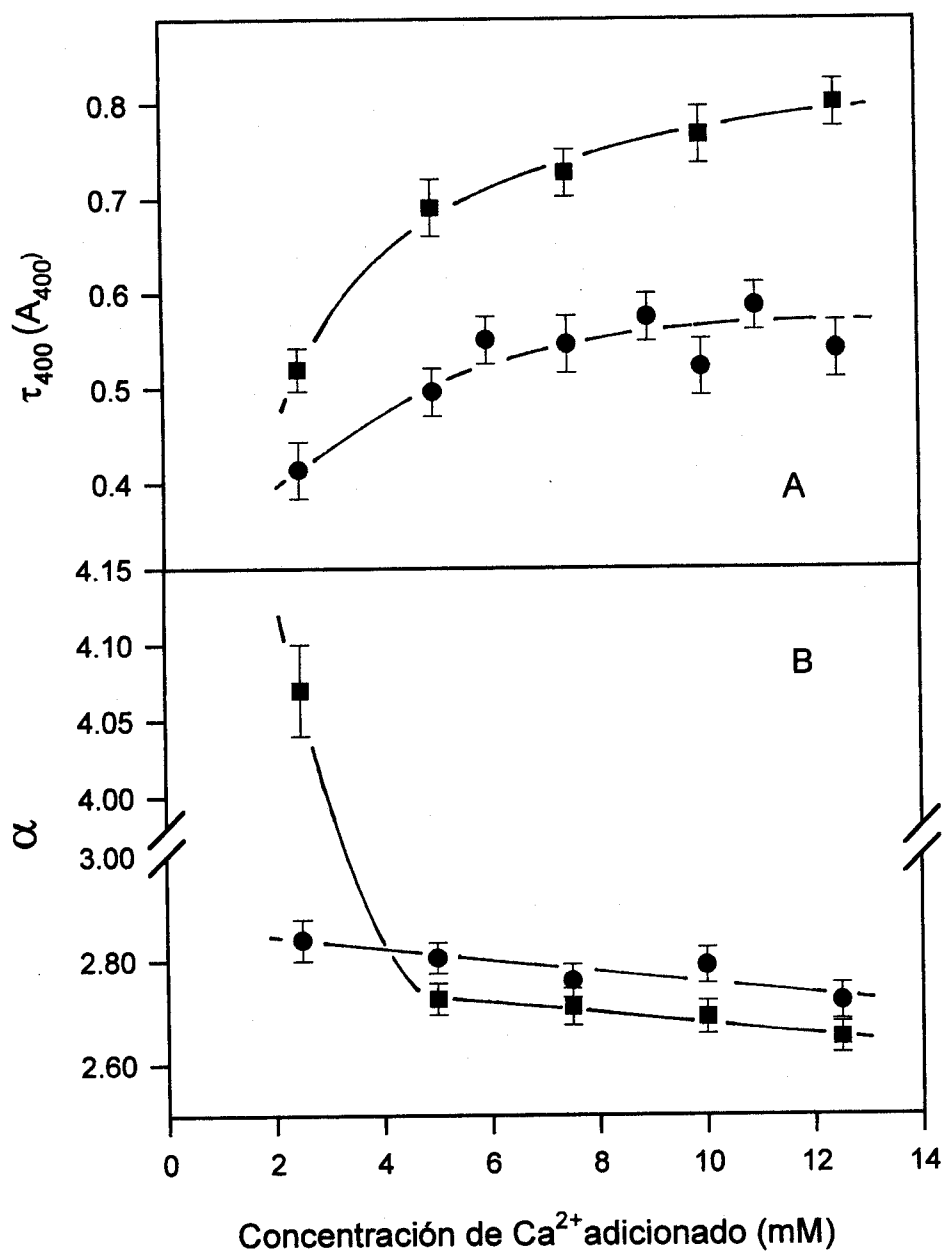
de las diluciones de ambos tipos de micelas (MC y MCM) en los buffers con distintos contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  son presentados en la Figura 3.16

Rango de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  estudiado (mM): 2,5 - 12,5

Se obtuvieron gráficos similares al presentado en la sección 3.5. Para la obtención de cada gráfico se mantuvo constante la concentración de caseína, el pH, la temperatura, la viscosidad del medio y se fue variando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

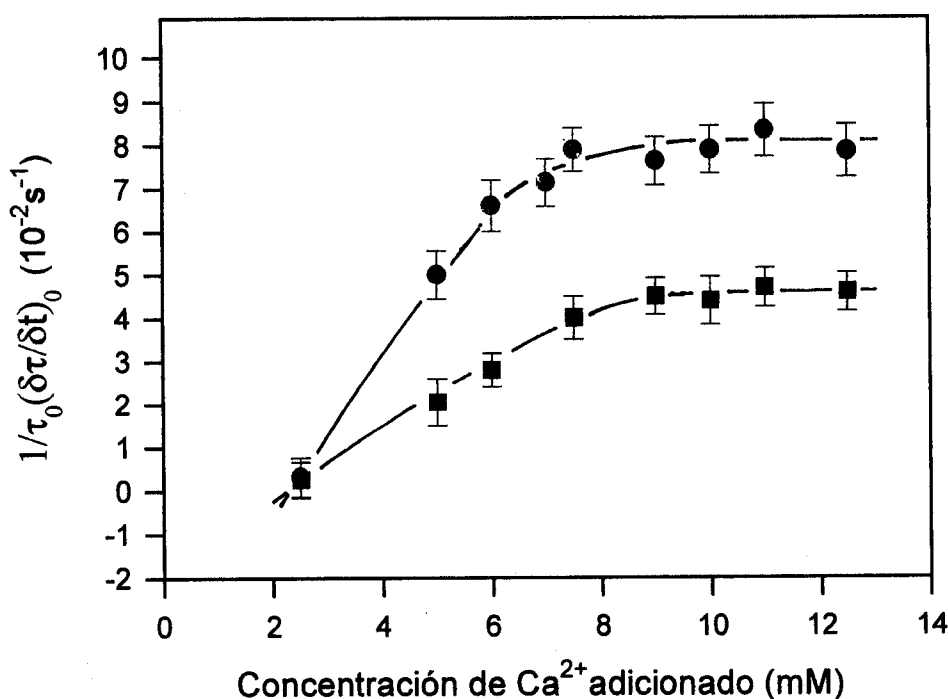
Los tiempos requeridos para obtener el máximo valor de CMP liberados antes del incremento de  $\tau$ , para ambos tipos de micelas, fueron de 45 segundos para 2,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y de 30 segundos para concentraciones  $\geq 5$  mM. El agregado de 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/8 v/v de cuajo Hansen a 3,0 mL de una dilución de MC (o MCM) conteniendo 0,30 g/L fue suficiente para obtener los tiempos informados.

De los gráficos de  $\tau_{600}$  vs. tiempo, luego de finalizada la etapa de hidrólisis, se obtuvo la derivada máxima en los tiempos iniciales  $(\partial \tau / \partial t)_0$ .



**Figura 3.16.** (A) Turbidez y (B)  $\alpha$  de las MC (●) y de las MCM (■) en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado al medio. Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C.

Con el valor inicial de la  $\tau$  a 600nm ( $\tau_0$ ), registrada antes del agregado de cuajo, se calculó el incremento relativo de la turbidez ( $1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0$ ) para cada dilución de ambos tipos de micelas. Estos resultados se muestran en la Figura 3.17 en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado al medio.



**Figura 3.17.**  $(1/\tau_0 (\partial\tau/\partial t)_0)$ , velocidad del incremento relativo de la turbidez, en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado. MpC (●) y las MpCM (■). Concentración de caseína: 0,30g/L. Temperatura: 35°C.

### **3.9.2 Discusión**

#### **Estado inicial de las MC y MCM**

La Figura 3.16(B) muestra que la  $\tau$  para las suspensiones de MC y MCM permanecieron prácticamente constantes en el rango entre 7,5 y 12,5 mM de concentración de calcio agregado. A concentraciones menores a 7,5 mM ambos tipos de micelas presentaron una disminución de la  $\tau$ . Los valores de  $\alpha$  permanecieron practicamente constante para ambos tipos de micelas en todo el rango de concentraciones estudiado excepto a 2,5 mM donde las MCM presentaron un brusco aumento ( $\alpha \sim 4$ ). Este valor estaría indicando la desintegración de las micelas modificadas a esa concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  agregado.

Varios autores han observado que las suspensiones de MC al equilibrarse con soluciones conteniendo baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH 6,4 cambian el equilibrio mineral causando la solubilización del PCC, disociando  $\text{Ca}^{2+}$  de los caseinatos de calcio y disminuyendo la densidad de las MC.<sup>83,84</sup> Estas modificaciones en el contenido mineral de las MC provocarían una disminución del índice de refracción y explicarían la disminución de la  $\tau$  a concentraciones menores a 7,5 mM. Los cambios, sin embargo, no modifican el tamaño, como lo muestra el valor constante de  $\alpha$  indicando que la estructura se conservaría, tal cual fuera informado por de Kruif et al <sup>85</sup> para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por acidificación. Este comportamiento podría extrapolarse a las MCM excepto a 2,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  donde el valor de  $\alpha$

estaría indicando la desintegración de las micelas modificadas a esa concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  agregado.

En la Figura 3.16 (A y B) puede observarse nuevamente las diferencias entre las MC y las MCM. Estas últimas, en todo el rango de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , presentan valores de  $\tau$  mayores acompañados de valores de  $\alpha$  menores (excepto a 2,5mM), indicando que son de mayor tamaño mayor y más turbias que las MC. Esto se explica por el aumento del índice de refracción y por la presencia de los complejos entre la  $\kappa$ -caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas. Hechos, estos últimos, provocados por el tratamiento térmico al que son sometidas en la preparación.

### **Estudios cinéticos:**

La Figura 3.17 muestra que la velocidad de agregación es prácticamente nula a 2,5mM de  $\text{Ca}^{2+}$  para las MpC, sugiriendo ausencia de agregación a esas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionado, hecho previamente descripto por Dalglish.<sup>67</sup>

Para las MpCM no es válido el uso de  $\frac{1}{\tau_0} \left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right)_0$  como una medida de la velocidad de agregación sólo a 2,5 mM de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por producirse modificaciones de tamaño, sí lo es para las MpC a todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al aumentar hasta 7,5 mM los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  agregados se produce un aumento de la velocidad inicial de agregación para ambos tipos de micelas y a partir de 7,5 en adelante la

$\frac{1}{\tau_0} \left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right)_0$  permanece constante. En todo el rango de concentraciones en estudio las

MpC presentan valores de  $\frac{1}{\tau_0} \left( \frac{\partial \tau}{\partial t} \right)_0$  mayores a los de las MpCM.

Gran cantidad de resultados han sido informados acerca del accionar del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la coagulación enzimática de la leche<sup>66,67,78</sup> señalando generalmente un incremento de la velocidad de coagulación enzimática en su conjunto cuando se adiciona a la leche concentraciones de calcio en un rango entre 0-30mM. Este efecto ha sido atribuido a la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la segunda etapa de la coagulación debido a la reducción del valor absoluto del  $\psi_\zeta$  por la neutralización de residuos proteicos cargados negativamente como por ej. fosfoserina, grupos carboxílicos, etc. con  $\text{Ca}^{2+}$  e incluso con complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -fosfato.<sup>24,78</sup> Este efecto electrostático podría estar asociado con el colapso parcial de los pelos de la capa externa por acción del  $\text{Ca}^{2+}$  agregado,<sup>63</sup> sería un efecto electroestérico. Sin embargo, el comportamiento de ambos tipos de micelas presentó características similares sugiriendo que los efectos dominantes estarían asociados a variaciones de carga. A concentraciones mayores a 7,5 mM (Figura 3.17) la velocidad de agregación alcanzó un valor constante para las MpC y las MpCM, este comportamiento puede atribuirse a la saturación progresiva de los residuos negativos de las micelas con el incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio. Dado que la concentración de caseína en nuestro sistema es  $\sim 100$  veces menor que la presente en la leche, el efecto de saturación se observa a concentraciones menores de  $\text{Ca}^{2+}$  que las observadas en la leche.<sup>66,67,78</sup> En este caso, a 2,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  agregado, la carga



negativa libre de las partículas podría ser suficiente para explicar la ausencia de coagulación.

### 3.10 Conclusiones generales

Las MC no pueden considerarse coloides liofóbicos estrictos, de manera que la teoría D.L.V.O. resulta insuficiente para explicar su comportamiento. Por ej. la leche a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre  $\sim 2,5\text{mM}$  y a la  $\mu$  total que presenta  $\sim 0,075\text{M}$ , de acuerdo a la regla de Shulze-Hardy debiera flocular espontáneamente.<sup>26</sup> Sin embargo, el sistema es estable y la explicación ha sido asignada a un componente estérico por la proyección de la porción hidrofílica de la  $\kappa$ -caseína hacia el medio acuoso.<sup>26,2,68</sup> Las micelas de caseína modificadas (MCM) utilizadas en este trabajo fueron obtenidas por calentamiento a temperaturas superiores a los  $70^\circ\text{C}$ , este tratamiento produce la desnaturalización de las proteínas del suero. Las proteínas desnaturalizadas que permanecen solubles (especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina) forman complejos con la  $\kappa$ -caseína superficial de las MC modificando la superficie de las mismas.<sup>21,22,24</sup> Estudios de m.e. muestran la superficie de las MCM con apéndices y aspecto rugoso.<sup>74</sup> Estos cambios superficiales se reflejaron en los resultados experimentales a través de una incrementada estabilidad de las MCM con respecto a las MC. Esto permite inferir que el componente estérico superficial es imprescindible para explicar la estabilidad de ambos tipos de micelas. La estabilidad estérica puede interpretarse por la combinación de dos contribuciones: una *entrópica o de restricción de volumen*, relacionada con el movimiento dificultado de los pelos flexibles de una partícula por la presencia de otra, y por el término de *mezclado* relacionado con la capacidad de solubilización de los pelos en

el medio dispersante. Esta última contribución puede ser repulsiva o atractiva dependiendo de la "calidad solvente" del medio.<sup>2,51</sup> En este caso podría explicarse por una contribución entrópica repulsiva por el término de restricción de volumen debida a la presencia de los pelos superficiales, más acentuada para las MCM por los cambios superficiales. Este no sería el único mecanismo responsable de su estabilidad pero sí el que explica las diferencias con las MC sin modificar.

El agregado de cuajo cataliza la hidrólisis de la porción hidrofílica de la  $\kappa$ -caseína superficial *casi* en su totalidad. Está descrita la permanencia en algunos pelos luego de la acción enzimática.<sup>2</sup> Si la estabilidad de las MC (y las MCM) está basado en la presencia de la  $\kappa$ -caseína superficial que produce un aumento del componente estérico de restricción de volumen, podría esperarse que luego de la acción enzimática, las micelas flocularan espontáneamente y además que se verifique en ellas el comportamiento de un coloide liófilico y que su estabilidad pueda ser explicada a través de la teoría D.L.V.O. La acción enzimática produce la floculación espontánea de las MC pero lo hace a una velocidad menor que la esperada, los resultados experimentales ( $k_2 < k_2^0$ ) reflejan la presencia de un factor estabilizante. El estudio de la agregación de las micelas de  $p$ -caseína frente a distintas variables permitió analizar cuál era el mecanismo responsable o predominante de este factor estabilizante.

Los resultados experimentales frente a variaciones en la concentración de caseína permitieron verificar el cumplimiento de la hipótesis de von Smoluchowski, a tiempos iniciales, de una cinética de agregación de segundo orden. Esto se verificó

hasta una determinada concentración de caseína de acuerdo a la metodología utilizada.

La agregación de las MC a distintas temperaturas permitió también verificar la hipótesis de von Smoluchoski con un aumento de la velocidad al aumentar la temperatura. Pero a temperaturas bajas, las MC presentaron un factor estabilizante adicional. Esto es coincidente con lo informado en la literatura respecto a la ausencia de coagulación a bajas temperaturas ( $\sim 4-10^{\circ}\text{C}$ ) y que es conocido como el “efecto Berridge”.<sup>41</sup> La voluminosidad de las micelas aumenta a bajas temperaturas (W) y esto ha sido asignado a la proyección de las cadenas de caseína- $\beta$  hacia la superficie por debilitamiento de las uniones hidrofóbicas que la mantienen en el interior micelar. (W). Esto produce una expansión de la micela con aumento de tamaño (verificado a través del cálculo de los  $R_m$ ). Este efecto produce una disminución de la constante de Hamaker con la disminución del componente atractivo. Esto podría explicar la estabilidad adicional de las MC a bajas temperaturas. Los resultados obtenidos luego con las MCM nos permitieron aclarar este punto.

La agregación *en presencia de glicerol* se realizó para verificar si el mecanismo de agregación era el de difusión (DLA). El aumento de la viscosidad produjo una disminución de la velocidad de agregación lo que permite verificar una agregación limitada por difusión (DLA). Este aditivo fue elegido porque su presencia no produce significativas modificaciones del tamaño ni cambios de la estructura micelar.<sup>60</sup> Sin embargo, al comparar las velocidades en ausencia y ante el primer

agregado de glicerol (5%P/V) se observó un aumento de la velocidad. Esto sugiere cierta interacción del glicerol con las micelas que causa una disminución de la estabilidad de las MpC. El glicerol podría actuar con la micela como con una proteína globular a través de un parámetro de interacción preferencial negativo, es decir reforzando uniones de puente hidrógeno con el agua y excluyéndose de la superficie proteica causando una hidratación preferencial de la proteína (efecto solvofóbico). Esto produciría cierta expansión de la proteína con aumento del tamaño medio.<sup>69</sup> Este efecto se produce a altas concentraciones de glicerol y pudo verificarse en nuestro caso, por el aumento de  $R_m$  de las MC, para la máxima concentración de glicerol agregado (~30%P/V). Pero el agregado inicial debería involucrar otro tipo de proceso porque además de aumentar la velocidad, los valores de  $R_m$  indican una leve disminución de tamaño. Na señala que el glicerol podría ser atraído por grupos carboxilos, aminos o hidroxilos y formar uniones con las proteínas superficiales a través de múltiples uniones de puente hidrógeno reemplazando agua estructurada que se encuentra unida a las proteínas.<sup>67</sup> Estas interacciones podrían modificar la superficie micelar aumentando la estabilidad de las micelas. Los resultados a distintas temperaturas y la comparación con el comportamiento de las MCM, permitirán discutir más información sobre este punto.

La agregación en presencia de distintos iones a diferentes concentraciones permitió confirmar la imposibilidad de explicar la estabilidad de las MpC solamente con los componentes atractivos y repulsivos electrostáticos de la teoría D.L.V.O., es decir considerarlas un coloide liofóbico estricto. El aumento de la fuerza iónica del

medio debió producir un aumento de la velocidad de agregación por disminución del espesor de la doble capa eléctrica (parámetro de Debye) lo que se traduce en una disminución del componente electrostático repulsivo con predominio (por la proximidad) de las fuerzas atractivas de van der Waals. Esto no sucedió para ninguno de los iones. Los resultados respondieron a cambios producidos en las micelas por los distintos iones de acuerdo a sus características (caotrópicos, cosmotrópicos o de interacciones específicas con la micela como por ej. el  $\text{Na}^+$ )<sup>70,34</sup> El efecto de los cationes puso además en evidencia la estructura dinámica de las micelas.

La modificación superficial de las MCM con respecto a las MC permitió aclarar algunos aspectos sobre los mecanismos responsables de la estabilidad de las micelas luego de la acción enzimática, es decir de las micelas de *p*-caseína.

La variación de la concentración de caseína permitió verificar también para las MpCM el cumplimiento de la hipótesis de von Smoluchowski, la cinética de segundo orden a tiempos iniciales se verificó al igual que para las MC también hasta cierta concentración de caseína con la metodología propuesta.

Los resultados a temperaturas variables sobre ambos tipos de micelas permitieron aclarar cuál podría ser el mecanismo estabilizante que predomina a bajas temperaturas. En el caso de las MC se describió una proyección de la caseína  $\beta$  por debilitamiento de las uniones hidrofóbicas<sup>1,2</sup>, en el caso de las MCM esta proyección estaría dificultada<sup>19</sup>. Si la estabilidad adicional de ambos tipos de micelas a bajas temperaturas se pudiera explicar únicamente con la disminución del

componente atractivo de la teoría D.L.V.O. a través de la disminución de la constante de Hamaker, las curvas de velocidad de las MpCM debieran haber presentado alguna diferencia con respecto a las curvas de las MpC. Este hecho no se observó, las curvas presentaron un paralelismo en todo el rango de temperatura permaneciendo solamente la diferencia originada por el tratamiento térmico, es decir, velocidades mayores para las micelas sin modificar. Esto indicaría que el componente estérico repulsivo (que podría ser de naturaleza entálpica) sería el mecanismo predominante y podría explicar la mínima temperatura a la cual se produce la coagulación como una temperatura crítica de floculación superior (UCTF).

Los resultados obtenidos con concentraciones crecientes de glicerol permitieron verificar, para ambos tipos de micelas, que el mecanismo de agregación está limitado por difusión. También se observó en las MpCM un aumento de velocidad ante el primer agregado de glicerol menor que para las MpC, esto indicaría que la interacción que produce la desestabilización inicial está dificultada por la presencia de los apéndices presentes en las modificadas por el tratamiento térmico. El efecto de la temperatura indica que esta interacción sería probablemente exotérmica, de carácter electrostática, pero además podría involucrar a las porciones de caseína  $\beta$  proyectadas a la capa superficial, que son más importantes a temperaturas más bajas.

Los estudios en presencia de pH y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  variable reforzaron evidencias sobre la presencia de un componente repulsivo estérico (más acentuado

en las MCM por las modificaciones superficiales) pero señalan además la importancia del componente electrostático. La disminución de pH produce la protonación de algunos grupos proteicos y ha sido informada como la causa de la disminución de la carga neta<sup>78,81</sup> lo que se traduce en una disminución de  $\psi_0$  y disminución del componente repulsivo electrostático de la teoría D.L.V.O. Los pelos de la  $\kappa$ -caseína están cargados negativamente y serían protonados con el descenso de pH lo que produciría cierto colapso con disminución del componente repulsivo. Sería un fenómeno electroestérico.<sup>51</sup> El efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sería similar al aumento de la concentración de protones, es decir se produciría la neutralización de ciertos grupos carboxílicos, fosfoserinas, etc.<sup>78,24</sup> que asociado con el colapso de los pelos darían nuevamente un efecto electroestérico.<sup>51</sup>



## CAPÍTULO IV: RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

## 4.1 RESUMEN

La coagulación de la leche es el proceso básico más importante en la manufactura del queso. Influye en la economía de la fabricación de los mismos por varias causas, por ejemplo, al no conseguirse la coagulación al momento adecuado, el rendimiento de la leche se reduce, la velocidad de procesamiento se reduce, el rendimiento de la leche se reduce, la calidad de los productos se reduce, etc. Aunque la leche es un producto natural, su coagulación es un proceso que ha sido objeto de numerosos estudios y experimentos desde hace muchos años, las bases teóricas de este proceso permanecen, sin embargo, poco claras y son motivo de innumerables estudios.

La leche está constituida por una gran cantidad de componentes: proteínas, minerales, azúcares, etc. De la gran variedad de proteínas, las *micelas de caseína* (MC) son el elemento fundamental sobre el que se basa el proceso de coagulación. Son estructuras aproximadamente esféricas con un diámetro entre 20-300nm. Están formadas por una gran cantidad de proteínas, principalmente caseína, y un núcleo de hidrofóbico. Las MC son muy hidrofóbicas y se agregan fácilmente en presencia de iones calcio. En este sentido, muy hidrofóbica se refiere a la capacidad de estas micelas de agregarse hacia el medio acuoso. En este sentido, las MC son un componente importante, el estudio de su estructura y comportamiento es fundamental para entender el proceso de coagulación de la leche. En este sentido, el estudio de la coagulación de la leche es un tema de gran importancia y los resultados obtenidos en este campo son fundamentales para la industria láctea. En este sentido, el estudio de la coagulación de la leche es un tema de gran importancia y los resultados obtenidos en este campo son fundamentales para la industria láctea.

## CAPÍTULO IV



## CAPÍTULO IV: RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

### 4.1 RESUMEN

La coagulación de la leche es el proceso básico más importante en la manufactura del queso. Influye en la economía de la fabricación de los mismos por varias razones: determina la velocidad de procesamiento de las plantas elaboradoras, el rendimiento y la calidad del queso producido. Aunque la fabricación de quesos es un arte practicado desde hace muchísimos años, las bases fisicoquímicas de este proceso permanecen, aún hoy, poco claras y son motivo de innumerables estudios.

La leche está constituida por una gran cantidad de componentes: proteínas, minerales, grasas, etc. De la fracción proteica, las *micelas de caseína* (MC) constituyen el elemento fundamental sobre el que se basa el proceso de coagulación. Son estructuras aproximadamente esféricas con un diámetro entre 20-300nm. Están formadas por varios tipos de caseína:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Esta última, muy hidrofílica se ubicaría en la superficie de estas estructuras proyectándose hacia el medio acuoso en forma de pelos. Presentan un componente inorgánico importante, el fosfato de calcio coloidal (PCC), responsable de uniones o puentes entre las distintas unidades de proteínas. Son innumerables los estudios realizados para establecer la estructura y los mecanismos responsables de la estabilidad de las micelas.<sup>2,26</sup> La teoría electrostática clásica de estabilidad de coloides liófilos (D.L.V.O.) ha sido descartada como única responsable de este mecanismo ya que son muchas las

situaciones en las cuales esta teoría no puede explicar el comportamiento de las MC. Su estabilidad ha sido relacionada con su carga neta negativa y la presencia de los pelos de la  $\kappa$ -caseína superficial que producen un efecto estérico repulsivo.<sup>2,26</sup>

La coagulación enzimática de la leche comprende una serie de etapas. El agregado de quimosina, contenida en el cuajo, cataliza la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína de las micelas generando micelas de para caseína (MpC), se elimina de esta manera el componente estabilizante y sobreviene la agregación de las MpC y finalmente el proceso de formación y afirmado del gel. Cada una de estas etapas tiene características diferentes e igualmente fundamentales para la obtención de un queso con alto rendimiento y calidad.

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar las propiedades de las micelas de para caseína (MpC) obtenidas por proteólisis enzimática de las MC en suspensión en un intento por aportar y/o reforzar evidencias acerca de las variables y características fisicoquímicas que conducen la etapa de agregación.

Las MpC son inestables, coagulan espontáneamente. Si bien existen numerosos trabajos sobre la cinética de esta coagulación, los orientados a examinar la estabilidad de las MpC y sus causas, son escasas. Para explicar esta estabilidad se podría recurrir a la teoría D.L.V.O. ya que al haberse eliminado los “pelos estabilizantes” podría pensarse en las MpC como un coloide liofóbico. Esta teoría interpreta el fenómeno de la agregación de partículas coloidales a través de la acción de dos tipos de fuerzas: atractivas, del tipo de las interacciones de van der Waals, y repulsivas de naturaleza electrostática.

La mayoría de las técnicas utilizadas para seguir la coagulación enzimática de la leche son globales, es decir evalúan el proceso completo (desde la hidrólisis enzimática hasta el afirmado del gel) y los modelos propuestos son muy complejos. Se han utilizado técnicas de viscosidad, reológicas y de dispersión de la luz.<sup>64</sup> Es muy escasa la literatura sobre estudios realizados en las etapas aisladas de la coagulación enzimática.<sup>41,67</sup> El presente trabajo propone separar la segunda etapa, o de agregación, de la primera de hidrólisis, e interpretarla en sus estadíos iniciales mediante el modelo de von Smoluchowski para la floculación browniana de partículas coloidales a tiempos iniciales, utilizando técnicas turbidimétricas. Basándonos en datos de la literatura se verificó en primer lugar la aplicabilidad de la teoría de Rayleigh, Debye y Gans (RDG) de dispersión de la luz para interpretar las medidas de turbidez de las suspensiones de MC. Esto fue luego confirmado experimentalmente para las distintas condiciones de trabajo mediante la determinación de índices de refracción de las micelas ( $n_1$ ) y del medio ( $n_0$ ). Se desarrolló un método simple que permitiera interpretar las medidas de turbidez a tiempos iniciales de la agregación y obtener información de la velocidad de formación de dobletes, de acuerdo a lo considerado en el modelo de von Smoluchowski. Más allá de este uso, la aplicabilidad de la teoría RDG permite, utilizando un planteo general de la cinética de la agregación, explicar la forma total de la curva de turbidez sin recurrir a consideraciones ajenas al proceso de agregación en sí, lo que fue evidenciado mediante simulaciones por computadora.

Trabajando a concentración de caseína, viscosidad y temperatura variables se

pudo verificar el cumplimiento del modelo de von Smoluchoski y establecer que las micelas de para caseína no se comportan, al igual que las MC, como un coloide liofóbico, es decir la teoría D.L.V.O. resulta insuficiente para explicar su estabilidad. Los resultados obtenidos en la velocidad de coagulación muestran, aún luego de la hidrólisis enzimática, una coagulación lenta que indica la presencia de un factor estabilizante traducido en un valor de  $W$ , coeficiente de estabilidad  $\gg 1$ .

El comportamiento de  $W$  con la temperatura permitió evidenciar que, a temperaturas relativamente bajas, la estabilidad de las  $MpC$  estaría controlada por un componente de estabilización estérica, asociada a las porciones hidrofílicas aún presentes en la superficie de las  $MpC$ . Este componente es mayor a temperaturas menores lo que sugiere que estarían involucradas en él fracciones de caseína  $\beta$  que se proyectan a la superficie al debilitarse las uniones hidrofóbicas que las ligan al resto de las  $MpC$ .

El comportamiento de la coagulación en medios de diferentes viscosidades logradas mediante el agregado de glicerol permitió, por una parte, verificar que el proceso es el de una agregación limitada por difusión (DLA), con una velocidad proporcional a la inversa de la viscosidad. Por otra parte, a concentraciones bajas de glicerol se observaron cambios menores de velocidad, que indicarían interacciones del glicerol con las fracciones proteicas superficiales, reforzando así la evidencia sobre la presencia de un componente estérico de la estabilidad. Para reforzar aún más esta evidencia, se hicieron modificaciones de la superficie de las  $MpC$  de manera de afectar ese componente estérico, analizando cómo respondían estas  $MpC$

modificadas (MpCM) ante las mismas variables que las micelas sin modificar. Para tal fin se obtuvieron micelas modificadas por calentamiento (MCM). La leche se sometió a temperaturas superiores a los 70°C, temperatura de desnaturalización de las proteínas del suero, temperaturas a las cuales las proteínas desnaturalizadas (especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina) forman complejos con la  $\kappa$ -caseína<sup>21,22,24</sup> cambiando la superficie micelar y dándole un aspecto rugoso y con apéndices, observada por m.e.<sup>74</sup>

Los resultados obtenidos con este tipo de micelas mostraron que la agregación de las MpCM era cinéticamente similar a la de las MpC y confirmaron la presencia de un componente estérico ya que la velocidad obtenida en este caso fue mucho menor que la correspondiente a la de las micelas sin modificar. La presencia de apéndices y la rugosidad superficial por la presencia de complejos dificultan el contacto entre las micelas, aumentando así la estabilidad.

Los estudios de agregación en presencia de distintos iones a diferentes concentraciones, al igual que los realizados a pH variable y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  variable, mostraron variaciones de velocidad atribuibles a variaciones de la carga neta, por lo que confirmaron que el componente electrostático es también muy importante y no debe dejar de considerarse. En realidad podría hablarse de una estabilidad electroestérica, ya que las modificaciones de carga produjeron a su vez colapso de los pelos superficiales negativos por protonación (caso del descenso de pH) o neutralización de cargas (en el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ ), y esto llevó a una modificación del componente estérico.

Una observación emergente de los resultados de este trabajo fue la naturaleza dinámica de la estructura tanto de las MpC como de las MpCM. Ante pequeñas variaciones de distintos factores externos como pH, temperatura, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , etc. estas estructuras responden con mucha labilidad produciéndose modificaciones (muchas veces significativas) de las mismas, evolucionando hacia nuevos equilibrios con nuevos valores de sus parámetros característicos.

## **4.2 AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos Gatti, mi director de tesis. No puedo hoy olvidar que aceptó dirigirme cuando en el Departamento Analítica, al que pertenezco, no contábamos con nadie que pudiera guiarnos en un trabajo de investigación. Eso fue muy importante para mí. A partir de allí compartimos muchas situaciones intentando superar los inconvenientes de un sistema muy complejo acompañado de pocos recursos económicos para la investigación, no obstante llegamos hasta aquí y hoy estoy presentando la tesis. De manera que muchas gracias.

Quiero agradecer al C.I.D.C.A. (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de la Plata) y al C.I.T.I.L. (Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea de Buenos Aires) por la bibliografía suministrada a lo largo de estos años.

No quiero olvidar a dos personitas que quiero mucho, mis hijos Darío y Pablo, a ellos más que agradecerle quiero pedirles disculpas por algunos juegos postergados debido a esta tesis. Quiero agradecer especialmente a Darki, por haberme apoyado siempre y por ayudarme tanto en estos últimos tiempos.

Y ahora sí, están ellos, la gente de Analítica, allí tengo compañeros de trabajo y también amigos. Compartí con ellos el sueño de terminar la tesis. No voy a nombrar a nadie, porque no quiero olvidar a nadie. Pero los que estuvieron cerca mío todo este tiempo, seguramente al leer esto sabrán (y espero que así sea) que les estoy diciendo GRACIAS.



### 4.3 BIBLIOGRAFÍA

1. Walstra, P. and Jenness, R. (1984). Dairy Chemistry and Physics. John Wiley & Sons. New York. pag. 2-10, 84-105, 142-162.
2. Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 73, 1965-1979.
3. Morr, C. V. (1967). Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 50, 1744-1759.
4. Shimmin, P. D., and Hill, R. D. (1964). An electron microscope study of the internal structure of casein micelles. *J. Dairy Res.* 54, 509-517.
5. Slattery, C. W. (1976). Review: casein micelle structure; an examination of models. *J. Dairy Sci.* 59, 1547-1558.
6. Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. Developments in dairy chemistry -1. Proteins. P. F. Fox, ed. Appl. Sci. Publ., London, UK. pag. 61-68.
7. Schmidt, D. G., and Payens, T. A. J. (1976). Colloidal aspects of casein. *Surface Colloid Sci.* 9, 165-171.
8. Pessen, H., Kumosinski, T. F. and Farrell H. M. (1989), Small - angle X-ray scattering investigation of the micellar and submicellar forms of bovine casein. *J. Dairy Res.* 56, 443-451.
9. Stothart, P. H. and Cebula D. J. (1982), Small-angle scattering study of bovine casein micelles and submicelles. *J. Mol. Biol.* 160, 391-398.
10. Holt, C., and Dalgleish, D. G. (1986). Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *J. Colloid Interface Sci.* 114, 513-521.
11. Horne, D. S. (1989). Application of fractal concepts to the study of casein aggregation phenomena. *J. Dairy Res.* 56, 535-541.
12. Horne, D. S., and Davidson C. M. (1986). The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid. Pol. Sci.* 264, 727-738.
13. Walstra, P. (1979). The voluminosity of casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46, 317-323.

14. Griffin, M. C. A., and Roberts, G. C. K. (1985). A  $^1\text{H}$ -NMR study of casein micelles. *Biochem. J.* 228, 273-281.
15. Rollema, H. S., Brinkhuis J. A. and Vreeman, H. J. (1988).  $^1\text{H}$ -NMR studies of bovine  $\kappa$ -casein and casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.* 42, 233-239.
16. H. J. M. van Dijk, (1992). The properties of casein micelles. 6. Behaviour above pH 9, and implications for the micelle model. *Neth. Milk Dairy J.* 46, 101-113.
17. Dewan, R. K., Bloomfield, V. A., Chudgar, A. and Morr, C. V. (1972). Viscosity and Voluminosity of Bovine Milk Casein Micelles. *J. of Dairy Sci.* 56, 699-705.
18. Walstra, P. (1979). The voluminosity of barine casein micelles and some of its implications. *Journal of Dairy Research.* 46, 317-323.
19. Dzurec, D. J.; Zall, R. R. (1985). Effect of heating, cooling and storing milk on casein and whey protein. *J. Dairy Sci.*, 68, 273-280.
20. Douglas, F. W., Greenberg, R., Fanell Jr. H. M. and Edmondson L. F. (1981). Effects of Ultra - High - Temperature Pasteurization on milk proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 11- 15.
21. Pappas, C. P. (1992). Interactions between milk proteins: Influence of heat, calcium and lactose. I -Interactions between whole casein and b-lactoglobulin and  $\kappa$ -casein and  $\beta$  - lactoglobulin. *Lebensm. Wiss. u Technol.*, 25, 102-112.
22. Sawyer, W. H. (1963). Complex between  $\beta$  - lactoglobulin and  $\kappa$ -casein. A. Review. *J. Dairy Sci.* 52 (9), 1347-1355.
23. Zitle, C. A. Thompson, M. P., Custer, J. H. and Cerlulis, J. (1962).  $\kappa$ -casein- $\beta$ -lactoglobulin interaction in solution when heated. *J. Dairy Sci.*, 45, 807-816.
24. Lucey, J. A.; Gorry, C.; Fox, P. F. (1993). Rennet coagulation properties of heat milk. *Agric Sci. Finl.*, 2, 361-368.
25. Dalgleish, D. G. (1990). The effect of denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin on renneting. A quantitative study. *Milchwissenschaft*, 45, 491-497.
26. Payens, T. (1979), Casein micelles: the colloid-chemical approach. *J. of Dairy Research* 46, 291-306.
27. Horne, D. S. (1984). Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* 23, 989-997.

28. Horne, D. S. (1986). Sterric stabilization and casein micelle stability. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 250-258.
29. Horne, D. S., and Parker, T. G. (1981). Factors affecting the ethanol stability of the bovine milk. I. Effect of serum phase components. *J. Dairy Res.* 48, 273-279.
30. Horne, D. S. and Parker, T. G. (1981). Factors affecting the ethanol stability off bovine milk. II. The origin of the pH transition. *J. Dairy Res.* 48, 235-242.
31. Overbek, J. Th. G. (1952). *Colloid Science*. Vol.1. Ed. H. Kruyt Elsevier, Amsterdam.
32. Walstra, P. and Jenness R. (1984). *Dairy Chemistry and physics*. John Wiley, New York. pag. 203-225.
33. Darling, D. F. and van Hooydonk, A. C. M. (1981). Derivation of a mathematical model for the mechanism of casein micelle coagulation by rennet. *J. Dairy Res.* 48, 189-196.
34. van Hooydonk, A. C. M., Hagedoom, H. G., and Boerrigter I. J. (1986). The effects of various cations on the renneting of milk. *Neth. Milk Dairy J.* 40, 369-375.
35. van Hooydonk, A. C. M., and Walstra, P. (1987). Interpetation of the renneting reaction in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 19-27.
36. Walstra, P., Blomfield, V. A., Wei, G. J., and Jenness, R. (1981). Effect of chymosin on the hydrdynamic diameter of casein micelles. *Bioch. Biophys. Acta.* 669, 258-264.
37. Roesf, S. P. F. M. (1986). Structure of acid casein gels. ph.D. Diss., Wageningen Agric. Univ. Wageningen, Neth.
38. Zoon, P. T. van Vliet, and Walstra, P. (1988). Rheological properties of rennet-induced skim-milk gels. 2 . The effect of temperature. *Neth. Milk Dairy J.* 42, 271-279.
39. Carlson, A.; Hill, C.; Olson, N. (1987) Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 582-589.
40. Dalgleish, D. G. (1979) Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *J. Dairy Res.*, 46, 653-661.

41. Carlson, A.; Hill, C.; Olson, N. (1987) Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of secondary phase: micelle flocculation. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 590-600.
42. Myers, D. (1991). Surfaces, interfaces and colloids. VCH Publishers, New York. pag. 187-199.
43. Tanford, Ch. (1961). Physical Chemistry of macromolecules. John Wiley and Sons, Inc., NY. pag. 180-221
44. Richards, E. G. (1980). An introduction to the physical properties of large molecules in solution. Cambridge University Press, Cambridge. pag. 36-72.
45. Prigogine, I. and Defay, R. (1967). Chemical Thermodynamics. 4a Ed. Longmans, London. pag. 381-393
46. Flory, P. J. (1953). Principles of polymer chemistry. Cornell University Press. Ithaca. Chs. XII y XIII.
47. Flory, P. J. and Krigbaum, W. R. (1951). Thermodynamics of high polymer solutions. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 2, 383-391.
48. Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1982). Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 21, 6545-6552.
49. Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1985). Theory of protein solubility. *Methods in Enzymology*, 114, 49-77.
50. Hiemenz, P. C. (1977) Principles of colloids and surface chemistry. Ed. Marcel Decker Inc. pag. 352-434.
51. Hunter, R. J. (1995). *Foundations of colloid science*, Clarendon Press, Oxford, pag. 450-493
52. Hiemenz, P. C. (1977) Principles of colloids and surface chemistry. Ed. Marcel Decker Inc. pag. 435-451.
54. van de Hulst, H. C. (1957). *Light Scattering by Small Particles*, Wiley, New York, pag. 729-736.
55. Kuaye, A. Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.*, 49, 207-211.
56. Queiroz Macedo, I., Faro, C. J., Pires, E. M. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine k-casein. *J. Agric. Food Chem.*, 10, 1537-1540.

57. Peterson, G. L. A (1977). Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83, 346-356.
58. Kourti, T.; MacGregor, J. F. (1991). *ACS Symposium Series 412*, ed. Th. Provder, American Chemical Society Washington, DC, pag. 34-63.
59. Kerker, M. (1969). *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*, Academic Press, New York, pag. 417-428.
60. Ambrose Griffin M. C., Griffin W. G. (1985). A Simple Turbimetric Method for the Refractive index of Large Colloidal Particles Applied to Casein Micelles. *J. Colloid Interface Sci*, 104, 409-415.
61. Camerini-Otero, R. D. and Day L. A. (1978). The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules. *Biopolymers*, 17, 2241-2249.
62. Holt, C., Parker, T. G. and Dalgleish, D. G. (1975). Measurement of particle sizes by elastic and quasi-elastic light scattering. *Biochimica et Biophysica Acta* 400, 283-292.
63. Horne, D. S. (1987). Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discuss. of the Chem. Soc.* no. 83, 259-270.
64. Ruettimann K. W. and Ladisch M. R. (1987). Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. Review, *Enzyme Microb.*, pag. 578-589.
65. Green, M. L. and Morant, S. V. (1981). Mechanism of aggregation of casein micelles in rennet-treated milk. *J. of Dairy Res.*, 48, 57-63.
66. McMahon, D. J. and Brown, R. J. (1984). Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review. *J. Dairy Sci.*, 67, 919-926.
67. Dalgleish, D. G. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.*, 50, 331-340.
68. Ottewill R. H. (1977). Stability and Instability in Disperse Systems. *J. Colloid and Interface Sci.*, 58, 357-373.
69. Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water. *Annu. Rev. Biophys. Struct.*, 22, 67-97.

70. Collins, K. D. and Washabaugh, M. W. (1985). The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces. *Quarter Reviews of Biophysics*, 18, 323-364.
71. Law, A. J. R. (1996). Effects of heat treatment and acidification on the dissociation of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 63, 35-48.
72. Leaver, J., Law, A. J. R.; Horne, D. S. (1995). Banks, J. M. Influence of heating regime and pH on the primary phase of renneting of whole milk. *Int. Dairy J.*, 5, 129-140.
73. Calvo, M. M., Law, A. J. R. and Leaver, J. (1995). Heat-induced interactions between serum albumin, immunoglobulin, and  $\kappa$ -casein inhibit the primary phase of renneting. *J. Agric. Food Chem*, 43, 2823-2827.
74. Mohammad, K. S., Fox, P. F. (1987). Heat induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 22, 191-198.
75. Jeurnick, Th. J. M. (1992). Changes in milk on mild heating: turbidity measurements. *Neth. Milk Dairy J.*, 46, 183-196.
76. Penders, M. H. G. M. and Vrij, A. (1990). A turbidity study on colloidal silica particles in concentrated suspensions using the polydisperse adhesive hard sphere model. *J. Chem. Phys.*, 93, 5, 3704 -3711.
77. Na, G. C. (1986). Interaction of calf skin collagen with glycerol: linked function analysis. *Biochemistry*, 25, 967-973.
78. van Hooydonk A. C. M., Hagedoorn H. G. and Boerrigter (1986). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. I. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Neth. Milk Dairy J.*, 40, 281-296.
79. Vreeman, H. J., van Markwijk B. W. and Both, P. (1989). The structure of casein micelles between pH 5.5 and 6.7 as determined by light-scattering, electron microscopy and voluminosity experiments. *J. Dairy Res.*, 56, 463-470.
80. Dalgleish, D. G. and Law, J. R. (1988). pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.*, 55, 529-538.
81. Gastaldi, E.; Lagaude, A. and Tarodo de la Fuente, B. (1996). Micellar Transition State in Casein Between pH 5.5 and 5.0. *J. Food Sci.*, 60, 59-68.

82. Law, A. J. R. (1996). Effects of heat treatment and acidification on the dissociation of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 63, 35-48.
83. Dalgleish, D. G.; Law, J. R. (1989). pH-induced dissociation of bovine casein micelles II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.*, 56, 727-735
84. Holt, C.; Davies, D. T. and Law, A. J. R. (1986). Effects of colloidal calcium phosphate and free calcium ion concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.*, 53, 557-572.
85. de Kruif, C. G. and Roefs, S. P. F. M. (1996). Skim milk acidification at low temperatures: A model for the stability of casein micelles. *Neth. Milk Dairy J.*, 50, 113-120.

*No debo pedir milagros a los sueños...*

*sino hacer de los sueños ...un milagro*  
*D. A.*