



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA**

PROPIEDADES REOLÓGICAS Y MICROESTRUCTURA
DE MEZCLAS ALMIDÓN DE MAÍZ CEROSO
RETICULADO, AISLADO DE PROTEINA DE SUERO Y
kappa-CARRAGENINA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERIA

INGENIERIA QUIMICA-BIOINGENIERIA

P R E S E N T A :

M. en C. MARÍA ALEJANDRA ESPINOSA DZIB

TUTOR:

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos, FQ, UNAM

Secretario: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, CICyTA, UAEH

Vocal: Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya, CINVESTAV, IPN

1^{er}. Suplente: Dr. Javier Solorza Feria, CEPROBI, IPN

2^{do}. Suplente: Dr. Alberto Tecante Coronel, FQ, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 313. Departamento de Alimentos y Biotecnología.

Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

TUTOR DE TESIS:

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

**“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás
un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una
llegada.”**

[Karl Popper]

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis Dr. Alberto Tecante Coronel, por toda su disponibilidad, sus enseñanzas, tolerancia y apoyo para la conclusión de este proyecto, por ayudarme a poner en orden el caos experimental y el de mis propias ideas y por ponerle alas a mis sueños. Infinitas gracias.

A la Ingeniero en Alimentos Mariana Ramírez Gilly por su apoyo durante las mediciones en el reómetro.

A la M. en C. Karina Jiménez Durán, Técnica Académica del Laboratorio de Microscopia Confocal de Barrido Láser de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química-UNAM, por su apoyo durante las observaciones en el microscopio confocal de barrido láser.

A la Q. Araceli Tovar, Responsable del Laboratorio de Absorción Atómica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química-UNAM, por el apoyo brindado en la determinación de iones del aislado de proteínas de suero lácteo.

Al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter (UAM Iztapalapa) por permitirme usar el analizador de tamaño de partículas, Malvern Master SizerS.

A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM y a la DGAPA-UNAM por el apoyo económico a través del proyecto IN 208609 para la asistencia al 5th Pacific Rim Conference on Rheology del 1 al 6 de agosto de 2010 en Sapporo, Japón.

Al Dr. Eduardo Vivaldo Lima y al Dr. Rafael Herrera Nájera, miembros de mi Comité Tutoral, por sus valiosas observaciones y recomendaciones para el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco en forma muy especial a los miembros del jurado:

Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos, FQ, UNAM

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, CICyTA, UAEH

Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya, CINVESTAV, IPN

Dr. Javier Solorza Feria, CEPROBI, IPN

Por sus valiosas sugerencias para la presentación de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio L-313, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. La dirección estuvo a cargo del Dr. Alberto Tecante Coronel.

Agradecemos el apoyo financiero de la DGAPA-UNAM a través del proyecto de investigación IN 208609.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, No. de becario 177364, para la realización de mis estudios de doctorado.

DEDICATORIAS

A Dios y a mamá María, por darme la vida, luz, fortaleza y por darme la oportunidad de conocer gente maravillosa como la del Lab. 313. Gracias por sus porras, su apoyo y sus enseñanzas a Juanita, Emmanuel, Betty, Ixchel, Vero, Nora, Mariana, Susi, Marlene, Olga, Carmen Venegas y Carmen Tafoya.

A mi esposo, César por todo tu amor, tu apoyo, tu paciencia y por estar en las duras y en las maduras siempre junto a mí.

A mis hijos César y Liz por ser la más grande bendición en mi vida y mi motivación para seguir adelante.

A mis hermanas Pili, Azu, Inés; mis hermanos Pepe, José María, Víctor, Eduardo y mis sobrinos Beto, Miguel Ángel, Emilio y Camila por todo su apoyo, sus porras, sus consejos y por compartir conmigo su alegría.

A mi Papá y Mamá por todo su apoyo y todo su amor.

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en un sistema de tres componentes macromoleculares formado por almidón de maíz modificado químicamente (CH10), κ -carragenina (κ C) y proteína aislada de suero lácteo (WPI), para estudiar las propiedades viscoelásticas y la microestructura de sus mezclas con diferentes concentraciones. Se estudió el comportamiento de los componentes individuales y posteriormente de las mezclas con dos componentes, para entender la manera en que interactúan y definen el comportamiento de las mezclas con tres componentes. El principal objetivo de este trabajo fue conocer la manera en que interactúan los componentes a nivel de su microestructura y relacionarla con su comportamiento viscoelástico. Para ello se hicieron pruebas de cizalla oscilatoria, de microscopia confocal de barrido láser, microcalorimetría de barrido diferencial y difracción láser. Las concentraciones fueron 1.0 a 4.0% masa para el CH10, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0% masa para la κ C y 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 3.9% masa para el WPI en una solución con 100 mM de NaCl y pH 7.0. Tanto los componentes individuales como las mezclas recibieron el mismo tratamiento térmico. Los resultados de microscopia confocal mostraron que la adición de κ C en el sistema CH10-WPI provoca que la κ C y los agregados de WPI formen el sistema continuo. Sin embargo, para una concentración de WPI mayor de 2% ya no se observaron agregados sino un medio continuo uniforme con gránulos de CH10 embebidos en la red de WPI y κ C. Los resultados reológicos demostraron que la adición de κ C resultó en geles más fuertes, sin embargo, más allá de 2.0% de WPI el sistema tendió a comportarse como un sistema CH10-WPI. La calorimetría diferencial de barrido demostró que las transiciones para la gelatinización del CH10 y la desnaturalización del WPI se vuelven de tipo “cooperativo”, sin embargo, la fusión de la κ C ocurre a temperaturas menores que la gelatinización del CH10, la temperatura de gelificación de la κ C también ocurre a temperaturas bajas y no se ve afectada por la presencia de CH10 y WPI. Cuando el CH10 estuvo presente, se formaron mezclas de dos fases, ya sea con κ C o con WPI. En mezclas de los tres componentes, se formaron mezclas sin separación de fases cuando las concentraciones de κ C y WPI fueron bajas; 0.25 y menos de 2.0%, respectivamente. Sin embargo, para concentraciones mayores de κ C y WPI, los gránulos hinchados de CH10 estuvieron rodeados por un sistema de dos fases formado por κ C y WPI. El grado de separación de fases dependió, sin embargo, de la proporción de estos últimos dos componentes.

ABSTRACT

This work was conducted in a three-component system of macromolecular components formed by cross-linked waxy corn starch (CH10), κ -carrageenan (κ C) and whey protein isolate (WPI), to study the viscoelastic properties and microstructure of their mixtures with different concentrations. The approach was to study the behavior of individual components and two-component mixtures, to understand how the components interact and understand the behavior of three-component mixtures. The main goal of this thesis was to know the way in which these components interact and to relate the microstructure with observations from rheological tests. For this purpose, oscillatory shear tests, confocal laser scanning microscopy, differential scanning microcalorimetry and laser diffraction techniques were used. The concentrations (wt%) were 1.0 to 4.0% for CH10, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0% for κ C and 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 to 3.9% for WPI in 100 mM NaCl solutions at pH 7.0. The individual components and mixtures underwent the same heat treatment. Confocal microscopy showed that addition of κ C to CH10-WPI mixtures resulted in κ C and WPI aggregates forming the continuous phase. However, for WPI concentrations greater than 2.0%, aggregates were not observed but a uniform continuous medium between the WPI network and κ C with embedded CH10 granules. Rheological data showed that addition of κ C resulted in strong gels, but for WPI concentrations greater than 2.0%, the system behaved like a binary mixture of CH10-WPI. Differential scanning calorimetry showed that CH10 gelatinization and WPI denaturation are “cooperative”, however, melting of κ C occurred at temperatures below starch gelatinization, gelation temperature κ C also took place at low temperatures and this was not affected by the presence of CH10 and WPI. When CH10 was present, two-phase mixtures were formed, either with κ C or with WPI. In three-component mixtures, two-phase mixtures were formed when κ C and WPI concentrations were low; 0.25 and less than 2.0%, respectively. However, for higher concentrations of κ C and WPI, the swollen CH10 granules were embedded in a two-phase system formed by κ C and WPI. The extent of phase separation depended, however, of the proportion of these two latter components.

1.INTRODUCCIÓN

La relación entre el las propiedades mecánicas y las propiedades sensoriales es compleja y varía entre los materiales alimenticios. La percepción de las propiedades físicas en al boca pueden ser visualizadas considerando la compresión de una pieza de huevo cocido entre los dientes. El gel es comprimido al punto de fractura con la continua detección de la relación fuerza-deformación relacionada con la fractura. Después de la fractura, hay diferentes propiedades que pueden ser evaluadas, tales como número de partículas, la cohesividad de las partículas y la sensación del gusto entre el gel y la boca.

Las propiedades mecánicas correspondientes del material iniciarían con la determinación de la región de viscoelasticidad lineal para después pasar a la medida de la región no lineal poniendo fin a la ruptura. Normalmente, la evaluación mecánica generalmente se detiene una vez que el gel es fracturado, mientras que percepción sensorial evalúa el resultado de la fractura inicial y posteriormente se continúa la fractura varias veces hasta que el alimento es ingerido. Hay que tener en cuenta que también es probable que los niveles de estrés y deformaciones asociadas a la región viscoelástica lineal están por debajo del umbral de percepción sensorial (Foegeding, 2004).

La meta de relacionar las propiedades mecánicas con las propiedades sensoriales tiene al menos dos rutas con diferentes enfoques. La primera es la imitación, el objetivo es desarrollar la imitación de la masticación donde las propiedades mecánicas se relacionen con las propiedades sensoriales. Como rara vez las mediciones fuerza-deformación se pueden convertir en tensiones, su propósito es servir como sustituto al análisis sensorial.

El otro enfoque consiste en la determinación de las propiedades mecánicas en la zona de viscoelasticidad lineal, en la región no lineal y en la rotura y posteriormente observar la combinación de estos relacionando estos elementos con el análisis sensorial. Las propiedades mecánicas se pueden entender mejor si se utilizan datos microestructurales y de retención de agua. La ventaja de este último enfoque es que permite la aplicación de las teorías sobre la estructura de gel de las propiedades mecánicas, y por lo tanto el desarrollo de principios científicos que se pueden utilizar para obtener estructuras precisas en los alimentos. Este enfoque se resume en la Figura 1.

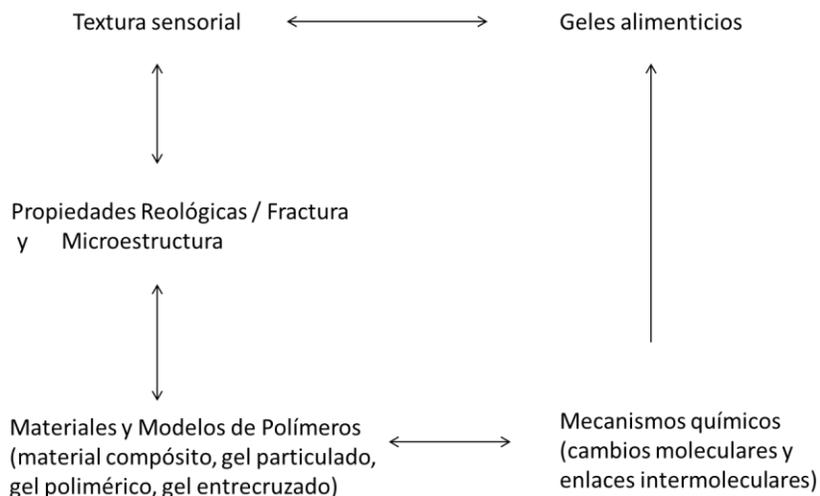


Figura 1. Relaciones entre la textura sensorial, materiales y modelos poliméricos y mecanismos químicos para geles alimenticios. (Foegeding, 2004)

Las proteínas de la leche, debido a su alto valor nutricional y propiedades fisicoquímicas únicas, son componentes clave en muchos alimentos procesados. Existen muchos grados y tipos de productos enriquecidos con proteínas que son manufacturados por las industrias lácteas: caseínas y caseínatos, Concentrado de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés Whey Protein Concentrate) y aislado de proteína de suero (WPI, Whey Protein Isolate), polvos de concentrados de proteína de leche (MPC, Milk Protein Concentrate) y mezclas específicas de proteínas específicamente diseñadas para aplicaciones particulares. Estos ingredientes desempeñan un amplio rango de funciones clave en los alimentos preparados, incluyendo emulsificación, espesamiento, gelificación y espumación. A través de estas funciones, las proteínas también contribuyen a las características sensoriales y la estabilidad de alimentos manufacturados (Pouzot, Benyahia, Durand & Nicolai, 2004).

Problemas no resueltos

Se han realizado diversos estudios en mezclas de almidón con polisacáridos no amiláceos y de proteínas con polisacáridos por medio de reometría, dispersión de luz, microscopía electrónica y microscopía confocal, entre otras. Sin embargo, los polímeros naturales son generalmente muy sensibles a factores ambientales como fuerza iónica, pH y temperatura. Por ello, es difícil generalizar las conclusiones a partir de resultados con diferentes macromoléculas y no existe un estudio similar para mezclas de tres componentes como el que se realizó en la presente investigación. Existen estudios fundamentales que se

ocupan de estudiar la manera en que gelifican o gelatinizan los componentes. No obstante, hay ciertas cuestiones que permanecen sin respuesta, como por ejemplo:

- ¿Cuáles son los factores más importantes para la gelificación de polímeros naturales?
- ¿Cómo interaccionan las proteínas con los polisacáridos?
- ¿Qué condiciones son necesarias para la gelificación?
- ¿Cómo afectan estas condiciones la estructura del gel?
- ¿Cuál es el mecanismo de gelificación?
- ¿Cuál es el papel de una proteína, un polielectrolito y una macromolécula neutra en un gel?

Responder estas preguntas ayudará a entender el comportamiento básico de los polímeros naturales en un sistema más complejo. Cabe mencionar que el comportamiento reológico de los polielectrolitos es muy diferente de aquel de macromoléculas neutras, debido al efecto de la densidad de carga a lo largo de la cadena que define la estructura primaria del macroión. El efecto de la densidad de carga es significativamente sensible a las condiciones ambientales, por lo que el polielectrolito muestra cambios reológicos notables cuando estos factores cambian (Tobitani, 1995). Una de las cuestiones que se discute en este documento es el efecto que se provoca en el módulo de almacenamiento y de pérdida (G' y G''), por el hecho de variar la concentración de cada componente y saber cuál de las tres macromoléculas es la que determina las características viscoelásticas de la mezcla. Para una mejor comprensión del papel que juega la organización de la microestructura, la observación por microscopía confocal es una herramienta sumamente útil en la interpretación de los resultados.

Dado que no existe información sobre mezclas de tres componentes macromoleculares y hay muchas preguntas que responder al respecto, el presente proyecto tiene como objetivo principal explicar de manera clara la forma en que interactúan estos polímeros naturales. Sobre la base de la fisicoquímica de estas macromoléculas se explica el comportamiento de sus mezclas considerando el estudio de los componentes individuales y de las mezclas de dos y de tres componentes. De esta forma, la estrategia adoptada se basó en el estudio del comportamiento viscoelástico de los componentes individuales, las mezclas de dos y de tres componentes, el análisis de la microestructura y de las transiciones térmicas de los

componentes individuales y de las mezclas de dos y de tres componentes. Además, se aplicó la herramienta estadística de metodología de superficie de respuesta para analizar el efecto de las interacciones entre los componentes sobre el módulo de almacenamiento, el módulo de pérdida no se consideró para este estudio debido a que se tiene el mismo comportamiento que G' . Se espera que la aproximación sistemática, como la que se siguió en el presente proyecto, ayude a entender el comportamiento de estos sistemas complejos.

La funcionalidad de productos de proteínas de leche pueden ser considerados el resultado de las estructuras moleculares de las proteínas y sus interacciones con otros componentes alimenticios, tales como grasas, azúcares, polisacáridos, sales, compuestos aromáticos y saborizantes. Estas interacciones pueden tomar lugar en dos niveles. Primeramente, los procesos alteran las estructuras nativas de las proteínas de la leche, las cuales pueden ejercer efectos positivos o negativos sobre la funcionalidad. En segundo punto, los ingredientes tienden a interactuar con otros componentes alimenticios durante la manufactura de alimentos preparados. Los tipos y fuerzas de las interacciones determinan la estructura, textura, reología, propiedades sensoriales y vida de anaquel de productos alimenticios manufacturados. No existe suficiente información sobre la interacción entre diferentes componentes como resultado del procesamiento. Controlando estas interacciones y comprendiéndolas se podrán desarrollar productos novedosos y mejorados en lugar de los convencionales (Pouzot, Benyahia, Durand & Nicolai, 2004).

En esta investigación se seleccionaron los siguientes materiales: aislado de proteínas de suero lácteo, almidón de maíz ceroso modificado químicamente y κ -carragenina, para usarlos como un sistema modelo debido a sus importantes aplicaciones industriales. Se aplicó un tratamiento térmico para después analizar sus propiedades viscoelásticas por métodos reológicos y su microestructura por métodos ópticos.

La presente tesis está presentada en diez capítulos.

Capítulo 1. Introducción. Se explica la relación entre la reología y la textura de los alimentos así como las interrogantes que dan lugar a este trabajo.

Capítulo 2. Almidones modificados. En esta parte se describe la estructura del almidón, la transformación química para la obtención de almidones modificados, sus propiedades

físicoquímicas y una revisión de la bibliografía donde se estudia el comportamiento viscoelástico del almidón y su interacción con otros hidrocoloides.

Capítulo 3. Proteína Aislada de Suero lácteo. Se describe la proteína aislada de suero lácteo, su estructura, el proceso de obtención, así como la gelificación de la proteína. Se incluye la revisión bibliográfica de las propiedades de la proteína aislada de suero y su interacción con otros polisacáridos.

Capítulo 4. κ -carragenina. Se describe su estructura, el proceso de obtención, y la revisión bibliográfica de las propiedades viscoelásticas tanto con otros polisacáridos así como su comportamiento con diferentes cationes.

Capítulo 5. Hipótesis. Planteamiento de la hipótesis.

Capítulo 6. Objetivos. Se enuncia el objetivo general y los objetivos particulares

Capítulo 7. Estrategia Experimental. En este capítulo se describe la estrategia experimental seguida así como los materiales y métodos empleados en la presente investigación.

Capítulo 8. Resultados y discusión. Se muestran los resultados obtenidos, así como la discusión de los resultados en base a los discutidos bibliográficamente.

Capítulo 9. Análisis Estadístico de los resultados. Se aplica el método de superficies de respuesta para analizar la respuesta de cada componente en la mezcla.

Capítulo 10. Conclusiones Generales. Se presentan de manera concreta y resumida las conclusiones más importantes de este trabajo

La tesis finaliza con recomendaciones para trabajos futuros. Se incluyen además anexos en los cuales se enlistan los exponentes obtenidos al aplicar la ley de la potencia en las mezclas, la relación potasio/sodio en las mezclas y una introducción al tratamiento estadístico aplicado y los resultados obtenidos. Al final de cada capítulo se incluye la lista de referencias correspondiente. Se ha preferido hacerlo así, en lugar de incluir una sola lista al final del documento para facilitar su lectura.

Referencias Bibliográficas

Foegeding, A. (2004) Rheology, Structure and Texture Perception en Food Protein Gels en Food Colloids. Interaction, Microstructure and Processing. Editado por Eric Dickinson. R.S.C advancing the chemical sciences. pp. 3-15

Pouzot, M., Benyahia, L., Durand, D. & Nicolai, T. (2004). Linear and Non-Linear Rheological Properties of β -Lactoglobulin Gels in Relation to their Microstructure en Food Protein Gels en Food Colloids. Interaction, Microstructure and Processing. Editado por Eric Dickinson. R.S.C advancing the chemical sciences. pp. 37- 47

Tobitani, A., Yamamoto, H., Shioya, T. & Ross-Murphy S. B. (1995). Rheological and structural studies on heat-induced gelation of concentrated skim milk. *Journal of Dairy Research* 62, 257-267.

1.INTRODUCCIÓN	10
2. ALMIDONES MODIFICADOS.....	27
2.1 Componentes del almidón	27
2.1.1 Amilosa.....	27
2.1.2 Amilopectina.....	27
2.2 Gelatinización del almidón.....	29
2.3 Microcalorimetria de barrido diferencial.....	31
2.4 Hinchamiento y solubilidad.....	33
2.5 Almidón de maíz ceroso nativo	35
2.6 Almidones entrecruzados.....	36
2.7 Aplicaciones en alimentos de almidones entrecruzados.....	39
2.8 Almidones estabilizados	40
2.9 Comportamiento reológico del almidón de maíz entrecruzado químicamente con otros polisacáridos y con proteínas	41
2.10 Discusión	44
2.10 Referencias Bibliográficas	47
3. PROTEÍNA AISLADA DE SUERO LÁCTEO	51
3.1 Proteínas de la leche	51
3.2 Propiedades funcionales de las proteínas lácteas.....	53
3.3 β-lactoglobulina	54
3.3.1 Propiedades funcionales de la β -lg.....	57
3.4 α-lactalbúmina.....	57
3.5 Seroalbúmina.....	58
3.6 Propiedades en solución de proteínas nativas globulares.....	59
3.7 Estados desnaturalizados de la proteína	60
3.7.1 Termodinámica de las proteínas desplegadas.....	60
3.7.2 El estado de glóbulo fundido	60
3.8 Interacciones entre polímeros naturales	62
3.9 Interacciones proteína-polisacárido.....	63
3.11 Caracterización del fenómeno de gelificación	72
3.12 Comportamiento reológico del WPI con otros polisacáridos.....	72
3.13 Discusión	75
3.14 Referencias Bibliográficas.....	77

4. CARRAGENINAS.....	82
4.1 Generalidades de las carrageninas	82
4.2 Estructura química de las carrageninas.....	82
4.3 Propiedades de las carrageninas.....	85
4.4 Conformación ordenada de la carragenina: Conformación en hélice en el estado sólido	86
4.5 Propiedades en solución de carrageninas desordenadas	87
4.6 Transición sol-gel.....	89
4.7 Mecanismo de gelificación.....	90
4.8 Comportamiento reológico de geles de κ -carragenina	92
4.9 Interacción con proteínas.....	94
4.10 Discusión	99
4.11 Referencias Bibliográficas.....	101
5. HIPÓTESIS.....	104
6. OBJETIVOS	105
6.1 Principal	105
6.2 Particulares	105
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	106
7.1 Diagrama general	106
7.2 Materiales	107
7.3 Métodos	108
7.3.1 Preparación de las pastas y geles de κ -carragenina-CH10-WPI.....	108
7.4 Mediciones.....	109
7.4.1 Hinchamiento, solubilidad y fracción volumen.....	109
7.4.2 Distribución de tamaños de partícula.....	110
7.4.3 Microcalorimetría de barrido diferencial (μ DSC).....	111
7.5 Microscopia	111
7.5.1 Microscopia de luz transmitida y polarizada.....	111
7.5.2 Microscopia confocal de barrido láser.....	111
7.6 Cizalla oscilatoria de baja amplitud	112
7.7 Observación de la separación de fases.....	113
7.8 Análisis estadístico.....	113
7.9 Referencias Bibliográficas.....	114

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
8.1 Componentes individuales.....	115
8.1.1 Hinchamiento y solubilidad del almidón	115
8.1.2 Tamaño y distribución de tamaños de los gránulos de almidón.....	115
8.1.3 Fracción volumen	117
8.1.4 Microcalorimetría de barrido diferencial	118
8.1.5 Efecto del ion sodio sobre la temperatura de gelatinización del almidón	119
8.1.6 Comportamiento viscoelástico	121
8.1.7.2 Microscopia confocal de barrido láser	124
8.2 Propiedades de la κ -carragenina.....	126
8.2.2 Comportamiento viscoelástico	128
8.2.3 Microestructura	130
8.2.4 Discusión.....	131
8.3 Aislado de proteína de suero lácteo	131
8.3.1 Microcalorimetría de barrido diferencial	131
8.3.2 Comportamiento viscoelástico	133
8.3.3 Microestructura	134
8.3.4 Discusión.....	135
8.5 CH10-WPI	135
8.5.1 Microcalorimetría de barrido diferencial	135
8.5.2 Comportamiento viscoelástico	137
8.5.3 Microestructura	141
8.5.4 Discusión.....	142
8.6 Aislado de proteína de suero lácteo (WPI)- κ -carragenina	145
8.6.1 Microcalorimetría de barrido diferencial	145
8.6.3 Microscopia confocal de barrido láser	151
8.6.4 Discusión.....	152
8.7 Almidón ceroso químicamente modificado (CH10)- κ -carragenina	154
8.7.1 Microcalorimetría de barrido diferencial	154
8.7.2 Propiedades viscoelásticas	155
8.7.3 Microscopia confocal de barrido láser	159
8.7.4 Discusión.....	160
8.8 Mezclas de tres componentes	161

8.8.1 Microcalorimetría de barrido diferencial	161
8.8.3 Microscopia confocal de barrido láser	169
8.8.4 Discusión.....	175
9.3 Referencias bibliográficas.....	176
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	179
9.1 Modelo de superficies de respuesta	179
9.2 Análisis de la superficie de respuesta	181
Referencias Bibliográficas.....	183
10. CONCLUSIONES GENERALES	184
11. ANEXOS	187
Cuadro A. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas CH10 y WPI	187
Cuadro B. Intervalo de frecuencias (rad/s) usado para determinar a y b mostrados en el Cuadro A.....	188
Cuadro C. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas WPI y κ C. El intervalo de frecuencias fue 0.1 a 100 rad/s.	189
Cuadro D. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas CH10 y κ C. El intervalo de frecuencias fue 0.1 a 100 rad/s.	190
Cuadro E. Relación de iones $[K^+]/[Na^+]$ para cada una de las mezclas κ C-WPI.	191
INTRODUCCIÓN A LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA....	192
Cuadro F. Valores estadísticos decodificados para el análisis de respuesta por métodos de superficie.	200

Indice de Figuras

Figura 1. Relaciones entre la textura sensorial, materiales y modelos poliméricos y mecanismos químicos para geles alimenticios. (Foegeding, 2004)	11
Figura 2. Representación esquemática de la cadena de amilosa (Tester et al., 2004); n tiene un valor promedio de 1000.	27
Figura 3. Representación esquemática de la cadena de amilopectina (Tester et al., 2004). Para cadenas exteriores, a = 12 a 23, para cadenas interiores, b = 20 a 30.	28
Figura 4. Representación esquemática de la amilopectina, indicando el patrón de ramificaciones de las unidades de cadenas α -1 \rightarrow 4 (A, B1-B3) unidas por enlaces α -1 \rightarrow 6 (puntos de ramificación) (Hizukuri, 1986).	29
Figura 5. Representación del hilio de los gránulos de almidón (Donald et al., 1997).....	30

Figura 6. Termograma en microDSC de gelatinización de una suspensión con 4% de almidón de maíz ceroso reticulado químicamente. Tasa de calentamiento 1.2 °C/min.	32
Figura 7. Esquema de la estructura de un gránulo de almidón entrecruzado (Thomas & Atwell, 1999). Cada “x” representa un enlace covalente de entrecruzamiento.	37
Figura 8. Reacción química para entrecruzamiento de almidón por una mezcla de anhídridos adípico y acético. St = almidón (Thomas & Atwell,1999).	38
Figura 9. Reacción química para el entrecruzamiento de almidón con oxicloriguro de fósforo en medio alcalino (Singh et al., 2007). St = almidón.	38
Figura 10. Reacción química para entrecruzamiento de almidón con trimetafosfato de sodio. St = almidón (Singh et al., 2007).	38
Figura 11. (A) Gránulos de almidón rodeados por hebras de κ -carragenina; (B) Gránulos de almidón rodeados por hélices de κ -carragenina por la adición de KCl.	43
Figura 12. Gránulos de almidón rodeados de agregados de proteína de suero aislado después del tratamiento térmico.	43
Figura 13. Esquema de los factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (de Wit, 1998).	53
Figura 14. Estructura primaria de la β -lg bovina A. Se indica la ubicación de las sustituciones de distintas variantes genéticas (Kilara & Vaghela, 2004).	55
Figura 15. Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina bovina. Las flechas indican las zonas planas β , nominada con letra. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro (S-S) y del grupo tiol libre (S-H) (Phillips et al., 1994).	56
Figura 16. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos al mezclar soluciones de una proteína y un polisacárido (de Kruif & Tuinier, 2001; McClements, 2006).	63
Figura 17. Representación esquemática de un diagrama de fase típico de una solución acuosa de proteína y polisacárido, mostrando la posición de la curva binodal. Se incluye el comportamiento descrito en la Figura 16 de los sistemas por debajo y por encima de la curva binodal.	68
Figura 18. Esquema del proceso de gelificación, involucrando la desnaturalización y la agregación proteínicas.	69
Figura 19. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos (B) geles agregados o particulados (Piloso 2000).	71

Figura 20. Estructura química de las carrageninas de importancia comercial (Solís-Bravo, 2007).	84
Figura 21. Estructura cristalina de la κ -carragenina. Una cadena se presenta clara y la otra obscura para diferenciarlas entre sí (Chandrasekaran, 1998).	87
Figura 22. Diagrama de transición sol-gel de κ -carragenina en presencia de Na^+ (Rochas, 1982). El significado de C_{crit} , I, II y III, se explica en el texto, La línea punteada representa la división entre la zona II y III.	91
Figura 23. Modelo de gelificación de la κ -carragenina en presencia de Na^+ (adaptado de Rochas, 1982).	92
Figura 24. Influencia de la naturaleza y concentración de diferentes cationes sobre el módulo G' para κ -carragenina (21.6 g/L) (Kavanaugh & Ross-Murphy, 1998).	93
Figura 25. Dependencia de la temperatura del módulo de almacenamiento (círculos negros) y el módulo de pérdida (círculos blancos) (Kavanaugh & Ross-Murphy, 1998).	94
Figura 26. Observación visual de dos muestras después del tratamiento térmico (80 °C por 30 minutos) y centrifugación. (a) 5% WPI con 0.2% κ -carragenina; (b) 5% WPI con 0.4% κ -carragenina, ejemplo de separación de fases.	98
Figura 27. Agregados de proteína rodeados por hebras de κ -carragenina en ausencia de sal.	99
Figura 28. Metodología Experimental de la investigación.....	106
Figura 29. Esquema de la preparación de geles.	108
Figura 30. Distribución de tamaños de los gránulos de almidón cocido a 90 °C para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (línea continua), 2.0 (línea discontinua), 3.0 (línea discontinua con puntos) y 4.0 (línea de segmentos largos).	116
Figura 31. Fracción volumen de pastas de almidón cocido a 90 °C para diferentes concentraciones de almidón.	118
Figura 32. Termograma de gelatinización de 1.0% de CH10. La temperatura de gelatinización (T_{gelat}) es de 64.7 °C.	119
Figura 33. Efecto de la adición de ion sodio sobre la gelatinización de CH10. a) 1.0% de almidón, b) 1.0% en una solución 100 mM de NaCl.	120
Figura 34. Variación con la frecuencia del módulo de almacenamiento (símbolos negros) y el módulo de pérdida (símbolos blancos) para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (círculos), 2.0 (triángulos), 3.0 (cuadrados) y 4.0 (diamantes). La deformación aplicada	

para 1.0 y 2.0% de CH10 fue de 50%, mientras que para 3.0 y 4.0% de CH10 fue del 1.0%	121
Figura 35. Tangente de delta en función de la frecuencia para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulo negro invertido) y 4.0 (triángulo blanco).	122
Figura 36. Almidón nativo observado con luz transmitida, objetivo 40x (a), almidón nativo observado con luz polarizada, objetivo 40x (b) y almidón cocido teñido con lugol observado con luz transmitida, objetivo 40x (c). En todos los casos la barra de escala es de 20 μm	124
Figura 37. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de gránulos de 1.0% de CH10 cocido marcado con FITC. $\lambda = 565 \text{ nm}$, objetivo 60x. La barra de escala es de 20 μm	125
Figura 38. Termograma de 1.0% de κ -carragenina en presencia de 100 mM de NaCl (1.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$).	126
Figura 39. Módulo de almacenamiento (símbolos en negro) y módulo de pérdida (símbolos vacíos) para diferentes concentraciones de κ -carragenina a) 0.25% κ -carragenina, círculos; b) 0.5% κ -carragenina, triángulos; c) 0.75% κ -carragenina, cuadrados; d) 1.0% κ -carragenina, diamantes. La deformación aplicada para 0.25% fue del 50% mientras que para 0.5, 0.75 y 1.0% de κ -carragenina fue del 1.0%	129
Figura 40. Tangente de delta de diferentes concentraciones de κ -carragenina (0.25% círculos negros, 0.5% círculos blancos, 0.75% triángulos blancos, 1% triángulos negros invertidos).	130
Figura 41. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de 0.75% de κ -carragenina marcada con RITC. $\lambda = 580 \text{ nm}$. La barra de escala es de 2 μm	131
Figura 42. Termograma para 3.0% de WPI. Tasa de calentamiento 1.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	133
Figura 43. Espectro mecánico para diferentes concentraciones (%) de WPI. a) 0.5 (círculos), 1.0 (triángulos), 2.0 (cuadrados) y 3.0 (diamantes). b) 3.5 (círculos), 3.9 (triángulos). G' (símbolos negros) y G'' (símbolos blancos). La deformación aplicada fue del 50% para 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0% de WPI, para 3.5% de WPI fue del 5.0% y para el 3.9% de WPI fue del 1.0%	134
Figura 44. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de 2.0% de WPI marcada con ANSA. $\lambda = 450 \text{ nm}$	135
Figura 45. Termograma de mezclas con 1.0% de CH10 con 2.0 (a) y 3.5% (b) de WPI. (1.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$).	136

Figura 46. Variación del módulo de almacenamiento con la frecuencia de mezclas con 1.0 (a), 2.0 (b), 3.0 (c) y 4.0% (d) de CH10 y diferentes concentraciones (%) de WPI: 0.5 (círculos negros), 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos) 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos). La deformación para 1.0% CH10 y todas las concentraciones de proteína fue de 10% mientras que para 2.0, 3.0 y 4.0% CH10 fue de 1%.	139
Figura 47. Dependencia de la $\tan \delta$ con la frecuencia de mezclas con concentraciones (%) de CH10 de 1.0 (a), 2.0 (b), 3.0 (c) y 4.0 con diferentes concentraciones (%) de WPI: 0.5 (círculos negros), 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos), 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros), 3.9 (cuadrados blancos)	140
Figura 48. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de la mezcla 2.0% CH10 con 1.0% WPI marcado con ANSA, $\lambda = 450$ nm.	142
Figura 49. Variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de WPI para diferentes concentraciones (%) de CH10: 0.0 (círculos), 1.0 (cuadrados), 2.0 (triángulos), 3.0 (triángulos invertidos) y 4.0 (rombos).	145
Figura 50. Termogramas de las mezclas WPI- κ -carragenina: 2.0% WPI + 0.75% κ -carragenina (línea punteada), 3.5% WPI + 0.75 κ -carragenina (línea continua). (1.2 °C/min)	146
Figura 51. Módulo de almacenamiento de diferentes mezclas WPI- κ C con diferentes concentraciones (%) de κ C, a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75 y d) 1.0 y de WPI, 0.5 (círculos negros) 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos) 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos). La deformación aplicada fue del 1.0% para todas las combinaciones, excepto para 0.5% WPI con 0.25% κ C con las que fue del 10.0%	149
Figura 52. Variación de $\tan \delta$ con la frecuencia para diferentes mezclas WPI- κ C con diferentes concentraciones (%) de κ C, a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75 y d) 1.0 y de WPI, 0.5 (círculos negros) 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos) 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos).	150
Figura 53. Variación de G' (Pa) durante el calentamiento (la línea continua muestra el perfil de temperatura) para (a) 3.9% WPI; (b) 3.9% WPI + 0.25% κ C; (c) 3.9% WPI + 0.50 % κ C; (d) 3.9% WPI + 0.75% κ C; (e) 3.9% WPI + 1.0% κ C.	151
Figura 54. Imágenes en confocal de WPI (azul) y κ C (rojo). La imagen colocalizada de la mezcla 2.0% WPI + 0.75% κ C se observa en rosa.	153
Figura 55. Variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de WPI para diferentes concentraciones (%) de κ C: 0.0 (círculos), 0.25 (cuadrados), 0.50 (triángulos), 0.75 (triángulos invertidos) y 1.0% (diamantes).	154

Figura 56. Termograma correspondiente a 1.0% CH10 + 0.75% κ C. La línea continua indica el calentamiento y la línea punteada indica el enfriamiento. (1.2 °C/min).....	155
Figura 57. Espectro mecánico de mezclas κ C-CH10 con diferentes concentraciones (%) de κ C; a) 0.25, b) 0.50, c) 0.75, d) 1.0 y almidón; 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulos negros invertidos) y 4.0 (triángulos blancos invertidos). La deformación aplicada en las mezclas 0.25% κ C- CH10 fue de 10.0% para 1.0% CH10 y para 2.0, 3.0 y 4.0% de CH10 de 1.0%. Para las mezclas 0.5% κ C-CH10, 10% de deformación. Para 0.75% κ C-CH10, 1.0% de deformación y para 1.0% κ C-CH10 se aplicó 0.3% de deformación.....	157
Figura 58. Variación de $\tan \delta$ con la frecuencia para diferentes concentraciones (%) de κ C; a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75, d) 1.0 y almidón; 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulos negros invertidos) y 4.0 (triángulos blancos invertidos).	158
Figura 59. Imágenes de confocal de CH10 (verde), κ C (rojo) y de la imagen colocalizada correspondiente a la mezcla 1.0% CH10 + 0.75% κ C (verde-amarillo).	159
Figura 60. Variación de G' a 6.28 rad/s contra la concentración de CH10 para diferentes concentraciones (%) de κ C: 0.0 (círculos), 0.25 (cuadrados), 0.50 (triángulos), 0.75 (triángulos invertidos) y 1.0% (rombos).....	161
Figura 61. Termograma para 2.0%WPI + 0.75% κ -carragenina + 1.0% CH10 (línea punteada) y 3.5% WPI + 0.75% κ -carragenina + 1.0% CH10 (línea continua). (1.2 °C/min)	162
Figura 62. Variación de los módulo dinámicos con la frecuencia para: (a) 1.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ -carragenina y (b) 1.0% CH10 + 3.5% WPI + 0.75% κ -carragenina. G' (símbolos negros), G'' (símbolos blancos). La deformación aplicada fue de 1.0%.	164
Figura 63. Variación de G' a 6.28 rad/s versus diferentes concentraciones de κ C para diferentes concentraciones de WPI y 1% CH10 (a), 2% CH10 (b) y 4% CH10 (c). 0.5% WPI (círculos), 2.0% WPI (triángulos), 3.5% (triángulos invertidos) and 3.9% (estrellas).	165
Figura 64. Variación de G' (Pa) durante el calentamiento (la línea continua muestra el perfil de temperatura) para: a) 1.0% WPI + 0.25% κ C; (b) 4.0% CH10 + 1.0% WPI + 0.25% κ C; (c) 4.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ C; (d) 4.0% CH10 + 3% WPI + 0.75% κ C; (e) 4.0% CH10 + 3.9% WPI + 1.0% κ C	168
Figura 65. Mezclas después del tratamiento térmico y centrifugación: (a) 1.0% WPI + 0.25% κ C; (b) 4.0% CH10 + 1.0% WPI + 0.25% κ C; (c) 4.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ C; (d) 4.0% CH10 + 3% WPI + 0.75% κ C; (e) 4.0% CH10 + 3.9% WPI + 1.0% κ C.....	169

Figura 66. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.25% κ -carragenina + 2.0% WPI. Objetivo 60x.....	171
Figura 67. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 2.0% WPI. Objetivo 60x.....	172
Figura 68. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 3.5% WPI. Objetivo 60x.....	173
Figura 69. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 1% κ -carragenina + 3.5% WPI. Objetivo 60x.....	174
Figura 70. a) Efecto de la concentración de CH10 y WPI para 0.0% κ -carragenina en el módulo de almacenamiento (G'). b) Efecto de la concentración WPI y κ -carragenina a 0.0% CH10 en G' . c) Efecto de la concentración de CH10 y κ -carragenina en G'	182

Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros de gelatinización de almidones de diversas fuentes botánicas obtenidos por DSC.	33
Tabla 2. Composición proteínica de la leche de vaca (Grasselli et al., 1997).....	52
Tabla 3. Funcionalidad y aplicación de las proteínas del suero en alimentos.	54
Tabla 4. Tipos de fuerzas intermoleculares que contribuyen a las interacciones entre polímeros naturales (Dickinson, 1998; McClements, 2006).	62
Tabla 5. Contenido de componentes químicos y peso molecular (Solís-Bravo, 2007).	83
Tabla 6. Contenido de iones del aislado de proteína de suero lácteo.....	107
Tabla 7. Contenido de iones de la κ -carragenina.	107
Tabla 8. Solubilidad e hinchamiento del CH10 cocido a 90 °C.....	115
Tabla 9. Diámetro mediano $D[v,0.5]$ y poder de hinchamiento de CH10 cocido a 90 °C.....	116
Tabla 10. Temperaturas de transición y entalpía (J/g muestra) de las mezclas CH10.....	120
Tabla 11. Temperatura de fusión, gelatinización y entalpía (J/g muestra) para 1.0% de κ -carragenina (100 mM NaCl).....	128
Tabla 12. Temperaturas de transición y entalpía (J/ g muestra) de las mezclas WPI (100 mM NaCl).....	132
Tabla 13. Temperaturas de transición y entalpía (J/g muestra) de las mezclas CH10-WPI.	136

Tabla 14. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para la mezclas 2.0% WPI + 0.75% κ C y 3.5% WPI + 0.75% κ C.....	147
Tabla 15. Observación visual de la separación de fases	151
Tabla 16. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para la mezcla 1.0% CH10 + 0.75% κ C.....	155
Tabla 17. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para 2.0% WPI + 0.75% κ -carragenina + 1.0% CH10 y 3.5% WPI + 0.75% κ -carragenina + 1.0% CH10.....	162
Tabla 18. Significancia estadística de los coeficientes del modelo de respuesta.....	181

NOMENCLATURA

c	Concentración	% masa
c _{ad}	Concentración de azul dextrana	% m/v
C _{polímero}	Concentración iónica debido al polímero	eq/L
C _s	Concentración de almidón en la fase continua	%
C _{sal}	Concentración iónica debida a la sal (sal inherente al biopolímero + sal añadida)	eq/L
C _T	Concentración iónica total	eq/L
D[v,0.5]	Diámetro mediano del almidón	μ m
D ₀	Diámetro mediano del almidón nativo sin cocer	μ m
D _i	Diámetro de las partículas de almidón	μ m
D _{max}	Diámetro máximo de las partículas de almidón	μ m
G'	Módulo de almacenamiento	Pa
G''	Módulo de pérdida	Pa
H	Hinchamiento	%
H	Entalpía de gelatinización	J/g
H _m	Entalpía de fusión	J/g

H_g	Entalpía de gelificación	J/g
m_{ad}	Peso de la solución de azul dextrana 0.1%	g
m_b	Peso de agua absorbida por los gránulos de almidón	g
m_d	Peso de los gránulos secos	g
m_t	Peso total de agua (agua en la dispersión del almidón + agua en la solución de azul dextrana)	g
PH	Poder de hinchamiento calculado como $(D/D_0)^3$	
PH_{AD}	Poder de hinchamiento determinado por el método de azul dextrana.	
S	Solubilidad	%
$\tan \delta$	Tangente del ángulo de pérdida o desfaseamiento	
T_{fus}	Temperatura de fusión	(°C)
T_{gelat}	Temperatura de gelatinización	(°C)
T_{gelif}	Temperatura de gelificación	(°C)
T_{ini}	Temperatura inicial (T_{onset})	(°C)
T_{max}	Temperatura máxima (T_{peak})	(°C)
Letras griegas		
Δ	Diferencia de entalpías	
ϕ	Fracción volumen $\phi = (1-S/100)cH$	
γ	Coficiente de actividad promedio (0.55 para potasio, 0.72 para sodio)	
ω	Frecuencia	rad/s

2. ALMIDONES MODIFICADOS

2.1 Componentes del almidón

2.1.1 Amilosa

La amilosa (Figura 2) es una cadena relativamente larga, lineal de α -glucano que contiene alrededor de 99% de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y diferentes tamaños y estructuras dependiendo del origen botánico. En general, tiene un peso molecular promedio de 1×10^5 a 1×10^6 Daltones (Buleon et al., 1998a; Biliaderis, 1986), con un grado de polimerización por número (DP_n) de 324 a 4920 y con alrededor de 9 a 20 puntos de ramificación equivalente de 3 a 11 cadenas por molécula. Cada cadena contiene aproximadamente 200 a 700 residuos de glucosa, equivalentes a un peso molecular de 32400 a 113400. En soluciones acuosas, la amilosa adopta una conformación de hebra flexible aunque con cierta rigidez, con un radio hidrodinámico característico de 7 a 22 nm (Buleon et al., 1998b).

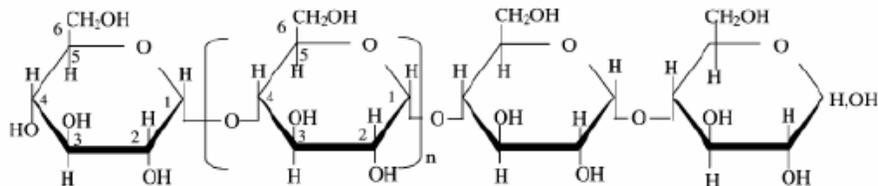


Figura 2. Representación esquemática de la cadena de amilosa (Tester et al., 2004); n tiene un valor promedio de 1000.

2.1.2 Amilopectina

La amilopectina se diferencia de la amilosa porque contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol. El peso molecular de la amilopectina es mucho mayor que el de la amilosa y va de 1×10^7 a 1×10^9 y una estructura pesada, construida con alrededor de 95% de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y el restante 5% de enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figura 3). Las ramificaciones se encuentran unidas al tronco central por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$,

localizados cada 12 a 23 unidades lineales de glucosa (Tester et al., 2004) en intervalos regulares de 9 nm a lo largo de la molécula. El grado de polimerización fluctúa entre 9600 a 15900, pero abarca tres intervalos de grado de polimerización: 13400 a 26500, 4400 a 8400 y 700 a 2100 (Takeda et al., 2003). Al igual que la amilosa, el peso, el tamaño molecular y la estructura de la molécula varían con el origen de la especie botánica. Una diferencia fundamental con la amilosa es que las longitudes de las cadenas lineales son relativamente cortas y con un patrón de ramificaciones amplio. Típicamente tiene entre 18 y 25 unidades de longitud en promedio (Takeda et al., 2003) aunque se puede extender desde 19 a 31 unidades, si se incluyen los almidones de alto contenido en amilosa (Jane et al., 1999). Sin embargo, este tipo de almidones contienen una proporción bastante alta de cadenas muy cortas.

El modelo de ramificaciones se puede concebir de dos maneras: (1) con regiones lineales exteriores de amilopectina en forma de dobles hélices cristalinas; y (2) con puntos de ramificación 1→6 que se encuentran distribuidos con cierta variación periódica en puntos densos de ramificación (Thompson, 2000), lo que proporciona un carácter no aleatorio a los puntos de ramificación de la amilopectina.

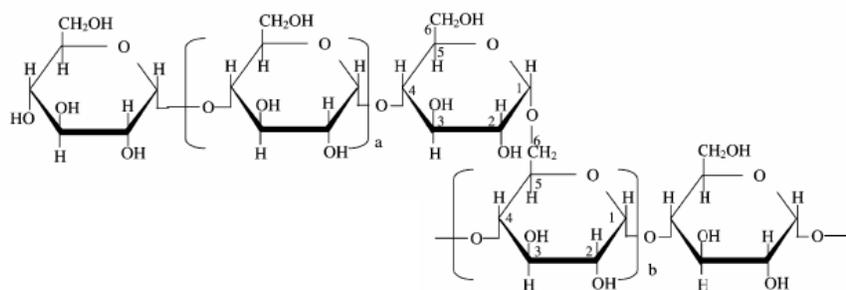


Figura 3. Representación esquemática de la cadena de amilopectina (Tester et al., 2004). Para cadenas exteriores, a = 12 a 23, para cadenas interiores, b = 20 a 30.

En relación con la estructura de la amilopectina (Figura 4), las cadenas tipo A y B1 son las cadenas ubicadas en la parte externa de la molécula y forman dobles hélices en los gránulos nativos. Las cadenas A se unen a las cadenas B mediante enlaces α -(1→6), las cuales pueden estar enlazadas a otra cadena B o a la cadena principal de la molécula de amilopectina. Dependiendo de la longitud de la cadena y el correspondiente número de racimos radiales, las cadenas B son referidas como B1-B4, de uno a cuatro racimos. La relación de las cadenas A a B depende de la fuente botánica del almidón y típicamente están en el orden de 1:1 a 2:1 en una base molar (Tester et al., 2004).

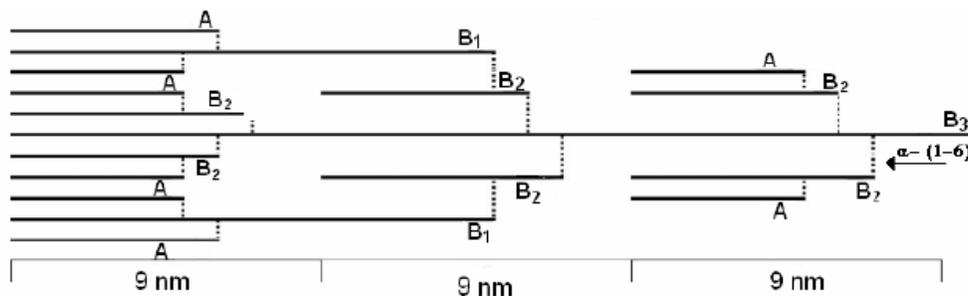


Figura 4. Representación esquemática de la amilopectina, indicando el patrón de ramificaciones de las unidades de cadenas α -1 \rightarrow 4 (A, B1-B3) unidas por enlaces α -1 \rightarrow 6 (puntos de ramificación) (Hizukuri, 1986).

2.2 Gelatinización del almidón

Usualmente en la industria de alimentos, el almidón es procesado mediante tratamientos térmicos y mecánicos en presencia de agua dando lugar a diversos fenómenos, entre los que se encuentra la gelatinización. La gelatinización es el colapso o destrucción del orden molecular, en el cual los gránulos manifiestan un cambio irreversible en sus propiedades, tales como pérdida del orden cristalino nativo, pérdida de la birrefringencia óptica (observación de la cruz de malta bajo luz polarizada), hinchamiento del gránulo y disociación de las dobles hélices (Singh et al., 2003). La transición orden-desorden ocurre durante el calentamiento de una suspensión de almidón en exceso de agua (> 60% masa) (Liu et al., 2006). El punto inicial de la gelatinización o temperatura inicial (T_{ini}) y el intervalo en el cual ésta ocurre está gobernado por el tratamiento térmico, el tipo de gránulo, la homogeneidad de la población de los gránulos y en algunas ocasiones se ve afectada por la presencia de compuestos almidón-lípido (Thomas & Atwell, 1999). Durante la gelatinización, inicialmente se observan los gránulos de almidón en estado nativo, insolubles en agua fría, sin embargo, conforme la temperatura aumenta, las moléculas de almidón vibran más vigorosamente, rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares y dando origen a los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua.

La gelatinización comienza en el hilio del gránulo (Figura 5), el cual se hincha rápidamente hacia la periferia, por tanto ocurre inicialmente en las regiones amorfas (Jenkins & Donald, 1998) porque los puentes de hidrógeno son más débiles en estas áreas. Conforme esto ocurre, el incremento de translucidez se debe a que el índice de refracción de los gránulos hinchados es cada vez más cercano al del agua. En el estado inicial de la

gelatinización no se observan cambios en las láminas de amilopectina, sin embargo, al final del proceso, adicionalmente a la pérdida del orden cristalino, las observaciones realizadas con rayos X han demostrado que se observa también la pérdida del orden laminar (Jenkins & Donald, 1998).

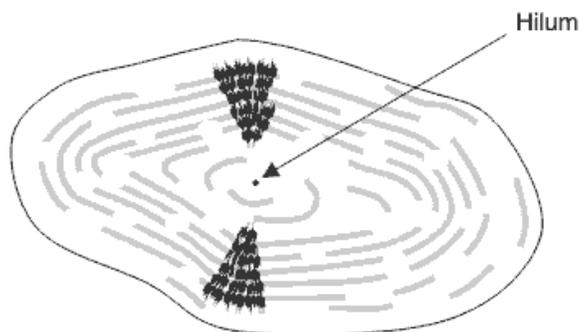


Figura 5. Representación del hilum de los gránulos de almidón (Donald et al., 1997).

Cuando la amilosa está presente, se disuelve inclusive a temperaturas menores que la temperatura de gelatinización, debido a su localización en las regiones no cristalinas y al hecho de que su tamaño es relativamente pequeño y la molécula lineal emigra fuera del gránulo (Whistler & BeMiller, 1997). Por otro lado, existe la posibilidad de que algunas cadenas pequeñas de amilopectina se disuelvan también (Mizukami et al. 1999) debido a que el rompimiento del dominio cristalino solamente proporciona una disolución parcial, y la amilopectina atraviesa dominios o laminillas y esto hace más difícil su disolución.

Conforme la temperatura aumenta, el agua pasa hacia las áreas cristalinas, desestabilizando esta zona y los índices de cristalinidad tienden a cero (Jenkins & Donald, 1998). Dado el gran número de grupos hidroxilo en las moléculas de almidón, los gránulos pueden absorber grandes cantidades de agua, lo que se traduce en un crecimiento de los gránulos, siendo varias veces mayor que su tamaño original (Parker & Ring, 2001). Combinando técnicas de difracción de rayos X de amplio y corto ángulo (SAXS por sus siglas en inglés) con la microcalorimetría de barrido diferencial (microDSC por sus siglas en inglés). Vermeylen et al. (2006) mostraron que en los almidones tipo A, la pérdida del carácter cristalino se presenta rápidamente en el intervalo de temperatura registrado por micro DSC, mientras que los almidones tipo B presentan la existencia de láminas remanentes al final de la endoterma de gelatinización, lo que sugiere que durante la gelatinización, las endotermas de la fusión de cristales de amilopectina se acompañan por la formación exotérmica de una red amorfa.

En general, el proceso de gelatinización ocurre sobre un intervalo limitado de temperatura para un solo gránulo, sin embargo, considerando que la población de éstos no es homogénea, la gelatinización puede ocurrir en un amplio intervalo de temperaturas (Whistler & BeMiller, 1997). Algunos almidones presentan mayor resistencia al tratamiento mecánico que otros. Por ejemplo, los almidones de maíz ceroso modificados químicamente, muestran una mayor resistencia cuando se calientan mas allá de la temperatura de gelatinización (Loisel et al. 2000), sin embargo, la gran mayoría de los almidones nativos extraídos de variedades silvestres, tienden al rompimiento de los gránulos una vez hinchados.

2.3 Microcalorimetría de barrido diferencial

La gelatinización del almidón es un proceso de absorción de energía que puede ser estudiado por microcalorimetría de barrido diferencial (microDSC por sus siglas en inglés), con la cual es posible medir la temperatura y la energía de gelatinización. Es conocido que el tratamiento térmico de los almidones es bastante complejo, porque los cambios fisicoquímicos que ocurren durante el calentamiento de éstos o de sus productos involucran gelatinización, fusión, transición vítrea, cristalización, cambios de la estructura cristalina, expansión volumétrica y degradación molecular (Yu & Christie, 2001), que dependen del contenido de agua presente en los almidones durante la etapa previa al calentamiento. Sin embargo, en este contexto, se ha demostrado que en exceso de agua (> 60%) ocurre el fenómeno de gelatinización (Liu et al., 2006).

Un termograma característico durante la gelatinización del almidón se muestra en la Figura 6. El agua es un plastificante para el almidón y su movilidad mejora al invadir inicialmente la región amorfa del mismo. Cuando los gránulos son calentados en presencia de cantidades mayores de 60% de agua (Biliaderis et al., 1986) y su temperatura de transición vítrea, T_g , es rebasada, la región amorfa plastificada de los gránulos pasa de una transición de un cristal amorfo a una estructura “gomosa” (Whistler & BeMiller, 1997). Sin embargo, el pico de absorción de energía para esta transición, a menudo no se observa, porque la fusión de las regiones cristalinas sigue muy de cerca la de la transición vítrea. La endoterma correspondiente a la gelatinización, parte de una temperatura inicial (T_{ini}) característica para cada sistema, sin embargo, la temperatura de gelatinización (T_{gelat})

reportada en la literatura, es aquella a la cual se obtiene el valor máximo de flujo de calor (T_{max} en la Figura 6). Es muy usual que también se reporte la temperatura del final de la transición (T_{final}) por considerarla la parte final del fenómeno de gelatinización del almidón.

La temperatura (T_{gelat}) y las entalpías de gelatinización (ΔH_{gelat}) medidas por DSC así como el hinchamiento, son controladas en parte por la estructura molecular de la amilopectina; longitud de la cadena unitaria, cantidad de ramificaciones, peso molecular y polidispersidad (Tester & Morrison, 1990; Jane et al., 1999), por la composición del almidón; relación amilosa-amilopectina y contenido de fosfatos (Liu et al., 2006) y por la arquitectura del gránulo; porcentaje del carácter cristalino de los gránulos (Singh et al., 2003).

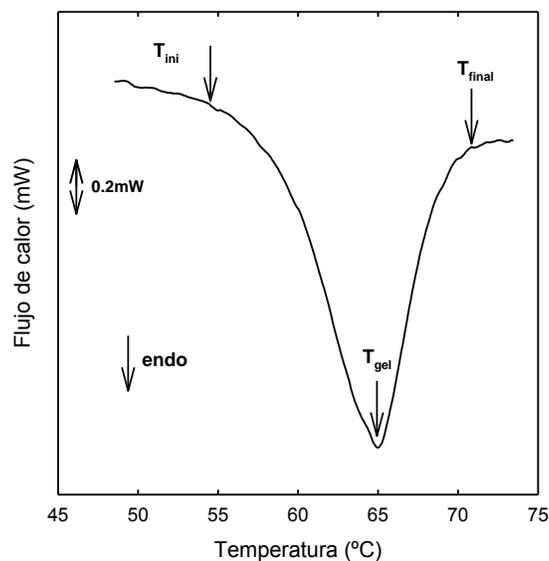


Figura 6. Termograma en microDSC de gelatinización de una suspensión con 4% de almidón de maíz ceroso reticulado químicamente. Tasa de calentamiento 1.2 °C/min.

Es un hecho que la gran diversidad de almidones existentes en la naturaleza presenta un número igual de posibilidades en la conformación de los gránulos de almidón y con diversos grados de cristalinidad, composición y arquitectura de los mismos. La Tabla 1 muestra un resumen de los parámetros de gelatinización de almidones de diferentes fuentes botánicas obtenidas por microDSC. En general, se ha observado que las altas temperaturas

Tabla 1. Parámetros de gelatinización de almidones de diversas fuentes botánicas obtenidos por DSC.

Fuente	T _{ini} (°C)	T _{max} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH _{gelat} (J/g almidón)	Referencia
Papa	59.7-66.2	62.9 a 69.6	67.3 a 75.4	12.6 a 17.9	Singh & Singh 2003
Maíz normal	62.9	70.5	81.1	12.6	Tester et al. 2000
Maíz normal	69.8	74.8	78.1	10.9	Singh & Singh 2003
Maíz normal	65.7	71.0	-	12.0	Li & Yeh 2001
Maíz ceroso	64.2	69.2	74.6	15.4	Jane et al. 1999
Maíz normal	68.3	72.5	77.9	14.4	Liu et al. 2006
Maíz ceroso	66.6	73.6	-	14.2	Li & Yeh 2001
Maíz ceroso	62.6	72.6	84.4	15.6	Tester et al. 2000
Amilomaíz	67.7	91.0	104.8	17.7	Tester et al. 2000
Amilomaíz	66.8	73.7	-	13.7	Li & Yeh 2001
Arroz	61.1 a 75.8	67.0 a 79.2	73.7 a 83.6	8.8. a 8.1	Singh et al. 2006
Arroz	57.7	65.1	-	11.5	Li & Yeh 2001
Arroz	66.0 a 67.3	69.7 a 71.9	74.1 a 74.0	8.2 a 10.9	Singh & Singh 2003
Arroz	70.3	76.2	80.2	13.2	Jane et al, 1999
Sorgo	-	69.3 a 70.1	-	15.1 a 16.3	Ahmad et al. 1999
Trigo	57.1	61.6	66.2	10.7	Jane et al. 1999
Trigo	51.9	58.2	69.6	10.1	Tester & Morrison 1990
Avena	44.7 a 47.3	56.2 a 73.7	68.7 a 73.3	8.1 a 9.2	Tester & Karkalas 1996

- no reportado

de gelatinización son mayores cuando el grado de cristalinidad es mayor y éste a su vez se ve favorecido con altos contenidos de amilopectina y con la existencia de cadenas más largas de este polisacárido al interior del gránulo (Singh et al., 2003). Por el contrario, el almidón con altos contenidos de amilosa tiene regiones más amorfas y menos cristalinas, lo cual produce T_{gelat} más pequeñas. Sin embargo, en almidones con altos contenidos de amilosa de cadenas de grandes longitudes, producen T_{gelat} elevadas (Jane et al., 1999).

2.4 Hinchamiento y solubilidad

Como se ha citado previamente, el calentamiento continuo de los gránulos de almidón en exceso de agua, resulta en su hinchamiento y la lixiviación de los componentes solubles (principalmente la amilosa). Cuando el hinchamiento y la solubilidad se completan, el sistema resultante es una suspensión de partículas hinchadas, dispersas en una solución macromolecular, generalmente compuesta por amilosa, que constituye el medio continuo,

en otros casos, las moléculas de almidón se disuelven totalmente. Con el hinchamiento de la amilopeptina contenida en los gránulos, tales como el de maíz, algunas de las moléculas más pequeñas de amilosa se disuelven y son conducidas fuera del gránulo, para reasociarse y precipitar si la concentración de almidón es baja, o pueden formar un gel si la concentración es alta.

Históricamente, el hinchamiento del almidón se ha estudiado con un método que no distingue entre el agua intragranular y el agua intergranular o intersticial. Para corregir este error, se desarrolló un método que considera únicamente el agua intragranular y se ha reportado como el verdadero factor de hinchamiento a una temperatura dada.

La base de este método es la cuantificación de la concentración de azul dextrana ($M_w = 2 \times 10^6$) que no penetra en los gránulos de almidón hinchados y se conoce como el método de azul dextrana (Tester & Morrison, 1990).

Por otro lado, el poder máximo de hinchamiento se define como la relación entre el volumen máximo y el volumen inicial, calculado como la relación cúbica del diámetro máximo y el diámetro inicial: $(D_1/D_0)^3$, donde D_1 puede ser $D[v,0.5]$, el diámetro mediano de los gránulos hinchados, y D_0 es $D[v,0.5]$ del almidón nativo sin cocer (Tecante & Doublier, 1999). La aplicación de este método produjo resultados similares con el hinchamiento calculado por el método de azul dextrana en suspensiones con 4% de maíz ceroso modificado químicamente, en procesos de calentamiento de 90 a 130 °C (Nayouf et al., 2003).

A partir de este valor de hinchamiento de los gránulos de almidón y considerando que éstos son partículas deformables que absorben el disolvente, la fracción volumen es equivalente al producto $C \cdot H$ cuando $C \cdot H < 1$, donde C es la concentración de los gránulos de almidón y H es el hinchamiento (Bagley & Christianson, 1982). Así, inicialmente se propuso que la fracción volumen de los almidones hinchados en una suspensión libre de material soluble, se puede estimar simplemente por el producto $C \cdot H$. Cuando $C \cdot H < 1$, existe un exceso de disolvente entre las partículas, para $C \cdot H > 1$, todo el disolvente está absorbido por las partículas (Bagley & Christianson, 1982). Sin embargo, cuando parte del almidón se disuelve, esta condición se puede extender a la siguiente expresión (Doublier, 1987):

$$\Phi = [1-(S/100)] \cdot C \cdot H \quad (1)$$

Se ha establecido que el incremento de la fracción volumen de los gránulos de almidón en la suspensión, produce un incremento en la viscosidad de las pastas (Acquarone & Rao,

2003). Esto ha servido como soporte para que los resultados del comportamiento reológico sean interpretados con base en la fracción volumen del almidón.

2.5 Almidón de maíz ceroso nativo

El almidón, en general, contiene dos tipos de polímeros, amilosa, la cual es esencialmente lineal y amilopectina la cual es ramificada. El almidón de maíz ceroso contiene una cantidad significativamente mayor de amilopectina que el almidón de maíz común, esto le da características especiales en aplicaciones donde el almidón se utiliza primordialmente como espesante o estabilizador, y donde es deseable un sol estable que resista la retrogradación.

Para satisfacer las demandas necesarias de la industria de alimentos, el almidón de maíz ceroso nativo es frecuentemente modificado por numerosas técnicas como las mencionadas anteriormente. En particular, la modificación es realizada para incrementar la tolerancia al proceso y la estabilidad de la dispersión acuosa. Las dispersiones acuosas de almidón entrecruzado nativo son frecuentemente utilizadas bajo condiciones que involucran almacenamiento prolongado a relativamente bajas temperaturas o la exposición de ciclos repetidos de congelación, descongelación. Por ejemplo, las pastas de almidón utilizadas en productos congelados, particularmente preparados de frutas, rellenos para pavs, sopas y alimentos para bebé. En el caso de comida enlatada, son almacenados en lugares que no tienen calentamiento y soportan bajas temperaturas por periodos prolongados y pueden congelarse durante el transporte. Los alimentos congelados son también sometidos a largos periodos de almacenamiento a muy bajas temperaturas y también a periodos de congelación-descongelación durante la distribución. Bajo ciertas circunstancias que involucran la exposición a bajas temperaturas, hay una pérdida del poder de hidratación del almidón presente, resultando en sinéresis, junto con un marcado deterioro de textura, color y claridad del alimento. Aunque los soles de almidón de maíz ceroso son superiores a los de almidones de maíz regulares, son propensos a la asociación intermolecular durante el almacenamiento a una temperatura cercana a la de congelación. El almidón de maíz ceroso se obtiene del homocigoto del alelo sugary-2 (Campbell, 1994).

2.6 Almidones entrecruzados

El propósito del entrecruzamiento en la preparación de almidones alimentarios modificados es reforzar los enlaces químicos entre los enlaces de hidrógeno responsables de la integridad del gránulo. Cuando los almidones nativos, es decir, aquellos que contienen amilosa y amilopectina, son calentados en agua arriba de su temperatura de gelatinización, los puentes hidrógeno (Figura 7) retienen la estructura intacta de los gránulos, permitiéndoles hincharse tangencial e irreversiblemente muchas veces su volumen original mientras absorben agua (Wurzburg, 1972). Cuando esto ocurre, los gránulos pierden su birrefringencia, su viscosidad se incrementa inicialmente y la dispersión se aclara. Al continuar la cocción, los gránulos hinchados se colapsan y se fragmentan, liberando moléculas, agregados y fragmentos. La viscosidad del medio desarrolla una textura cohesiva y elástica inconveniente para los sistemas alimentarios. La forma y la extensión en la cual estos cambios ocurren dependen de un gran número de factores. Algunas raíces y almidones cerosos se hinchan en mayor grado y producen una mayor viscosidad que los cereales de almidón, como aquellos de maíz o avena regular, mostrando una gran disminución en la viscosidad sobre el cocimiento y una mayor tendencia a desarrollar texturas elásticas cohesivas. La acidez del cocimiento también ejerce un marcado efecto. Las condiciones ácidas aceleran el hinchamiento del gránulo, incrementan la estabilidad de la viscosidad y disminuyen la temperatura de gelatinización. Aditivos como la sacarosa, la dextrosa y otras moléculas solubles en agua como los hidróxidos, podrán en suficiente concentración, inhibir el hinchamiento de los gránulos.

Los almidones entrecruzados fueron desarrollados para minimizar y prevenir la ruptura del gránulo durante la cocción, provocando que los almidones se desarrollen un mínimo o previniendo la ruptura del gránulo, lo que le provee al gránulo una mejor viscosidad final y una corta y no cohesiva textura de pasta; una textura de goma características de las dispersiones de almidones no modificados. El entrecruzamiento del almidón es típicamente producido mediante una reacción alcalina a pH 7.5 a 12 de una dispersión granular con 30 a 45% de sólidos con un reactivo para el entrecruzamiento apropiado.

Existen dos tipos de entrecruzamientos para los almidones alimentarios. Los almidones adipato y los almidones fosfato. Los primeros están hechos por el tratamiento de una solución acuosa de almidón granular con una mezcla de anhídrido adípico y acético mezclado bajo condiciones ligeramente alcalinas para formar el adipato de dialmidón

(Caldwell, 1960; Wurzburg, 1972). Como el anhídrido acético está también presente durante la reacción, algunos grupos acetato se introducirán y el nivel de acetilación dependerá de la cantidad de anhídrido acético presente en la mezcla. Después de que el nivel deseado ha sido alcanzado, la pasta es neutralizada y el almidón es lavado en extenso y posteriormente es secado.

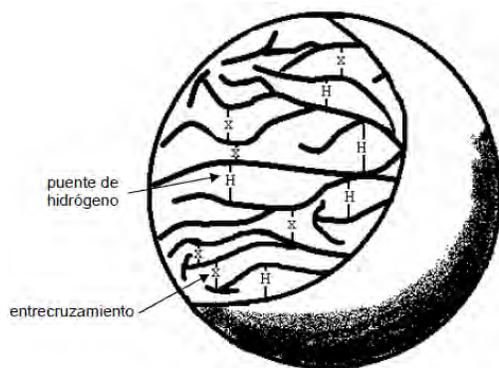


Figura 7. Esquema de la estructura de un gránulo de almidón entrecruzado (Thomas & Atwell, 1999). Cada “x” representa un enlace covalente de entrecruzamiento.

Este tipo de derivado de almidón es ampliamente utilizado (Wurzburg, 1986). En general, el procedimiento es el siguiente: una suspensión acuosa de almidón, tratada previamente con peróxido de hidrógeno, se ajusta a pH preferentemente entre 8 y 8.5, mediante la adición de NaOH. La cantidad de ácido adípico es generalmente hasta de 0.12% del peso seco del almidón y la del anhídrido acético puede ser desde 3 a 7%. La reacción se lleva a cabo a una temperatura que puede situarse alrededor de 40 °C. El tiempo de reacción es usualmente de 0.5 a 1 hora y al final de la reacción el pH de la suspensión se reduce a aproximadamente 5.5 mediante la adición de HCl, y el producto sólido es separado del líquido por centrifugación. Finalmente es lavado y secado (Fitton & Gozne, 1988). La mezcla de reactivos anhídridos empleados en esta reacción (Figura 8), transforma enlaces de ésteres orgánicos en almidones que son relativamente estables bajo condiciones de pH neutros. Sin embargo, bajo condiciones extremas de pH, estos tipos de entrecruzamientos son menos estables que otros con ésteres o enlaces ésteres inorgánicos, por lo tanto, la mezcla de reacciones anhídridas se conduce a pH menores de 9. Cuando se emplea la mezcla de reactivos anhídridos, el almidón es sustituido por el grupo acetilo.

El otro tipo de almidón entrecruzado es el fosfato de dialmidón. Se obtiene por el tratamiento de la pasta acuosa de gránulos de almidón bajo condiciones alcalinas con oxiclóruo de fósforo o trimetafosfato de sodio (Felton, 1943).

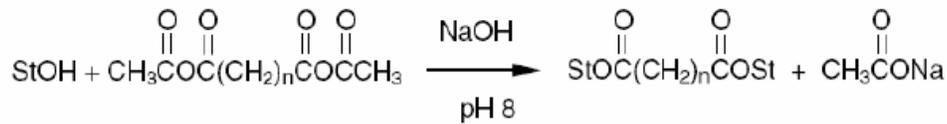


Figura 8. Reacción química para entrecruzamiento de almidón por una mezcla de anhídridos adipico y acético. St = almidón (Thomas & Atwell, 1999).

En cada caso, después de que el nivel deseado ha sido alcanzado, el almidón se recupera como se describió anteriormente. La reacción con oxiclورو de fosfato es comúnmente empleada para producir ésteres de almidones entrecruzados. La reacción se realiza típicamente a pH de aproximadamente 11.5 con o sin la presencia de fósforo. Las sales comúnmente empleadas son el cloruro de sodio y el sulfato de sodio. La reacción respectiva se muestra en la Figura 9. Dicha reacción generalmente se completa en una hora a temperatura ambiente. Dependiendo de la extensión del entrecruzamiento, los fosfatos dialmidones que se generan producen un almidón con mejores capacidades de viscosidad y mayor estabilidad termomecánica de los procesos (Thomas & Atwell, 1999).

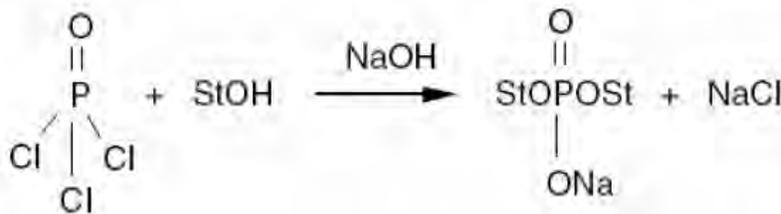


Figura 9. Reacción química para el entrecruzamiento de almidón con oxiclورو de fósforo en medio alcalino (Singh et al., 2007). St = almidón.

En la reacción con trimetafosfato de sodio, de manera similar que con el oxiclورو de fosfato, el producto obtenido es un fosfato de dialmidón con enlaces éster (Figura 10). Sin embargo, requiere un mayor tiempo de reacción que aquella con el oxiclورو de fosfato debido a la baja reactividad del trimetafosfato de sodio.

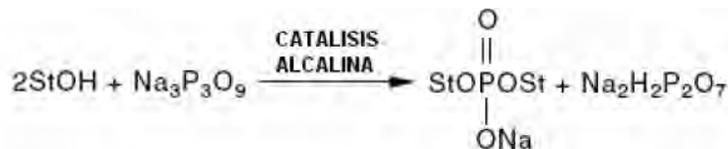


Figura 10. Reacción química para entrecruzamiento de almidón con trimetafosfato de sodio. St = almidón (Singh et al., 2007).

Los reactivos utilizados para el entrecruzamiento son destruidos a través de una reacción con los hidroxilos del almidón o hidrólisis por el agua y alcali. Los subproductos de la reacción, i.e. adipato, acetato o sales de fosfato o cloruro de sodio son removidos en el lavado.

Bajo condiciones neutras o ácidas (pH 3) la viscosidad del almidón de maíz ceroso sin modificar se incrementa rápidamente arriba de la temperatura de gelatinización y luego disminuye drásticamente con el calentamiento continuo en el viscoamilógrafo Brabender. Este descenso corresponde a la ruptura y colapso de los gránulos de almidón. Las condiciones ácidas agravan el descenso de la viscosidad. Con un solo entrecruzamiento por cada 1330 unidad de anhidroglucosa, el comportamiento del almidón se modifica de manera drástica. Bajo condiciones neutras, el hinchamiento de los gránulos mantiene su integridad y bajo estas condiciones, no alcanza la máxima hidratación. Cuando son cocidos en ácido se mantiene la integridad del gránulo y la viscosidad es mucho más grande que para el almidón de maíz ceroso sin modificar.

A pesar de las variaciones en el grado de entrecruzamiento, una amplia variedad de almidones modificados puede ser utilizada para satisfacer la demanda de una variedad igualmente amplia de aplicaciones alimentarias, involucrando temperaturas de procesamiento que tienen un gran intervalo de temperaturas asociadas con alimentos cocidos y de procesamiento aséptico. Por ejemplo, el entrecruzamiento puede ser variado para impartir la viscosidad óptima bajo un amplio intervalo de acidificaciones. Además, se incrementa la resistencia de los gránulos hinchados a la cizalla así que la viscosidad de las dispersiones de almidón entrecruzado no disminuye bajo agitación mecánica como lo hacen las dispersiones de almidones modificados (Choi & Kerr, 2004).

2.7 Aplicaciones en alimentos de almidones entrecruzados

El almidón entrecruzado es utilizado en la industria de alimentos para espesar, estabilizar y texturizar. Juega un papel importante en la suspensión de otros ingredientes para obtener alimentos nutricionalmente uniformes que son utilizados en relleno de pasteles, pan (Mizoguchi et al., 1992), pudines, alimentos para bebé, sopas, salsas, aderezos para ensalada (Kraetz et al., 1989), alimentos cocidos y procesos asépticos. Estos almidones

no sólo juegan un papel importante en términos de las propiedades del producto final sino son también para facilitar los procesos y el almacenamiento.

2.8 Almidones estabilizados

Esta categoría de almidones modificados incluye aquellas realizadas por la reacción de los grupos hidroxilo sobre las moléculas de almidón con reactivos monofuncionales que introducen grupos sustituyentes. En la mayoría de las instancias, el propósito fundamental de este tipo de tratamiento es estabilizar la amilosa contra la retrogradación y la fracción de amilopectina contra la asociación intemolecular. Las propiedades específicas funcionales pueden ser introducidas a través de algunos grupos sustituyentes.

La amilosa presente en la dispersión de almidón es muy susceptible a la retrogradación, la cual es causada por asociaciones intermoleculares entre hidroxilos de las moléculas adyacentes. La retrogradación es responsable de la tendencia del almidón de maíz cocido a volverse opaco y a formar estructuras de gel rígidas en el enfriamiento. La amilopectina presente en dispersiones de almidón normalmente no tiende a retrogradar como lo hace la amilosa a temperatura ambiente, tiende a desarrollar asociaciones intermoleculares entre los segmentos lineales de sus ramificaciones si es almacenada a bajas temperaturas por un tiempo largo de congelación. Este fenómeno es el responsable de la pérdida de claridad y retención de agua (sinéresis) y gelificación de los soles que contienen amilopectina durante la congelación o enfriamiento a bajas temperaturas. La linealidad de la amilosa y las porciones de las ramificaciones en la amilopectina, es considerada el factor causante de la retrogradación o de la asociación entre ramificaciones.

A través de la introducción de grupos sustituyentes sobre amilosa y las ramificaciones de la amilopectina por reacción con reactivos monofuncionales, puede interrumpirse la linealidad y como consecuencia las moléculas y las ramificaciones quedan estéricamente ocultas, así que no se aproximan lo suficiente para establecer asociaciones intermoleculares o entre las ramificaciones.

Hay cuatro tipos de almidones modificados preparados por la reacción del almidón con reactivos monofuncionales: acetatos de almidón, monofosfatos de almidón, sodio octenil succinato de almidón, hidroxipropil éter de almidón. Excepto los monofosfatos, el grupo sustituyente reacciona con los gránulos de almidón en soluciones acuosas. Las reacciones son usualmente realizadas en almidón sin modificación, en combinación con conversiones

como hidrólisis ácida o bien la subsecuente dextrinización o en almidones entrecruzados. Los subproductos son removidos por lavado. Los monofosfatos son aplicados sobre gránulos de almidón seco.

2.9 Comportamiento reológico del almidón de maíz entrecruzado químicamente con otros polisacáridos y con proteínas

En la caracterización viscoelástica de pastas y geles de almidón es frecuente el uso de cizalla oscilatoria de baja amplitud. El comportamiento de los módulos dinámicos, G' , G'' y G^* , así como el ángulo de pérdida, δ , han proporcionado información del carácter predominantemente elástico de estos sistemas (Evans & Haisman, 1979; Alloncle & Doublier, 1991; Tecante & Doublier, 1999), mismos que se han estudiado bajo el modelo de sistemas compuestos o “composites” (Elliason, 1986). Sin embargo, en los trabajos realizados con almidón de maíz ceroso nativo y entrecruzado (Abdulmola et al., 1996; Mohamed et al., 1998), donde el efecto de la amilosa en el medio continuo se ha descartado y donde las condiciones de preparación se controlaron para evitar el rompimiento de los gránulos, los espectros dinámicos mostraron el comportamiento de un material con carácter elástico predominante, con $G' > G''$ y poca dependencia de los módulos con la frecuencia, aun a bajas concentraciones de almidón, lo cual es debido a la fracción volumen y a la capacidad de los gránulos de almidón de deformarse.

En la literatura no hay muchos estudios de mezclas de almidón de maíz entrecruzado con otros polisacáridos, a pesar de que los almidones no son empleados de manera aislada, ya que se usan en asociación con otros hidrocoloides a fin de mejorar las características reológicas y de textura, por ejemplo, mayor viscosidad y rigidez que los almidones o hidrocoloides solos, optimizar el tratamiento térmico y mejorar la estabilidad de las mezclas durante la conservación de los alimentos (Lai et al., 1999; Lai et al., 2000). El estudio de las mezclas almidón-hidrocoloide se justifica debido a los cambios que se han observado en ellas, tales como: aumento en las temperaturas y entalpías de gelatinización (Chaisawang & Supphantharika, 2006), disminución en la retrogradación de las dispersiones de almidón (Kim et al., 2006), disminución de la sinéresis en los geles de almidón (Lai et al., 2000) y sobre todo, los cambios en el comportamiento reológico (Alloncle & Doublier, 1991; Abdulmola et al., 1996; Chaisawang & Supphantharika, 2006; Kim et al., 2006). De

ahí la importancia que toma el conocimiento y comprensión de las interacciones entre estos sistemas.

En general, el almidón es preferido debido a que su modificación química incrementa su resistencia a la desintegración de los gránulos con tratamientos térmicos y mecánicos. Sin embargo, la mayoría de los componentes del almidón permanecen dentro de los gránulos hinchados y una muy pequeña parte se disuelve en la fase continua, la cual probablemente influencia la reología de esta fase ($\leq 0.2\%$ amilosa, Tecante & Doublier 1999). Durante el calentamiento, el polisacárido que gelifica, principalmente encontrado en la fase continua (Doublier et al., 2004), se encuentra totalmente disuelto. Los gránulos de almidón hinchados provocan una reducción en la fracción volumen de la fase continua (Alloncle et al., 1989; Lai & Lii, 2000). Aunque algunos autores han reportado que la adición de hidrocoloides puede incrementar la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón (Alloncle et al., 1989; Tecante & Doublier, 1999; Loisel et al., 2000), el sistema resultante es una suspensión de partículas hinchadas dispersas en un medio macromolecular. Con el enfriamiento, en el caso de polisacáridos gelificantes, tales como pectina o κ -carragenina, la fase continua gelifica, resultando en un cambio notable en la reología del sistema disperso (Figura 11) (Tecante & Doublier, 1999). Un gel compuesto se obtiene con los gránulos de almidón hinchados insertados en la red formada por el otro polisacárido. Por otro lado, cuando el almidón es combinado con proteína aislada de suero, se producen geles fuertes, en los cuales los módulos de almacenamiento de la mezcla resultan ser mayores que aquellos de los componentes individuales, lo cual se refiere como sinergia reológica producida por mecanismos propuestos por diferentes autores (Shim & Mulvaney, 2001; Morris, 1990; Langton & Hermansson 1989). El efecto sinérgico puede ocurrir cuando cualquiera de los dos componentes es estructuralmente compatible con el otro o uno de ellos actúa como “relleno”. Cabe aclarar que según Bower (2002), los compósitos son materiales con propiedades diferentes que son añadidos a un polímero, así que ambos componentes contribuyen a las propiedades del producto. La función del compuesto consiste en incrementar la dureza y la rigidez del producto y se dice que lo refuerza. También en este punto es importante aclarar que dependiendo de la fuerza y naturaleza de las interacciones entre la proteína y el polisacárido, los geles macromoleculares pueden formar redes interpenetrantes (homogéneas) o redes de fases separadas (heterogéneas)

(Morris, 1990) pero para describir el comportamiento resultante en la mezcla almidón con proteína aislada de suero lácteo se ha utilizado el término gel composito.

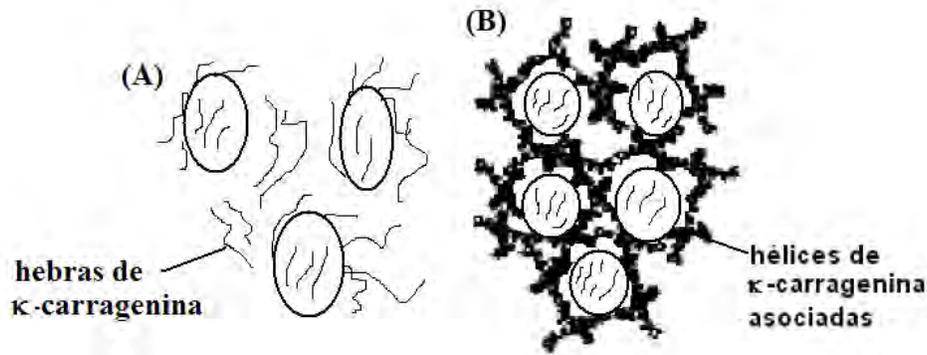


Figura 11. (A) Gránulos de almidón rodeados por hebras de κ -carragenina; (B) Gránulos de almidón rodeados por hélices de κ -carragenina por la adición de KCl.

Matser & Steeneken (1997) estudiaron las propiedades reológicas de mezclas de almidón de maíz entrecruzado con leche desnatada, sin embargo la mezcla es mantenida bajo agitación durante la desnaturalización de las proteínas, previniendo la formación del gel. De igual manera Ravindra, Genovese, Foegeding & Rao (2004) utilizan un método similar interrumpiendo la formación del gel y otro trabajo realizado por Vu Dang et al. (2009) determinan el comportamiento reológico de los agregados de proteína posteriormente al rompimiento. La explicación del rompimiento del gel es, según Vu Dang et al. (2009), la imitación de procesos industriales en la elaboración de alimentos que contienen estos dos componentes macromoleculares como se observa en la Figura 12.

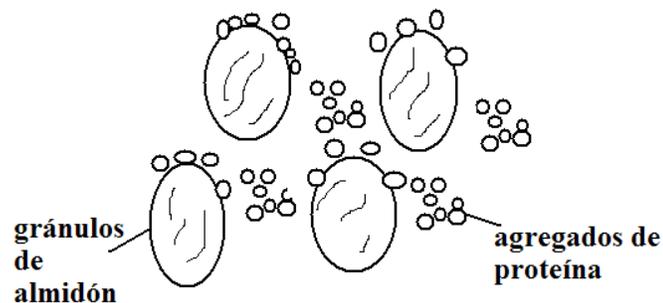


Figura 12. Gránulos de almidón rodeados de agregados de proteína de suero aislado después del tratamiento térmico.

Con la idea de analizar las interacciones en un modelo real, Yang et al. (2004), estudiaron el comportamiento reológico en mezclas almidón de trigo con proteína aislada

de suero lácteo, concluyendo que al incrementar la concentración de proteína, el gel es más firme debido al aumento de interacciones hidrofóbicas. La adición de azúcar, clara de huevo, leche entera, mantequilla, la adición de concentrado de proteína de suero sustituyendo al aislado de proteína de suero y polvo para hornear para crear un modelo real de pan provocó una disminución en los módulos de almacenamiento, debido a que ahora está limitada la cantidad de agua disponible para la gelatinización del almidón y la gelificación de las proteínas.

Por otro lado, existen otros reportes de trabajos realizados sin el rompimiento del gel. Aguilera & Banficcó (1997) aplican las leyes de mezclado a mezclas almidón de maíz de yuca con proteína aislada de suero. Se reporta que la competencia por el agua entre ambos provoca una reducción en el hinchamiento de los gránulos de almidón. A bajas concentraciones de almidón observaron un incremento sustancial en G' y a bajas concentraciones de proteína se forma una red continua de almidón en la gelatinización del mismo, la cual es fragmentada por la formación de la red de proteína aislada de suero lácteo (WPI).

Fitzsimons et al. (2008) concluyen que la afinidad de la proteína por el agua restringe la extensión del hinchamiento de los gránulos de almidón en redes de proteína, aplicando las leyes de mezclado a almidón de maíz entrecruzado químicamente, en combinación con proteína aislada de suero.

Debido a que las propiedades funcionales mejoran y los valores nutricionales se incrementan, los sistemas combinados almidón-proteína son aplicados en alimentos, fármacos, cosméticos, medicinas y también encuentran aplicación en el campo biotecnológico. En la industria de alimentos estos sistemas pueden ser utilizados para reemplazar grasa en alimentos que tienen carne, así como para incrementar la textura y las propiedades funcionales y estructurales (Ravindra et al., 2007).

2.10 Discusión

El almidón de maíz ceroso contiene una cantidad significativamente mayor de amilopectina que el almidón de maíz común. Esto le da características especiales en aplicaciones donde el almidón se utiliza primordialmente como espesante o estabilizador y

donde es deseable una dispersión estable que resista la retrogradación. Los estudios realizados para comprender el comportamiento de los gránulos de almidón involucran técnicas como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear, la microscopia y la calorimetría de barrido diferencial. En cuanto a los resultados reológicos se ha considerado un sistema bifásico, formado por una fase continua constituida por el disolvente y el material extraído del gránulo durante la gelatinización y una fase dispersa compuesta de gránulos hinchados, los cuales son elásticos (Doublier, 1987). El incremento en el tamaño del gránulo provoca un incremento en la viscosidad. Durante la gelatinización del almidón ocurre un proceso de dos etapas de acuerdo a Kokini et al. (1992); un incremento abrupto correspondiente a la rápida absorción de agua por los gránulos, seguido de un lento incremento que podría deberse a un mecanismo de difusión. De acuerdo con Doublier et al. (1987) y Steeneken (1989), el comportamiento reológico de suspensiones de almidón depende del intervalo de la fracción volumen. Especialmente para Φ superior a 0.7 (régimen concentrado), la deformabilidad de los gránulos de almidón juega un papel importante. Steeneken (1989) menciona que la habilidad de los gránulos de almidón para hincharse al máximo tamaño posible depende del valor de la fracción volumen (régimen diluido o concentrado). El régimen concentrado podría alcanzarse sólo para 4.0% de suspensiones calentadas a 120 °C ($\Phi = 0.92$) (Lagarrigue et al., 2008).

Cuando el almidón es mezclado con otras macromoléculas, se observa un incremento en ambos módulos, G' y G'' , y en la mayoría de los casos se explica como el hecho de que el almidón disperso se puede considerar un “composito”, en el cual los gránulos hinchados que forman la fase dispersa controlan las propiedades viscoelásticas, mientras que la fase continua normalmente forma una red (Alloncle et al., 1989; Tecante & Doublier, 1999; Loisel et al., 2000).

En el estudio de las propiedades viscoelásticas de mezclas almidón ceroso-proteínas aisladas de suero, con o sin rompimiento del gel, la afinidad de la proteína por el agua le permite establecer una red continua que rodea los gránulos hinchados de almidón. El incremento en los valores de los módulos de almacenamiento y de pérdida al incrementar la concentración de proteína, ha establecido la premisa simple de que los gránulos de almidón están dispersos como partículas de “relleno” a través de una red continua de proteína

después del tratamiento térmico que también afecta el grado de hinchamiento de los gránulos de almidón.

2.10 Referencias Bibliográficas

- Abdulmola, N.A., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (1996). Effect of xanthan on the small-deformation rheology of crosslinked and uncrosslinked waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers* 31, 65-78.
- Acquarone, V.M. & Rao, M.A. (2003). Influence of sucrose on the rheology and granule size of cross-linked waxy maize starch dispersions. *Carbohydrate Polymers* 51, 451-458.
- Alloncle, M. & Doublier, J.L. (1991). Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloid* 5, 455-467.
- Alloncle, M., Lefebvre, J., Llamas, G. & Doublier, J.L. (1989). A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. *Cereal Chemistry* 66, 90-93.
- Ahmad, F.B., Williams, P.A., Doublier, J.L. Durand, S. & Buleon, A. (1999). Physico-chemical characterization of sago starch. *Carbohydrate Polymers* 38, 361-370.
- Aguilera, J. M. & Baffico, P. (1997). Structure–mechanical properties of heat induced whey protein/cassava starch gels. *Journal of Food Science* 62, 1048–1053.
- Bagley, E. B. & Christianson, D.D. (1982). Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration. *Journal of Texture Studies* 13, 115-126.
- Biliaderis, C.G, Page, Ch. M., Terry, J.M. & Bienvenido, O.J. (1986). Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34, 6-14.
- Bower, D. (2002). An introduction to Polymer Physics. Ed. Cambridge University Press. UK. p. 22
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V. & Ball, V. (1998a). Starch granules structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Buleon, A., Gérard, C., Riekkel, C., Voung, R. & Chanzy, H. (1998b). Details of the crystalline ultrastructure of C-starch revealed by synchrotron microfocus mapping. *Macromolecules* 31, 6605-6610.
- Caldwell C., U:S: Pat. 2,461,139, Wurzburg O., U.S. Pat. 2,935,510 (1960).
- Campbell, M. R., (1994). Dossage effect at the sugary-2 locus on maize starch structure and function. *Cereal Chemistry* 71(5), 464-468.
- Chandrasekaran, R. (1998). X-ray diffraction of food polysaccharides. In *Advances in Food and Nutrition Research*, vol 42. Taylor, S.L. (ed). Academic Press, NY. pp. 158,162 y 183.
- Chaisawang, M. & Suphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum. *Food Hydrocolloids* 20, 641-649.
- Choi, S. & Kerr, W. (2004). Effects of chemical modification of wheat starch on molecular mobility as studied by pulsed ¹H NMR. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36, 105-112.
- Donald. A., Waigh, T.A., Jenkins, P.J., Guidley, M.J., Debet, M. & Smith, A., (1997). Internal structure of starch granules revealed by scattering studies. In “Starch: structure and functionality”. P.J. Frazier, A.M. Donald y P. Richmond (eds.) The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp. 172-179.
- Doublier, J.L. (1987). A rheological comparison of wheat, maize, faba bean and smooth pea starches. *Journal of Cereal Science* 5, 247-262.

- Doublier, J.L., Nayouf, M., Tecante, A. & Loisel, C. (2004). Flow and viscoelastic properties of cereal starch/hydrocolloid pastes and gels. In *Starch: From polysaccharides to granules, simple and mixture gels*. Edited by Yuryev V., Tomasik P., Ruck H., Nova Science Publishers, Inc. USA, 2004. pp. 231-244.
- Evans, I.D. & Haisman, D.R. (1979). Rheology of gelatinization of starch suspensions. *Journal of Texture Studies* 10, 347-370.
- Elliason, A.C. (1986). Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch. 1. Comparison of wheat, maize, potato and waxy barley starches. *Journal of texture Studies* 17, 253-265.
- Felton G.E. and Schopmeyer H., U.S. Pat 2,328,537 (1943).
- Fitton, M.G. & Gozme, M. (1988). Procedimiento para la preparación del almidón reticulado. Patente No. 157601. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México.
- Fitzsimons, S., Mulvihill, D. & Morris, E. (2008). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry, *Food Hydrocolloids* 21, 638-644.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research* 127, 342-347.
- Jane, J., Chen, Y.Y., Lee, L.F., McPherson, A.E., Wong, K.S., Radosavlejevic, M. & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content of the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry* 76, 629-637.
- Jenkins, P.J. & Donald, A.M. (1998). Gelatinization of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate Research* 308, 133-147.
- Kraetz, H., Schultz, P., Knospe, K., Schimer, R. & Hanstein, A. (1989) Pat. DD 255080 (1988) *Chemical Abstract* 110: 211303 d.
- Kim, C., Lee, S. & Yoo, B. (2006). Dynamic rheology of rice-starch-galactomannan mixtures in the aging process. *Starch/Stärke* 58, 35-43.
- Kokini, J. L., Lai, L. & Chedid, L. L. (1992). Effect of starch structure on starch rheological properties. *Food Technology* 46(6), 139-142.
- Lagarrigue, S., Alvarez G., Cuvelier G. & Flick, D. (2008). Swelling kinetics of waxy maize and maize starches at high temperatures and heating rates. *Carbohydrate Polymers* 73 (2008), 148-155.
- Langton, M. & Hermansson, A.M. (1989). Microstructural changes in wheat starch dispersion during heating and cooling. *Food Microstructure* 8. 29-39.
- Lai, V. M-F., Huang, A.L. & Lii, C.Y. (1999). Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. *Food Hydrocolloids* 13, 409-418.
- Lai, V.M.E., Wong, P.A-L. & Lii, C-Y. (2000). Effects of cation properties on sol-gel transition and gel properties of κ -carrageenan. *Journal of Food Science* 65, 1332-1337.
- Li, J. & Yeh, A. (2001). Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food Engineering* 50, 141-158.
- Liu, H., Yu, L., Xie, F. & Chen, L. (2006). Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers* 34, 365-375.

- Loisel, C., Tecante, A., Cantoni, P. & Doublier, J.L. (2000). Effect of temperature on the rheological properties of starch/carrageenan mixtures. In "Gums and Stabilizers for the Food Industry 10". P.A. Williams and G.O. Phillips. (eds.) Cambridge, The Royal Society of Chemistry, pp. 181-187.
- Matser, A.M. & Steeneken, P.A.M. (1997). Rheological properties of highly cross-linked waxy maize starch in aqueous suspensions of skim milk components. Effects of the concentration of starch and skim milk components. *Carbohydrate Polymers*, 36, 27-36.
- Mizoguchi N., Yanetani Y. & Yamashita N., Jap. Pat. 04, 91, 744 (92,91,744)(1992); *Chemical Abstract*.117: 68878 g.
- Mizukami, H., Takeda, Y. & Hizukuri, S. (1999). The structure of the hot-water soluble components in the starch granules of new Japanese rice cultivars. *Carbohydrate Polymers* 36, 37-48.
- Mohammed, Z.H., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (1998). Co-gelation of agarose and waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers* 36, 37-48.
- Morris, E.R. (1990). Mixed polymer gels en P. Harris, Food gels. Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 291-359.
- Nayouf, M., Loisel, C. & Doublier, J.L. (2003). Effect of thermomechanical treatment on the rheological properties of crosslinked waxy corn starch. *Journal of Food Engineering* 59, 209-219.
- Parker, R. & Ring, S.G. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science* 34, 1-17.
- Ravindra P., Chan, E.S., Lee, B., & Upender, R.K. (2007). Whey proteins isolate-starch system-A critical review. *International Journal of Food Engineering* 3(6), Article 1. Available at: <http://www.bepress.com/ijfe/vol3/iss6/art1>
- Ravindra, P., Genovese, D. B., Foegeding, E. A. & Rao, M. A. (2004). Rheology of heated mixed whey protein isolate/cross-linked waxy maize starch dispersions. *Food Hydrocolloids*, 18, 775-781.
- Shim, J. & Mulvaney, S.J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/ whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 706-717.
- Singh, J., Singh, N., Kaur, L., Singh, N.S. & Singh, B.G. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry* 81, 219-231.
- Singh, N., Kaur, L., Singh, K.S. Kaur, J. & Nishinari, K. (2006). Relationships between physicochemical morphological, thermal and rheological properties of rice starches. *Food Hydrocolloids* 20, 532-542.
- Singh, J., Kaur, L. & McCarthy, O.J. (2007). Factors influencing the physicochemical morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. *Food Hydrocolloids* 21, 1-22.
- Steeneken, P.A.M. (1989). Rheological properties of aqueous suspensions of swollen starch granules. *Carbohydrate Polymers* 11, 23-42.
- Takeda, Y., Shibahara, S. & Hanashiro, I. (2003). Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. *Carbohydrate Research* 338, 471-475.
- Tecante, A. & Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch- κ -carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers* 67, 551-557.

- Tester, R.F., Debon, S.J.J. & Sommerville, M.D. (2000). Annealing of maize starch. *Carbohydrate Polymers* 42, 287-299.
- Tester, R.F. & Karkalas, J. (1996). Swelling and gelatinization of oat starches. *Cereal Chemistry* 73, 271-277.
- Tester, R.F., Karkalas, J. & Xin, Q. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39, 151-165.
- Tester, R.F. & Morrison, W.R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and Lipids. *Cereal Chemistry* 67, 551-557.
- Thomas, D.J. & Atwell, W.A. (1999). Starches practical guides for the food industry. St. Paul. M.N. Egan press Handbook Series AACC, pp.19-22.
- Thompson, D.B. (2000). On the non-random nature of amylopectine branching. *Carbohydrate Polymers* 43, 223-239.
- Vermeulen, R., Derycke, V., Delcour, J.A., Goderis, B., Reynaers, H. & Koch, M.H.J. (2006) Gelatinization of starch in excess water, beyond the melting of lamellar crystallites. A combined wide- and small-angle X-ray scattering study. *Biomacromolecules* 7, 2624-2630.
- Vu Dang H., Loisel C., Desrumaux A. & Doublier J.L. (2009). Rheology and microstructure of cross-linked waxy maize starch/whey protein suspensions. *Food Hydrocolloids* 23, 1678-1686.
- Whistler, R.L. & BeMiller, J.N. (1997). Carbohydrate Chemistry for Food Scientist. St. Paul. MN Egan Press, pp-65.
- Wurzburg, O. (1972). Starch in the food industry. Handbook of Food Additives, 2nd ed. (Furia, T. E. ed.) CRC Press, Cleveland.
- Wurzburg, O. (1986). Crosslinked starches. Modified Starches: Properties and Uses (O.B. Wurzburg, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL.
- Yang, H., Irudayaraj, J., Otgonchimeg, S. & Walsh, M., (2004) Rheological study of starch and dairy ingredient-based food systems. *Food Chemistry* 86, 571-578.
- Yu, L. & Christie, G. (2001). Measurement of starch thermal transition using differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers* 46, 179-184.

3. PROTEÍNA AISLADA DE SUERO LÁCTEO

3.1 Proteínas de la leche

La leche de bovino contiene numerosas proteínas clasificadas en dos grandes grupos: Las caseínas insolubles a pH 4.6 y 20 °C y las proteínas del suero. La leche tiene un contenido de proteína expresado como N x 6.38, de 30-35 g proteína/litro. Cerca de 78% de estas proteínas son caseínas, las cuales consisten en cuatro principales componentes, α_{s1} , α_{s2} , β y κ . En la leche, estas caseínas están organizadas en forma de micelas, las cuales son complejos esféricos, cuyo diámetro varía entre 50 y 600 nm, con un promedio de 120 nm, que contienen 92% de proteína y 8% de sales inorgánicas, principalmente fosfato de calcio (Swaisgood, 1992; Rollema, 1992). La estructura de las micelas no está totalmente establecida y todavía es materia de controversia entre los partidarios del modelo submicelar y los del modelo núcleo-cubierto. Las micelas de caseína se disocian al remover el calcio coloidal con quelantes de calcio (fosfato, citrato, EDTA) o por acidificación. Los quelatos son parcialmente responsables del color blanco de la leche. Su estabilidad resulta del potencial zeta (aproximadamente -20 mV) y del impedimento estérico causado por segmentos sobresalientes C-terminal de la κ -caseína, la cual previene el acercamiento de las micelas. La remoción de estos segmentos sobresalientes por la quimosina, la principal enzima presente en el estómago de un ternero recién nacido da como resultado la coagulación de micelas alteradas de caseína. La integridad de las micelas de caseína es también afectada por el enfriamiento; a temperaturas inferiores a 4 °C, la β -caseína y el fosfato de calcio se liberan dentro de la fase sérica de la leche. Esto ocurre cuando se aplican altas presiones hidrostáticas (Schmidt, 1970) o con altas concentraciones de sal.

La fracción de la proteína de suero contiene numerosas unidades proteínicas. Los principales componentes en la leche de bovino son la β -lactoglobulina (β -Lg), la α -lactalbúmina (α -La), la seroalbúmina bovina (BSA) y las inmunoglobulinas (Ig), que representan aproximadamente 2.7, 1.2, 0.25 y 0.65 g/L, respectivamente (Alais, 1984). Hay otras proteínas menores, que incluyen la lactoferrina (Lf), enzimas como la lipasa, lipoproteína, fosfatasas ácidas y alcalinas, lisosima, xantina oxidasa, lactoperoxidasa,

catalasa, dismutasa superóxido, y α -amilasa, entre otras, factores de crecimiento y hormonas (Alais, 1984). La fracción de proteínas del suero de la leche humana es muy diferente a la leche de bovino (Tabla 2), ya que no contiene β -Lg pero es muy rica en α -La, en Lf, lisozima y factores estimulantes como factor de crecimiento bifidus, factor de crecimiento de la epidermis, bombesina y factores de crecimiento de insulina, entre otros (Fox, 1992).

Tabla 2. Composición proteínica de la leche de vaca (Grasselli et al., 1997).

Proteína	Leche de vaca (g/100 ml)
Caseína	2.8
α -lactalbúmina	0.12
β -lactoglobulina	0.30
Inmunoglobulinas	0.05
Lactoferrina	0.02
Lactoperoxidasa	0.03
Totales	3.4

Las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son muy amplias. La más usual es la deshidratación, por aspersion, para obtener suero en polvo o concentrados de proteína de suero (WPC por sus siglas en inglés, “whey protein concentrate”). En el primer caso, el suero es deshidratado directamente, mientras que en el segundo, el suero es previamente enriquecido en proteína, eliminando sales y lactosa mediante tecnología de ultrafiltración. La ultrafiltración se caracteriza por poseer un espectro de corte que va de 3000 a 100000 kDa. El corte más común para sistemas de lechería es 10000 kDa. Este es el tamaño de poro tradicional para separar las proteínas del suero de la lactosa para producir WPC desde 35 a 85% de pureza. Durante el proceso de ultrafiltración las proteínas del suero no se desnaturalizan, por lo que sus propiedades funcionales permanecen intactas. La innovación tecnológica en este ramo es la nanofiltración, que comenzó a aplicarse en el mercado industrial en la década de los noventa y desde entonces ha tenido un gran auge. Entre los productos proteínicos del suero, además de los concentrados con distintas proporciones de proteína, también se encuentran los aislado de proteínas (WPI, por sus siglas en inglés, “whey protein isolate”) y proteínas aisladas como la α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas. Todos estos productos se obtienen por diafiltración o cromatografía de intercambio iónico.

3.2 Propiedades funcionales de las proteínas lácteas

Para explicar el complejo comportamiento funcional de las proteínas lácteas se presenta un esquema (Figura 13) que muestra los diferentes factores que afectan a estas propiedades.

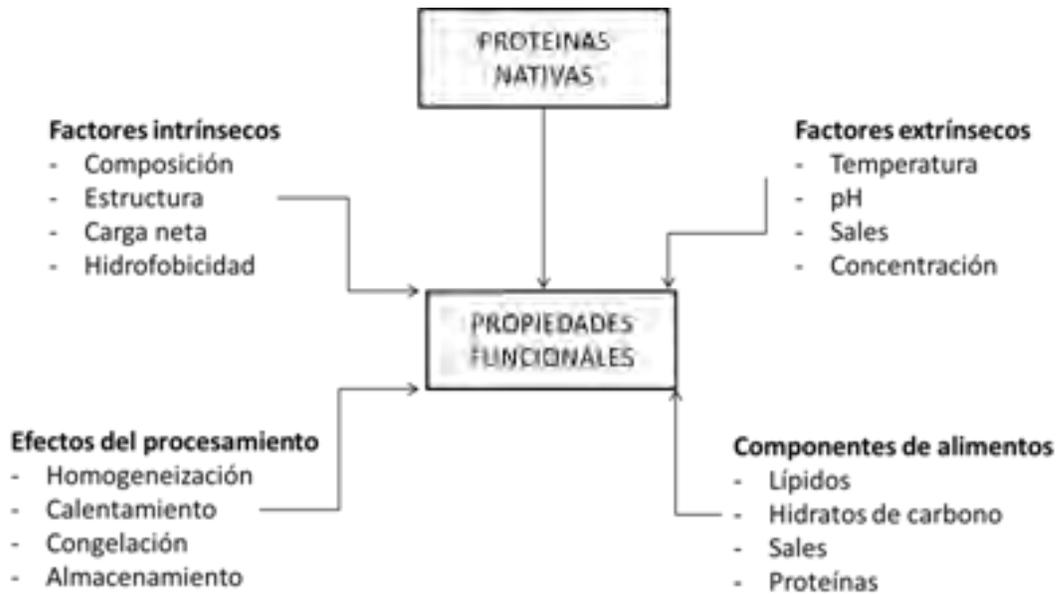


Figura 13. Esquema de los factores que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero (de Wit, 1998).

Las proteínas nativas, tal y como son sintetizadas en la vaca, (parte superior de la Figura 13) poseen un número de propiedades funcionales en solución acuosa (parte central de la Figura 13) las cuales son modificadas durante el procesado de los alimentos. En esta secuencia, las propiedades funcionales son el resultado de propiedades intrínsecas de las proteínas nativas y de un número de factores extrínsecos. El conocimiento de la relación de las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales y concentración de proteína es muy importante para deducir y controlar las propiedades funcionales. Estas características funcionales, sin embargo, dan información sobre la historia del proceso y la composición del suero proteínico involucrado en el producto. Además, las propiedades funcionales definen el comportamiento de las proteínas de suero en los alimentos y reflejan la manera en la cual las proteínas interactúan

con otros componentes de un alimento, tales como lípidos, azúcares, sales y otras proteínas, como se indica en la Figura 13.

Estas interacciones son gobernadas por los efectos del procesado y de las condiciones de almacenamiento. Así casi todas las aplicaciones requieren atributos funcionales específicos para obtener el comportamiento deseado, el cual es usualmente alcanzado por prueba y error. Las proteínas del suero son muy utilizadas como ingredientes en alimentos debido a sus propiedades funcionales únicas: emulsificación, gelificación, espumado, capacidad de retención de agua, entre otras. Pero además, la demanda actual no tiene que ver sólo con ingredientes funcionales, sino también saludables.

Tabla 3. Funcionalidad y aplicación de las proteínas del suero en alimentos.

Función	Mecanismo	Alimento
Solubilidad	Hidrofobicidad	Bebidas
Gelificación	Retención e inmovilización de agua, formación de red.	Carnes, geles, quesos, productos de panificación
Cohesión-adhesión	Uniones hidrofóbicas, iónicas y puentes de hidrógeno	Carnes, salsas, productos de panificación
Emulsificación	Adsorción y formación de películas en la interfase	Salsas, sopas, aderezos.
Espumado	Adsorción interfacial y formación de películas	Coberturas para pasteles, helados, postres.
Ligante de grasa y sabor	Retención, uniones hidrofóbicas	Roscas rellenas de mermeladas, productos de panificación bajos en grasa

3.3 β -lactoglobulina

Como se mostró en la Tabla 3, la β -lactoglobulina (β -lg) es la proteína más abundante del suero lácteo (50-65% del suero y 7-12% del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de alrededor 18.4 kDa. Existen diferentes variantes genéticas de la β -lg, entre ellas las más abundantes son la variante A y la B (Eigel et al., 1984). Estas variantes difieren de la sustitución de una glicina en la variante B por un ácido aspártico de la

variante A (Kilara & Vaghela, 2004). Ambas estructuras están estabilizadas por dos uniones disulfuro (entre Cys 160-Cys 66 y Cys 119- Cys 106) y también contienen un grupo sulfhidrilo libre (Cys 121). A pesar de diferencias menores en la composición de aminoácidos entre las diferentes variantes genéticas, todas poseen un alto contenido de aminoácidos esenciales (Phillips et al., 1994). En la Figura 14 se muestra la estructura primaria de la variante A de la β -lg.

1	Leu	Ile	Val	Thr	Gln	Thr	Met	Lys	Gly	Leu	Asp	Ile	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Thr	Thr	Trp
21	Ser	Leu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Arg
41	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Gln	Lys
61	Asp	Glu	Asn	Asp	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Lys	Ile	Ile	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala
81	Val	Phe	Lys	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Lys
101	Lys	Thr	Leu	Leu	Phe	Cys	Met	Glu	Asn	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Leu	Val	Cys	Gln
121	Cys	Leu	Val	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu
141	Lys	Ala	Leu	Pro	Met	His	Ile	Arg	Leu	Ser	Phe	Asn	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys
161	His	Ile	OH																	

Figura 14. Estructura primaria de la β -lg bovina A. Se indica la ubicación de las sustituciones de distintas variantes genéticas (Kilara & Vaghela, 2004).

La β -lg ha sido estudiada mediante dicroísmo circular y espectroscopia infrarroja para determinar su estructura secundaria. Contiene 10-15% de estructura α -hélice, 43% de regiones β -planas y 47% de estructura desordenada (Timasheff et al., 1966). Verheul et al. (1999) describen el monómero de la β -lg como una estructura esférica de 4 nm de diámetro. La estructura nativa de una proteína es una red tridimensional que resulta de un balance de varias fuerzas atractivas y repulsivas que ocurren entre diferentes partes de la cadena polipeptídica y entre la cadena polipeptídica y las moléculas de disolvente (Relkin & Launay 1990). La conformación tridimensional de la β -lg nativa se muestra en la Figura 15 (Phillips et al. 1994). La presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre le imparte a la molécula de la β -lg una estructura espacial rígida.

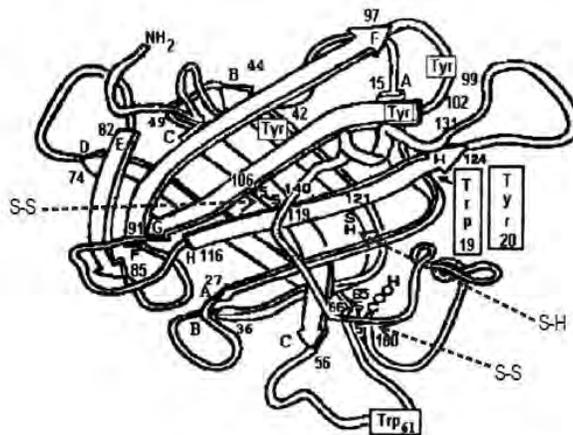


Figura 15. Estructura tridimensional de la β -lactoglobulina bovina. Las flechas indican las zonas planas β , nominada con letra. También se indica la ubicación de las uniones disulfuro (S-S) y del grupo tiol libre (S-H) (Phillips et al., 1994).

Existe un acuerdo general sobre la ubicación de uno de los grupos disulfuro (Cys 66-Cys 160), pero la ubicación del otro no es precisa, pudiendo estar localizado entre los residuos Cys 106 y Cys 119 o Cys 121 (Relkin et al., 1990). Por último, la posición del grupo tiol libre es también imprecisa y parece estar repartida entre los residuos Cys 119 y Cys 121. La conformación de la molécula de la β -lg es fuertemente dependiente del pH. Según la conformación, el grupo tiol estará más o menos accesible y podrá participar en los intercambios de uniones disulfuro que condicionan numerosas características y en particular la solubilidad. El punto isoeléctrico (pI) de la β -lg se encuentra entre 4.6 y 5.2 según la variante genética (Barnett & Bull, 1960; Bromley et al., 2005; Das & Kinsella, 1989; Harnsilawat et al., 2006; Haug et al., 2009; Townsend et al., 1964). Por abajo de pH 3 y por encima de pH 7, la β -lg existe como monómero. Entre pH 3.1 y 5.1 a bajas temperaturas y altas concentraciones de proteína, la β -lg se asocia en forma octamérica. Esta polimerización se da por medio de los grupos carboxilo, de esta manera, la variante A tiene más posibilidad de formar octámeros que la variante B por la presencia de un ácido aspártico más, en el lugar que la variante B tiene glicina. A otros valores de pH, incluyendo el pH natural de la leche (pH 6.5), la β -lg se presenta generalmente en forma dimérica (Kilara & Vaghela, 2004). Esta asociación entre monómeros de β -lg se debe a interacciones electrostáticas entre los residuos Asp 130 y Glu 134 con los residuos de lisina en la molécula vecina.

La disociación del dímero en monómeros de β -lg a pH mayor que 7, coincide con un aumento en la actividad del grupo tiol. Por lo tanto, los reactivos que estabilizan la conformación nativa o asociada en dímeros de β -lg, podrían reducir la actividad del grupo tiol libre, al quedar ocultos en el interior de las moléculas asociadas. La asociación que se da entre las moléculas de proteína en diferentes condiciones del medio, afecta la estabilidad de la misma frente a la desnaturalización irreversible, ya que limita la exposición de grupos ocultos (disulfuro y tiol) en las zonas de unión de las moléculas, y la consiguiente formación de enlaces covalentes entre las moléculas parcialmente desplegadas.

3.3.1 Propiedades funcionales de la β -lg

Aunque la β -lg tiene una importante cantidad de residuos hidrofóbicos, es una proteína muy soluble en agua ya que la mayoría de los residuos no polares están ocultos en el interior de la molécula y la mayoría de los grupos polares están expuestos en su superficie (Mangino, 1984). Además, relacionado con esta alta solubilidad en agua, la β -lg es muy activa superficialmente, lo que le proporciona buenas propiedades espumantes y emulsificantes. Sin embargo, las propiedades superficiales dependen mucho del estado de desnaturalización de la proteína; por lo tanto, estas propiedades se ven modificadas por condiciones del medio como el pH y la fuerza iónica (Cayot & Lorient, 1996). La capacidad de ligar agua y estabilizar productos luego de la cocción como por ejemplo, emulsiones cárnicas y salsas cuando el pH es cercano a la neutralidad. La ausencia de sinéresis en productos hidratados es un criterio muy importante de calidad en la aceptación de un producto, por lo tanto, esta característica de la β -lg es de suma importancia. La capacidad gelificante de la β -lg la ubica entre las proteínas más estudiadas. La gelificación de esta proteína puede lograrse por adición de sales y enzimas a una solución de β -lg concentrada; el valor de concentración crítica para la gelificación depende del pH, a pH extremos o por calentamiento (Clark et al., 2001; Kilara & Vaghela, 2004).

3.4 α -lactalbúmina

El segundo componente más importante es la α -lactalbúmina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 14 500 Da con homologación de la cadena (forma bovina). La estructura del cristal a 0.17 nm de resolución está disponible para la α -lactalbúmina de

babuino (Acharya et al., 1989). La estructura es muy similar a la lisozima; en la región término C es más flexible y se une a un ion calcio. La cadena sencilla de polipéptido de 123 residuos aminoácidos está plegada en forma elipsoidal con dimensiones 2.3 x 2.6 x 4 nm y los elementos de la estructura secundaria incluyen 4 secciones α -hélice (*ca.* 30% hélice) y una sección irregular de hojas β antiparalelas (*ca.* 15% hoja). Recientemente, estudios de espectroscopia Raman (Byler & Susi, 1988) le asignan un contenido más elevado (36 a 41%) para α -lactalbúmina. Como sucede con la β -lg, la α -lactalbúmina de la leche no es conocida con certeza, sin embargo, tiene un papel importante en la síntesis de la lactosa. En solución a bajos valores de pH, la α -lactalbúmina sufre un despliegue, el cual involucra la pérdida de la estructura terciaria tridimensional, pero no hay cambio sustancial en la estructura secundaria y esto ha sido descrito como la forma de “glóbulo fundido” (Damaschun et al., 1986; Gast et al., 1986).

3.5 Seroalbúmina

La seroalbúmina es una proteína globular estudiada desde el punto de vista de su comportamiento en el calentamiento, particularmente como seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés). El peso molecular aproximado es de 66,500 Da y las cadenas sencillas de BSA contienen cerca de 850 residuos entrecruzados por 17 puentes disulfuro (un grupo tiol libre permanece). Se ha logrado observar la estructura cristalina de la seroalbúmina humana (HSA) a 0.4 nm de resolución (Carter y He, 1990) confirmando los resultados obtenidos anteriormente por Brown y Shockley (1982), en los que la molécula de BSA consta de tres dominios estructurales homólogos. La estructura propuesta originalmente para cada dominio fue un cilindro formado por seis hélices α , y este cilindro contiene a su vez subdominios de A y B. La BSA tiene proteínas en forma de hélice (*ca.* 50 y 60% contenido de hélice), sin embargo, el contenido de hojas determinado por dicroísmo circular es de aproximadamente 30% (Byler & Susi, 1988). El estudio de la molécula en solución por dispersión de luz (Benedouch & Chen, 1983) ha sugerido una forma elipsoide compacta, la cual a pH neutro tiene dimensiones asignadas de un elipsoide (a, b, b) con a = 7.0 nm y b= 2.0 nm. Estudios previos realizados por dispersión de luz (Bloomfield,1966) han revelado una expansión considerable de la molécula por debajo de pH 3.6. Esta desnaturalización ácida es bien conocida para la BSA. La función in vivo de la

BSA parece ser la de transportar sustancias (metales y ácidos grasos por ejemplo) en sangre, también establece la presión osmótica del plasma de la sangre.

3.6 Propiedades en solución de proteínas nativas globulares

El primer paso en la preparación de gel de proteínas por calentamiento es disolver la proteína a bajas temperaturas en solución acuosa. Esta solución puede involucrar el control de la fuerza iónica a través de la inclusión de sales, o controlar el pH por medio de una solución buffer o por simple ajuste de pH. La solución es entonces agregada y gelificada por subsecuente calentamiento controlado, con un incremento progresivo de la temperatura a una velocidad predeterminada o a través de una tasa de calentamiento programado. Al inicio, la solución se encuentra con proteínas globulares monoméricas, que se disuelven del estado cristalino y adoptan una geometría tridimensional en la solución cercana a la estructura cristalina. La conformación asumida no difiere mucho de la estructura cristalina, excepto porque la molécula se vuelve más solvatada y más móvil, sin embargo, algunos cambios en la estructura y en la movilidad no son tan grandes. Esto ha sido discutido por Koenig & Frushour (1972) y Frushour & Koenig (1975) en términos de cambios en la espectroscopía Raman de las proteínas como la ribonucleasa, quimiotripsinógeno, ovoalbúmina y β -lactoglobulina.

Una solución de proteína que no esté drásticamente alterada no tiene mayor viscosidad, aún a concentraciones altas debido a su forma plegada (baja viscosidad intrínseca), pero particularmente cuando el estado de carga es alto, estudios por dispersión de luz revelan que hay presentes interacciones significativas proteína-proteína, las cuales gobiernan el arreglo espacial de las moléculas (Matsuoka et. al., 1985). Los efectos de la viscosidad no son pronunciados como resultado de dichas interacciones, por lo que las estructuras fácilmente se rompen. Sin embargo, el carácter viscoelástico de la solución bajo cizallamiento ha sido reportado (Inoue & Matsumoto, 1996) para algunas soluciones de proteínas globulares previas a su conversión por calor, como más geles más fuertes y más estructurados. Soluciones más complejas son también posibles y comunes. El equilibrio de asociación-disociación requerido para los monómeros de β -lactoglobulina ha sido referido como asociaciones de subunidades complejas y disociaciones de globulinas. El equilibrio puede obviamente variar por cambios en el pH y en la fuerza iónica antes de calentar, y sin

embargo, puede ser modificado por los cambios de temperatura aplicados de manera subsecuente. Adicionalmente, el pH induce el despliegue de proteínas monoméricas o también es posible la presencia de unidades disociadas. La expansión inducida por el ácido de las moléculas de seroalbúmina es un ejemplo de esto y la transformación de glóbulo fundido de la α -lactalbúmina es otra. Adicionalmente, el despliegue de la β -lactoglobulina puede ser inducida a pH alcalinos (Frushour & Koenig, 1975). Algunas transformaciones no producen geles debido a la alta carga involucrada, pero representan eventos preliminares que en general modifican un comportamiento subsecuente de una solución en calentamiento. Finalmente, la calidad del disolvente, aparte de su pH y de los efectos de las sales, puede ser determinante en la influencia de las propiedades de la solución, como la denaturalización de la proteína por adición de pequeños componentes moleculares como urea y alcoholes. Es un fenómeno bien conocido del comportamiento de las soluciones de proteínas y la gelificación puede ocurrir a temperatura ambiente.

3.7 Estados desnaturalizados de la proteína

3.7.1 Termodinámica de las proteínas desplegadas

El estado plegado de las proteínas globulares es estable al calentamiento a cierta temperatura, la cual depende de las condiciones ambientales como presión, pH y calidad del disolvente. Arriba de estas temperaturas el despliegue de las proteínas nativas está asociado con una absorción de calor. El análisis termodinámico detallado de los picos de absorción muestra que el repliegue de las proteínas es un proceso cooperativo y hay algunas proteínas globulares que existen en dos estados bien definidos: plegados (P) y desplegados (D). Cualquier estado intermedio es considerado como una población muy escasa, la cual puede ser ignorada. El repliegue de las proteínas es comúnmente aproximado a dos modelos de estado: $P \leftrightarrow D$. Los dominios en las proteínas multidominios usualmente se despliegan independientemente unas de otras, así que pueden ser tratadas como unidades aisladas (Privalov, 1989).

3.7.2 El estado de glóbulo fundido

En la teoría clásica de dos estados en el despliegue de proteínas globulares (Privalov, 1979), la transformación del estado nativo al estado desordenado es un proceso

cooperativo, que ocurre bajo ciertas condiciones de desnaturalización, sin involucrar ciertos estados intermedios. Más recientemente, sin embargo, se ha definido que al menos un intermediario cinético bien definido, existe indudablemente a través de la ruta de repliegue entre los estados desordenados y nativos. El estado de estructura intermedia es caracterizado por una globularidad molecular compacta, teniendo estructuras secundarias en el estado nativo, pero con estructuras terciarias desplegadas, llamado estado de glóbulo fundido (Ohgushi & Wada, 1983). Este estado de glóbulo fundido parece ser relevante en varios aspectos, debido a la funcionalidad de las proteínas globulares, como es la gelificación (Hirose, 1993) y la emulsificación (Dickinson & Matsumura, 1994; Matsumura et al., 1994). La α -albúmina de la leche toma su estado de glóbulo fundido bajo una variedad de condiciones en la solución. Las propiedades del glóbulo fundido de la α -lactalbúmina producidas en un pH ácido (llamado el estado "A") han sido investigadas extensivamente. Los rasgos más primordiales en este estado son:

- i) El estado A no está completamente desplegado y existe en su estado nativo como estructura secundaria.
- ii) El ambiente en las cadenas de la proteína es indicativo de una completa pérdida de la estructura terciaria.
- iii) El estado A es compacto, pero es en cierto modo más expandido que en el estado nativo.
- iv) El estado A tiene una superficie más hidrofóbica que el estado nativo.
- v) La transición térmica del estado A al estado completamente desordenado involucra una cooperatividad no significativa.
- vi) La estructura del estado A posee una flexibilidad conformacional substancial.

De manera general, los rasgos estructurales similares se conservan en el estado de glóbulo fundido formado por calentamiento, adición de desnaturalizantes, formación de enlaces disulfuro o remoción de los iones calcio. El estado de glóbulo fundido puede presentarse por la desnaturalización por calor y la gelificación de proteínas globulares (e.g. β -lactoglobulina). La primera etapa involucra el despliegue parcial de las proteínas, con un incremento en la disponibilidad de grupos hidrofóbicos mientras que se retiene la forma nativa de la estructura secundaria. Las interacciones intermoleculares hidrofóbicas entre grupos expuestos pueden causar la agregación de las moléculas en el estado de glóbulo fundido. Los agregados son fuertemente impulsados por la formación de uniones disulfuro,

vía intercambio sulfhidril-disulfuro o reacciones de oxidación sulfhidrilo. Parecería que el desarrollo de estructuras reológicamente significativas no comienza hasta que la mayoría de las proteínas se ha agregado por la combinación de enlaces covalentes y no covalentes (McSwiney et al., 1994).

3.8 Interacciones entre polímeros naturales

Según las condiciones del medio en que se encuentre la proteína, ésta se comportará de diferentes maneras ante diferentes tratamientos, por ejemplo, el calentamiento, la adición de sales, la mezcla con otros polímeros naturales. Todos estos comportamientos están dados por diferentes tipos de interacciones entre las moléculas proteínicas o entre ellas y las de otros polímeros naturales, como por ejemplo, otras proteínas y polisacáridos. Las interacciones entre estos polímeros naturales involucran diferentes tipos de fuerzas intermoleculares, que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Tipos de fuerzas intermoleculares que contribuyen a las interacciones entre polímeros naturales (Dickinson, 1998; McClements, 2006).

Covalentes: unión muy fuerte formada entre grupos reactivos específicos de diferentes macromoléculas. Por ejemplo, uniones por puentes disulfuro.
Electrostáticas: interacción que puede ser repulsiva o atractiva según las cargas eléctricas sean de signo igual u opuesto, respectivamente. La fuerza de estas interacciones disminuye con el aumento de la fuerza iónica.
Volúmenes de exclusión: es una interacción repulsiva dada por el gran volumen ocupado por algunos polímeros naturales en solución, produciendo un importante efecto sobre la exclusión esférica, es decir hay una reducción en el volumen disponible a ser ocupado por una molécula de polímero natural.
Uniones hidrógeno: interacción atractiva moderadamente fuerte entre átomos de hidrógeno y otros átomos mucho más electronegativos. Las uniones puente de hidrógeno son menos importantes cuando aumenta la temperatura.
Hidrofóbicas: interacción atractiva moderadamente fuerte de origen entrópico entre grupos no polares. Las uniones hidrofóbicas aumentan su fuerza con el aumento de la temperatura.
Puentes iónicos: tipo específico de interacción que involucra la unión de cationes polivalentes (específicamente Ca^{++}) con dos grupos aniónicos diferentes.
Van der Waals: interacción atractiva débil de origen electromagnético entre grupos con dipolos inducidos o permanentes.

Estas interacciones pueden ocurrir tanto en sistemas proteína-proteína como en sistemas proteína-polisacárido. La importancia relativa de estas interacciones en un sistema particular depende del tipo de polímero natural involucrado (peso molecular, densidad de carga en función de pH, flexibilidad, hidrofobicidad), las características de la solución (pH, fuerza iónica) y las condiciones ambientales (temperatura, cizalla) (McClements, 2006). Conociendo y manejando estos parámetros, es posible controlar las interacciones entre los polímeros naturales y por lo tanto, crear atributos funcionales diferentes en un sistema alimentario.

3.9 Interacciones proteína-polisacárido

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos también juegan un papel muy importante en la estructura y estabilidad de muchos alimentos procesados. Las propiedades funcionales de las proteínas, es decir, solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, propiedades gelificantes, espumantes y emulsificantes, se ven afectadas por su interacción con polisacáridos. Las interacciones entre proteínas y polisacáridos se pueden dividir en dos grupos, interacciones atractivas y repulsivas. Estos dos tipos de interacciones entre polímeros naturales son los responsables de la formación de complejos y de la inmiscibilidad de polímeros naturales, respectivamente. Al mezclar una solución de proteínas con una de polisacáridos, se pueden observar algunos de los comportamientos que se representan en la Figura 16.

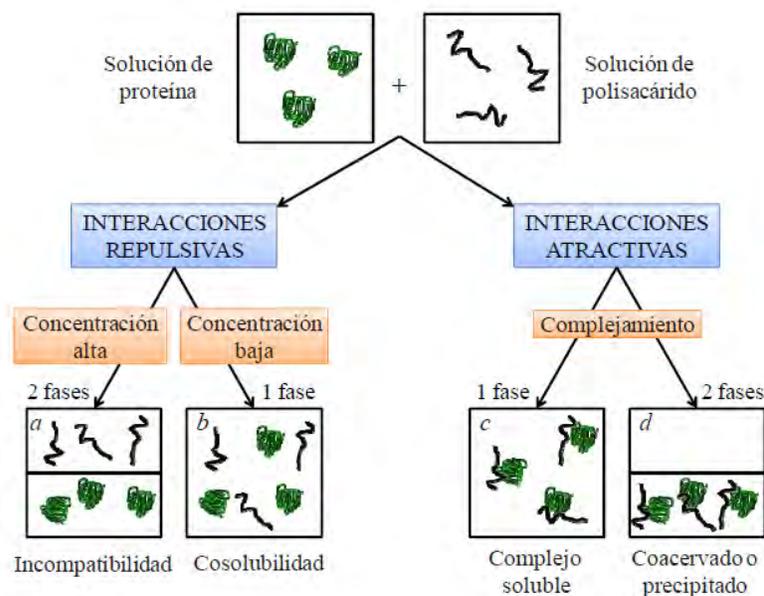


Figura 16. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos al mezclar soluciones de una proteína y un polisacárido (de Kruif & Tuinier, 2001; McClements, 2006).

Las interacciones de los dos polímeros naturales puede ser segregativa o asociativa; en la primera, los polímeros naturales se repelen entre sí y entonces se definen como incompatibles. En la segunda, los polímeros naturales se atraen entre sí formando complejos (de Kruif & Tuinier, 2001; McClements, 2006; Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 2003). En soluciones diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado, y la proteína y el polisacárido son cosolubles; sistema b. Cuando se aumenta la concentración de los polímeros naturales pueden ocurrir fenómenos de asociación o segregación. En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los distintos polímeros naturales (los polímeros naturales poseen carga neta opuesta), puede producirse la formación de complejos no solubles que precipitan, obteniéndose dos fases separadas: una fase “coacervada” que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja concentración de ambos polímeros naturales. Este fenómeno se llama “coacervación compleja” y es un fenómeno de acomplejamiento, sistema d. En ciertos casos las atracciones electrostáticas pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase. En este caso estamos en presencia del efecto de solubilidad por acomplejamiento, sistema c. Por último, en condiciones donde predominan las fuerzas de repulsión entre los polímeros naturales (ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases (emulsión agua en agua), en el cual ambos componentes macromoleculares están concentrados en diferentes fases. Esto se debe a la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos en medio líquido, entonces estamos en presencia del fenómeno de segregación: sistema a.

La diferencia entre los sistemas líquidos de dos fases a y d reside en que en los distintos sistemas, los polímeros naturales están concentrados juntos en una fase inferior (d) o en diferentes fases (a).

Todos los sistemas descritos de soluciones mixtas (estados estables o de fases separadas), difieren en estructura y propiedades, por lo tanto también variarán las propiedades funcionales de los sistemas de los que forman parte (Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 1990; Tolstoguzov, 1991; Tolstoguzov et al., 1985). Entonces, las soluciones acuosas de mezclas de polímeros naturales, son susceptibles a la separación de fases por dos de los siguientes mecanismos i) coacervación compleja o ii) incompatibilidad termodinámica.

i) Coacervación compleja

Como lo definió originalmente (Bungenberg de Jong, 1949), la coacervación compleja es una separación espontánea de un sistema de dos fases líquidas. La fase más concentrada en polímeros naturales es el coacervado y la otra fase es la solución en equilibrio. La separación de fase asociativa de dos polímeros naturales en agua, ocurre si existe una atracción electrostática. La coacervación compleja es causada por la interacción de dos polímeros naturales con cargas opuestas (de Kruif et al., 2004), esto se origina en condiciones donde se favorece la atracción entre los dos tipos de macromoléculas. Esto es, a pH por debajo del pI de la proteína y a baja fuerza iónica. La formación de estos complejos es usualmente reversible, dependiendo de las condiciones del medio. Las interacciones atractivas no específicas, se dan como resultado de múltiples interacciones químicas entre grupos laterales de los polímeros naturales: iónicos, dipolares, van der Waals, puente de hidrógeno, hidrofóbicas. Las atracciones más fuertes pueden ocurrir entre los grupos positivamente cargados de la proteína ($\text{pH} < \text{pI}$) y polisacáridos aniónicos, especialmente a bajas fuerzas iónicas y las atracciones débiles se dan entre grupos no cargados o negativamente cargados de las proteínas ($\text{pH} > \text{pI}$) y polisacáridos (Dickinson, 1993). Durante la formación de complejos electrostáticos, la carga neta de los polisacáridos aniónicos va disminuyendo a medida que estos se acomplejan a los grupos polares de las proteínas. Esta disminución de carga neta opuesta reduce la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo resultante. La formación de complejos solubles ocurre generalmente cuando la relación entre los reactivos está lejos de la necesaria para que las cargas opuestas sean equivalentes (Baeza, 2003).

Las partículas dispersas de complejos no solubles se agregan y precipitan. La agregación de estos complejos en solución se da mediante uniones puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo (Baeza, 2003). Existe una relación entre la formación de complejos con la composición, la estructura y las propiedades de los polímeros naturales. Los polímeros naturales se ponen en contacto durante el acomplejamiento y forman zonas de unión que son regiones donde se juntan segmentos de dos o más moléculas de diferentes polímeros naturales. La heterogeneidad de las zonas de unión entre términos de tamaño y estabilidad se debe a diferencias en la estructura química, el tamaño y la forma de las cadenas que interactúan (Tolstoguzov, 1993; Tolstoguzov, 1994). El área de contacto entre moléculas de proteínas globulares está limitada por su

topografía. La conformación rígida y compacta de las proteínas globulares restringe el número de grupos con cargas opuestas capaces de interactuar unos con otros. El número de posibles zonas de unión en proteínas esféricas como las globulares (por ejemplo la β -Lg) es menor que para otras proteínas con estructuras más desordenadas y flexibles, e.g. polisacáridos aniónicos lineales (Tolstoguzov, 1997). Los principales usos de los complejos son como reemplazantes de grasa, debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Además, se utilizan los complejos texturizados en forma de fibra para la obtención de análogos de carne bajos en grasa. Los complejos también se utilizan en la producción de películas comestibles, que poseen varias ventajas respecto a películas formadas con un solo polímero natural (Baeza, 2003).

ii) Incompatibilidad termodinámica

Por el contrario, en el fenómeno de incompatibilidad termodinámica, existe una separación espontánea en dos fases también pero en este caso, una es predominantemente rica en proteína y la otra rica en polisacárido (Tolstoguzov, 1991). Generalmente, esta separación ocurre cuando la concentración total de componentes macromoleculares excede 4% (Tolstoguzov, 1986). Incluso a concentraciones totales de 1%, se han observado fenómenos segregativos en algunas soluciones mixtas de polisacáridos y proteínas (Doublier et al., 2000). La presencia de una interacción repulsiva desfavorable (endotérmica) entre segmentos químicamente diferentes de polímeros en solución, conduce a una alta probabilidad de exclusión mutua de cada componente polimérico. La incompatibilidad de los polímeros naturales depende de la intensidad de las interacciones entre ellos, entre las moléculas de cada uno consigo mismas y con el disolvente (diferencias en la hidrofiliidad de los polímeros naturales) y se origina bajo ciertas condiciones, las cuales inhiben la formación de complejos entre polímeros naturales. A una concentración total de polímero natural moderada, la separación del sistema en dos fases depende de la carga del polímero natural, del pH y la fuerza iónica (Alves et al., 1999). La incompatibilidad se favorece a alta fuerza iónica o a valores de pH mayores que el pI de la proteína. Además, la incompatibilidad puede aumentar por el efecto de otros factores: i) el aumento de peso molecular y la rigidez estructural de los polímeros naturales; ii) la desnaturalización de proteínas globulares debido al incremento de la hidrofobicidad y el

tamaño de las cadenas polipeptídicas agregadas; iii) el aumento de la concentración de sales y de la temperatura (Tolstoguzov, 1997).

La estructura química de los polisacáridos es el factor que más afecta la incompatibilidad y la separación de fases en sistemas de proteínas y polisacáridos. La incompatibilidad disminuye en el siguiente orden: polisacáridos con grupos carboxilo, polisacáridos neutros (galactomananos como goma tara, goma guar, goma de algarrobo), polisacáridos con grupos sulfato (polielectrolitos como alginatos, agar, carragenanos, pectinas). Además, los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). La incompatibilidad termodinámica también varía por la presencia de otros componentes como moléculas lipofílicas y moléculas de sacarosa, los cuales presentan en general un efecto negativo y positivo, respectivamente (Semenova, 1996).

El comportamiento de incompatibilidad se representa en la Figura 17, donde se muestra el diagrama de fases (Grinberg & Tolstoguzov, 1972; Tolstoguzov et al., 1985; Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Polyakov et al., 1997; Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 2001). La línea gruesa es la curva binodal, y marca el límite de cosolubilidad de los polímeros naturales. Cuando la composición del sistema, respecto a los dos polímeros naturales, se encuentra por debajo de la curva binodal, el sistema permanece como una fase simple homogénea (sistema b de la Figura 16). En cambio, cuando la composición de un sistema se encuentra por encima de la curva binodal, es inestable y se separa en dos fases líquidas, una rica en proteína y la otra en polisacárido; sistema a de la Figura 16 (Dickinson & McClements, 1995; Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 2003). El concepto de curva binodal está definido por Teraoka (2002), el cual menciona que es la curva de equilibrio de fases que delimita el campo de existencia de los sistemas heterogéneos. Está descrita por el conjunto de puntos que cumplen la condición de igualdad de potenciales químicos en ambos componentes en ambas fases. Su posición depende del peso molecular del polímero. Las mezclas cuya composición se encuentra dentro de la curva binodal, se separan en dos fases líquidas de composiciones coincidentes con la curva.

Se han reportado una gran cantidad de diagramas de fases para sistemas mixtos de proteínas y polisacáridos (Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 1997). Las diferencias en volúmenes de exclusión entre los polímeros naturales incompatibles afecta el resultado de la competencia entre los polímeros naturales en el seno de la fase. Esta competencia entre los polímeros naturales o un fenómeno de exclusión mutua entre las

macromoléculas contribuye a la asimetría de los diagramas de fase en sistemas de proteínas y polisacáridos (Tolstoguzov, 1997). El grado de asimetría de los diagramas de fase, refleja una mayor hidrofiliicidad y un volumen efectivo superior de los polisacáridos (especialmente para los lineales) comparado con las moléculas compactas de proteínas globulares. De acuerdo a esto, una fase menos concentrada rica en polisacárido se encuentra en equilibrio con una fase más concentrada rica en proteína. En muchos casos, la concentración de proteína se ve aumentada de modo que gelifica.

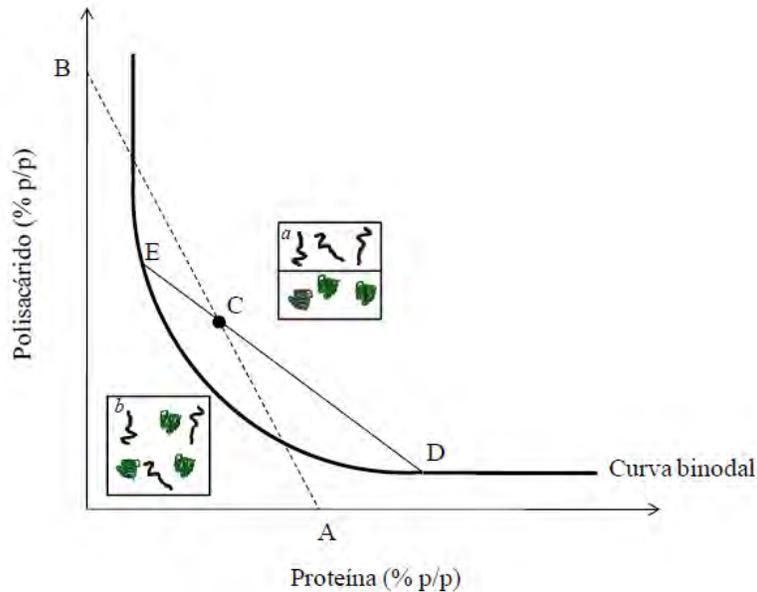


Figura 17. Representación esquemática de un diagrama de fase típico de una solución acuosa de proteína y polisacárido, mostrando la posición de la curva binodal. Se incluye el comportamiento descrito en la Figura 16 de los sistemas por debajo y por encima de la curva binodal.

3.10 Gelificación por calor de proteínas globulares

La Figura 18 muestra un esquema del fenómeno de gelificación para proteínas globulares. Se pueden caracterizar varias etapas (Foegeding & Hamann, 1992):

- i) La proteína se desnaturaliza por acción del calor.
- ii) Las moléculas proteínicas desnaturalizadas interaccionan entre sí generando agregados.
- iii) Luego de un cierto tiempo se llega al “punto de gel”, donde la interacción entre agregados es suficientemente importante como para generar una matriz primaria, que exhibe propiedades de sólido viscoelástico. Estas propiedades pueden ir cambiando

con el tiempo y con el enfriamiento, hasta formar la matriz de equilibrio o sea la estructura final del gel.

Existen básicamente dos teorías para describir la gelificación: la teoría de Flory-Stockmayer (1953; 1974) y la teoría de la percolación atribuida a De Gennes (1979). Según el modelo de Flory-Stockmayer, la gelificación es un evento súbito que ocurre cuando es alcanzado cierto grado de entrecruzamiento entre el polímero, valor crítico llamado punto de gel, en el cual la viscosidad diverge al infinito. En la teoría de la percolación, se considera que los monómeros forman agregados pequeños y que en un cierto momento, se llega al punto de gel en el cual los agregados se entrecruzan. El fenómeno mostrado en la Figura 18 puede ser visto desde el punto de vista reológico como la transición de una solución (sol), que va aumentando su viscosidad mientras se forman los agregados proteínicos, a la formación de un sólido viscoelástico (gel) (Baeza, 2003). La desnaturalización de las proteínas del suero se puede describir como un proceso de dos etapas: i) un despliegue de la molécula de proteína, el cual puede ser reversible o irreversible y ii) una agregación irreversible (de Wit & Klarenbeek, 1981; Mulvihill & Donovan, 1987).

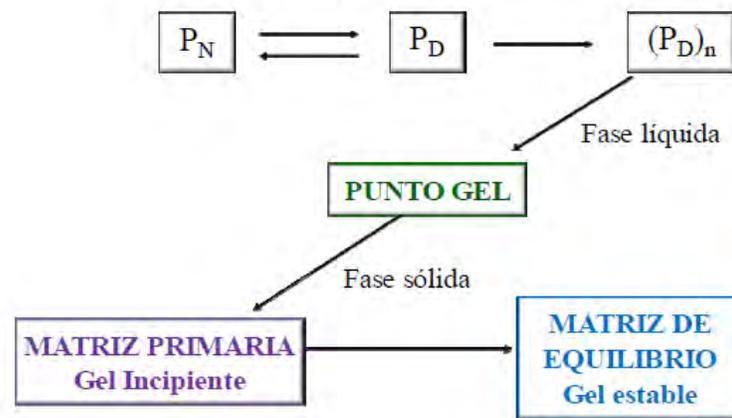
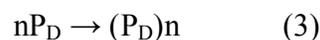
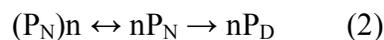


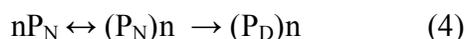
Figura 18. Esquema del proceso de gelificación, involucrando la desnaturalización y la agregación proteínicas.

El mecanismo aceptado clásicamente para describir la desnaturalización y la agregación de proteínas globulares es el siguiente (Morr & Ha, 1993)



donde P_N es la proteína nativa, P_D es la proteína desnaturalizada y n es un número pequeño de subunidades o monómeros de proteína. Las reacciones iniciales (2) de este proceso implican un debilitamiento y ruptura de uniones disulfuro e hidrógeno, de modo que se altera la conformación nativa de la proteína y se disocian agregados proteínicos.

La segunda etapa (3), si el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína son suficientes, es una polimerización de moléculas de proteína disociadas y desplegadas para producir una estructura tridimensional (gel) mediante la formación de enlaces intermoleculares de tipo disulfuro, hidrofóbicos o electrostáticos (Mangino, 1984; Morr & Ha, 1993). Si bien el estado gelificado final está formado por agregados de proteína principalmente desnaturalizada ($(P_D)_n$), no se sabe ciertamente cuál de las siguientes reacciones está implicada:



Según se produzca una u otra reacción, el tipo de uniones que forman los agregados y el tamaño y forma de los mismos será diferente, produciendo así diferentes tipos de geles.

La reacción (4) ocurre en condiciones que favorecen las interacciones proteína-proteína en solución. Estas condiciones pueden ser pH cercano al pI de la proteína, presencia de una considerable concentración de sales o a bajas temperaturas de calentamiento (Verheul et al., 1999). Este tipo de reacción puede dar lugar a la formación de agregados de proteína previamente a la desnaturalización (Baeza, 2003) y luego se dará la desnaturalización de los agregados formados. La reacción (5) se da por calentamiento en condiciones más favorables a la desnaturalización o desdoblamiento de la proteína, que a la agregación de la misma; pH por encima del pI de la proteína, fuerzas iónicas débiles, presencia de ciertos tipos de iones, presencia de agentes disociantes como la urea o detergentes, altas temperaturas de calentamiento. En estas condiciones durante el calentamiento, se liberan los grupos tiol internos y se promueve la formación o intercambio de uniones disulfuro entre moléculas vecinas, lo que lleva a la formación de agregados lineales. El calentamiento además favorece las interacciones hidrofóbicas, ya que también se activan grupos hidrofóbicos antes ocultos en el interior de la molécula proteínica. La formación de la red tridimensional final, implica también enlaces puente de hidrógeno que se favorecen durante el enfriamiento. Además, desde el punto de vista microestructural los geles se pueden clasificar en geles formados por una red de filamentos finos y geles agregados o particulados (Pilosof, 2000).

El hecho de que se forme uno u otro tipo de gel, se relaciona con que las condiciones mencionadas anteriormente den lugar a la reacción (5) y (4), respectivamente. Así, los geles de filamentos finos están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño, de tal forma que estos geles son transparentes, mientras que los geles agregados se forman a partir de una agregación desordenada, son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua. Las diferencias en las interacciones moleculares y en el equilibrio de las fuerzas atractivas y repulsivas dependientes de las condiciones del medio mencionadas anteriormente, se reflejan en la apariencia macroscópica de los geles de proteínas globulares. En la Figura 19 se muestra un esquema de los dos tipos de geles mencionados anteriormente.

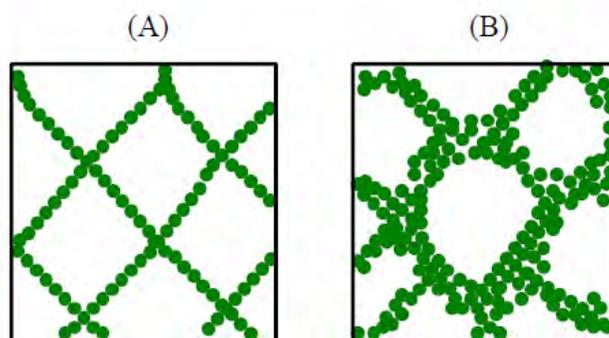


Figura 19. Esquema de los diferentes tipos de microestructura de geles de proteínas globulares: (A) de filamentos finos (B) geles agregados o particulados (Pilosof 2000).

Todo lo mencionado hasta aquí respecto al fenómeno de gelificación está definido por la interacción proteína-proteína. Sin embargo, los geles de proteínas pueden formarse también en presencia de otros polímeros naturales como polisacáridos, sean o no gelificantes. Este fenómeno está dado a partir de ciertos tipos de interacciones proteína-polisacárido ilustrados en la Figura 16. La mayoría de los estudios de gelificación de mezclas de proteínas y polisacáridos se dan en condiciones de incompatibilidad termodinámica (Fernandes, 1994; Syrbe et al., 1995; Ndi et al., 1996; Zasypskin et al., 1996; Walkenstrom et al., 1998; Beaulieu et al., 2001; Turgeon & Beaulieu, 2001). La presencia de polisacáridos en estos sistemas se pone en evidencia de diferentes formas: disminución de la concentración de proteína mínima necesaria para gelificar o concentración crítica (Ndi et al., 1996; Zasypskin et al., 1996; Turgeon & Beaulieu, 2001), disminución de la temperatura o tiempo de gelificación respecto a los geles de proteína sola (Bryant & McClements, 2000), modificación en la textura de los geles obtenidos (Olsson et al., 2002; Zasypskin et

al., 1996), cambios en la microestructura del gel, es decir, geles particulados o filamentos finos (Olsson et al., 2002 ; Zasytkin et al., 1996), modificación de la apariencia y de la capacidad de retención de agua de los geles (Beaulieu et al., 2001; Olsson et al., 2002). En presencia de polisacáridos no gelificantes, se obtienen geles en los cuales el polisacárido se encuentra disperso en la fase acuosa de la matriz gelificada de proteína o en forma de relleno (Baeza, 2003). Aún sin que se produzca una separación macroscópica de fases, la existencia de interacciones repulsivas entre proteína y polisacárido, puede producir importantes efectos en la cinética de gelificación de uno o ambos componentes, así como en la microestructura y reología del gel resultante (Dickinson, 1993).

3.11 Caracterización del fenómeno de gelificación

La esencia del fenómeno de gelificación es sin duda el punto de gel, es decir el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido. Esto indica que las propiedades que caracterizan esta transición son fundamentalmente mecánicas. Pero el método para determinarlas debe cumplir ciertos requerimientos: la medición debe ser muy rápida, no debe perturbar el sistema fuera del intervalo de la respuesta lineal, debe proveer magnitudes físicas objetivas e indicadoras de las características de la red formada y con una base teórica (Pilosof, 2000). Estos requerimientos eliminan a los métodos transitorios como las mediciones de fluencia (creep) o de relajación del esfuerzo, quedando solamente los métodos reológicos dinámicos, en los cuales se aplica un esfuerzo o deformación oscilatoria, como única alternativa de seguimiento de la gelificación (Pilosof, 2000), así como la evolución de los módulos con la temperatura. Este método es el que se usó en el presente trabajo.

3.12 Comportamiento reológico del WPI con otros polisacáridos

Las proteínas del suero son bien conocidas por sus propiedades funcionales y nutricionales (de Wit, 1998), por estas razones son incorporadas en muchos productos alimenticios. Por otro lado, las proteínas del suero ofrecen algunos cambios para la industria de alimentos, tales como costo, variabilidad en las propiedades gelificantes, así como la proclividad a agregarse bajo ciertas condiciones. En general en la industria, no se emplea sólo proteína, sino una mezcla con uno o más polisacáridos, ampliando la gama de

posibilidades para obtener diferentes propiedades reológicas y de textura, mejorando las propiedades de los sistemas. Dentro de estas combinaciones, Noisuwan et al. (2008), estudiaron la interacción de WPI en combinación con 10% de almidón de arroz nativo y con almidón de arroz ceroso, utilizando mediciones reológicas y por calorimetría diferencial de barrido. Reportan que la adición de WPI afectó, el comportamiento de las pastas de almidón de arroz nativo y el almidón ceroso (waxy) de manera diferente. Para el almidón nativo, la temperatura del pico de viscosidad primero se incrementó de 85 a 89 °C cuando se tenía 2.5% y 5.0% de WPI, posteriormente disminuyó a 85 °C cuando estuvo presente 10.0% de WPI. El pico de viscosidad disminuyó a bajas concentraciones de WPI (2.5 y 5.0%) y aumentó a concentraciones de 7.5% y 10.0%. La viscosidad final de las mezclas WPI/almidón normal aumentó con la adición de WPI. Cuando el WPI fue añadido al almidón de arroz ceroso, la temperatura del pico se incrementó ligeramente, sin embargo, la viscosidad del pico disminuyó con la adición de WPI, la viscosidad final se incrementó, particularmente al 10% de WPI. El WPI no afectó la temperatura de inicio del pico de gelatinización observada en el calorímetro para almidón normal, tampoco se afectó la entalpía, ni la temperatura del pico máximo. Sin embargo, todos estos parámetros se incrementaron cuando se añadió almidón ceroso. van de Berg et al. (2007), relacionan las propiedades de fractura de geles de WPI mezclados con otros polisacáridos, así como su efecto en la percepción sensorial, justificando la respuesta con la microestructura del gel.

Reportan como un gel de estructura homogénea la combinación de WPI con 0.01% de gelana, como un gel tipo de hebra gruesa la combinación WPI con 0.05% κ -carragenina. Como un gel bicontinuo, la mezcla WPI con 0.09% de pectina y la combinación WPI-0.025% y 0.04% de gelana y como un gel continuo de proteína formado por WPI con algarrobo (0.05, 0.1 y 0.14%). Los geles con alta porosidad tales como el bicontinuo y de hebra gruesa, liberan con la compresión uniaxial, gran cantidad de “suero”. Los geles homogéneos y continuos liberan poca cantidad de “suero”. El “suero” liberado afecta fuertemente las propiedades de deformación y de fractura de los geles. Se concluye que la matriz de proteínas, determina las propiedades de fractura del gel y en lo sensorial, los geles que liberan gran cantidad de suero, son denominados como “acuosos” y los que no liberan tanta cantidad de suero, son denominados como “untables”.

Por otro lado Lutz et al. (2009), estudiaron las condiciones de los complejos asociados entre WPI y pectina enzimáticamente modificada, con medidas reológicas y por microscopia confocal. Se reporta la formación de complejos asociados, los cuales se observan como pequeños agregados. La viscosidad de las mezclas era mayor que la de los constituyentes individuales, lo cual indicaba una sinergia de interacciones de atracción que ocurrían en la solución. Los componentes individuales exhibieron un comportamiento no newtoniano, sin embargo, las mezclas de ambos componentes se comportaron como estructuras poliméricas “enredadas” o de geles débiles. El valor del módulo de almacenamiento era igual o mayor que el módulo de pérdida, por lo que concluyeron que la formación de complejos es formada a pH 6 y 4.0% de WPI con un intervalo de concentraciones de pectina de 0.1 a 0.75%.

Turgeon & Beaulieu (2001) realizaron un estudio sobre las modificación en la textura del gel del proteína, utilizando diferentes polisacáridos. En este caso se analizó el comportamiento a altas deformaciones de geles de WPI- κ -carragenina y geles WPI-pectina, añadiendo sales de calcio, potasio y sodio. En este estudio se reporta que el WPI y la κ -carragenina en presencia de sodio (≥ 100 mM) y potasio (≥ 100 mM) forma geles que presentan mayor resistencia a la fractura, sin embargo, presentan menos brillo, esto se debe a la forma de gelificación de la κ -carragenina en presencia de dichos cationes. En los sistemas WPI- κ -carragenina, se observan dos tipos de comportamiento, a bajos niveles de κ -carragenina añadida (0.1%), los geles resultantes son muy similares a los geles de WPI, tienen valores muy similares de dureza, firmeza y deformación a la fractura. En algunos casos, con calcio añadido, la adición de 0.1% de κ -carragenina incrementa la dureza y la fractura de los geles de proteína. Se concluye que a bajos niveles de κ -carragenina hay compatibilidad con el WPI y entonces la κ -carragenina está uniformemente distribuida en la red de proteína. La κ -carragenina tiene una pequeña contribución en la mejora de la capacidad de retención de agua del gel, y tiene un efecto menor en las propiedades texturales. Cuando la concentración de κ -carragenina aumenta a 1%, el comportamiento del polisacárido es el que determina las propiedades texturales en los geles. Cuando las soluciones son calentadas, el WPI y la κ -carragenina se vuelven incompatibles, resultando en un gel bicontinuo de fases separadas. Por otro lado, la mezcla WPI-pectina resulta en la formación de un gel, sin embargo, para 8.0% de WPI, no hay formación de un gel auto-sostenible sin la adición de sal. Añadiendo cloruro de sodio se forma un gel con separación

de fases. Esta separación de fases es dirigida por el comportamiento de cada polímero natural en la solución, antes de que tenga lugar la formación del gel. Las repulsiones entre WPI/pectina son más fuertes que las repulsiones WPI-WPI y pectina-pectina, lo que da lugar a un patrón de gelificación de fases separadas. El tratamiento térmico debilita la energía de los enlaces responsables de la codisolución de WPI y la pectina. Después de romper el equilibrio, ocurre una competencia entre la separación de fases y la gelificación de la proteína en el sistema. Las repulsiones electrostáticas son bajas, considerando que ambos polímeros naturales no tienen tantas cargas negativas. El efecto pequeño por la adición de sodio sobre la firmeza de los geles, es un indicador de las débiles repulsiones electrostáticas.

Nishinari et al. (2000) han hecho observaciones importantes en la formación de geles entre proteínas y polisacáridos. Reportan que los geles de leche formados con kappa-carragenina se forman debido a que la κ -carragenina actúa como una especie de adhesivo molecular para incorporar micelas de caseína en la red. Por otro lado en este mismo trabajo, se menciona que la interacción de las proteínas de la leche con pectina de bajo metoxilo, forma un gel debido a que la caseína actúa como un recurso de iones calcio, siendo responsable de promover la gelificación de la pectina. Otros estudios de proteína con polisacáridos, tales como el de Bertrand & Turgeon (2007) con WPI y goma xantana a pH neutro y con 100 mM de NaCl, reportan que existe una separación de fases entre las proteínas de suero desnaturalizadas y la goma xantana cuando se aplica calor. Por último, el estudio realizado por Tavares et al. (2005) describen la existencia de sistemas bifásicos a pH 7 entre WPI y galactomananos provenientes de goma Algarrobo, goma Guar y goma Tara, donde se observa por microscopía confocal una fase enriquecida de polisacárido, dispersa sobre una matriz de proteína a bajas concentraciones de polisacárido. Tanto en los trabajos de Bertrand et al. (2007) y Tavares et al. (2005), se habla de mecanismos sinérgicos que provocan aumentos en los módulos de almacenamiento de las mezclas.

3.13 Discusión

La gelificación de proteínas involucra la modificación de la estructura nativa en un desdoblamiento parcial y posteriormente la agregación. La estructura, las propiedades

reológicas y otras propiedades en algunos alimentos, están determinadas por el comportamiento de las proteínas y su interacción con los polisacáridos presentes. Profundizar en el estudio la relación proteína-polisacárido ayuda a entender las propiedades funcionales de las macromoléculas alimentarias y la formación de mecanismos en estructuras alimentarias. Como se mencionó anteriormente en la Figura 17, son varios los eventos que pueden ocurrir en esta relación y cada uno de ellos afecta las propiedades funcionales de las mezclas.

La adición de proteína a un alimento incrementa su valor nutricional, además, con el calentamiento, ésta se desnatura y forma una red que constituye el medio continuo del sistema, en forma dispersa se encuentran los otros polisacáridos tales como el almidón.

En el caso de la adición de almidón, su baja estabilidad termodinámica y la afinidad por el agua en el caso de la proteína, conduce a mezclas de dos fases; este fenómeno ha sido estudiado por Turgeon et al. (2001), Ravindra et al. (2004), Vu Dang et al. (2009), quienes realizan el análisis reológico de los agregados de proteína. Esto significa que cuando se logra la desnaturación térmica de la proteína, la agitación en el proceso experimental no se detiene y la posible formación de la red de proteína es destruida, por lo que los resultados reportados corresponden a la cantidad de agregados presentes, dependiendo de la concentración de la proteína utilizada. Sin embargo, se puede resaltar que el comportamiento de dichos agregados provoca un incremento en el módulo elástico G' , al incrementar la cantidad de proteína (Vu Dang, 2009) y que añadiendo algún otro polisacárido tal como pectina (Turgeon, 2001), se forman dos fases, en donde la fase continua está constituida por agregados de proteína y la fase dispersa por pequeños agregados de pectina. Shim & Mulvaney (2001) reportan que para almidón de maíz ocurre de manera muy similar, una fase continua formada por agregados de proteína, que tiene insertados los gránulos de almidón hinchado, lo cual refuerza la red y por esta razón, se incrementan los módulos de almacenamiento. La revisión de la literatura parece ser consistente en que la interacción WPI-polisacárido, incluye una separación de fases y esto puede explicarse debido a la alta afinidad de WPI por el agua.

3.14 Referencias Bibliográficas

- Alais, C. (1984). *Sciences du lait. Principes des Techniques Laitières*, 4th ed. Sepaic, Paris. 1-814.
- Acharya, K., Stuart, D. I., Walker, P. C. & Lewis, M. (1989). Refined structure of baboon α -lactalbumin 1.7 Å resolution: Comparison with C-type lysozyme. *Journal of Molecular Biology* 1, 99-127.
- Alves, M. M., Antonov, Y. A., & Goncalves, M. P. (1999). The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. *Food Hydrocolloids* 13, 157-166.
- Baeza, R. (2003). Interacciones entre β -lactoglobulina y polisacáridos en coloides alimentarios. *Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*. Tesis de Doctorado. Buenos Aires, Argentina. p.253
- Barnett, L. B. & Bull, H. B. (1960). Electrophoresis of ribonuclease and of β -lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 89(2), 167-172.
- Beaulieu, M., Turgeon, S. L. & Doublier, J. L. (2001). Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal* 11, 961-967.
- Benedouch, D. & Chen, S-H. (1983). Structure and Interparticle Interactions of Bovine Serum Albumin in solution studied by Small-Angle Neutron Scattering. *The Journal of Physical Chemistry* 87, 1473-1477.
- Bertrand, M.E. & Turgeon, S. (2007). Improved gelling properties of Whey Protein Isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 21, 159-166
- Bloomfield, V.(1966). The structure of Bovine Serum Albumin at low pH. *Biochemistry* 5, 684-689.
- Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H. & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length scales in β -lactoglobulin. *Faraday Discussions* 128, 13-27.
- Brown, J. R. & Shockley, P. (1982). In *Lipid Protein Interactions*. Vol. 1. Eds. P.C. Jost and O.H. Griffith, John Wiley, New York, p. 25-68.
- Bryant, C. M. & McClements, D. J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids* 14, 383-390.
- Byler, D. M. & Susi, H. (1988). Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 3, 73-88.
- Bungenberg de Jong, H. G. (1949). *Colloids Science*. Ed. H. R. Kruyt, Elsevier, Amsterdam Vol. 2, capítulo 9, 259.
- Carter, D.C. & He, X-M. (1990). Structure of Human Serum Albumin. *Science* 249, 302-303.
- Cayot, P., & Lorient, D., (1996). Structure-function relationship of whey proteins. En: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food Proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker. 225-256.
- Clark, A. H., Kavanagh, G. M. & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation theory and experiment. *Food Hydrocolloids* 15, 383-400.

- Damashun, G., Gernat, Ch., Damashun, H., Bychkova, V.E. & Ptitsyn O.B. (1986). Comparison of intramolecular packing of a protein in native and “molten globule” states. *International Journal of Biological Macromolecules* 8, 226-230.
- Das, K. P. & Kinsella, J.E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin. *Journal of Dispersion Science and Technology* 10(1), 77-102.
- De Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Ithaca, New York: Cornell University Press
- de Kruif, C. G. & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids* 15, 555-563.
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F. & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9(5), 340-349.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science* 81, 597-608.
- de Wit, J.N. & Klarenbeek, G. (1981). A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 160 °C. *Journal of Dairy Research* 48, 293-302.
- Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: E. Dickinson, & P. Walstra, *Food Colloids and polymers: stability and mechanical properties*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 77-93.
- Dickinson, E. & Matsumura, Y. (1994). Protein at liquids interfaces: Role of the molten globule state. *Colloids and Surfaces. B: interfaces* 3, 1-2.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5, 202-214.
- Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrel, H., Harwalker, V., Jenness, R. & Whitney, R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67, 1599-1631.
- Fernandes, P. (1994). Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids* 8, 277-285.
- Flory, P.J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Flory, P.J. (1974). Introductory lecture. *Faraday Discussions of the Chemical Society* 57, 7-18.
- Foegeding, E.A. & Hamann, D.D. (1992). Physicochemical aspects of muscle tissue behaviour. En: H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartel, *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel Dekker. 423-441.
- Frushour, B.G. & Koenig, J.L. (1975). Raman studies of the crystalline, solution, and alkaline-denatured states of β -lactoglobulin. *Biopolymers* 14, 649-662.
- Fox, P.F. & Flynn, A. (1992). Biological properties of milk proteins, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins*. Ed. Fox. Elsevier, London, p. 255.
- Gast, K., Zirwer, D., Welfle, H., Bychkova V.E. & Ptitsyn O.B. (1986). Quasielastic light scattering from human α -lactalbumin: comparison of molecular dimensions in native and “molten globule” states. *International Journal of Biological Macromolecules* 8, 231-236.
- Grasselli, M., Navarro del Cañizo, A., Fernández Lahore, H.M., Miranda, M.V., Camperi, S.A. & Cascone, O. (1997). ¿Qué hacer con el suero de leche?. *Ciencia Hoy*, vol. 8. Buenos Aires, Argentina: Copyright Asociación Civil Ciencia Hoy.

- Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B. (1972). Thermodynamic compatibility of gelatin and some D-glucans in aqueous media. *Carbohydrate Research* 25, 313-320.
- Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids* 11, 145-158.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R. & McClements, D.J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, lightscattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* 20, 577-585.
- Haug, I.J., Skar, H.M., Vegarud, G.E., Langsrud, T. & Draget, K.I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids* 23(8), 2287-2293.
- Hirose, M. (1993). Molten globule state of food proteins. *Trends in Food Science & Technology* 2, 48-51.
- Inoue, H. & Matsumoto, T. (1996). Viscoelastic characterization of solid-like structure in aqueous colloids of globular proteins. *Colloids and Surfaces A* 109, 89-96.
- Kilara, A. & Vaghela, M.N. (2004). Whey proteins. En: R. Y. Yada. *Proteins in food Processing*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited & CRC Press. 72-99.
- Koenig, J.L. & Frushour, B.G. (1972). Raman scattering of chymotrypsinogen A, ribonuclease, and ovalbumin in the aqueous solution and solid state. *Biopolymers* 11, 2505-2520.
- Lutz, R., Aserin, A., Portnoy, Y., Gottlieb, M. & Garti, N. (2009). On the confocal images and the rheology of whey protein isolated and modified pectins associated complex. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69, 43-50.
- Mangino, M.E. (1984). Physicochemical aspects of whey protein functionality. *Journal of Dairy Science* 67, 2711-2722.
- Matsumura, Y., Mitsui, S., Dickinson, E. & Mori, T. (1994). Competitive adsorption of α -lactalbumin in the molten globule state. *Food Hydrocolloids* 8, 555-566.
- Matsuoka, H., Ise, N., Okubo, T. & Kunugi, S. (1985). "Ordered" structure in dilute solutions of biopolymers as study by small-angle x-ray scattering. *The Journal of Chemical Physics* 83, 378-387.
- McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances* 24, 621-625.
- McSwiney, M., Singh, H., & Campanella, O.H. (1994). Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 8, 441-453.
- Morr, C. & Ha, Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 431-476.
- Mulvihill, D.M. & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology* 11, 43-75.
- Ndi, E., Swanson, B., Barbosa-Canovas, G. & Luedecke, L. (1996). Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/sodium polypectate gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 86-92.
- Nishinari, K., Zhang, H., Ikeda, S. (2000). Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5, 195-201.

- Noisuwan, A., Bronlund, J., Wilkinson, B. & Hemar, Y. (2008), Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. *Food Hydrocolloids* 22, 174-183.
- Ohgushi, M. & Wada, A. (1983). Molten globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Letters* 164, 21-24.
- Olsson, C., Langton, M. & Hermansson, A.-M.(2002). Dynamic measurements of β -lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and gel break-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocolloids* 16(5), 477-488.
- Phillips, L.G., Whitehead, D.M. & Kinsella, J.E. (1994). Chapter 4: Structural and chemical properties of β -lactoglobulin. En: S. L. Taylor, *Structure-function properties of food proteins*. San Diego, California, Estados Unidos: Academic Press, Inc. 75-106.
- Pilosof, A.M.R. (2000). Gelificación. En: A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai, *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Editorial Eudeba. Buenos Aires, Argentina. 75-95.
- Polyakov, V.I., Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins. *Food Hydrocolloids* 11, 171-180.
- Privalov, P.L. (1979). Stability of Proteins. In *Advances in Protein Chemistry* 35, Eds. C. B. Anfinsen, John T. Edsall, Redert C. M. Richards, Academic Press, New York. 1-104.
- Privalov, P.L. (1989). Thermodynamic problems of protein structure. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 18, 47-69.
- Relkin, P. & Launay, B. (1990). Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids* 4, 19-32.
- Rollema, H.S. (1992). Casein association and micelle formation, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins*. Eds. Fox. Elsevier, London, 111.
- Shim, J. & Mulvaney, S.J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and Starch / whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch / whey Protein mixed gels. *Journal of the Science of Food Agriculture* 81, 706-717.
- Swaigood, H.E. (1992). Chemistry of caseins, *Advanced Dairy Chemistry, Vol I: Proteins* P.F. Ed. Fox. Elsevier, London, p. 63
- Schmidt, D.G. & Buchheim, W. (1970). Elektronenmikroskopische untershurung der feinstruktur von caseinmicellen in kuhmilch. *Michwissenschaft* 25, 596-600.
- Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F., Bauer, W. & Klostermeyer, H. (1995). Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its applications. En: E.Dickinson, & D. Lorient, *Food Colloids and Macromolecules*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 328-339.
- Tavares, C., Monteiro, S., Moreno, N. & Lopes da Silva, J.A. (2005) Does the branched degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? *Colloids and Surface A Physicochem. Eng. Aspects* 270-271, 213-219.
- Teraoka, I. (2002). *Polymer Solutions*.Ed. Wiley Interscience. Cánada. p.85.
- Timasheff, S. N., Townend, R. & Mescanti, L. (1966). The optical rotatory dispersions of the β -lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry* 241, 1863-1870.

- Tolstoguzov, V. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. En: J. R. Mitchell, & D. A. Ledward. *Functional properties of food macromolecules*. London: Elsevier Applied Science Publishers. 385-411.
- Tolstoguzov, V. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. En: G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock, *Gums and stabilisers for the food industry*. Oxford: IRL Press. 157-175.
- Tolstoguzov, V. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids* 4, 429-468.
- Tolstoguzov, V. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. En: K. D. Schwenke, & R. Mothes, *Food proteins, structure and functionality*. Weinheim: VCH. 203-209.
- Tolstoguzov, V. (1994). Some physico-chemical aspects of protein processing into foods. En: G. O. Phillips, P. A. Williams, & D. J. Wedlock. *Gums and stabilisers for the food industry*. Oxford: IRL Press. 115-124
- Tolstoguzov, V. (1997). Protein-polysaccharide interactions. En: S. Damodaran, & A. Paraf. *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker. 171-198
- Tolstoguzov, V. (2001). Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food and beverages. *Critical Reviews in Biotechnology* 22(2), 89-174.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids* 17, 1-23.
- Tolstoguzov, V., Grinberg, V. & Gulov, A. (1985). Some physicochemical approaches to the problem of protein texturisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 151-159.
- Townend, R., Herskovits, T. T., Swaisgood, H. E. & Timasheff, S. N. (1964). The solution properties of β -lactoglobulin C. *The Journal of Biological Chemistry* 239 (12), 4196-4201.
- Turgeon, S.L. & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 15 (4-6), 583-591.
- van den Berg, L., van Vliet T., van der Linden, E., van Boekel. M. & van de Velde, F. (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/ polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocolloids* 21, 961-976.
- Verheul, M., Pedersen, J.S., Roefs, S.P.F.M. & de Kruijff, K.G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Bipolymers* 49, 11-20.
- Walkenstrom, P., Panighetti, N., Windhab, E. & Hermansson, A. M. (1998). Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids* 12, 469-479.
- Zasytkin, D. V., Dumay, E. & Cheftel, J. C. (1996). Pressure and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids* 10, 203-211

4.1 Generalidades de las carrageninas

Las carrageninas forman parte de un grupo de polisacáridos sulfatados, que constituyen la estructura principal de ciertas variedades de algas rojas, de la clase *Rhodophyceae*. Estos polímeros son fuertemente aniónicos debido a la presencia de grupos sulfato, lo cual facilita su interacción con moléculas catiónicas y anfotéricas como las proteínas, a su vez, se caracterizan por ser solubles en agua, formando soluciones de alta viscosidad o bien geles, por lo que son ampliamente utilizadas en diversos productos en la industria alimentaria (Whistler & BeMiller, 1993). Los diferentes tipos de carragenina comercial se presentan de dos formas, de acuerdo con el grado de refinación que tengan en su proceso de elaboración. Conforme a lo anterior, se encuentran la carragenina refinada, con un bajo contenido de impurezas y material celulósico y la semi-refinada, compuesta de carragenina y otros materiales de la pared celular. Ambos tipos se utilizan en diversas aplicaciones industriales, como en productos cárnicos, lácteos y otros.

En la extracción de la carragenina se utilizan algas rojas de la clase *Rhodophyceae*, siendo los géneros *Euchema*, *Chondrus* y *Gigartina*, las principales fuentes de materia prima para la elaboración de carragenina de importancia comercial.

4.2 Estructura química de las carrageninas

Fennema (2000), define la carragenina como cadenas lineales de unidades repetitivas de D-galactosa y 3,6 anhidro D-galactosa (3,6 AG), unidas a través de enlaces glicosídicos α -1,3 y β -1,4, a excepción de la λ -carragenina, que sólo está compuesta de unidades de D-galactosa. También contienen grupos éster sulfato en diferentes proporciones, de acuerdo al tipo de carragenina.

Tabla 5. Contenido de componentes químicos y peso molecular (Solís-Bravo, 2007).

Tipo de carragenina	Peso molecular (kDa)	Ester sulfato (%)	3,6 Anhidro galactosa (%)
κ -carragenina I	100-300	24-25	34-36
κ -carragenina II	300-500	25-28	32-34
λ -carragenina	500-700	32-39	0
ι -carragenina	>700	28-39	25-30

Como se muestra en la Tabla 5 y de acuerdo con van de Velde et al. (2001), las carrageninas son clasificadas de acuerdo a la presencia de 3,6 AG y a la posición y número de grupos éster-sulfato, por lo tanto, estos componentes determinan las características y propiedades de los diferentes extractos de carragenina. De acuerdo con lo anterior, existen los tipos κ -carragenina I, κ -carragenina II, iota (ι) y lambda (λ), que son de interés comercial, y otros tipos denominados mu(μ), nu (ν), xi (ξ), theta (θ) y pi (π), que se pueden encontrar en las carrageninas nativas o cuando se utilizan métodos de extracción suaves. En la Figura 20, se muestran las estructuras químicas de los tipos de carragenina de importancia comercial.

La unidad principal de la κ -carragenina I, está compuesta de unidades de galactosa 4-sulfato, unidas a través de enlaces α -1,3 y gran cantidad de unidades de 3,6 AG, unidas a través de enlaces β -1,4. Según Glicksman (1969), Millane et al. (1988) y Whistler & BeMiller (1993), un aumento del contenido de 3,6 AG implica una mayor capacidad de gelificación y sensibilidad al ion potasio, lo cual explica de algún modo, la textura firme y quebradiza de los geles que forma la κ -carragenina I en soluciones acuosas. Además, su estructura química permite la interacción con sales de potasio a través de los grupos sulfato, lo cual intensifica la fuerza del gel.

Para Glicksman (1969), la presencia de un grupo sulfato con el carbono-2 de la unidad 3,6 AG en la iota-carragenina, es la principal diferencia estructural con la κ -carragenina I. De acuerdo a Millane et al. (1988), a medida que aumenta el contenido de grupos sulfato en esta posición, disminuye la sensibilidad a los iones potasio y produce un debilitamiento en la fuerza del gel, sin embargo, aumenta la sensibilidad a los iones calcio, por lo cual, éstos usualmente se emplean para incrementar la fuerza del gel de ι -carragenina.

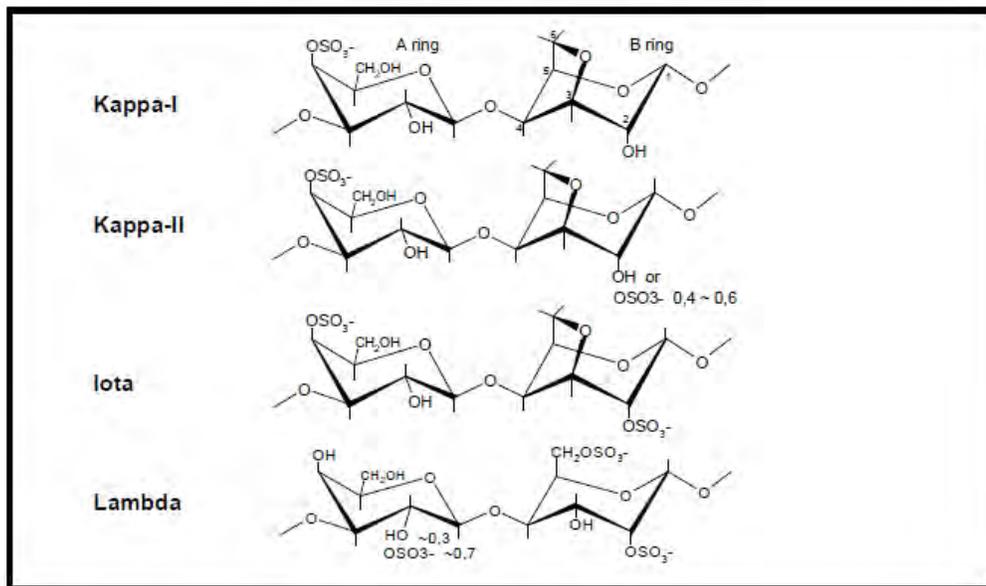


Figura 20. Estructura química de las carrageninas de importancia comercial (Solís-Bravo, 2007).

Las diferencias de la estructura química y en el contenido de componentes químicos entre las carrageninas κ , λ , e ι (Tabla 5), implican que ésta última sea más soluble y que el gel que forma tenga mayor elasticidad, tanto en sistemas acuosos como lácteos, libre de sinéresis y además, resistente a los cambios producidos por ciclos de congelación – descongelación (Millane et al, 1988). La κ -carragenina II es un polímero híbrido ya que contiene carragenina iota, y κ -carragenina I en su estructura, en la cual la proporción molar de esta última puede variar entre 80 a 45%, según la familia y especie de alga de la cual sea extraída (Whistler & BeMiller, 1993; Villanueva et al, 2004). van de Velde et al. (2001), estudiaron la estructura química de estos polímeros híbridos, con el fin de determinar la conformación de las cadenas κ , λ , y ι dentro de la molécula y concluyeron que ésta consiste en cadenas mezcladas, en las cuales ambos tipos de carragenina se encuentran presentes en la misma cadena. Villanueva et al. (2004), compararon química y funcionalmente, extractos de κ -carragenina II y mezclas de κ -carragenina I- ι -carragenina con un contenido mayoritariamente de iota, mientras que la deformación de los geles, es similar a mezclas con una mayor proporción de κ -carragenina I. Ambos autores coinciden en que los extractos de κ -carragenina II, al tener una conformación estructural diferente, no sólo combinan las propiedades de los tipos κ -carragenina I, lambda y iota, sino que además, tienen características y propiedades reológicas especiales. Por ejemplo, la alta reactividad

que se produce entre ésta y los sistemas lácteos y la formación de geles de textura firme y elástica, que la diferencian de una mezcla de κ -carragenina I- ι -carragenina elaborada.

Según van de Velde et al. (2001), la razón de κ , λ , y ι de los diferentes extractos de κ -carragenina II y el peso molecular, pueden determinar en gran manera sus propiedades reológicas, reportan una clara disminución de la fuerza del gel a medida que la concentración molar de κ -carragenina I también disminuye y gran variabilidad en el peso molecular entre las diferentes especies, en las que los mayores valores determinan una mayor viscosidad.

Como se ha señalado anteriormente, la fase tetrasporofítica de las algas de la familia *Gigartinaceae*, hace que sinteticen otros tipos de carragenina, donde sólo la carragenina lambda es de importancia comercial. Como se muestra en la Tabla 5, este tipo de carragenina es altamente sulfatada y por tanto, tiene como principal componente galactosa 2-sulfato y galactosa 2,6 disulfato (Figura 20), esta composición química implica que posee una alta solubilidad, tanto en caliente como en frío y principalmente, permite formar soluciones de alta viscosidad. La ausencia de unidades de 3,6 AG en la molécula impide la formación del gel (Glicksman, 1969).

4.3 Propiedades de las carrageninas

Las carrageninas son polímeros fuertemente aniónicos, de gran tamaño y peso molecular. Estas características, le confieren la capacidad de reaccionar con otras moléculas a través de diversos mecanismos, entre los que se incluyen los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, para formar estructuras complejas que usualmente implican cambios en las propiedades físicas del sistema en que se aplican. Estas propiedades son aprovechadas ventajosamente en múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (Glicksmann, 1969).

Fennema (2000), señala que las carrageninas tienen las siguientes funciones como aditivo alimentario:

- Determinar diferentes propiedades reológicas con el fin de espesar y suspender partículas insolubles o de gran tamaño.
- Formar geles termorreversibles a temperatura ambiente, transparentes, de texturas rígidas a elásticas y con distintos grados de retención de agua.
- Formar complejos con las proteínas para obtener geles o suspensiones.

Para llevar a cabo estas funciones en los distintos alimentos en que se aplican, las carrageninas poseen diversas propiedades, cuyas características varían principalmente según el tipo de carragenina y el medio en el que son aplicadas.

La κ -carragenina se encuentra constituida por cadenas lineales alternadas de (1 \rightarrow 3)- β -D-galactosa-4-SO₃⁻(1 \rightarrow 4)-3,6-anhidro- α -D-galactosa (Chandrasekaran, 1998). Debido a que las moléculas tienen una carga negativa, a la κ -carragenina se le clasifica como un polielectrolito, por lo que es sensible a las interacciones con aniones y cationes.

4.4 Conformación ordenada de la carragenina: Conformación en hélice en el estado sólido

Estudios de difracción de rayos X en muestras de fibras de una sal de potasio de κ -carragenina, han demostrado que la ι -carragenina y la κ -carragenina forman hélices ordenadas en el estado sólido (Cairns, 1991). Se ha identificado que la κ -carragenina produce patrones de difracción difusos debido a que las fibras de κ -carragenina no se organizan en microcristales. Como consecuencia, la evidencia de una estructura particular en hélice es menos directa. Sin embargo, Millane et al. (1988) demuestran que la κ -carragenina se encuentra en una conformación de doble hélice. Las dobles hélices se estabilizan en forma paralela siguiendo la dirección de la mano derecha, con ambas estructuras torcidas en forma escalonada, de tal forma que cuando un residuo de galactosa anhidra se encuentra frente a un grupo sulfato de otra molécula, existe un puente de hidrógeno que estabiliza la hélice (líneas punteadas de la Figura 21). Los grupos sulfato se ubican en la periferia de la doble hélice y son las que interactúan con otros iones.

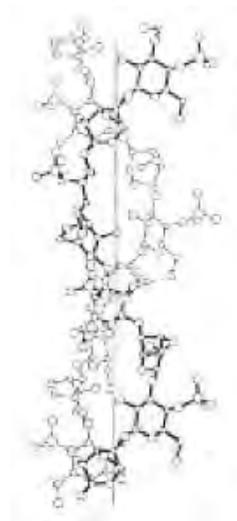


Figura 21. Estructura cristalina de la κ -carragenina. Una cadena se presenta clara y la otra oscura para diferenciarlas entre sí (Chandrasekaran, 1998).

4.5 Propiedades en solución de carrageninas desordenadas

Se han realizado algunos estudios de las propiedades conformacionales de las carrageninas en su forma desordenada (Morris et al., 1978; Vreeman et al., 1980) empleando las técnicas de dispersión de luz, viscosidad y experimentos de sedimentación para deducir la conformación y datos termodinámicos en varias muestras de κ -carragenina de diferentes pesos moleculares y a diferentes fuerzas iónicas. Los estudios demostraron que las carrageninas desordenadas son hebras aleatorias con flexibilidad intrínseca, pero las cuales se expanden debido a los efectos polielectrolíticos. Así, para cualquier grado de polimerización, el radio de giro $\langle r^2 \rangle$, de una hebra de carragenina en solución diluida varía con el grado de sulfatación y con el contenido de sal de la solución.

La relación entre la viscosidad intrínseca, $[\eta]$ y el peso molecular M , de una hebra de carragenina está expresada por la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K_{\eta} M^{\alpha} \quad (6)$$

Los valores de los parámetros de K_{η} y α varían con la fuerza iónica y con el tipo de peso molecular promedio utilizado en su determinación. A bajas concentraciones de sal, el valor del exponente α en la ecuación de Mark-Howink es ligeramente menor que la unidad, indicando una configuración expandida.

El tipo de contraiones empleados en soluciones de κ -carragenina, es el que determina su conformación como consecuencia de la disminución de la carga efectiva del polímero (Takemesa & Nishinari, 2004). En soluciones de NaCl, la κ -carragenina adopta una conformación desordenada (Snoeren, 1976), mientras que en soluciones iónicas con NaI, adopta una conformación ordenada en forma helicoidal (Slootmaekers et al., 1988). En el estado desordenado la κ -carragenina se describe como una hebra aleatoria (random coil), expandida como resultado del volumen excluido y de las repulsiones electrostáticas que se establecen entre los segmentos de las cadenas (Snoeren, 1976; Vreeman et al., 1980) con una gran capacidad de absorción de agua. En esta conformación, las cadenas son flexibles y sensibles a la presencia de iones. De las observaciones por difracción de luz, se concluyó que la conformación ordenada tiene el doble de la masa molecular de una hebra aleatoria, hecho que se interpreta como la formación de una doble hélice (Viebke et al., 1995). Así, la transición de la κ -carragenina se describe de un estado desordenado a un estado ordenado como 2 hebras aleatorias \leftrightarrow 1 doble hélice.

Meunier et al. (2001) demostraron que la conformación de dobles hélices no es precisamente el doble de la masa molecular de una hebra aleatoria y que la relación entre las masas moleculares y los radios de giro entre una y otra conformación, dependen del intervalo de la masa molar de las hebras aleatorias. Los estudios de las soluciones de κ -carragenina en estado ordenado en NaI, muestran que es una estructura rígida (Chronakis et al., 2000) con una alta densidad de carga (Takemesa & Nishinari, 2004). De igual manera que en otros polielectrolitos, como la gelana (Milas et al., 1996) y la ι -carragenina (van de Velde et al., 2002), la transición desorden-orden de la κ -carragenina ocurre a una temperatura dada, llamada temperatura de transición, T_{d-o} (Rochas, 1982), cuyo valor depende de la naturaleza del contraión y de la concentración iónica total.

La κ -carragenina presenta mayor afinidad hacia algunos iones. Considerando la secuencia para estabilizar la conformación ordenada deducida a partir de las T_{o-d} , el orden decreciente de afinidad es (Rochas, 1982):

- Cationes monovalentes: $Rb^+ > Cs^+ > K^+ > NH_4^+ > (CH_3)_4N^+ > Na^+ > Li^+$
- Cationes divalentes: $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$

De acuerdo con esta clasificación, los cationes monovalentes que provocan la transición a temperaturas más bajas son el Rb^+ , el Cs^+ y el K^+ . A diferencia de otros polielectrolitos, la transición desorden-orden de la κ -carragenina, también es sensible a la presencia de ioduro

como producto de repulsiones electrostáticas entre éste y el sulfato de la κ -carragenina, sin que exista una agregación de las dobles hélices precursoras de la formación de gel. Debido a esta particular característica, algunos investigadores la han aprovechado en el estudio del mecanismo de gelificación de este polisacárido (Slootmaekers et al., 1988; Viebke et al., 1995; Meunier et al., 2001; Takemesa & Nishinari, 2004), asegurando así que la transición desorden-orden es precursora de la formación de geles.

4.6 Transición sol-gel

Rochas & Rinaudo (1982), propusieron el diagrama de transición sol-gel para una sal de K^+ y de Na^+ utilizando técnicas de polarimetría y conductividad eléctrica, durante el calentamiento y el enfriamiento, para establecer la dependencia con la temperatura de transición de la concentración iónica total (C_T), debida al polímero y la concentración de sal añadida. La Figura 22 muestra el diagrama de transición para Na^+ , debido a que es el catión que se utilizó en el presente trabajo.

En el diagrama de transición sol-gel se puede destacar que el gel es termorreversible y que la temperatura de transición depende del tratamiento térmico aplicado (enfriamiento o calentamiento), produciendo una diferencia entre las temperaturas de gelificación (durante el enfriamiento T_{gel}) y fusión (durante el calentamiento T_{fus}), conocida como histéresis térmica. La histéresis térmica aparece como una consecuencia de la agregación de las estructuras helicoidales durante la formación del gel. Sin embargo, para una concentración límite llamada concentración iónica crítica, C_{crit} , a la cual corresponde una temperatura crítica, T_{crit} , ($C_T < 0.1$ eq/L), la histéresis térmica no existe. La concentración iónica total se calcula como

$$C_T = C_{sal} + \gamma C_{polimero} \quad (7)$$

Donde C_T es la concentración iónica total (eq/L), C_{sal} es la concentración iónica debido a la sal externa (eq/L), $C_{polimero}$ es la concentración iónica debida al polímero en solución (eq/L) y γ es el coeficiente de actividad promedio, $(\gamma_{desorden} + \gamma_{orden})/2$, cuyo valor depende del ion agregado y que en el caso del ion sodio es 0.72. De acuerdo a la ecuación (7) y al diagrama de transición sol – gel (Figura 22), T_{gel} es afectada tanto por la concentración del polímero, como por la sal externa en solución, obteniendo geles a bajas concentraciones de κ -carragenina con altas concentraciones de Na^+ y viceversa, lo que deriva en diferentes

comportamientos reológicos en ambos casos. El modelo de cálculo para C_{T5} propuesto por Rochas (1982), considera la temperatura de gelificación, T_{gel} , como aquella para la cual el 50% del polímero se encuentra en forma de hebra aleatoria y el otro 50% en forma de hélices. Por otra parte la actividad total está dada por el producto de la concentración iónica total (C_T) y el coeficiente de actividad (γ_0). En el caso de soluciones de baja concentración se puede suponer que $\gamma_0 = 1$ (Sánchez-Basurto, 2006). Por lo que la actividad total es igual a la concentración iónica total. El coeficiente de actividad promedio se calculó bajo la consideración de que el Na^+ permanece como estado de hebra, a diferencia del potasio que forma una estructura ordenada de hélice.

Rochas (1982) definió tres regiones sobre el diagrama de transición, donde la κ -carragenina adopta diferentes conformaciones:

I: Región de dominio macromolecular en forma de hebra aleatoria no ordenada, donde la temperatura es superior a T_{fus} .

II.- Región de conformación ordenada en forma de hebras, sin que exista una agregación de éstos. La temperatura es inferior a T_{gel} y C_T es inferior a C_{crit} .

III: Región de conformación de agregados, formando una red tridimensional, donde C_T es superior a C_{crit} y T es inferior a T_{gel} .

4.7 Mecanismo de gelificación

El mecanismo de gelificación de la κ -carragenina en presencia de Na^+ , no ocurre como un proceso dividido en etapas, como en el caso del ion potasio (Nuñez et al., 2011), partiendo de la existencia de la conformación de hebra aleatoria, el polímero está en solución para una concentración inferior a C_{crit} y una temperatura superior a T_{fus} (a en la Figura 23) que corresponde a la región I en el diagrama de transición sol-gel (Figura 22).

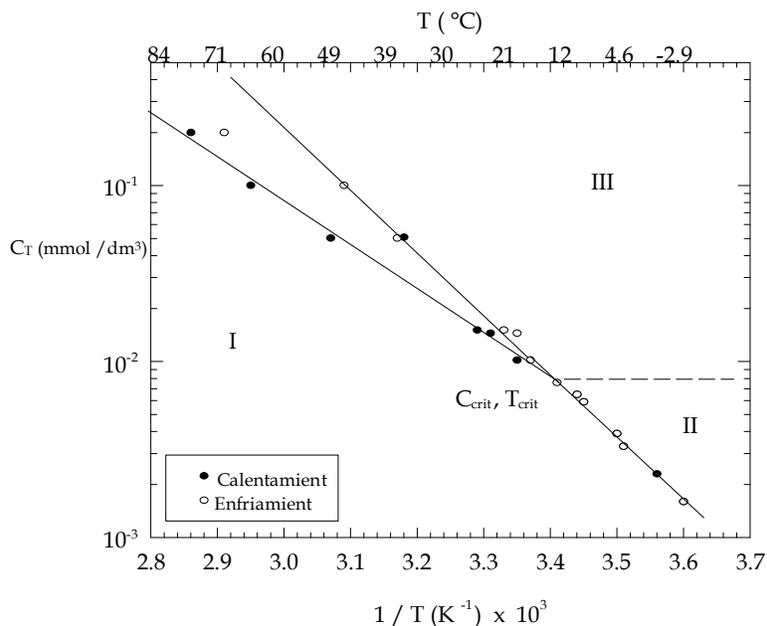


Figura 22. Diagrama de transición sol-gel de κ -carragenina en presencia de Na^+ (Rochas, 1982). El significado de C_{crit} , I, II y III, se explica en el texto, La línea punteada representa la división entre la zona II y III.

Una disminución de temperatura por debajo de T_{gel} para una concentración constante, o un aumento de concentración a temperatura constante, conservan la hebra aleatoria (b en la Figura 23) que corresponde a la región II en la Figura 22. Para una temperatura dada, un aumento de la concentración iónica total por arriba de C_{crit} , no conduce a la unión de estas hebras, como ocurre con el potasio y tampoco a la formación de una red tridimensional (Rochas; 1982; Chen et al., 2002; Takemesa & Chiba, 2001; Yoshiaki et al., 2002).

Mangione et al. (2005) han establecido que para que exista la formación de una red tridimensional, debe haber una relación entre las concentraciones de los iones de potasio y sodio, $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$, de 0.33. La presencia de sodio añadido a soluciones de κ -carragenina ha sido estudiada por métodos como resonancia magnética nuclear (Rochas & Rinaudo, 1980a), polarimetría y conductividad eléctrica (Rochas & Rinaudo, 1980b), reología (Rochas & Rinaudo, 1984; Mangione et al., 2005), dispersión de luz (Slootmaekers et al., 1988). Todas estas técnicas han confirmado que el efecto del ion sodio en la κ -carragenina, sólo es de hebra aleatoria a una asociación de hebras durante la gelificación.

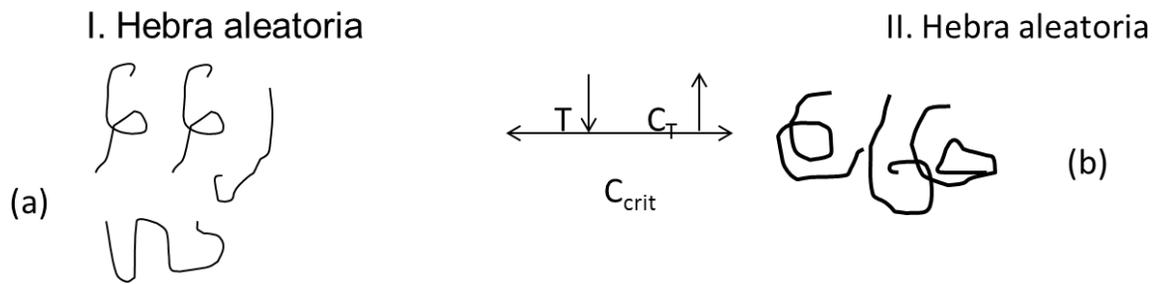


Figura 23. Modelo de gelificación de la κ -carragenina en presencia de Na^+ (adaptado de Rochas, 1982).

Sin embargo, no se ha podido aclarar por qué no hay asociación doble como en el caso del potasio (Slootmaekers et al., 1988). En este sentido, Semenova et al. (1988) sugieren que el proceso de agregación de las macromoléculas en el enfriamiento de soluciones diluidas, ocurre en dos etapas. La primera, consiste en la asociación de macromoléculas desordenadas, la cual se verifica con un aumento en el índice de refracción y el segundo paso, a bajas temperaturas, es la asociación en hebras de las macromoléculas.

4.8 Comportamiento reológico de geles de κ -carragenina

El carácter sólido de los geles de κ -carragenina, surge de la formación de una red tridimensional, la cual se extiende continuamente a través de todo el sistema y atrapa el medio disperso en la estructura de ésta. La red tridimensional se origina a través de enlaces no covalentes con un tiempo de vida finito. Entre las interacciones están las fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, transferencia de cargas, interacciones iónicas, interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. En consecuencia, los geles de κ -carragenina se clasifican como geles físicos por no existir enlaces covalentes en la formación de su red. Los enlaces covalentes pueden estar formados por uno o más mecanismos listados previamente, combinados con mecanismos más específicos y complejos implicando zonas de interacción (Morris, 1990; Michel et al. 1997; Kavanaugh & Ross-Murphy, 1998) realizaron mediciones reológicas en una mezcla de 21.6 g/L de κ -carragenina a diferentes concentraciones de sal para diferentes contraiones; como se puede apreciar en la Figura 24, el módulo de almacenamiento varía de la siguiente manera:

$$\text{KCl} > \text{CaCl}_2 = \text{CuCl}_2 \gg \text{NaCl}$$

a bajas concentraciones de sal. Esta es la consecuencia de la afinidad específica de la κ -carragenina. Sin embargo, los iones potasio se unen a las hélices de κ -carragenina y consecuentemente, crean una mejor protección contra las repulsiones electrostáticas de cationes divalentes y mucho más efectivas que para cationes monovalentes.

El valor de “meseta” para G' en la Figura 24, corresponde a sistemas heterogéneos turbios, excepto para sistemas con KCl. Así, un incremento en la concentración de sal y la afinidad ($K^+ > Ca^{2+} = Cu^{2+} \gg Na^+$), permiten un alto grado de asociación sólo cuando el gel formado es homogéneo (transparente). Para sistemas heterogéneos, los cationes no inducen el fenómeno de entrecruzamiento. Probablemente, la adición de cationes más allá del valor crítico, incrementa una heterogeneidad local del sistema y contribuye a la separación de fases. Mangione et al. (2005) también estudiaron los efectos del ion sodio sobre la gelificación de κ -carragenina, reportando que se requiere una concentración de 300 mM de sal para observar gelificación. Sin embargo, aunque la gelificación macroscópica ocurre, no existe la transición conformacional. Determinan el módulo de almacenamiento y de pérdida en una solución de 0.4% κ -carragenina con 300 mM de NaCl en el réometro, los barridos de temperatura fueron de 65 a 10 °C, utilizando una geometría de cono y plato y a bajas deformaciones. De acuerdo a la Figura 25, el módulo elástico aumenta rápidamente cerca de 30 °C y se vuelve más grande que el módulo de pérdida (G''); a esta temperatura se define la agregación del sistema. Sin embargo, la estructura es de un gel débil ya que el valor de G' es de 3 Pa.

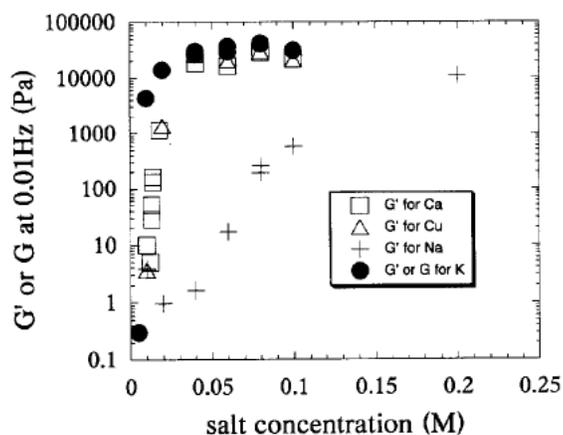


Figura 24. Influencia de la naturaleza y concentración de diferentes cationes sobre el módulo G' para κ -carragenina (21.6 g/L) (Kavanaugh & Ross-Murphy, 1998).

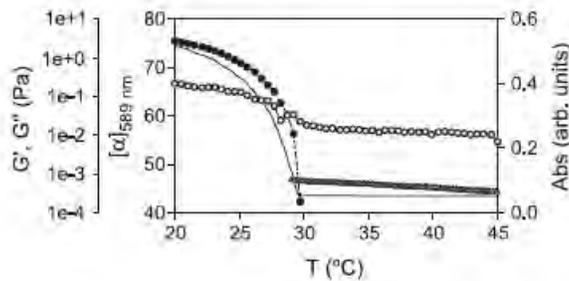


Figura 25. Dependencia de la temperatura del módulo de almacenamiento (círculos negros) y el módulo de pérdida (círculos blancos) (Kavanaugh & Ross-Murphy, 1998).

La conclusión es que en una región de alta concentración de sal, el entrecruzamiento de κ -carragenina es favorecido y la gelificación comienza, permitiendo a las estructuras locales más compactas, menos interconectadas (bajo valor de G') y heterogéneas macroscópicamente, lo cual se justifica con una alta turbidez de la mezcla. Sin embargo, una contribución importante del trabajo de Mangione et al. (2005), es la consideración de la relación de ambos iones potasio/sodio y analizar el efecto combinado para proponer la factibilidad de las rutas de gelificación. Explican que el K^+ contenido en la solución, es capaz de formar hebras y hélices, pero la presencia de sodio introducirá un número de defectos en estas estructuras, mejorando la flexibilidad y el número de enlaces. En este caso, se reporta la obtención de regiones de dobles hélices parcialmente formadas o más flexibles, así como hélices más cortas. En este trabajo se concluye que hay dos mecanismos que pueden inducir la gelificación de la κ -carragenina cuando ambos iones están presentes en la solución. El entrecruzamiento y la estructura de red, está dominada por alguno de estos dos procesos:

- La formación y crecimiento de la longitud de las hélices inducida por los iones potasio
- Por la agregación de las hebras inducidas por la separación de fases.

Estos mecanismos están modulados por la temperatura y por la concentración de las sales, la elección apropiada de la relación $[K^+]/[Na^+]$ hace posible la obtención de un gel. Esta relación se ha establecido como $[K^+]/[Na^+]$ de 0.3394.

4.9 Interacción con proteínas

La capacidad de las carrageninas de interactuar con las proteínas depende de múltiples factores, tales como la concentración de carragenina, tipo de proteína, pH y punto

isoelectrico de la proteína (FAO, 1987). Los productos lácteos constituyen una de las principales aplicaciones de las carrageninas, la cual se emplea como agente gelificante, espesante y estabilizante, debido principalmente a la capacidad que poseen las carrageninas, a diferencia de otros hidrocoloides, de interactuar con las proteínas de la leche (Drohan, 1997; Langendorff, 1997). Según Glicksman (1969), la capacidad de interacción se debe a los grupos sulfato y a las unidades 3,6 AG, cuya presencia es fundamental para la formación del gel en medio lácteo. Este fenómeno de interacción se presenta en las carrageninas del tipo kappa, especialmente en la κ -carragenina II, cuya importancia comercial se debe precisamente a su funcionalidad específica en aplicaciones lácteas (Villanueva, 2004; Xu, 1992; Langendorff, 1997). La alta reactividad que se produce entre la carragenina y la leche, se debe específicamente a los grupos de éster sulfato cargados negativamente, presentes en la carragenina, que interactúan con la región positiva de las micelas de κ -caseína de la leche y a la presencia de iones calcio, que actúan como puentes electrostáticos entre ambas moléculas. Según lo que señalan Drohan (1997) y Villanueva (2004), las interacciones entre la carragenina y la κ -caseína adquieren mayor importancia cuando la concentración de carragenina en el sistema es baja ($< 0.018\%$ p/p), ya que a una concentración mayor, capaz de permitir la gelificación del sistema lácteo, la formación del gel es predominantemente el resultado de la asociación de las hélices de carragenina. El mecanismo de estabilización mediante la aplicación de carragenina, se logra en primera instancia, a través del aumento de la viscosidad que se produce en el sistema lácteo, pero es atribuido principalmente, a la formación de un gel de estructura débil e imperceptible, capaz de suspender partículas de cacao y soportar la agitación. Además, se consigue una mejor textura y palatabilidad en el producto (Villanueva, 2004).

Gaaloul et al. (2009), estudiaron cómo afecta el cizallamiento a las características físicas y al comportamiento reológico de las mezclas WPI- κ C. El procedimiento de mezclado que reportaron para ambos componentes a diferentes concentraciones es como sigue: se prepara cada uno de ellos en solución por separado y posteriormente, se efectúa el mezclado de las soluciones con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocan las mezclas en tubos de plástico que son calentados a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos sin agitación y antes de que ocurra el enfriamiento, las mezclas son sometidas a centrifugación. Se observa una separación de fases donde la fase superior está compuesta por κ -carragenina y la fase inferior compuesta por WPI (Figura 26). Este experimento se realizó con el

objetivo de realizar el diagrama de fases y determinar el límite de cosolubilidad entre los biopolímeros, entendiendo como co-solubilidad la miscibilidad a nivel molecular y formación de una fase. Posteriormente, se realiza el mismo experimento pero aplicando cizallamiento a las muestras a una frecuencia de 28 s^{-1} y determinando después de la centrifugación el diagrama de fases. Los resultados, muestran que en el experimento sin cizalla con bajas concentraciones de WPI y κ -carragenina, las mezclas son homogéneas después del calentamiento, pero al aumentar las concentraciones de WPI o κ -carragenina ocurre una separación de fases o bien la gelificación, arriba de la fase de frontera, la cual depende de la concentración de WPI o κ -carragenina; la solución se separa en dos fases después de la centrifugación. Cuando la concentración de WPI es mayor o igual a 8%, la fase inferior fue una fase sólida compacta. En el caso de los geles, cuando la concentración de proteína fue de 4.0 a 10%, la formación de gel con el incremento en la concentración de κ -carragenina para una concentración constante de WPI, resultó en un incremento en la fuerza del gel con transiciones del estado sol a geles débiles y posteriormente a geles fuertes. La concentración de WPI necesaria para obtener un gel inducido por calor en ausencia de κ -carragenina a estas condiciones fue cerca de 12% (w/w). Al aumentar la concentración de κ -carragenina, inicialmente ocurrió la separación de fases y al aumentar la concentración, ocurrió la gelificación. La conclusión es que la concentración de polisacárido afecta la cinética de la separación de la fase segregativa, así como en la mezcla, la gelificación compite con la separación de fases. Los cambios en la apariencia de un gel claro y translúcido a turbio son debidos a la transición de una red de gel de hebras finas a mezcladas y finalmente a estructuras de partículas. Un mayor incremento en la concentración de κ -carragenina, permite la separación segregativa de fases. Cuando la concentración de WPI fue superior al punto de gel, el incremento en la cantidad de κ -carragenina causó la transición de un gel suave a un gel firme y turbio. Por otro lado, las mediciones reológicas, muestran que el módulo de almacenamiento a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ es mucho más pronunciado cuando la concentración de κ -carragenina es mayor de 0.2%. Este intervalo de concentración, corresponde al límite de incompatibilidad termodinámica entre el WPI y la κ -carragenina. Por arriba de 0.4% en las mezclas, G' se incrementa para diferentes sistemas, pero el incremento es más pronunciado para mezclas que contienen 4.0% de WPI. Este incremento puede estar relacionado, porque la agregación de la proteína se ve favorecida en la separación de fases, dando como resultado una red de proteína más firme

porque está interconectada. Para mayores concentraciones de WPI, los módulos fueron altos tanto para la proteína sola como para las mezclas WPI- κ -carragenina. Cuando se observa la dependencia del módulo elástico final sobre la concentración del polisacárido en las mezclas que contienen 4.0% y 5.0%, es posible distinguir dominios: 1) En ausencia de κ -carragenina, el módulo de elasticidad final es bajo y depende de la concentración de WPI; 2) Para bajas concentraciones de WPI y para concentraciones de κ -carragenina entre 0.2 y 0.4% la dependencia del módulo, G' , sobre la concentración es muy bajo; 3) Para altas concentraciones de κ -carragenina ($> 0.4\%$), cuando el sistema está en el dominio inmiscible, G' muestra una fuerte dependencia con el incremento en la concentración de κ -carragenina. Para geles con 8.0% de WPI, el comportamiento es diferente así como cuando pequeñas cantidades de κ -carragenina afectan fuertemente el módulo elástico final, mientras que para concentraciones de κ -carragenina ($> 0.4\%$), el módulo muestra una pequeña dependencia con la concentración. Estas concentraciones corresponden a los puntos binodales. Otra conclusión importante es que los sistemas mezclados de soluciones WPI- κ -carragenina a pH 7, son compatibles a temperatura ambiente. Con el tratamiento térmico, las interacciones proteína-proteína se ven favorecidas y el WPI forma agregados. El sistema evoluciona promoviendo la separación de fases segregativa. Los agregados de WPI se forman primero durante el tratamiento térmico, la κ -carragenina gobierna la separación de fase segregativa a altas temperaturas y puede reforzar el gel cuando el sistema es enfriado. Para altas concentraciones de κ -carragenina, se observa una más rápida agregación de proteína y formación del gel. El módulo elástico se incrementa abruptamente cuando la concentración de κ -carragenina es mayor que 0.2%. Sin embargo, el módulo de almacenamiento se incrementa cuando existe un desplazamiento de un dominio compatible a uno incompatible.

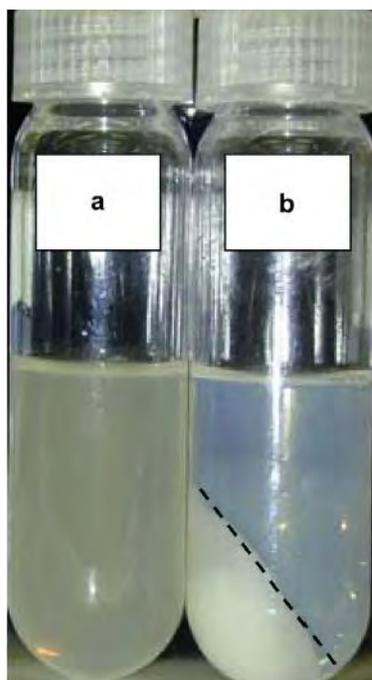


Figura 26. Observación visual de dos muestras después del tratamiento térmico (80 °C por 30 minutos) y centrifugación. (a) 5% WPI con 0.2% κ -carragenina; (b) 5% WPI con 0.4% κ -carragenina, ejemplo de separación de fases.

En otro trabajo reportado por Flett & Corredig (2009), se determinó el efecto de la κ -carragenina sobre el tamaño de los agregados de WPI, utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para una concentración dada de κ -carragenina, el calor que induce la agregación de la β -lactoglobulina no es afectado por el polímero presente en solución, al menos hasta que los agregados de proteína alcanzan cierto tamaño y la separación de fases ocurre. Al incrementar la temperatura, la presencia de κ -carragenina afecta el comportamiento de agregación. La κ -carragenina y la proteína muestran incompatibilidad termodinámica y esto afecta la formación de “bloques intermedios” en la agregación. La presencia del polisacárido causa la formación de agregados intermedios polidispersos, modificando el arreglo de los bloques de construcción en la estructura de geles de WPI (Figura 27).

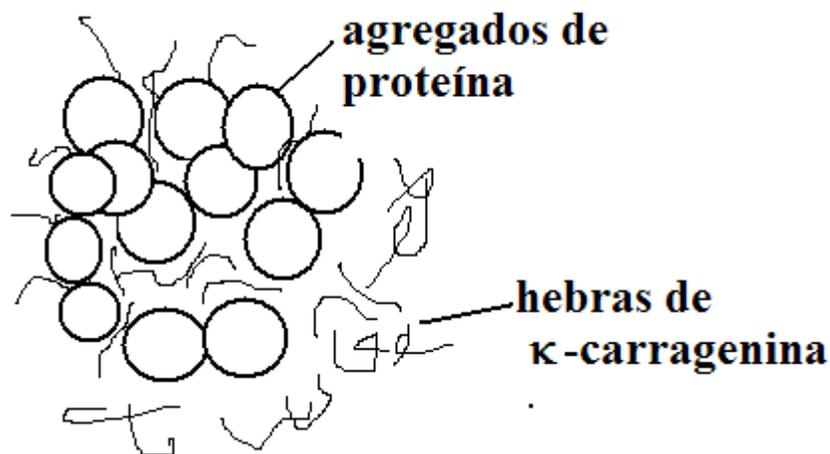


Figura 27. Agregados de proteína rodeados por hebras de κ -carragenina en ausencia de sal.

Por otro lado Mleko et al. (1997), reportaron que hay un efecto moderado de la κ -carragenina en la exposición de grupos hidrofóbicos del WPI a pH 7, después del tratamiento térmico, es de $92.5\%^{-1}$ y con la adición de κ -carragenina, es de $84.8\%^{-1}$. Para bajos valores de pH, hay un incremento en la superficie hidrofóbica; a pH 3, el valor de la superficie hidrofóbica es $1176\%^{-1}$ y a pH 5, de $121\%^{-1}$ siendo los valores para WPI a pH 3 de $548\%^{-1}$ y a pH 5 de $119\%^{-1}$. Los resultados se expresan como $\%^{-1}$ porque la hidrofobicidad de superficie es expresada como la pendiente de una gráfica de intensidad de fluorescencia relativa de blancos de proteína, contra porcentaje de concentración de proteína.

Harrington et al. (2009), reportaron que para mezclas 10% WPI con κ -carragenina a concentraciones de 0.05 a 3.0% posterior al tratamiento térmico, la gelificación de la κ -carragenina en los poros de una red formada de WPI, forma una estructura de un gel bicontinuo y por otro lado, la formación y la disociación de la red de carragenina no causa interrupción en la red de WPI.

4.10 Discusión

Se ha estudiado la transición de κ -carragenina en presencia de sodio por diversos métodos, sin embargo, todavía no ha quedado bien asentado el fenómeno de gelificación de este polielectrolito en presencia de sodio. Semenova et al. (1988), afirmaron que hay una asociación de las hebras para que se realice la gelificación en presencia de sodio a bajas temperaturas y basan sus observaciones en el aumento del índice de refracción. Sin

embargo, Mangione et al., (2005) afirmaron que la asociación de hélices para que exista la formación de un gel, debe existir una relación entre los iones potasio y sodio presentes en la disolución.

Como se ha mostrado en la Figura 24, los iones pueden tener distintos efectos sobre las propiedades reológicas de la κ -carragenina, aunque los efectos dependen de la conformación de un hidrocoloide. Tal como señala Chronakis et al., (2000) al relacionar el efecto de diversos contraiones con la rigidez de los geles, en conformación desordenada, los contraiones disminuyen el volumen hidrodinámico de la molécula, mientras que cuando hay agregación, los iones incrementan la rigidez de los geles. Sin embargo, el exceso de iones conduce a la disminución de G' por la extensa formación de agregados así como por la precipitación. El ion yoduro (I^-) puede hacer que la κ -carragenina forme dobles hélices, sin embargo, estos no se agregan y como resultado, se forma un “gel débil” ya que no se autosostiene. Por otro lado, la adición de WPI ya ha sido estudiada por Turgeon & Beaulieu, (2001); Mleko et al. (1997), quienes afirmaron que la variación en la firmeza de estos geles puede ser atribuida a un cambio en la estructura de hebras a partículas. Este fenómeno puede ser explicado por la formación de complejos entre las proteínas y la κ -carragenina, debido a que las moléculas de carragenina están conectadas a las proteínas globulares, lo cual provoca un incremento de la densidad electrónica del medio circundante (Turgeon et al., 2001). Cabe resaltar también las observaciones de Turgeon et al., (2001) quienes mencionaron que si se incrementa la concentración de κ -carragenina ($C_{\kappa-car}$), el sistema se aleja de una solución diluida hacia un sistema biopolimérico más concentrado ($C^* < C_{\kappa-car} < C^{**}$) y la incompatibilidad termodinámica entre el WPI y la κ -carragenina del sistema aumenta. En las mezclas ocurren algunas reacciones de competencia al mismo tiempo: i) gelificación de WPI (cambio en el tamaño de los agregados), ii) incremento en la asociación κ -carragenina- κ -carragenina y iii) separación de fases segregativa inducida por la incompatibilidad termodinámica. Sin embargo, el calentamiento a pH neutro provoca que la β -lactoglobulina desnaturalizada exponga los grupos positivos de los aminoácidos, los cuales se vuelven disponibles para su interacción con κ -carragenina y podrían permitir la formación de complejos (de la Fuente et al., 2004).

4.11 Referencias Bibliográficas

- Cairns, P., Atkins, E., Miles, M. & Morris, V. (1991). Molecular transforms of Kappa carrageenan and furcellaran from mixed gel systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 13, 65-68.
- Chandrasekaran, R. (1998). X-ray diffraction of food polysaccharides. En "Advances in food and nutrition research. Vol. 42". Steve L. Taylor. Ed. Academic Press, NY. 158,162 y 183.
- Chen, Y., Ming-Long, P. & Dunstan, D. (2002). The rheology of K^+ - κ -carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers* 50, 109-116.
- Chronakis, I.S., Doublier, J.L. & Péculel, L. (2000). Viscoelastic properties of kappa- and iota carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behavior. *International Journal of Biological Macromolecules* 28, 1-14.
- de la Fuente, M. A., Hemar, Y. & Singh, H. (2004). Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions. *Food Chemistry*, 86, 1-9.
- Drohan, D., Tziboula, A., Mc Nulty, D. & Horne, D. (1997). Milk Protein carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids* 11(1), 101-107.
- FAO, Food Agricultural Organization, (1987). Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Roma. FAO Fisheries Technical Paper 288.
- Fennema, O. (2000). Química de los Alimentos. Ed. Acirbia S.A. Zaragoza. España, 2ª Edición. 115-150.
- Flett, K. & Corredig, M. (2009). Whey protein aggregate formation during heating in the presence of κ -carrageenan. *Food Chemistry* 115, 1479-1485.
- Harrington, J., Foegeding, E.A., Mulvihill, D. & Morris E. (2009). Segregative interactions and competitive binding of Ca^{+2} in gelling mixtures of whey protein isolate with Na^+ κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids* 23, 468-489.
- Gaaloul, S., Turgeon, S. & Corredig, M. (2009). Influence of shearing on the physical characteristics and rheological behavior of an aqueous whey protein isolate-kappa-carrageenan mixture. *Food Hydrocolloids* 23, 1243-1252.
- Glicksman, M. (1969). Gum Technology in the food industry, Ed. Academic, New York. EE.UU, 200-250.
- Kavanaugh, G.M. & Ross-Murphy, S.B. (1998). Rheological characterization of polymer gels. *Progress Polymer Science* 23, 533-562.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1997). Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids* 11(1), 35-40.
- Mangione M., Giacomazza D., Bulone D., Martorana V., Cavallaro G. & San Biagio P.L. (2005). K^+ and Na^+ effects on gelation properties of κ -Carrageenan. *Biophysical Chemistry* 113, 129-135.
- Meunier, V., Nicolai, T. & Durand, D. (2001). Structure of aggregating κ -carrageenan fractions studied by light scattering. *International Journal of Biological Macromolecules* 28, 157-165.

- Michel, A., Mestdagh, M. & Axelos, M. (1997). Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* 21, 195-200.
- Milas, M. & Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate Polymers* 30, 177-184.
- Milas, M., Shi, X. & Rinaudo, M. (1990). On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, 30, 451-464.
- Mleko, S., Li-Chan, Y. & Pikus, S. (1997). Interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International* 30(6), 427-433.
- Millane, R., Chandrasekaran, R., Arnoti, S. & Dea, C. (1988). The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research* 182, 1-17.
- Morris, E.R. (1990). Mixed polymer gels en P. Harris, Food gels. Elsevier Science Publishing Co. Inc. 291-359.
- Morris, E.R., Rees D.A., Welsh E.J., Dunfield. E.J., Dunfield, L.G. & Whittington, S. (1978). Relation between primary structure and chain flexible of random coil polysaccharides: Calculation and experiment for a range of model carrageenan. *Journal of Chemical Society of Pekin Trans II*, 793.
- Núñez, M., Tecante, A., Garnier, C. & Doublier, J.L. (2011). Rheology and microstructure of k-carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ions. *Food Hydrocolloids* 1, 31-41.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980a). Structural and Conformational Investigation of Carrageenans. *Biopolymers* 19, 2165- 2175.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980b). Activity coefficients of Counterions and Conformation in Kappa-Carrageenan Systems. *Biopolymers* 19, 1675-1687.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1982). Calorimetric determination of the conformational transition of kappa-carrageenan. *Carbohydrate Research* 105, 227-236.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1984). Mechanism of Gel Formation in κ -Carrageenan. *Biopolymers* 23, 735-745.
- Sánchez-Basurto González, B.E. (2006). Descripción reológica de la transición orden-desorden de gelana en ausencia de contraion externo. Tesis de Maestría, Facultad de Química-UNAM
- Semenova, M., Plaschina, I., Braudo, E. & Tolstoguzov, V. (1988). Structure Formation in Sodium κ -Carrageenan Solutions. *Carbohydrate Polymers* 9, 133-145.
- Slotmaekers, D., De Jonghe, D., Reynaers, H., Varkevisser, F.A. & Bloys van Treslong, C.J., (1988). Static Light scattering from κ -carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 10, 160-168.
- Snoeren, T.H. (1976). κ -carrageenan. A study on its physic-chemical properties, sol-gel transition and interaction with milk proteins. Tesis doctoral. Wageningen, Holanda
- Solís-Bravo, I.M. (2007). Estudio comparativo de las propiedades finales de extractos de carragenina κ -I/ κ -II utilizando distintas algas productoras de carragenina κ -II. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fas687e/doc/fas687e.pdf> Octubre 2011.
- Takemesa, M. & Chiba, A. (2001). Gelatin mechanism of κ and ι -carrageenan investigated by correlation between the strain-optical coefficient and the dynamic shear modulus. *Macromolecules* 34, 7427-7434.

- Takemesa, M. & Nishinari, K. (2004). The effect of the linear charge density of carrageenan on the ion binding investigated by differential scanning calorimetry (DSC), conductivity, and dielectric relaxation. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 38, 231-240.
- Turgeon, S.L., & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 15(4-6), 583-591.
- Viebke, C., Borgström, J. & Picullel, L. (1995). Characterisation of kappa- and iota- Carrageenan coils and helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers* 27, 145-154.
- Villanueva, R., Mendoza, W., Rodriguez, M., Romero, J. & Montaña, M. (2004). The structure of k/i hybrid carrageenan II. Coil helix transitions as a function of chain composition. *Carbohydrate Research* 340, 1113-1129.
- van de Velde, F., Peppelman, H., Rollema, H. & Tromp, R. (2001). The structure of κ/ι hybrid carrageenan from *Euchema denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers* 58, 455-460.
- van de Velde, F., Rollema, H.S., Gringberg, N.V., Burova, T., Gringberg, V. & Tromp, H. (2002). Coil-Helix transition of ι -carrageenan as a function of chain regularity. *Biopolymers* 65, 299-323.
- Viebke, C., Borgström, J., Carlsson, I., Picullel, L. & Williams, P. (1998). A differential scanning calorimetry study of κ -carrageenan in the NaCl/NaI/CsI/CsCl systems and analysis by Poisson-Boltzmann calculations. *Macromolecules*, 31, 1833-1841.
- Viebke, C., Borgström, J. & Picullel, L. (1995). Characterisation of kappa- and iota- Carrageenan coils and helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers*, 27, 145-154.
- Vreeman, H.J., Snoeren, H.M., & Payens, T.A.J. (1980). Physicochemical investigations of κ -carrageenan in the random state. *Biopolymers* 19, 1357-1374.
- Whistler, R. & BeMiller, J. (1993). Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives, 3rd edition, Ed. Academic Press, San Diego, EE.UU. 375.
- Xu, S., Stanley, D., Goff, H., Davidson, V. & Maguer, M. (1992). Hydrocolloid/milk gel formation and properties. *Journal of Food Science* 57 (1), 96-102.
- Yoshiaki, Y., Thanh, T., Urakawa, I. & Kajjara, K. (2002). Structural characteristics of carrageenan gels, temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids* 16, 515-522.

5. HIPÓTESIS

En la Introducción se han resaltado las propiedades de los compuestos macromoleculares. Se discutieron los diferentes comportamientos de las mezclas proteína-polisacárido. Se hizo notar que la κ -carragenina en presencia de sodio no forma estructuras ordenadas de dímeros helicoidales, sino que permanece como hebra y se han puesto de manifiesto las propiedades espesantes del almidón. Con base en esto, la hipótesis de esta tesis es la siguiente:

Las propiedades viscoelásticas de las mezclas de almidón de maíz ceroso modificado químicamente-proteínas séricas lácteas- κ -carragenina, dependerán de la morfología y arquitectura resultantes del tratamiento a 90°C, de tal manera que mientras mayor sea la concentración de κ -carragenina, mayor será el predominio del carácter elástico sobre el viscoso y menor será la asociación física entre los gránulos hinchados de almidón y las proteínas séricas lácteas desnaturalizadas con respecto a la κ -carragenina. Lo anterior significa que dependiendo de las proporciones de las mezclas, podrán generarse diferentes morfologías y arquitecturas y comportamientos reológicos, como resultado de diferentes formas de interacción física entre los componentes.

Cabe mencionar que la fracción volumen de los gránulos hinchados de almidón, tendrá su aportación en el comportamiento reológico de las mezclas, reforzando la estructura de red formada por la fase continua, que está constituida por la κ -carragenina y por el aislado de proteína de suero.

6. OBJETIVOS

6.1 Principal

Determinar el comportamiento viscoelástico de mezclas de almidón de maíz ceroso modificado químicamente, proteínas aisladas de suero lácteo y κ -carragenina, por medio del examen de su comportamiento reológico y relacionarlo con su morfología y arquitectura asociada al tratamiento a 90 °C.

6.2 Particulares

- ❖ Determinar, por medio de pruebas de cizalla oscilatoria, el comportamiento viscoelástico de las pastas de almidón de maíz ceroso reticulado químicamente (CH10), de los sistemas acuosos de aislados de proteína de suero (WPI) y de las mezclas preparadas con diferentes concentraciones de κ -carragenina (κ C), almidón y WPI, para conocer el espectro de comportamiento reológico de suspensiones diluidas, semidiluidas y concentradas que se obtienen a 90 °C.
- ❖ Determinar por medio de pruebas reológicas si la presencia de la κ -carragenina modifica la temperatura de gel de las proteínas y en las mezclas proteína-almidón
- ❖ Determinar, por medio de difracción láser, el tamaño y distribución de tamaños de los gránulos de almidón de las pastas, y de los gránulos de almidón en las mezclas preparadas a diferentes concentraciones de almidón, para conocer el espectro de estado físico de las suspensiones diluidas, semidiluidas y concentradas que se obtienen a 90°C.
- ❖ Examinar por medio de microscopia, la morfología de los gránulos de almidón de las pastas, así como la morfología y arquitectura de las mezclas de almidón y WPI preparadas a 90 °C y diferentes concentraciones de almidón, WPI y κ -carragenina, para conocer el efecto a 90 °C y correlacionarlo con el comportamiento viscoelástico.
- ❖ Examinar por medio de microcalorimetría diferencial de barrido, las temperaturas de transición de gelatinización del almidón, de desnaturalización de la proteína, de la fusión y gelificación de la κ -carragenina, así como el comportamiento de cada uno de los elementos en la mezcla ternaria.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

7.1 Diagrama general

El diagrama general de la investigación realizada se presenta en la Figura 28, Posteriormente se describen los materiales y métodos empleados.

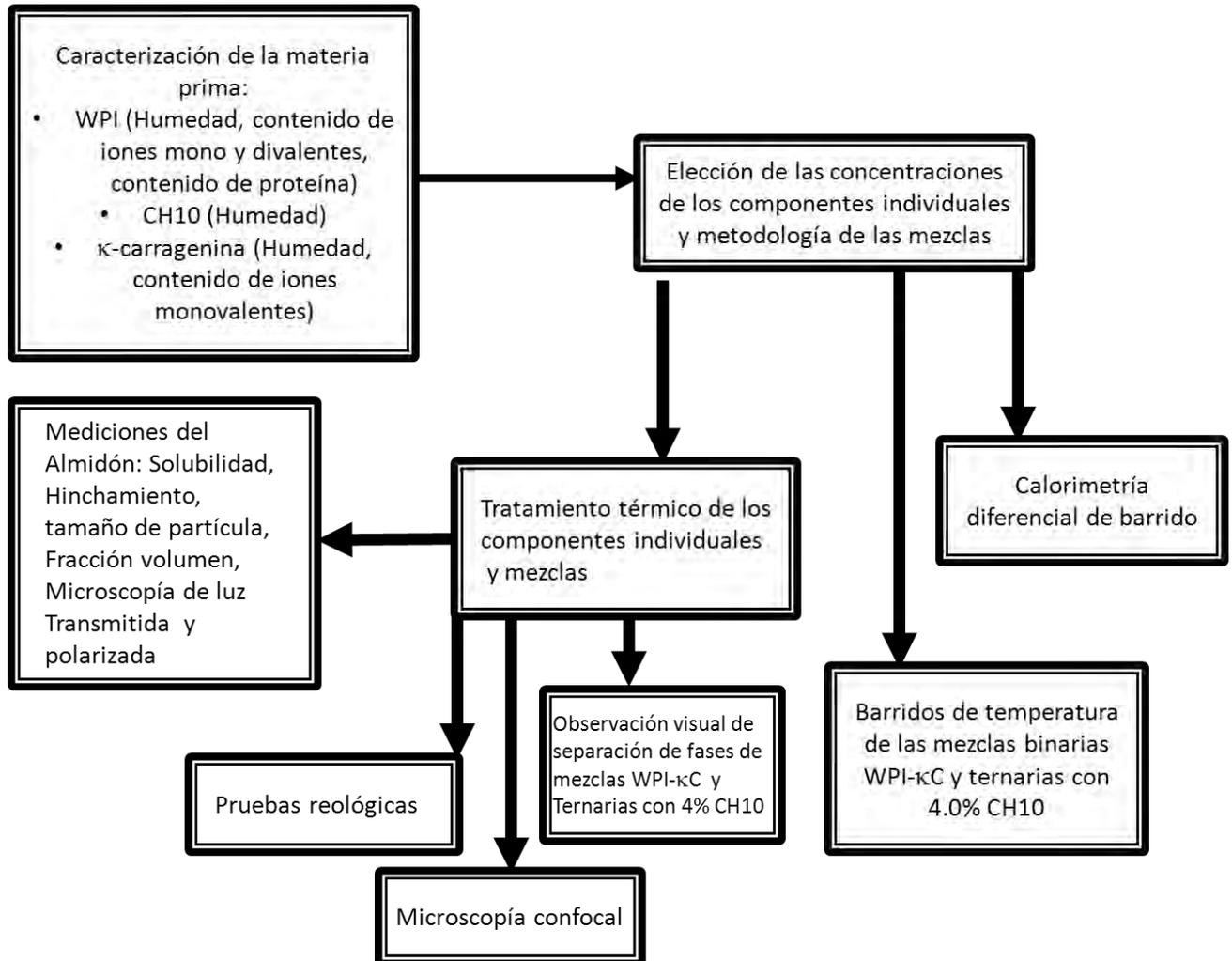


Figura 28. Metodología Experimental de la investigación

7.2 Materiales

Los materiales incluyeron aislado de proteína de suero lácteo, WPI por sus siglas en inglés, (Nutrical, Lactoprot, México), almidón de maíz ceroso modificado químicamente con ácido adípico y estabilizado con acetato, Clearam CH10® (Roquette Frères, Lestrem Francia) y κ -carragenina (κ C) grado alimenticio (Degusa Texturant Systems, Baupre, Francia), extraída de *Euchema cottoni*. El contenido de iones fue determinado por absorción atómica. La composición del WPI y la κ -carragenina se muestra en la tabla 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6. Contenido de iones del aislado de proteína de suero lácteo.

	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Concentración (mg/kg)	3868	749.2	2328	474.1

Tabla 7. Contenido de iones de la κ -carragenina.

	K ⁺	Na ⁺
Concentración (mg/kg)	64423	15807

Como fluorocromos se emplearon isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés) para el almidón. Para el WPI se empleó el ácido 8-anilin-naftalensulfónico (ANSA) y el isotiocianato de rodamina B (RITC por sus siglas en inglés) para la κ -carragenina. El dimetilsulfóxido (DMSO), la azida de sodio (NaN₃), el dibutiltín dilaureato (DBTDL), la piridina, el cloruro de sodio (NaCl) y la dextrana azul (M_w = 2 x 10⁶, Sigma D5751-5G), fueron grado analítico. El disolvente fue agua desionizada a menos que se indique lo contrario. Los fluorocromos empleados así como el DMSO, el DBTDL y la azida de sodio pertenecen a la marca Sigma-Aldrich, México.

7.3 Métodos

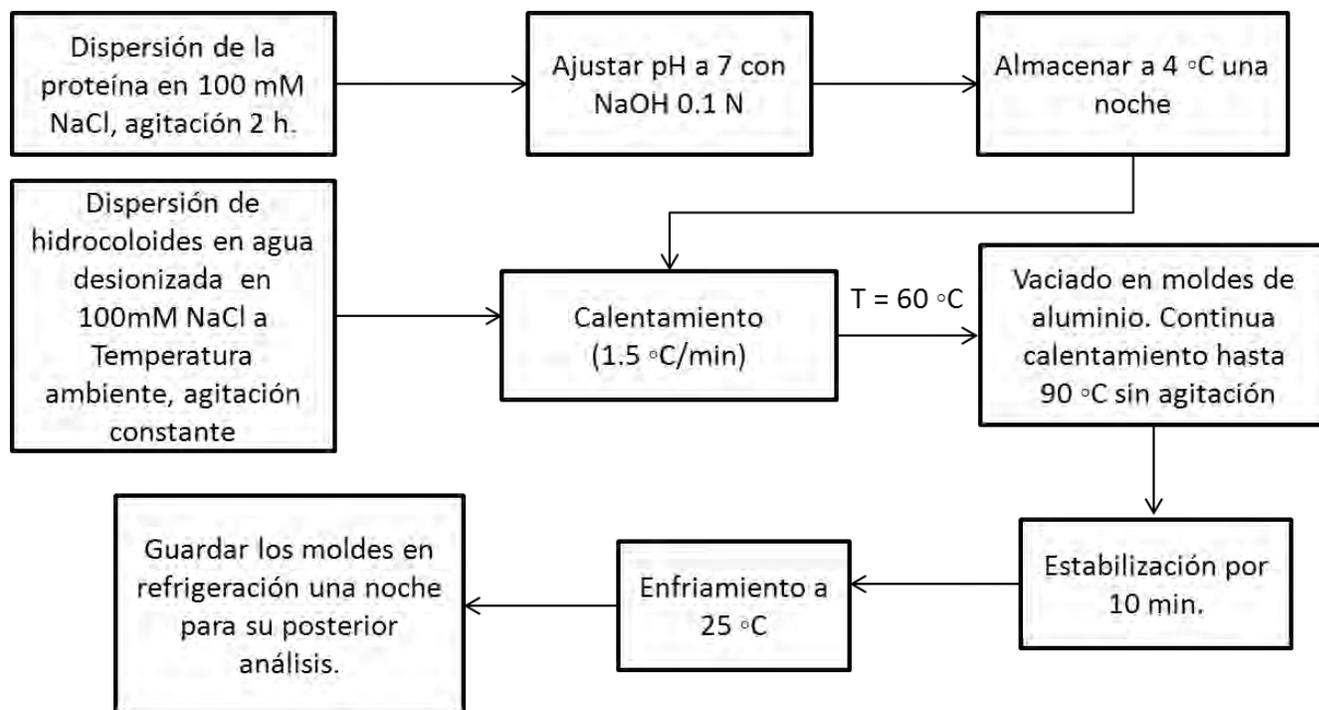


Figura 29. Esquema de la preparación de geles.

7.3.1 Preparación de las pastas y geles de κ -carragenina-CH10-WPI

Se pesó la cantidad de polvo de WPI y se disolvió en una disolución de cloruro de sodio 100 mM a temperatura ambiente (20 °C) con agitación magnética a 560 rpm por dos horas. Posteriormente, se ajustó el pH a 7 con NaOH 0.1M y se mantuvo la disolución a 4 °C durante toda la noche. Para preparar las diferentes mezclas, la disolución de WPI se atemperó a 25 °C en un tanque enchaquetado, conectado a un baño programable con circulación externa de agua (Polystat, Cole Parmer, EUA). Una vez alcanzada dicha temperatura, se añadió poco a poco la cantidad necesaria de polvo de almidón y de κ -carragenina. Se dispersó con agitación magnética a 260 rpm para prevenir la sedimentación del almidón y la agregación de la κ -carragenina. Se calentó desde 25 °C hasta 90 °C, a una tasa de 1.5 °C /min. Cuando se alcanzó una temperatura de 60 °C, se detuvo la agitación y se vaciaron 50 mL de la mezcla en dos moldes de aluminio de 10 cm de altura, con

diámetro interno de 2.5 cm. Los moldes se colocaron en el baño, se llevaron a 90 °C, se mantuvieron a esa temperatura 10 minutos y se enfriaron hasta 25 °C, con la misma tasa que durante el calentamiento. Este mismo procedimiento se aplicó a las muestras individuales y a las mezclas de dos componentes en las concentraciones siguientes: CH10; 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0%, WPI; 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 3.9% y κ -carragenina; 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0%. El contenido de humedad en CH10 fue de 9.2%, para la κ C fue de 5.20% y para el WPI 5.50%.

7.4 Mediciones

7.4.1 Hinchamiento, solubilidad y fracción volumen

Estas determinaciones se realizan con el fin de obtener la fracción volumen que ocupan los gránulos de almidón hinchados y describir el estado físico de las pastas. El hinchamiento y la solubilidad terminales, es decir, al final de la cocción, se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Tecante & Doublier (1999). La pasta se diluyó con agua caliente (60 °C), tomando una alícuota necesaria para obtener una concentración final de 0.5% de almidón. La dilución se enfrió rápidamente a 25 °C y se centrifugaron 8 mL de ésta a 700g durante 15 min (Mohammed et al., 1998) en una centrífuga de laboratorio (Hermle Z200A, Labnet, Germany). Los restantes 8 mL se secaron en una estufa durante 24 h a 100 °C para obtener la masa de almidón seco. La solubilidad, [S], referida a la masa de almidón seco, se calculó a partir de la concentración de almidón soluble en el volumen total de sobrenadante, determinada por el método de fenol-sulfúrico (Tollier & Robin, 1979), el cual cuantifica la cantidad de azúcares totales. El hinchamiento del gránulo, H, se calculó a partir de la masa de residuo de la centrifugación y la masa de almidón seco. Se calculó la fracción volumen, Φ , usando la relación $\Phi = [1-(S/100)]cH$, donde c es la concentración inicial de almidón (Ellis et al., 1989).

Se empleó también el método dextrana azul (Ellis et al., 1989) para determinar el hinchamiento como se describe a continuación. Una porción de 75 g de una dispersión de almidón cocido de concentración conocida, se mezcló con 25 g de una solución 0.1% de dextrana azul ($M_w = 2 \times 10^6$) en un matraz de boca ancha. La mezcla se agitó varias veces y se tomaron alícuotas de 10 g para separar los gránulos a 1000g por 5 minutos en una centrífuga de laboratorio (Hermle Z200A, Labnet, Germany). El sobrenadante fue separado

y se leyó su absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation, E.U.A.). Previamente se obtuvo una curva de calibración estándar, preparada con dextrana azul, con ocho concentraciones diferentes (C_{da}), en un intervalo de 0.01 a 0.1% (m/v). Resultando la siguiente ecuación de regresión ($r^2 = 0.989$) de dicha curva:

$$C_{da} = -4 \times 10^{-4} + 0.117A \quad (8)$$

donde A es la absorbancia (Unidades de Absorbancia). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

El hinchamiento (g de residuo húmedo /g de residuo seco) se calculó como:

$$H = \frac{m_b + m_d}{m_d} \quad (9)$$

donde m_d es el peso de los gránulos secos (g), m_b es el peso del agua absorbida por los gránulos de almidón (g) calculado como:

$$m_b = m_t - m_{da} \left(\frac{0.1}{C_{da}} \right) \quad (10)$$

donde m_t es el peso total de agua (agua en la dispersión de almidón + agua en la solución de dextrana azul) (g), m_{da} es el peso de la solución 0.1% de dextrana azul (g), C_{da} es la concentración (%) de dextrana azul en el sobrenadante. El producto m_{ad} ($0.1/C_{da}$) toma en cuenta el agua intersticial entre los gránulos de almidón.

7.4.2 Distribución de tamaños de partícula

La distribución de tamaños de partícula se determinó por quintuplicado a temperatura ambiente (25 °C) en un equipo de difracción de rayo láser (Malvern Master SizerS 2000, Malvern Instruments, Ltd) provisto de una unidad de dispersión (Hydro 2000 MU). Una vez preparada la pasta y enfriada a 60 °C, la suspensión de almidón, se dispersó en agua desionizada caliente (60 °C), haciendo una dilución 1 en 10. Se enfrió rápidamente a temperatura ambiente a fin de evitar la posibilidad de un hinchamiento subsecuente de almidón. Posteriormente, 10 mL de la dilución 1 en 10 se dispersaron en 800 mL de agua desionizada en el módulo Hydro 2000 MU, para obtener una concentración final de almidón del orden de $5 \times 10^{-3}\%$. Los resultados se expresan como el diámetro mediano $D[v,0.5]$. Este diámetro es la medida a la cual el 50% de las partículas en volumen son

pequeñas y 50% son grandes. La difracción láser requiere la media de los índices de refracción. El índice de refracción del almidón y de la fase líquida fue 1.5295 y 1.3300, respectivamente (Tecante & Doublier, 1999)

7.4.3 Microcalorimetría de barrido diferencial (μ DSC)

Se utilizó un microcalorímetro de barrido diferencial (DSC7 Evo, Setaram, France) con celdas de Hastelloy C276. En una celda (diámetro interno 6.4 mm, altura 19.5 mm) se colocó una masa de agua igual a la de la muestra (838 mg), la cual fue utilizada como referencia. Las celdas de referencia y la de la muestra se cerraron con una tapa roscada. La temperatura de gelatinización del almidón, de desnaturalización de la proteína y de la fusión-gelificación de la κ -carragenina, fue determinada como una transición endotérmica con respecto a la línea base. La intención de realizar experimentos de calorimetría para estas tres mezclas, fue la de relacionar los resultados obtenidos con las pruebas reológicas. Asimismo, se analizaron los resultados con base en el diagrama de transición de fases para la κ -carragenina, cuando se añade cloruro de sodio.

7.5 Microscopia

7.5.1 Microscopia de luz transmitida y polarizada

Una vez obtenidas las pastas de almidón a 25 °C, se diluyeron en una proporción 1 en 10. Para ello se colocó una gota de la dilución sobre un portaobjetos. Se adicionó una gota de lugol (Sigma Chemicals, México) y se colocó un cubre objetos. Los gránulos de almidón se observaron por medio de una cámara de alta resolución acoplada a un microscopio Olympus BX (Japón), con los objetivos 10 y 40x. La captura de imágenes se realizó con el programa Image-Pro Plus Ver.1.00 (Media Cybernetics, L.P.). Las imágenes de luz polarizada se obtuvieron por observación directa de los gránulos nativos sin cocer, usando un filtro de luz polarizada (BX45-PO).

7.5.2 Microscopia confocal de barrido láser

La κ -carragenina se marcó de manera covalente con RITC, siguiendo el procedimiento descrito por Núñez et al. (2011). Un gramo de κ C fue disuelto en 50 mL de DMSO con

agitación magnética a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se añadió 1.5 mL de piridina, 0.06 g de RITC y 50 μ L de DBTL. La mezcla fue calentada con agitación magnética por 2 horas a 40 °C. Después de este tiempo, la κ C marcada fue precipitada con etanol (95%), filtrada a través de una membrana porosa (40 a 60 μ m) (Millipore, USA) y deshidratada con etanol absoluto y acetona para remover el marcador libre y finalmente, secada en un horno (Barnsted, Lab-line, USA) a 30 °C por 24 horas. La κ C seca y marcada fue disuelta en agua a 80 °C por 15 min, dializada (Spectra/Por 28.6 mm, Spectrum Medical Industries, Inc. USA) contra agua desionizada con 0.02% de azida de sodio para prevenir el crecimiento microbiano, liofilizada y almacenada a 4 °C. El fluorocromo fue excitado a 568 nm y la emisión observada a 580-600 nm.

El WPI fue marcado de manera no covalente como sigue; 0.02 de ANSA fue disuelto en 100 mL de agua y agitado por 5 min. Un volumen de 50 μ L de esta mezcla fue añadido a 100 mL de la solución de WPI. El ANSA fue excitado utilizando un láser UV a 364 nm y su emisión fue observada a 450 nm. El CH10 también fue marcado de manera no-covalente con FITC; 0.02 g de fluorocromo fue disuelto en 10 mL de una solución 50/50 (DMSO/H₂O). Un volumen de 50 μ L de FITC fue excitado a 488 nm, su emisión fue observada a 565 nm. Cuando las mezclas alcanzaron 90 °C, una muestra de 50 μ L fue depositada en el portaobjetos, sellada con barniz para uñas y guardada a 4 °C toda la noche. Las observaciones fueron realizadas en el microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus, Japón), utilizando un láser Argón/Kriptón y un objetivo de inmersión de aceite 40x.

7.6 Cizalla oscilatoria de baja amplitud

Las pruebas reológicas se llevaron a cabo en un reómetro ARES-RFS III (TA Instruments, E.U.A.) usando placas paralelas estriadas de 25 mm de diámetro y una separación de 1.5 a 2 mm. Las mezclas almidón-WPI 1.0 + 0.5 y 1.0 + 1.0% fueron examinadas en placas paralelas de 50 mm de diámetro, con una separación de 1 mm. Los geles a temperatura ambiente fueron cortados en discos (25 mm de diámetro y 2 mm de espesor) y colocados en la placa inferior del reómetro. La placa superior fue colocada sobre la muestra y el exceso de muestra fue cortado. El borde de la geometría fue cubierto con aceite de parafina para minimizar las pérdidas de humedad durante el experimento. Las

pruebas realizadas fueron: a) Barrido de deformación a 25 °C, iniciando desde 0.1 a 100% con una frecuencia de 6.28 rad/s para determinar la región de viscoelasticidad lineal. B) Barridos de frecuencia se realizaron a una deformación constante de 1%. El intervalo de frecuencia fue de 0.01 a 100 rad/s. Los resultados son expresados por medio del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). Adicionalmente, la fuerza de los geles fue interpretada en términos de la $\tan \delta$. En general, geles con $\tan \delta > 0.1$ fueron considerados como geles poco rígidos, mientras que los geles con $\tan \delta < 0.1$ fueron rígidos (Shim & Mulvaney, 2001). C) Barridos de Temperatura a una frecuencia angular de 6.28 rad/s como sigue: (1) Incremento de la temperatura a una velocidad de 1.5 °C/min de 25 a 90 °C a 50% de deformación; (2) Diez minutos a 90 °C a 30% de deformación; (3) enfriamiento a la misma temperatura de calentamiento de 90 °C a 5 °C a 20% de deformación; (4) Diez minutos a 5 °C a 5% de deformación. Se aplicaron diferentes deformaciones verificando que las mediciones se llevaran a cabo dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

7.7 Observación de la separación de fases

Las mezclas WPI- κ C fueron centrifugadas para identificar las concentraciones en las cuales existe la separación de fases. Las soluciones de ambos componentes fueron mezcladas a diferentes concentraciones a pH 7.0 y agitadas a temperatura ambiente en tubos de centrífuga con tapa. Los tubos fueron sometidos al tratamiento térmico descrito previamente y manteniendo a 90 °C por 10 minutos sin agitación. Posteriormente los tubos se colocaron en la centrífuga (Hermle Z200A, Labnet, Germany) a 5000 rpm por 30 minutos.

7.8 Análisis estadístico

El diseño experimental permite optimizar la influencia de varios parámetros de operación minimizando el número de experimentos por parámetro de salida, el cual es la respuesta al diseño experimental. Se utilizó el programa Statgraphics Centurion (Version XV para Windows) para reunir los datos en tres variables independientes y varios niveles de combinaciones variables, para el CH10 se utilizaron cinco niveles (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 y

4.0%), para el WPI se utilizaron siete niveles (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 3.9%) y para la κ -C se utilizaron 5 niveles (0.0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0%).

7.9 Referencias Bibliográficas

- Ellis, H.S., Ring, S.G. & Whittam, M.A. (1989). comparison of the viscous behavior of wheat and maize starch pastes. *Journal of Cereal Science* 10, 33-44.
- Mohammed, Z.H., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (1998). Co-gelation of agarose and waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers* 36, 37-48.
- Núñez-Santiago, M.C., Tecante, A., Garnier, C., & Doublier, J.L. (2011). Rheology and microstructure of κ -carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. *Food Hydrocolloids*, 25, 32-41
- Shim, J., & Mulvaney, S.J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/ whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 706-717.
- Tecante, A. & Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch- κ -carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers* 67, 551-557.
- Tollier, M. T. & Robin, J. P. (1979). Adaptation de la méthode à l'arcinol sulfuric au dosage automatique des glucides neutres totaux condition d'application au extraits d'origine végétale (Adaptation of the sulphuric orcinol method to the automatic analysis of total neutral sugars: application to vegetable origin extracts). *Annals de Technological Agriculture* 28, 1-16.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Componentes individuales

8.1.1 Hinchamiento y solubilidad del almidón

La Tabla 8 muestra el hinchamiento (H) obtenido por el método de Ellis (1989) y la solubilidad (S) del CH10 en las pastas cocidas por el método fenol-sulfúrico. La solubilidad es menor de 3.0% debido a la baja cantidad de amilosa que hay en este almidón. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la solubilidad para las diferentes concentraciones de almidón. De igual manera, el hinchamiento disminuyó al aumentar la concentración.

Tabla 8. Solubilidad e hinchamiento del CH10 cocido a 90 °C.

Almidón (%)	Solubilidad (%)	Hinchamiento (g/g)
1.0	2.60 ± 0.100	46.0 ± 1.93
2.0	2.42 ± 0.120	36.4 ± 1.25
3.0	2.16 ± 0.084	34.7 ± 3.72
4.0	2.47 ± 0.068	30.7 ± 1.09

8.1.2 Tamaño y distribución de tamaños de los gránulos de almidón

La Figura 30 muestra la distribución de tamaños de los gránulos de pastas con diferentes concentraciones de CH10. La distribución de tamaños es muy similar para las diferentes concentraciones de almidón. La Tabla 9 muestra el diámetro mediano y el poder de hinchamiento de los gránulos de CH10 cocidos a 90 °C. El poder de hinchamiento (PH) se define como $(D_{\max}/D_i)^3$ (Ziegler et al., 1993), donde D_{\max} es el diámetro máximo de los gránulos cocidos y D_i es el diámetro inicial de los gránulos de almidón nativo. Se usó el diámetro mediano $D[v,0.5]$, cuyo valor indica que 50% del volumen de la población es mayor y 50% es menor de dicho diámetro. La relación de diámetros se expresó como

$(D/D_0)^3$, donde D_0 es el diámetro mediano del almidón nativo sin cocer y D es el diámetro mediano en el almidón cocido (Tecante & Doublier, 1999; Nayouf, 2003). De manera similar, se calculó el poder de hinchamiento con el método de azul dextrana (PH_{AD}), con el procedimiento descrito previamente.

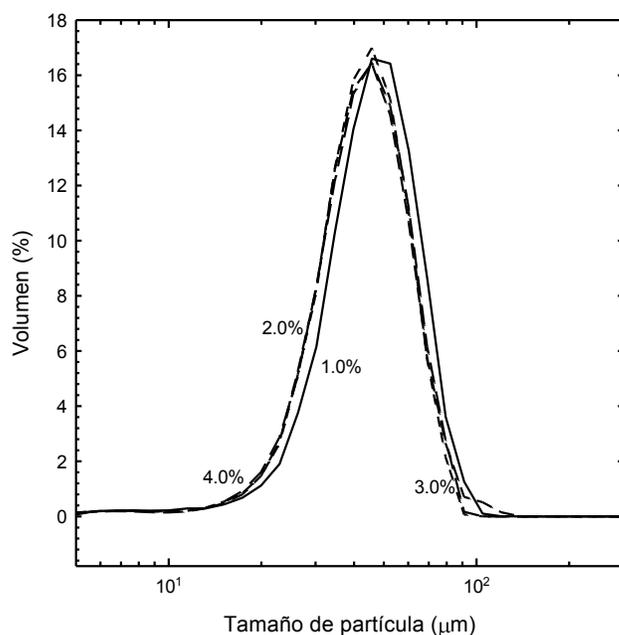


Figura 30. Distribución de tamaños de los gránulos de almidón cocido a 90 °C para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (línea continua), 2.0 (línea discontinua), 3.0 (línea discontinua con puntos) y 4.0 (línea de segmentos largos).

Tabla 9. Diámetro mediano $D[v,0.5]$ y poder de hinchamiento de CH10 cocido a 90 °C.

CH10 (%)	$D[v,0.5]$ (µm)	PH $(D/D_0)^3$	PH_{AD}
1.0	43.3 ± 0.151	23.3 ± 0.177	22.8 ± 4.07
2.0	40.3 ± 0.176	18.8 ± 0.184	20.2 ± 3.89
3.0	40.2 ± 0.035	18.6 ± 0.007	22.6 ± 1.16
4.0	40.4 ± 0.098	18.9 ± 0.056	20.5 ± 0.026

Nayouf et al. (2003) reportaron $D[v,0.5] = 43.2 \mu\text{m}$, $(D/D_0)^3 = 15.7$ y $H = 23 \text{ g/g}$ para 4% de CH10 cocido a 90 °C. Por otro lado, Tecante & Doublier (1999) reportaron una solubilidad en el intervalo de 1.1 a 2.0% mientras que el hinchamiento fue de 25.9 ± 0.82 , 27.3 ± 0.76 y $29.3 \pm 1.90 \text{ g/g}$ para 2.0, 3.0 y 4.0% de CH10, respectivamente. Asimismo, el

poder de hinchamiento reportado por Tecante & Doublier (1999) fue de 10.9, 20.1 y 17.1 para 2.0, 3.0 y 4.0%, respectivamente.

El método empleado por Tecante & Doublier (1999) en la determinación de H, considera que los gránulos hinchados ocupan todo el espacio disponible, desplazando al agua que está en el espacio intergranular. La temperatura de cocción afecta el hinchamiento de los gránulos de almidón. Cuando esa temperatura es superior a la temperatura de gelatinización, el PH_{AD} de los almidones de maíz ceroso modificados químicamente es de 16.7 y 20.7, para 90 y 130 °C, respectivamente (Nayouf et al., 2003). Sin embargo, para temperaturas de cocción superiores a 120 °C, los gránulos tienen una mayor fragilidad al tratamiento mecánico que a 90 °C. Los almidones de maíz ceroso no modificado (Li & Yeh, 2001) muestran un aumento en el PH para $T < T_{gelat}$ ($PH = 30$), mientras que para $T > T_{gelat}$, el PH disminuye debido a la fragilidad de los gránulos y su posterior rompimiento. Almidones normales de avena cocidos a 80 °C muestran un $PH = 9.0$ (Tester & Karkalas, 1996), mientras que el almidón de maíz con alto contenido de amilosa cocido a la misma temperatura, tiene un $PH = 10$. Lo anterior demuestra que el PH depende de diversos factores, pero principalmente de la resistencia al tratamiento térmico-mecánico que los gránulos puedan tener durante su cocción.

8.1.3 Fracción volumen

Con la solubilidad y el PH se calculó la fracción volumen, ϕ , ocupada por los gránulos hinchados (Bagley & Christianson, 1982; Doublier, 1981). Para ello se usó la relación $\phi = (1-S/100)CH$, en la cual C es la concentración de almidón y H el hinchamiento. Este último fue reemplazado por el PH obtenido por la relación de diámetros. Este cambio se hizo considerando que bajo las condiciones actuales de cocción, ambos valores fueron muy similares y puede servir de base para utilizar el PH en el cálculo de ϕ en las mezclas almidón-hidrocoloide. La Figura 31 muestra la relación entre ϕ y la concentración de almidón; la recta de regresión es $\phi = 17.078C + 4.1534$ ($r^2 = 0.9952$). El intervalo de concentraciones empleadas permitió tener sistemas con $\phi < 1.0$. Lo anterior significa que en todos los casos, existió un excedente de la fase continua y que los gránulos de almidón tuvieron suficiente disolvente para hidratarse completamente durante su cocción.

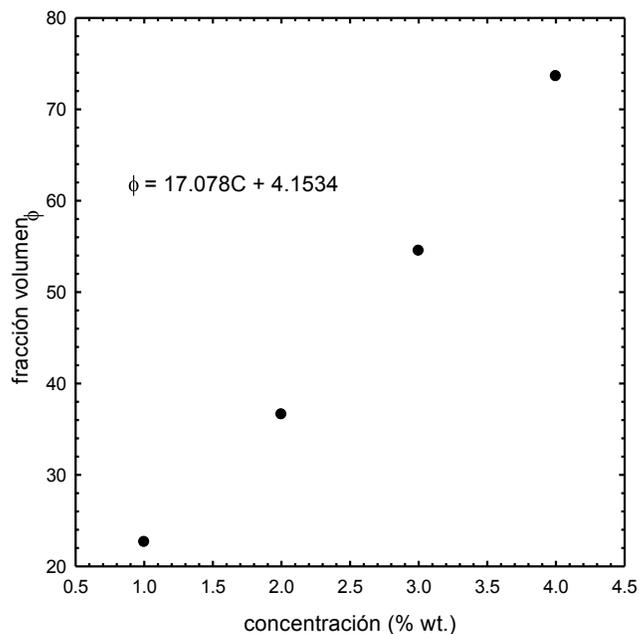


Figura 31. Fracción volumen de pastas de almidón cocido a 90 °C para diferentes concentraciones de almidón.

8.1.4 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 32 muestra el termograma para 1.0% de CH10. Las temperaturas durante la gelatinización fueron: $T_{ini} = 59.4$ °C, $T_{m\acute{a}x} = T_{gelat} = 64.7$ °C y $T_{final} = 72.7$ °C con $\Delta H = 1.25$ (J/g muestra). Es importante aclarar que T_{ini} , T_{final} y por tanto ΔH , dependen del criterio que se emplee para localizar el inicio de la gelatinización en el termograma. T_{ini} y T_{final} necesarias para calcular la entalpía, se determinaron utilizando como criterio la primera derivada de la señal. Esta primera derivada fue localizada analizando los datos en el software del calorímetro. T_g es la temperatura de transición vítrea y T_{gelat} es la temperatura de gelatinización, la cual es aquella a la cual se obtiene el valor máximo de flujo de calor (T_{max} en la Figura 32)

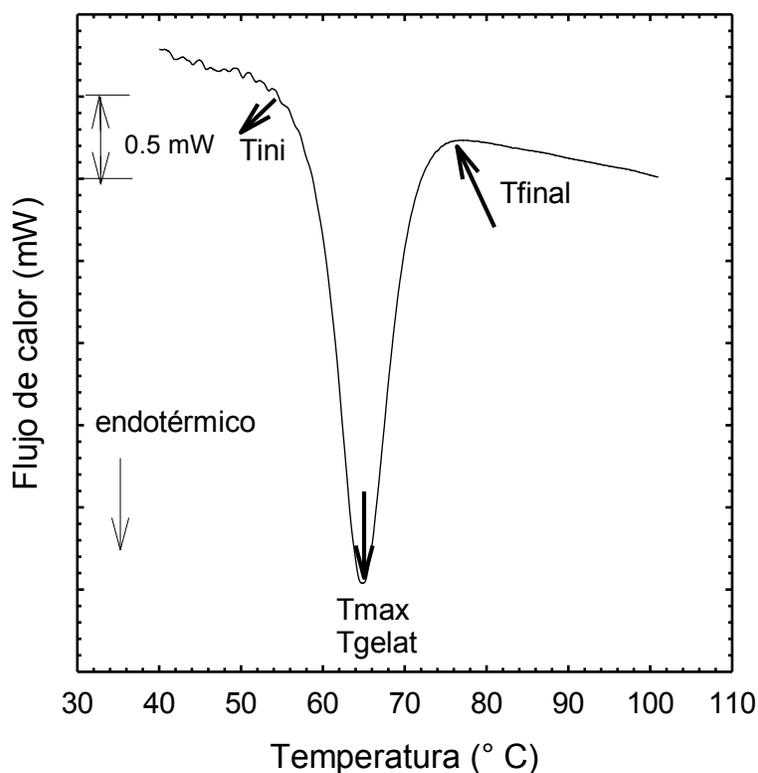


Figura 32. Termograma de gelatinización de 1.0% de CH10. La temperatura de gelatinización (T_{gelat}) es de 64.7 °C.

8.1.5 Efecto del ion sodio sobre la temperatura de gelatinización del almidón

La Figura 33 y la Tabla 10 muestran el efecto de la adición de NaCl sobre la gelatinización de CH10. No se estudiaron diferentes concentraciones de NaCl debido a que solamente se usó una concentración de 100 mM de ésta sal para preparar las mezclas de los componentes macromoleculares. Para esta concentración de NaCl, $T_{ini} = 61.0$ °C, $T_{gelat} = 68.3$ °C y $\Delta H = 0.18$ J/g muestra. El pico es mucho menor que para el CH10 sin NaCl. La adición de ésta sal aumentó 3.6 °C la temperatura de gelatinización ($T_{máx}$) y redujo casi siete veces la entalpía. Lii et al. (2002) estudiaron la influencia de la presencia de sales durante la gelatinización de almidones, a través de microscopía de luz polarizada, difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear y concluyeron que únicamente el ion litio retarda el hinchamiento, debido a que penetra en los gránulos. Sin embargo, los resultados mostrados aquí coinciden con los reportados por Chiotelli et al. (2002) donde se

estudió el efecto del cloruro de sodio sobre la gelatinización del almidón por técnicas de calorimetría de barrido diferencial, análisis térmico y resonancia magnética nuclear en dos tipos de almidón: almidón de trigo y almidón de papa. En este trabajo se reporta que con la adición de NaCl, la entalpía disminuye y la endoterma de gelatinización ocurre a temperaturas mayores. Este último hecho ocurre probablemente debido a que el cloruro de sodio disminuye el agua disponible para el hinchamiento del gránulo ya que el agua se encuentra solvatando los iones Na^+ y Cl^- , provocando la migración del agua hacia el interior del gránulo, retrasando la pérdida de orden molecular y posteriormente, una desestabilización de las regiones ordenadas del almidón en presencia de NaCl. El cloruro de sodio impide las interacciones polímero-polímero, favoreciendo la relación polímero-agua lo que resulta en una menor entalpía para las regiones ordenadas que se funden (Chiotelli, 2002).

Tabla 10. Temperaturas de transición y entalpía (J/g muestra) de las mezclas CH10.

Concentración	T_{ini} (°C)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{final} (°C)	ΔH (J/g)
1.0% CH10	59.4	64.7	72.7	1.246
1.0% CH10 + 100 mM NaCl	61	68.3	74.4	0.18

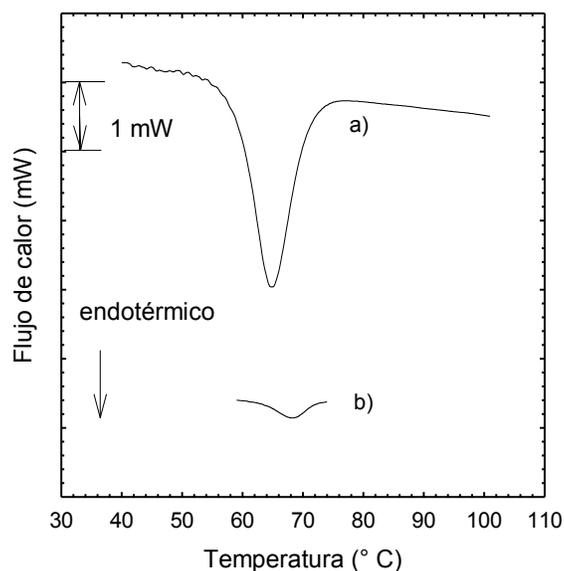


Figura 33. Efecto de la adición de ion sodio sobre la gelatinización de CH10. a) 1.0% de almidón, b) 1.0% en una solución 100 mM de NaCl.

8.1.6 Comportamiento viscoelástico

La Figura 34 muestra los barridos de frecuencia en la zona de viscoelasticidad lineal. Estos se aplicaron en las pastas con 3.0 y 4.0% de CH10, que corresponden a una fracción volumen de 0.57 y 0.74, respectivamente, es notorio que en los perfiles predominó el carácter elástico, con un comportamiento tipo sólido (Ferry, 1980; Giboreau et al., 1994). En estas pastas $G' > G''$ y ambos módulos mostraron poca dependencia con la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.05}$, $r^2 = 0.93$; $G'' \propto \omega^{0.34}$, $r^2 = 0.94$ sobre todo el intervalo de frecuencias. Sin embargo, los valores de la $\tan \delta$ (Figura 35) no fueron característicos de un gel (< 0.01). Dado que el sistema se encuentra compuesto por partículas en suspensión, i.e. gránulos de almidón hinchados, con una baja solubilidad ($< 2.0\%$), los espectros mecánicos corresponden a pastas lo suficientemente concentradas para presentar propiedades viscoelásticas (Sosa Herrera, 2002).

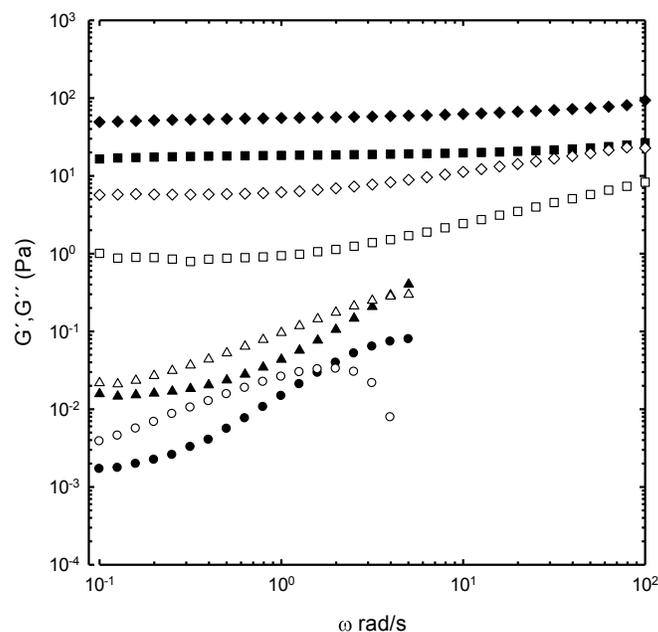


Figura 34. Variación con la frecuencia del módulo de almacenamiento (símbolos negros) y el módulo de pérdida (símbolos blancos) para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (círculos), 2.0 (triángulos), 3.0 (cuadrados) y 4.0 (diamantes). La deformación aplicada para 1.0 y 2.0% de CH10 fue de 50%, mientras que para 3.0 y 4.0% de CH10 fue del 1.0%

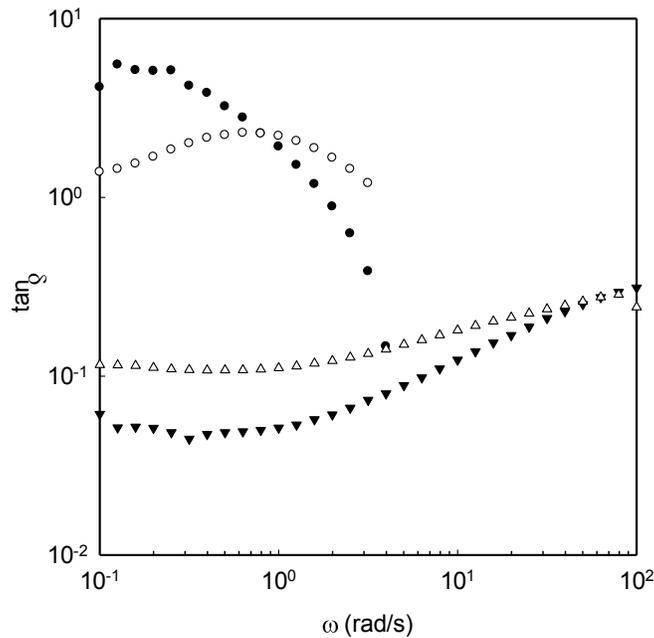


Figura 35. Tangente de delta en función de la frecuencia para diferentes concentraciones (%) de CH10: 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulo negro invertido) y 4.0 (triángulo blanco).

Las pastas con 1.0 y 2.0% de CH10 presentaron el comportamiento clásico de un material viscoelástico, con los módulos G' y G'' dependientes de la frecuencia. La pasta con 1.0% mostró un comportamiento característico de una suspensión diluida. Los módulos son notablemente dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{1.14}$, $r^2 = 0.98$; $G'' \propto \omega^{0.47}$, $r^2 = 0.76$ sobre todo el intervalo de frecuencia. Con lo anterior, se concluye que con 1.0% de CH10 a 25 °C, la fase continua domina el comportamiento viscoelástico de la pasta, dándole un carácter más líquido. Como se observa en la Figura 35, G' muestra un comportamiento característico de una suspensión concentrada, con los módulos dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.81}$, $r^2 = 0.95$; $G'' \propto \omega^{0.76}$, $r^2 = 0.99$) sobre todo el intervalo aplicado. En pastas con 3.0 y 4.0% de CH10, los gránulos hinchados que son deformables y elásticos, interactúan generando un comportamiento tipo sólido o gel, mientras que en las pastas con 1.0 y 2.0% de CH10, la interacción entre los gránulos es menos dominante. Estos comportamientos se pueden explicar con base en la fracción volumen de los gránulos hinchados. En las pastas con 3.0 y 4.0% ($\phi > 0.4$), el carácter elástico se debe a los gránulos de almidón hinchados (Acquarone & Rao, 2003), es decir, la fase dispersa domina el comportamiento viscoelástico. Nayouf (2003), reportó un comportamiento viscoelástico similar en CH10 cocido a 90 °C y observado a 17.5 °C. En

las pastas con $\phi < 0.4$, su carácter líquido se debe a la fase continua. Esto permite establecer que $\phi = 0.4$ es la fracción volumen crítica. Más allá de este valor, las pastas de almidón exhiben el comportamiento de suspensiones de partículas hinchadas.

8.1.7 Microestructura

8.1.7.1 Luz transmitida y luz polarizada

La Figura 36a y 36b muestran las imágenes en luz transmitida y bajo luz polarizada de los gránulos de CH10 sin cocer. Los gránulos nativos (Figura 36a) son pequeños, compactos y de forma esférica homogénea que no forman agregados. La luz polarizada (Figura 36b) permitió observar los “puntos blancos” debido a la birrefringencia de los gránulos de almidón ceroso donde debería observarse la cruz de malta, la cual no se observa claramente. En la Figura 36c se muestran los gránulos de almidón cocido. Estos gránulos crecieron en forma radial y mantuvieron una forma esferoidal con una superficie rugosa sin desintegrarse. El almidón cocido no produce imagen bajo luz polarizada, porque durante la gelatinización se pierde el orden cristalino de la amilopectina y por lo tanto la birrefringencia. El tratamiento térmico y mecánico no rompió los gránulos. Considerando la temperatura de cocción empleada en este trabajo, las pastas se clasifican como subcocidas (Nayouf et al., 2003) y están constituidas esencialmente por una fase dispersa, formada por gránulos hinchados y una fase continua prácticamente libre de amilosa y amilopectina, debido a su baja solubilidad.

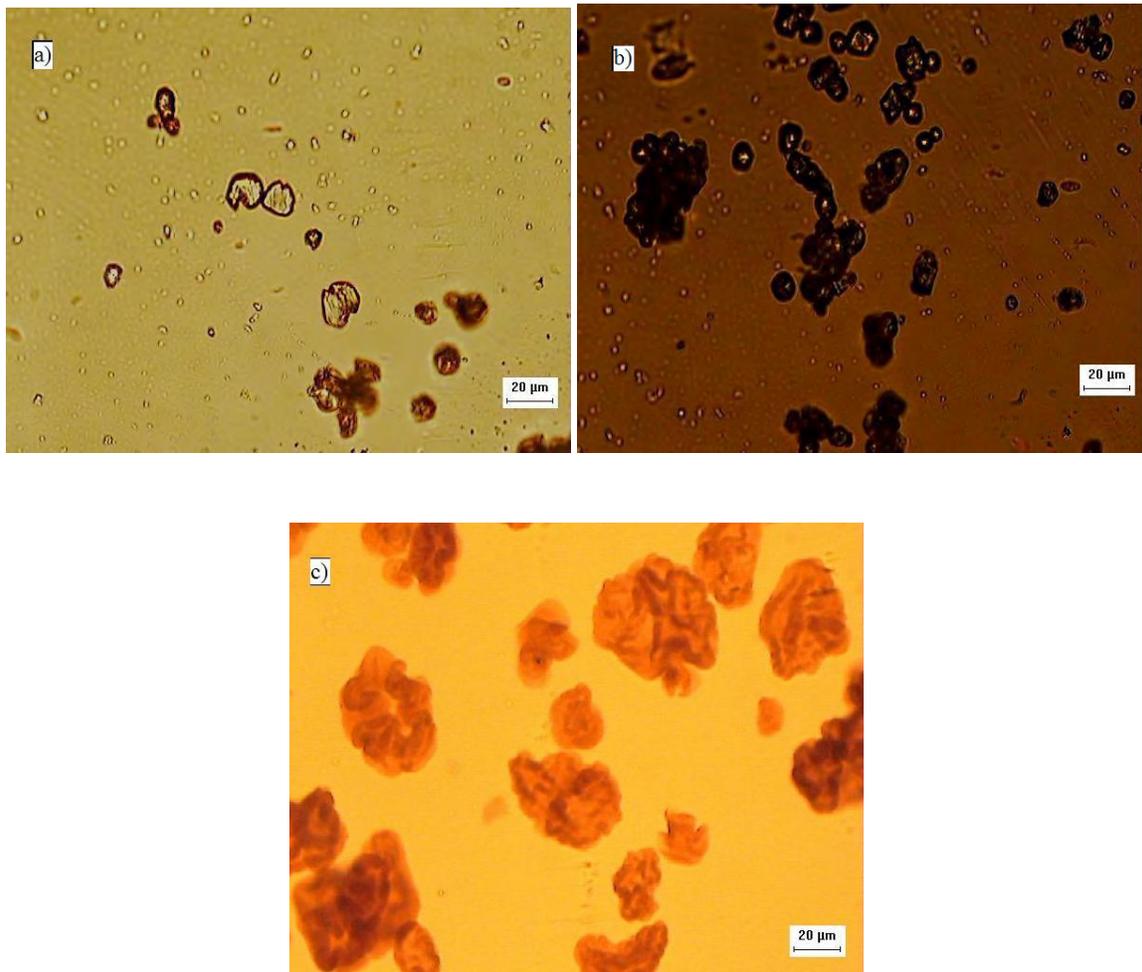


Figura 36. Almidón nativo observado con luz transmitida, objetivo 40x (a), almidón nativo observado con luz polarizada, objetivo 40x (b) y almidón cocido teñido con lugol observado con luz transmitida, objetivo 40x (c). En todos los casos la barra de escala es de 20 μm .

8.1.7.2 Microscopia confocal de barrido láser

En la Figura 37 se muestran gránulos de almidón cocido marcados con FITC. El fluorocromo fue adicionado antes de gelatinizar el almidón. El FITC no modificó la distribución de tamaños de los gránulos de almidón, como se aprecia en la Figura 37. El FITC es un fluorocromo muy afin a los gránulos de almidón. La naturaleza de la interacción entre el marcador y el almidón aún no ha sido comprendida. En general los almidones modificados tales como los almidones hidroxipropilados, muestran un incremento en el hinchamiento atribuido a la reducción de interacciones entre las cadenas de glucano debido al incremento en la hidrofiliidad del almidón por la introducción del grupo hidroxipropilo. Adicionalmente, los puentes de hidrógeno inter e intra moleculares en las cadenas de glucano se interrumpen y de este modo, la estructura granular del almidón

se debilita y quizá el movimiento libre de las cadenas de glucano en las regiones amorfas se incrementa (Kaur et al., 2004; Choi & Kerr, 2004). Para el almidón entrecruzado no hay ruptura de los gránulos como se aprecia en la Figura 37.

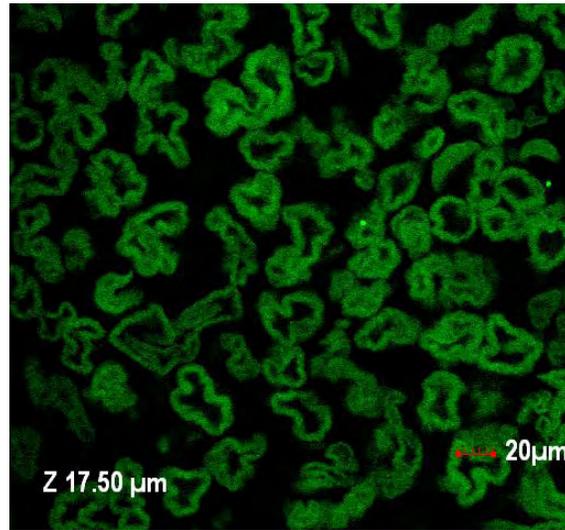


Figura 37. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de gránulos de 1.0% de CH10 cocido marcado con FITC. $\lambda = 565 \text{ nm}$, objetivo 60x. La barra de escala es de $20 \mu\text{m}$.

A diferencia de otras técnicas de microscopia, la confocal no solamente provee excelente resolución entre la sección de los planos ($\geq 0.1 \mu\text{m}$ en la dirección x e y) sino que también provee una excelente resolución entre los planos ($\approx 0.1 \mu\text{m}$ en la dirección z), lo que permite observar la microestructura de los materiales (van de Velde et al., 2003). Una pila de secciones seriales ópticas, ofrece la posibilidad de analizar en la computadora cada una de las proyecciones compuestas o un volumen, proporcionando una representación en tres dimensiones del espécimen (Tromp et al., 2001). La Figura 38 muestra que al igual que en la microscopia de luz transmitida, los gránulos de almidón crecen de manera radial en todas direcciones sin colapsarse o desintegrarse, gracias al entrecruzamiento químico que los refuerza (Loisel et al., 2000). También se observa que el marcador no penetró en los gránulos, sino que solamente permaneció en su superficie.

8.1.8 Discusión

El comportamiento viscoelástico de las pastas de almidón depende de su fracción volumen. Cuando la concentración es 1.0% de CH10, las pastas exhiben un

comportamiento característico de suspensiones diluidas de partículas deformables; G'' es mayor que G' y los módulos se cruzan aproximadamente a 2 rad/s. Sin embargo, para 4.0% de CH10, el comportamiento tipo sólido corresponde al de una suspensión concentrada en la cual G' es más grande que G'' sobre todo el intervalo de frecuencia. La imagen de confocal muestra los gránulos de almidón hinchados para 1.0% de CH10 y confirma que están rodeados por una fase acuosa que se ve negra debido a la falta de fluorescencia. Estos resultados demuestran que las pastas de CH10 son sistemas de dos fases, con partículas hinchadas rodeadas de una fase continua, en la cual hay una muy baja concentración de almidón disuelto.

8.2 Propiedades de la κ -carragenina

8.2.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 38 muestra el termograma para 0.75% de κ -carragenina en 100 mM de NaCl. Se observa un pico endotérmico durante el calentamiento y un pico exotérmico durante el enfriamiento. Durante el calentamiento, los puentes de hidrógeno se rompen y los agregados se deshacen, desintegrando la red que forma el gel. Como consecuencia, este se funde y se produce una solución. La temperatura máxima, $T_{máx}$, fue tomada como la temperatura de fusión, T_m . Durante el enfriamiento (b en la Figura 38), la transición de hebra aleatoria a la formación del gel es un proceso exotérmico, con una temperatura de transición sol-gel o temperatura de gelificación T_{gelif} , representada por la T_{max} en la señal de DSC.

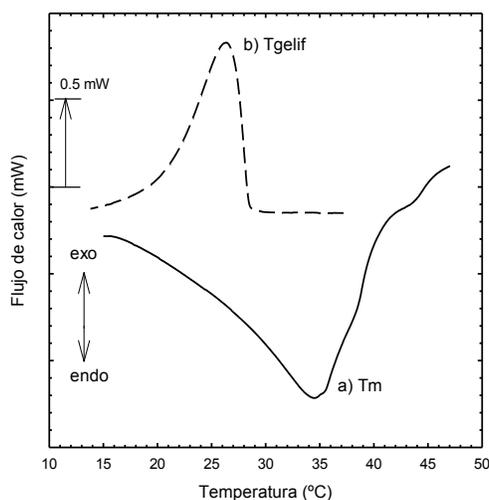


Figura 38. Termograma de 1.0% de κ -carragenina en presencia de 100 mM de NaCl (1.2 °C/min).

La diferencia entre T_m y T_g se conoce como “histéresis térmica”, la cual se asocia con la agregación de dobles hélices durante la formación del gel (Mangione et al., 2003; Nayouf, 2003). Sin embargo, con el ion sodio se sabe que no hay formación de hélices y por tanto, tampoco la asociación de dobles hélices, sino una separación de fases (Mangione et al., 2003). Cuando el sistema se aproxima a la separación de fases durante el barrido de temperatura, estos autores observaron un incremento en la dispersión de luz y una mayor turbidez debido a la separación en regiones de mayor y menor concentración de carragenina. En las regiones de alta concentración, el entrecruzamiento de la κ -carragenina se favorece, e inicia la gelificación, permitiendo que se formen estructuras localmente más compactas, menos interconectadas y macroscópicamente heterogéneas. Por ello Mangione et al. (2003) sugieren diferentes rutas de ensamblaje polimérico, que podrían ser responsables de las diferentes propiedades estructurales. Sin embargo, la agregación molecular de las cadenas de κ -carragenina sin el orden impuesto por la transición conformacional, parece ser consistente con un estado más desordenado y una estructura compacta, observada en el gel formado en presencia de ion sodio. Los resultados aquí mostrados muestran que la agregación ocurre cuando los iones Na^+ se adicionan a la κ -carragenina, lo que hace que T_m sea mayor que T_g para la misma concentración de NaCl. Semenova et al. (1988) usando dispersión de luz y polarimetría, afirmaron que en la etapa que precede a la formación de la hélice en soluciones de κ -carragenina con ion sodio, hay regiones con una concentración local mayor de polímero, es decir; agregados. La transición conformacional cooperativa toma lugar dentro de los agregados (Gringberg et al., 1997). De acuerdo a la concentración efectiva de las formas hebra y hélice, está controlada por una conversión dentro del agregado, pero es independiente del sistema. Kara et al. (2003) han reportado que la histéresis térmica ocurre con o sin la adición de NaCl, como en el caso de la gelana de bajo acilo, cuyo mecanismo de gelificación es muy similar al de la κ -carragenina. La histéresis térmica se puede asociar con la existencia de diferentes niveles de energía entre las hélices empaçadas (Milas & Rinaudo, 1996).

La variación de T_m , T_g , ΔH_m y ΔH_g en presencia de 100 mM de NaCl durante el calentamiento y enfriamiento de una solución 1.0% de κ -carragenina, se muestra en la Tabla 11. Este tipo de polisacáridos exhibe una relación lineal entre $\log C_T$ y T_m^{-1} (Rinaudo, 2001), donde C_T es la concentración iónica total (equiv/L) calculada como

$C_s + \bar{\gamma} C_p$, donde C_s es la concentración iónica debida a la sal externa, C_p es la concentración iónica del polímero (equiv/L) y $\bar{\gamma}$ es el coeficiente de actividad promedio, 0.72, para la sal de sodio de la κ -carragenina (Rochas, 1982).

Tabla 11. Temperatura de fusión, gelatinización y entalpía (J/g muestra) para 1.0% de κ -carragenina (100 mM NaCl).

	T_{ini} (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C) ^a	T_{final} (°C)	ΔH (J/g)
Calentamiento	21.369	34.59	40.74	1.097
Enfriamiento	28.38	26.402	21.011	-0.351

^aEn calentamiento $T_{m\acute{a}x} = T_m$ y en enfriamiento $T_{m\acute{a}x} = T_g$.

8.2.2 Comportamiento viscoelástico

La Figura 39 muestra el barrido de frecuencia para 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0% de κ -carragenina en presencia de 100 mM de NaCl. El comportamiento fue típico de un gel (Ferry, 1980; Nishinari, 1997) aún a 0.25%, sin embargo, para esta concentración de κ -carragenina, los módulos dinámicos muestran cierta dependencia con la frecuencia; $G' \propto \omega^{0.31}$, $r^2 = 0.94$; $G'' \propto \omega^{0.22}$, $r^2 = 0.94$. Esto contrasta con los sistemas con 1.0% de κ -carragenina, en los cuales $G' \propto \omega^{0.035}$, $r^2 = 0.98$; $G'' \propto \omega^{0.24}$, $r^2 = 0.86$, $G' > G''$ y $\tan \delta < 1.0$ en todo el intervalo de frecuencia (Figura 40). La κ -carragenina es un gel cuando $C_T > C$ (0.1 equiv/l) y $T < T_g$ (Nuñez-Santiago et al., 2011), lo cual concuerda con lo observado. Como se puede observar, la rigidez de los geles se incrementó con la concentración de polisacárido y la dependencia con la frecuencia, es menor a concentraciones superiores de 0.25% de κ -carragenina. La tangente de delta que se muestra en la Figura 40, muestra el comportamiento de un gel débil para 0.25% de κ -carragenina, a concentraciones mayores, el comportamiento es de un gel verdadero, mostrando independencia con la frecuencia a partir de 1 rad/s. Mangione et al. (2005) estudiaron el efecto de los iones sodio y potasio en la gelificación de la κ -carragenina, determinando la viscosidad por métodos reométricos, la turbidimetría y dispersión de luz, sugiriendo que la κ -carragenina sigue una diferente ruta de ensamblaje, la cual determina las propiedades características de un gel, sin embargo, la agregación molecular de las moléculas de κ -carragenina sin el orden establecido por la

transición conformacional que se observa con potasio, parece ser consistente con una estructura desordenada y compacta, observada en el gel obtenido en presencia de sodio.

Otro elemento importante de consideración es la presencia de iones potasio y sodio en la κ -carragenina, ya que existe una proporción entre ambos iones para saber si el ión potasio provoca la formación de dobles hélices. Mangione et al. (2005) expresan que esta proporción $[K^+]/[Na^+]$ debe ser igual o mayor a 0.33, utilizando los resultados del análisis de absorción atómica y considerando las concentraciones de κ -carragenina utilizada, así como el ambiente iónico (100 mM de NaCl), se realizó el cálculo de esta relación para las diferentes concentraciones de κ -carragenina usadas, determinando que la relación es 0.0293, con lo que podemos concluir que el ión potasio no determina el proceso de la gelificación de la κ -carragenina.

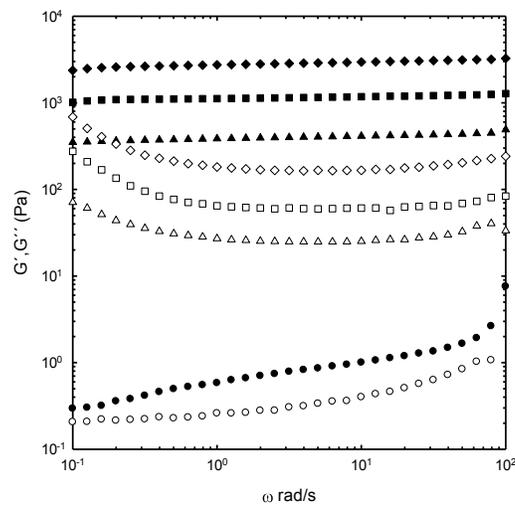


Figura 39. Módulo de almacenamiento (símbolos en negro) y módulo de pérdida (símbolos vacíos) para diferentes concentraciones de κ -carragenina a) 0.25% κ -carragenina, círculos; b) 0.5% κ -carragenina, triángulos; c) 0.75% κ -carragenina, cuadrados; d) 1.0% κ -carragenina, diamantes. La deformación aplicada para 0.25% fue del 50% mientras que para 0.5, 0.75 y 1.0% de κ -carragenina fue del 1.0%

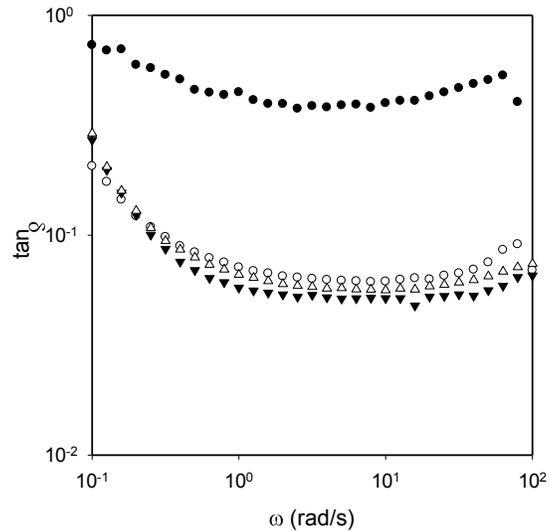


Figura 40. Tangente de delta de diferentes concentraciones de κ -carragenina (0.25% círculos negros, 0.5% círculos blancos, 0.75% triángulos blancos, 1% triángulos negros invertidos).

8.2.3 Microestructura

La Figura 41 muestra la imagen confocal de 0.75% de carragenina marcada con RITC en presencia de 100 mM de NaCl. En general, se forma un medio continuo de κ -carragenina con una distribución homogénea del fluorocromo. No se observa ningún arreglo tridimensional tal como sucede al añadir iones potasio o calcio (Nuñez-Santiago, 2011), tal como se ha mencionado en el párrafo anterior, la relación potasio/sodio es de 0.0293, lo cual sugiere que la cantidad de iones presentes de potasio no son suficientes para obtener una estructura de red, por lo que el comportamiento está determinado por el sodio (hebra-hélice). Cabe mencionar que para las cuatro concentraciones trabajadas, se tiene el comportamiento reológico de un gel ($G' > G''$), sin embargo la imagen de CLSM muestra un campo visual saturado con espacios intersticiales extremadamente pequeños.

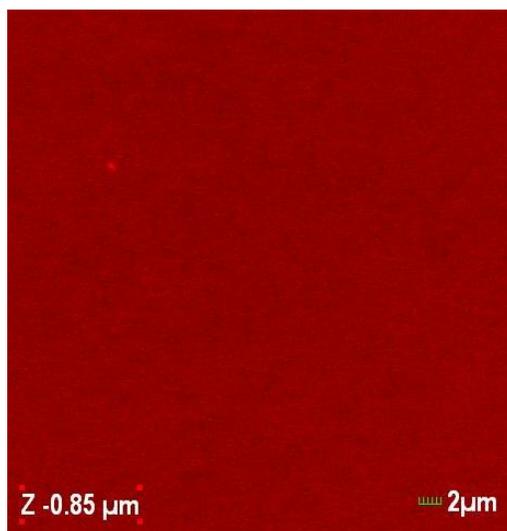


Figura 41. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de 0.75% de κ -carragenina marcada con RITC. $\lambda = 580$ nm. La barra de escala es de $2 \mu\text{m}$.

8.2.4 Discusión

La respuesta viscoelástica de la κ -carragenina es de la de un gel en todo el intervalo de concentraciones. Sin embargo, para una concentración de 1.0% se forma un gel más fuerte que para 0.25%. El módulo dinámico del primero es independiente de la frecuencia, con G' aproximadamente una década logarítmica mayor que G'' , mientras que para 0.25%, ambos módulos mostraron una mayor dependencia con la frecuencia. El gel con 0.25% de carragenina fue el menos fuerte de la serie. La imagen en confocal muestra un medio continuo en rojo, libre de zonas oscuras no fluorescentes. Por lo tanto, podemos concluir que en presencia de iones sodio externos, la κ -carragenina forma geles cuya rigidez depende de la concentración del polisacárido.

8.3 Aislado de proteína de suero lácteo

8.3.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 42 muestra el termograma para una solución con 3.0% de WPI en 100 mM de NaCl. La endoterma cuya $T_{\text{máx}}$ es 75.5 °C (Tabla 12) es atribuida a la desnaturalización de las proteínas del suero lácteo, constituidas en su mayoría por la β -lactoglobulina. La entalpía de la desnaturalización es 0.313 J/g de muestra. El despliegue de las proteínas globulares durante la desnaturalización térmica, es un proceso en el que se absorbe energía

para romper los enlaces intramoleculares no covalentes y en algunos casos disulfuro, y esto explica el pico endotérmico. Sin embargo, la desnaturalización de proteínas globulares no es suficiente para causar la gelificación. Para ello las moléculas individuales deben asociarse para formar una red continua (Clark & Lee-Tuffnell, 1986). De acuerdo a lo señalado por Fitzsimons et al. (2007), a pH neutro y en ausencia de sal externa, la agregación se ve inhibida debido a las repulsiones electrostáticas entre los glóbulos desnaturalizados. Una manera de promover la agregación y la gelificación es reduciendo la carga sobre las moléculas de proteína, disminuyendo el pH hacia el punto isoeléctrico. Sin embargo, también se puede promover por adición de sal para apantallar las cargas de las repulsiones intermoleculares, procedimiento que se usó en este trabajo. Un pico de gelificación debería aparecer como un pico exotérmico aproximadamente en 87 °C (Fitzsimons et al., 2007), pero que en nuestro caso se observa a 75.5 °C. Cabe aclarar que no se llevó a cabo un estudio calorimétrico con cada concentración de WPI, ya que la técnica fue utilizada con el objetivo de confirmar que ocurría la desnaturalización de la proteína en el intervalo de temperaturas en el que se desarrolló el presente estudio, por eso no se dan más conclusiones sobre el mismo.

Tabla 12. Temperaturas de transición y entalpía (J/ g muestra) de las mezclas WPI (100 mM NaCl).

Concentración (%)	T _{ini} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH (J/g)
3.0	62.794	75.565	83.945	0.313

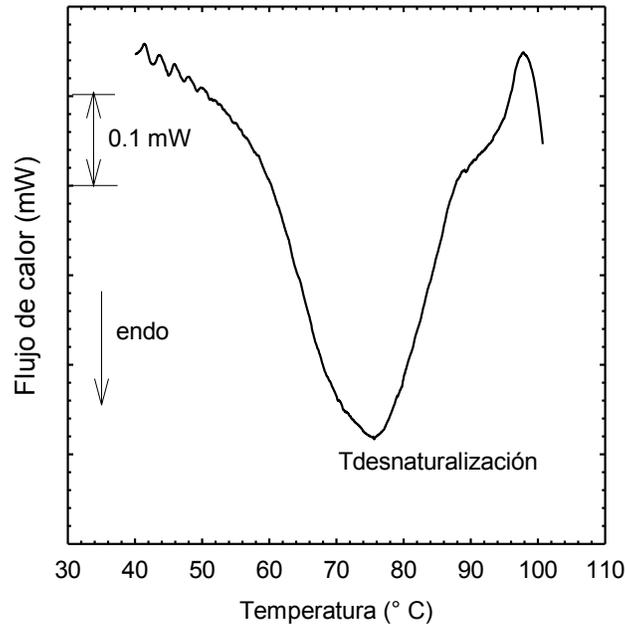


Figura 42. Termograma para 3.0% de WPI. Tasa de calentamiento 1.2 °C/min.

8.3.2 Comportamiento viscoelástico

La Figura 43 muestra el barrido de frecuencia para 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0% (a) y 3.5 y 3.9% de WPI (b). El barrido de frecuencia para concentraciones de WPI inferiores a 3.5%, presenta el comportamiento de una suspensión de agregados, en la que los módulos dinámicos aumentan conforme aumenta la cantidad de proteína, debido a la mayor cantidad de agregados que se forman con el calentamiento. En todos los casos $G'' > G'$, con un cruce de módulos en aproximadamente 0.5 rad/s y con $G' \propto \omega^{0.64}$, $r^2 = 0.97$; $G'' \propto \omega^{0.69}$, $r^2 = 0.99$ entre 1 a 10 rad/s. Para 3.5 y 3.9%, el comportamiento es típico de un gel (Ferry, 1980; Nishinari, 1997), con ambos módulos poco dependientes de la frecuencia. Por ejemplo, para 3.9%, $G' > G''$, $\tan \delta \ll 1.0$, $G' \propto \omega^{0.092}$, $r^2 = 0.99$ y $G'' \propto \omega^{0.051}$, $r^2 = 0.87$, entre 0.1 a 100 rad/s. La rigidez del gel se incrementó con la concentración de WPI.

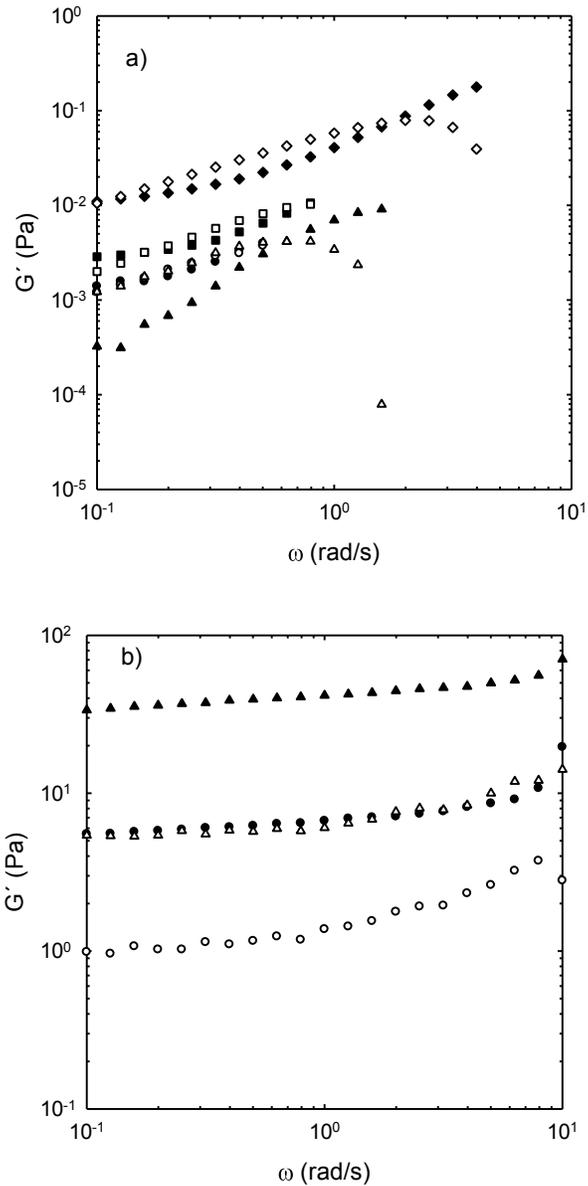


Figura 43. Espectro mecánico para diferentes concentraciones (%) de WPI. a) 0.5 (círculos), 1.0 (triángulos), 2.0 (cuadrados) y 3.0 (diamantes). b) 3.5 (círculos), 3.9 (triángulos). G' (símbolos negros) y G'' (símbolos blancos). La deformación aplicada fue del 50% para 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0% de WPI, para 3.5% de WPI fue del 5.0% y para el 3.9% de WPI fue del 1.0%

8.3.3 Microestructura

La Figura 44 muestra la imagen confocal de 2.0% de WPI, marcada con ANSA, después del tratamiento térmico. Se aprecia un conjunto de agregados que fluorescen en azul con el disolvente oscuro por ausencia de fluorescencia. Estos agregados están entonces dispersos en un medio líquido.

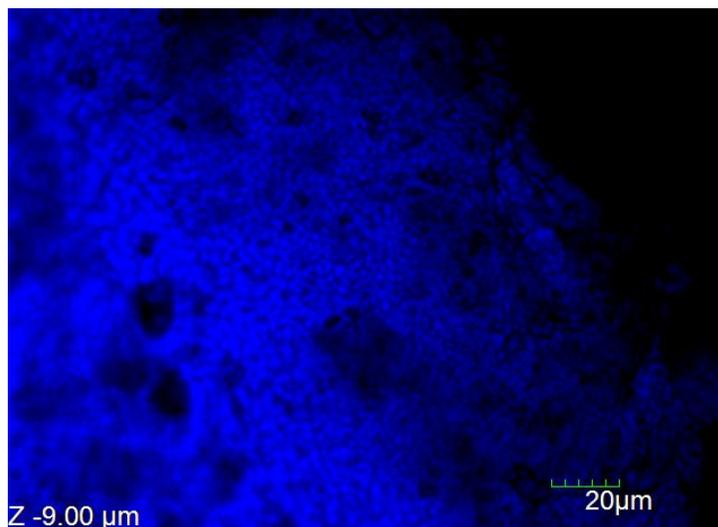


Figura 44. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de 2.0% de WPI marcada con ANSA. $\lambda = 450$ nm.

8.3.4 Discusión

Dependiendo de la concentración de WPI se forman soluciones, suspensiones o geles. Por ejemplo, a 3.9% de WPI, se forman geles que no se colapsan por su peso, cuya respuesta viscoelástica es característica de estos materiales. G' fue mayor que G'' por aproximadamente una década logarítmica y ambos módulos fueron prácticamente independientes de la frecuencia, con muy bajos ángulos de pérdida ($< 5^\circ$). Estos materiales no fluyen en el intervalo completo de frecuencia ni en el tiempo de observación experimental. La imagen de confocal muestra la presencia de pequeñas partículas, que resultan de la agregación de las proteínas desnaturalizadas de WPI debida al tratamiento térmico. Los agregados, que aparecen en azul debido a la exposición de regiones hidrofóbicas de proteínas de suero marcadas con ANSA, están rodeados por zonas no fluorescentes. En conclusión, el WPI puede formar sistemas de dos fases con agregados de proteína dispersos en una fase continua.

8.5 CH10-WPI

8.5.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 45 muestra el termograma para mezclas con 1.0% de CH10 con 2.0 y 3.5% de WPI. En la Tabla 13 se muestran los parámetros térmicos. Como se puede observar la entalpía se muestra en J/g de muestra y no como J/g de componente debido a que las transiciones de cada componente no están separadas.

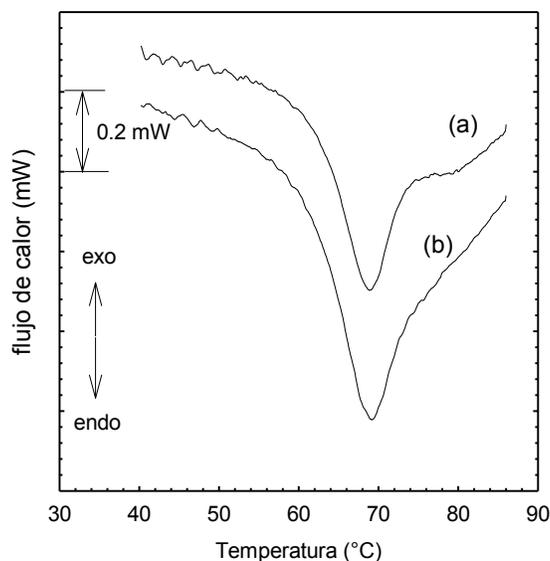


Figura 45. Termograma de mezclas con 1.0% de CH10 con 2.0 (a) y 3.5% (b) de WPI. (1.2 °C/min).

Tabla 13. Temperaturas de transición y entalpía (J/g muestra) de las mezclas CH10-WPI.

Concentración (%)	T _{ini} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH (J/g)
1.0 CH10 + 2.0 WPI	62.9	68.4	72.7	0.20
1.0 CH10 + 3.5 WPI	63.7	68.43	72.49	0.26

La Figura 45 muestra dos transiciones endotérmicas, cuyos picos son muy similares. La entalpía de gelatinización es ligeramente mayor cuando hay mayor cantidad de WPI. A pesar de que se tienen dos compuestos, sólo se observa una transición endotérmica. Esto puede deberse a que tanto la temperatura de gelatinización del almidón, como la temperatura de desnaturalización de la proteína, ocurren en intervalos muy cercanos de temperatura, provocando la formación de un solo pico. Estas observaciones no concuerdan con lo reportado por Fitzsimons et al. (2008), quienes realizaron estudios viscoelásticos y calorimétricos a mezclas WPI-almidón de maíz ceroso reticulado químicamente, estabilizado con fosfato. En los resultados calorimétricos mencionan la existencia de dos picos. Incluso cuando se determina la calorimetría del WPI solo se observan las

transiciones de desnaturalización de la β -lactoglobulina y de α -lactalbúmina por separado, la endoterma principal que corresponde a la β -lactoglobulina aparece en 74 °C, la endoterma de la α -lactalbúmina se observa como un pequeño hombro a 62 °C, mientras que la endoterma de gelatinización del almidón, aparece en 63 °C. Las mezclas 2.0% WPI con 2% de almidón y 10% WPI con 2% de almidón, dan como resultado dos endotermas, donde se aprecia la transición del almidón a 63 °C y la transición de la β -lactoglobulina en 72 °C. Sin embargo, ya no se aprecia la transición de la α -lactalbúmina. Con estos resultados estos autores concluyen que no existen interacciones de unión que mejoren la estabilidad de los gránulos de almidón o los glóbulos de proteína. Estos resultados que son totalmente diferentes a los obtenidos en el presente trabajo, lo cual puede deberse a la tasa de calentamiento. El experimento realizado por Fitzsimons et al. (2008) fue realizado a 0.4 °C/min mientras que los resultados obtenidos en el presente, se obtuvieron a 1.2 °C/min.

8.5.2 Comportamiento viscoelástico

La Figura 46 muestra la variación del módulo de almacenamiento con la frecuencia para diferentes mezclas CH10-WPI. Aunque G' no fue notablemente dependiente de la frecuencia, el grado de la misma fue particular para cada mezcla. Si se considera una dependencia de tipo ley de potencia expresada como $G' \propto \omega^a$ y $G'' \propto \omega^b$, entonces el valor de cada exponente puede ayudar a distinguir entre comportamientos con un mayor carácter elástico o viscoso, ya que cuando $a = 1$ y $b = 2$, se tiene un comportamiento viscoso característico de la zona terminal o zona de flujo, mientras que cuando a y b tienden a cero, el comportamiento es característico de la zona elástica. Los exponentes a y b a 25 °C se muestran en las Tablas A y B del Anexo. Los parámetros a y b representan la velocidad de cambio logarítmico de G' y G'' con la frecuencia, respectivamente. Para mezclas CH0-WPI con 4.0, 3.0, 2.0 y 1.0% de CH10 y con 0.5 a 3.9; 0.5 a 2.0; 0.5 a 1.0 y 0.5% de WPI, respectivamente, G' muestra una ligera dependencia ($a \leq 0.06$) con la frecuencia. El valor del exponente se incrementa ligeramente para las mezclas que tienen menor cantidad de almidón, tales como 2.0% CH10 con 0.5 y 1.0% de WPI y 1.0% CH10 con 0.5% WPI. En estos casos $0.08 \leq a \leq 0.15$, lo que sugiere que la dependencia con la frecuencia aumenta ligeramente en esas concentraciones de almidón. Por otro lado, para G'' hay una mayor dependencia con la frecuencia ($0.35 \leq b \leq 0.14$). En el caso de los geles en los cuales la concentración de WPI es dominante; (CH10/WPI = 1.0/2.0, 1.0/3.0, 1.0/3.5, 1.0/3.9, 2.0/3.0,

2.0/3.5, 2.0/3.9, 3.0/3.5, 3.0/3.9), G' exhibe una menor dependencia con la frecuencia ($0.06 \geq a \geq 0.08$) que para los geles con CH10. Para G'' ; $0.27 \leq b \leq 0.14$, aunque estos valores de igual forma son menores comparados con los geles con almidón. Los geles intermedios (CH10/WPI = 1.0/1.0, 2.0/2.0 y 3.0/3.0), tienen valores de $a = 0.11, 0.097, 0.063$, respectivamente, en los dos primeros el comportamiento es como el de los geles, donde domina la presencia de almidón y el último cae en el intervalo donde domina la concentración de WPI, mientras que para G'' , $b = 0.53, 0.15$ y 0.16 , respectivamente, con comportamientos muy parecidos a aquellos donde domina la concentración de almidón. Todas estas diferencias en la dependencia con la frecuencia se observan en la Figura 47, que muestra la dependencia con la frecuencia de la $\tan \delta$ para todos los geles. Notándose que los que contienen una mayor cantidad de WPI presentan el mismo tipo de comportamiento, es decir $G' > G''$.

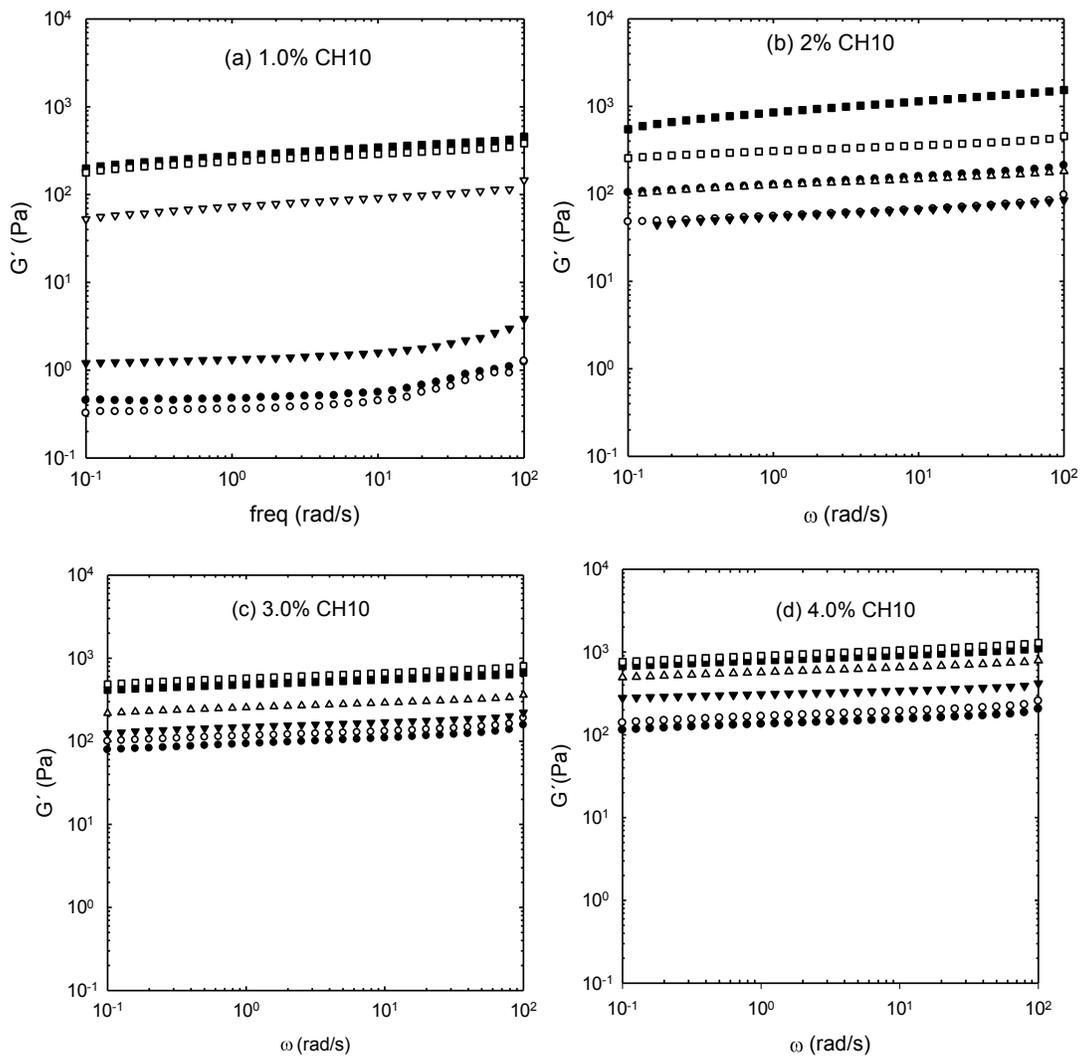


Figura 46. Variación del módulo de almacenamiento con la frecuencia de mezclas con 1.0 (a), 2.0 (b), 3.0 (c) y 4.0% (d) de CH10 y diferentes concentraciones (%) de WPI: 0.5 (círculos negros), 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos), 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos). La deformación para 1.0% CH10 y todas las concentraciones de proteína fue de 10% mientras que para 2.0, 3.0 y 4.0% CH10 fue de 1%.

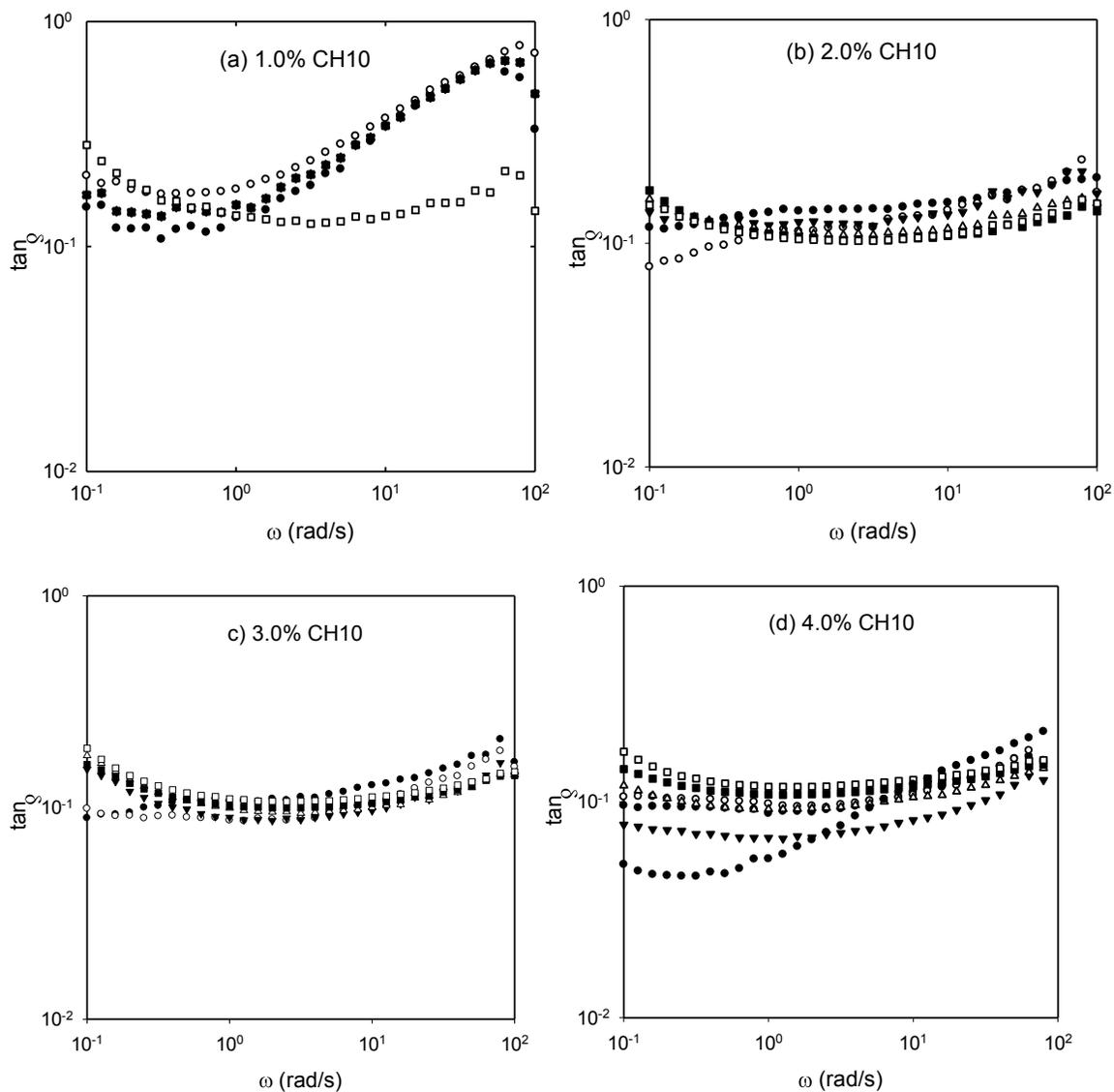


Figura 47. Dependencia de la $\tan \delta$ con la frecuencia de mezclas con concentraciones (%) de CH10 de 1.0 (a), 2.0 (b), 3.0 (c) y 4.0 con diferentes concentraciones (%) de WPI: 0.5 (círculos negros), 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos), 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros), 3.9 (cuadrados blancos)

De acuerdo con Ravindra et al. (2007) los geles son agrupados como estructuras de partículas agregadas, estructuras finas o redes mezcladas. Estas diferencias estructurales afectan las propiedades viscoelásticas del WPI. Los geles de partículas agregadas son más dependientes de la frecuencia y tienen mayores módulos elásticos que los geles de partículas finas. El incremento en G' se ha interpretado como la formación de una red, debida a la agregación de cadenas de proteínas desnaturalizadas, a través de interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Los resultados reológicos sugieren además, que los

gránulos hinchados de almidón dentro de una matriz continua de WPI gelificado, refuerzan dicha matriz cuando la fracción volumen de los gránulos es pequeña y el WPI forma la fase continua. Si la fracción volumen es grande, puede ocurrir una inversión de fases, donde los gránulos de almidón se vuelven la fase continua y la proteína que queda atrapada entre los espacios intersticiales de los gránulos de almidón se vuelve la fase dispersa.

8.5.3 Microestructura

La Figura 48 muestra la imagen confocal de la mezcla 1.0% CH10 con 2.0% WPI. En este caso los gránulos de almidón fueron marcados con FITC, debido a la afinidad de este fluorocromo por la proteína. Sin embargo, se aprecia con claridad un sistema de dos fases, en el cual los gránulos de almidón hinchados se encuentran dispersos en un medio continuo formado por la proteína desnaturalizada. Las zonas oscuras corresponden a los gránulos de almidón que no están marcados y las zonas azules, corresponden a la proteína marcada de manera no covalente con ANSA. La superficie de los gránulos hinchados no fluorescen, pero las cavidades del almidón son ocupadas por el WPI, lo cual explica por qué las zonas azules de proteína están rodeadas por zonas oscuras, que corresponden a los gránulos de almidón no fluorescentes. Savary et al. (2008) reportan la misma observación para sistemas almidón-carragenina, sugiriendo que esto ocurre debido a que el hinchamiento de los gránulos provoca la abertura de los poros de la superficie de los gránulos de almidón, permitiendo a la carragenina penetrar dentro del almidón. Vu Dang et al. (2009) reportan que para las mezclas almidón-WPI, hay una coexistencia de zonas ricas en proteína y zonas ricas en almidón. La repartición de los agregados de proteína a través de las dispersiones de almidón, varía con la concentración de WPI, sin embargo, mencionan que la proteína rodea los gránulos de almidón y esto es más evidente a mayores concentraciones de WPI, sin embargo, no observa la introducción de la proteína dentro de los gránulos de almidón.

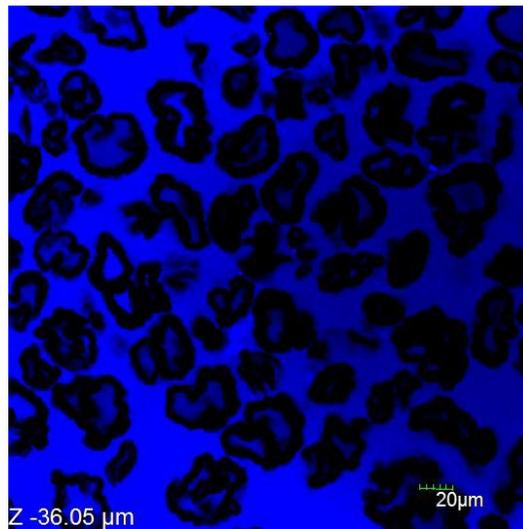


Figura 48. Imagen de microscopia confocal de barrido láser de la mezcla 2.0% CH10 con 1.0% WPI marcado con ANSA. $\lambda = 450$ nm.

8.5.4 Discusión

La variación de G' a 6.28 rad/s con las diferentes concentraciones de WPI para diferentes concentraciones de CH10, muestra que los valores del módulo de almacenamiento para 0.5, 1.0 y 2.0% WPI se encontraron en el intervalo de 4.20 a 8.30 mPa (círculos en la Figura 49). Arriba de 2.0% de WPI, G' se incrementó hasta 40.1 Pa para 3.9%. Este considerable incremento es el resultado de la gelificación de las proteínas. Para 0.5, 1.0 y 2.0% de WPI (círculos en la Figura 49), no hubo formación de geles posteriormente al calentamiento, pero la agregación fue observada como se indica en la Figura 48, que corresponde a la imagen de confocal para 2.0% de WPI. Esto significa que la concentración de los agregados de proteína es muy baja para formar una red continua. Arriba de 3.0% de WPI, el agua es atrapada por los agregados de proteína y se forman geles que se auto-sostienen. Estos geles son, sin embargo, termoirreversibles. Las proteínas se desnaturalizan térmicamente, independientemente de la concentración de WPI, pero la agregación de las proteínas conduce a la formación de redes, dependiendo de la concentración de WPI. La asociación de las proteínas ocurre por las interacciones hidrofóbicas entre los sitios expuestos de las cadenas desplegadas. Estos sitios se encuentran ocultos cuando las proteínas se encuentran en su estado nativo. Las proteínas de suero térmicamente tratadas forman un sistema de dos fases, en el cual el disolvente constituye la fase continua. Sin

embargo, arriba de 2.0% de WPI, el disolvente es atrapado por los agregados de proteína y se forman geles fuertes. Por debajo de esta concentración, las proteínas se encuentran suspendidas en la fase continua. Shim & Mulvaney (2001) expresan que los geles de proteína tienen las características de redes entrecruzadas. La adición de WPI a un gel formado por almidón de maíz normal, exhibe un comportamiento viscoelástico de gel entrecruzado. Al incrementar la concentración de proteína, hay un mayor número de enlaces disulfuro intermoleculares, esto incrementa la polimerización debido al incremento del intercambio disulfuro-sulfhidrilo. De manera similar, el entrecruzamiento de los agregados ocurre a 90 °C. Esto podría explicar por qué G' y G'' aumentan con la cantidad de proteína como se muestra en la Figura 46. Los valores de G' de las mezclas CH10-WPI fueron notablemente más grandes que aquellos de sus componentes individuales. Este comportamiento es frecuentemente llamado sinergia, debido a que G' y G'' de las mezclas, son mayores que los de sus componentes separados. En los geles, la sinergia reológica puede ocurrir debido a que alguno de los dos componentes actúan como “relleno” (Shim & Mulvaney, 2001), esto es, uno de los componentes refuerza al otro.

El módulo de almacenamiento de las mezclas con 1.0% de CH10 y 0.5, 1.0 y 2.0% de WPI fue 100 a 180 veces mayor que el de aquellos que corresponden al WPI solo (cuadrados en la Figura 49). Las mezclas con 1.0% de CH10 y 3.0, 3.5 y 3.9% de WPI, tuvieron valores de G' de 1300, 50 y 7 veces mayores, respectivamente, que aquellos con las mismas concentraciones de WPI solo (cuadrados en la Figura 49). Este incremento es el resultado de la coexistencia de los gránulos de almidón hinchados, con los agregados de proteína. En el caso de concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% de WPI, combinado con CH10 (círculos en la Figura 49), los agregados de proteína no son suficientes para formar una red continua y por lo tanto, geles auto-sostenibles. Por lo tanto, los gránulos de almidón refuerzan el sistema debido a que coexisten con las proteínas de suero desnaturalizadas. La fracción volumen sería ahora la suma de aquella de los gránulos de almidón hinchados (20%, 28%, 55%, 72% para 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0% CH10, respectivamente) y la de los agregados de proteína. Por arriba de 2.0% de WPI, los gránulos de almidón están rodeados por agregados de proteína que sirven de “relleno” en la red proteínica. Sin embargo, como la concentración del WPI en la mezcla se ha incrementado, la contribución de los gránulos de almidón en G' los vuelve débiles. En este punto, la rigidez de los geles está principalmente dada por la matriz de proteína.

Por otro lado, las mezclas con 2.0% de CH10, 0.5 WPI; 2.0% CH10, 1.0 WPI y 2.0% CH10, 2.0% de WPI (triángulos en la Figura 49) tuvieron valores de G' superiores a los de las mezclas con 1.0% de CH10, 0.5 WPI; 1.0% CH10, 1.0% WPI y 1% CH10 2.0% de WPI. Esto confirma el efecto de reforzamiento de los gránulos de almidón hinchados cuando el WPI no forma geles. El efecto sería el mismo que el observado en las mezclas con 1.0% de CH10. Sin embargo, los valores de G' de las mezclas con 2.0% de CH10 y 3.0, 3.5 y 3.9% de WPI (triángulos en la Figura 49), fueron prácticamente los mismos que aquellos para las mezclas con 1.0% de CH10. Mientras que el efecto de reforzamiento de los gránulos de almidón, se observó para las concentraciones de WPI en un intervalo de 0.5 a 2.0%, dicho efecto es marginal para concentraciones de WPI mayores. Mayores incrementos en las concentraciones de almidón, es decir, 3.0 y 4.0% de CH10, muestran un incremento moderado de 107 a 644 Pa y 152 a 1031 Pa, respectivamente, sobre el intervalo de concentraciones de WPI de 0.5 a 3.9% (triángulos invertidos y rombos en la Figura 49). A estas concentraciones de almidón, la fracción volumen de los gránulos de almidón es mayor que la de las mezclas que se comportan esencialmente como pastas de almidón individuales, aun para concentraciones de WPI de 0.5 a 2.0%.

Esto se confirma por las veces que se incrementa G' , de 5.5 a 2.5, para las pastas individuales de almidón, respectivamente, observadas en la Figura 49 para 0.0% de WPI. Dicho incremento contrasta con aquellos para 1.0 y 2.0% de CH10, que fueron cerca de dos y más de tres décadas logarítmicas, respectivamente. Algunos incrementos pueden ser atribuidos a la presencia de agregados de proteína, cuya influencia debilita la concentración de almidón incrementada. Los sistemas de dos fases formados por los gránulos de almidón dispersos en la fase continua de WPI, pueden ser observados en la imagen confocal de la Figura 48, la cual corresponde a la mezcla con 1.0% CH10 y 2.0% de WPI. Las zonas oscuras corresponden a los gránulos de almidón que no están marcados y las zonas azules corresponden a la proteína marcada de manera no covalente con ANSA.

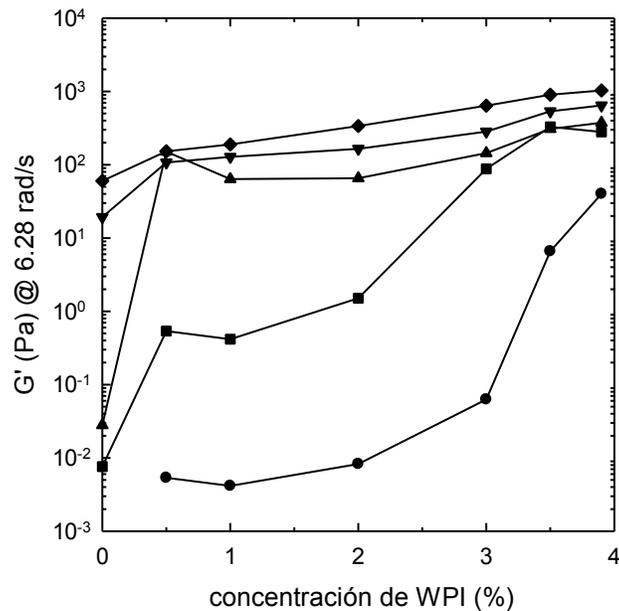


Figura 49. Variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de WPI para diferentes concentraciones (%) de CH10: 0.0 (círculos), 1.0 (cuadrados), 2.0 (triángulos), 3.0 (triángulos invertidos) y 4.0 (rombos).

8.6 Aislado de proteína de suero lácteo (WPI)- κ -carragenina

8.6.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 50 muestra el termograma de las mezclas con 2.0% WPI + 0.75% κ -carragenina y 3.5% WPI + 0.75% κ -carragenina. Una mayor cantidad de proteína resulta en picos endotérmicos más pronunciados, debido a la cantidad de energía que se necesita para desnaturalizar una mayor cantidad de esta. Gaaloul et al. (2009) han demostrado sin embargo, que cuando la proteína de suero lácteo es tratada térmicamente a pH neutro, la β -lactoglobulina se desnaturaliza, exponiendo los grupos con carga positiva de los aminoácidos, haciéndolos disponibles para interactuar con la κ -carragenina aniónica (de la Fuente et al., 2004). Capron et al. (1999) demostraron que la agregación inicial de la β -lactoglobulina en pequeños agregados no es afectada por la presencia de κ -carragenina, pero una agregación mayor de pequeños agregados forma partículas fractales; esta formación es acelerada en presencia de la κ -carragenina. La Tabla 14 muestra las temperaturas de transición y las entalpías correspondientes.

8.6.2 Propiedades viscoelásticas

La Figura 51 muestra los espectros mecánicos de diferentes mezclas WPI-κC. Los módulos dinámicos dependen de la frecuencia en diferentes grados en función de la combinación particular WPI-κC. Siguiendo el mismo tipo ley de potencia expresada como $G' \propto \omega^a$ y $G'' \propto \omega^b$, los parámetros a y b a 25 °C se muestran en la Tabla C del Anexo. Se calcularon los parámetros a y b correspondientes a la ley de la potencia, los cuales representan la dependencia logarítmica de G' y G'' con la frecuencia, respectivamente y podrían interpretarse como la velocidad de cambio de los módulos dinámicos con la frecuencia. Para todas las mezclas, G' fue prácticamente independiente ($0.03 \leq a \leq 0.04$) de la frecuencia, incluso en las mezclas con menor cantidad de κ-carragenina, es decir, (κC/WPI) 0.25/0.5, 0.25/1.0, 0.5/0.5. Esto sugiere que la dependencia con la frecuencia, es independiente de la concentración de κ-carragenina, esto se observa en la Figura 51, un comportamiento lineal para todo el rango de frecuencias.

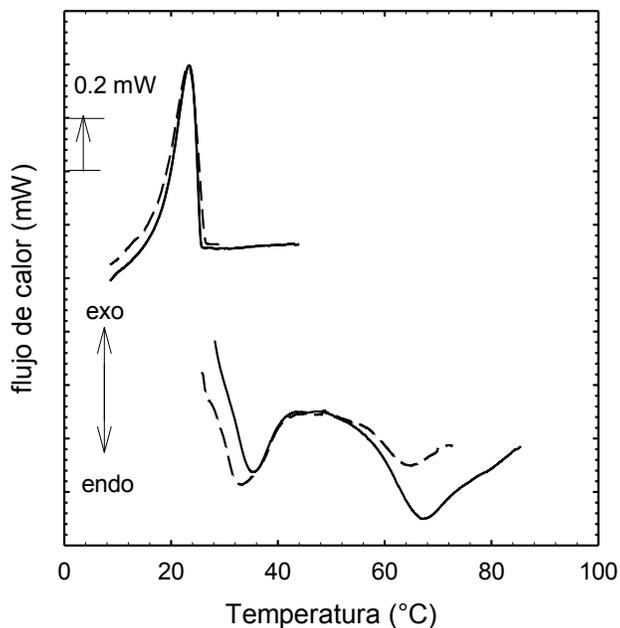


Figura 50. Termogramas de las mezclas WPI-κ-carragenina: 2.0% WPI + 0.75% κ-carragenina (línea punteada), 3.5% WPI + 0.75 κ-carragenina (línea continua). (1.2 °C/min)

Tabla 14. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para la mezclas 2.0% WPI + 0.75% κ C y 3.5% WPI + 0.75% κ C.

Concentración (%)	T _{ini} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH (J/g de muestra)
0.75 κ -carragenina (fusión)	27.0	32.3	39.5	0.110
2.0 WPI	62.6	68.9	74.3	0.205
0.75 κ -carragenina (gelificación)	26.7	24.2	18.4	- 0.228
0.75 κ -carragenina (fusión)	27.8	33.0	42.3	0.128
3.5 WPI	62.7	69.2	75.6	0.265
0.75 κ -carragenina (gelificación)	28.7	25.7	19.8	-0.249

El módulo G'' muestra una mayor dependencia con la frecuencia ($0.13 \leq b \leq 0.49$), en el intervalo de 0 a 1.0 rad/s. Todas estas diferencias entre la dependencia con la frecuencia de las mezclas se observan en la Figura 52 (a, b, c y d). En ella se muestra la dependencia con la frecuencia de $\tan \delta$ para todos los geles. Aquellos que contienen una mayor cantidad de WPI presentan el mismo tipo de comportamiento, es decir, $G' > G''$. La variación de G' y G'' con la concentración de κ -carragenina se muestra en la Figura 53.

Para el WPI, los módulos G' y G'' son muy pequeños en comparación con las mezclas con κ -carragenina. Ambos módulos dinámicos aumentan al incrementar la concentración de κ -carragenina. El aumento de G' y G'' de los geles puede atribuirse a un cambio en la estructura de hebras finas a partículas (Turgeon & Beaulieu, 2001, Mleko et al., 1997). Este fenómeno puede ser explicado por la formación de complejos entre el WPI y la κ -carragenina, debido a que las moléculas lineales del polisacárido se “conectan” a las proteínas globulares, incrementando la densidad electrónica del medio (Mleko et al., 1997). La influencia de la concentración de proteína sobre la gelificación de las mezclas WPI/ κ -carragenina se muestra en la Figura 51 (a, b, c y d); ambos módulos dinámicos aumentan con el incremento de concentración de WPI. Este incremento puede estar relacionado con la agregación de las proteínas, la cual se favorece por la separación de fases resultante en una red interconectada. Parece que el balance entre κ -carragenina y WPI contribuye a la formación del gel.

Gaaloul et al. (2009), estudiaron la viscoelasticidad de mezclas WPI/ κ -carragenina. Cuando se incrementa la concentración de κ -carragenina ($C_{\kappa C}$), el sistema está lejos de ser

una solución diluida y puede considerarse una solución semidiluida en la cual $C^* < C_{\kappa C} < C^{**}$, haciendo que la incompatibilidad termodinámica entre los componentes aumente. En estas mezclas ocurren simultáneamente varios eventos que podrían competir: 1) Gelificación del WPI debida a cambios en el tamaño de los agregados, 2) aumento en la asociación entre cadenas de κ -carragenina y 3) separación de la fase segregativa inducida por incompatibilidad termodinámica. Esta afirmación fue confirmada por Croguennoc et al. (2001), quienes reportan que en presencia de κ -carragenina hay crecimiento de los agregados de β -lactoglobulina, sin embargo, la estructura de los agregados no es modificada. Estos eventos se atribuyen a los efectos de volumen excluido, originados por la incompatibilidad termodinámica entre los polímeros naturales. Cuando la β -lactoglobulina se agrega, alcanza cierto tamaño, la floculación de los agregados puede ocurrir porque entre ellos se agota localmente la κ -carragenina, de tal modo que existe un incremento en la concentración de agregados y consecuentemente, mayores interacciones entre ellos. Este fenómeno es conocido como floculación por agotamiento.

Observando el comportamiento de G' en las mezclas proteína-carragenina, podemos afirmar que existe una competencia entre la gelificación y la separación de fases. Debido a que la tasa de calentamiento es baja ($1.5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) es posible que la separación de fases ocurra antes que la gelificación.

La Figura 53 muestra la variación de G' con la temperatura para 3.9 % de WPI y sus mezclas a diferentes concentraciones con κC . La temperatura de gel, T_{gel} , es obtenida cuando la $\tan \delta = 1$ y ocurre cerca de los $76 \text{ }^\circ\text{C}$ para el WPI. La presencia de κC acelera la agregación de WPI disminuyendo la temperatura de gel a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ para mezclas con 1.0% de κC . Por debajo de esta temperatura, hay un incremento en G' con un máximo a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ para las mezclas con 0.75 y 1.0% κC . Esto puede ser debido a la disolución de la κC seguido por una disminución en la viscosidad por el calentamiento (Tecante y Doublier, 1999). Este máximo no se observa a bajas concentraciones de κC , es decir, 0.25 y 0.5%.

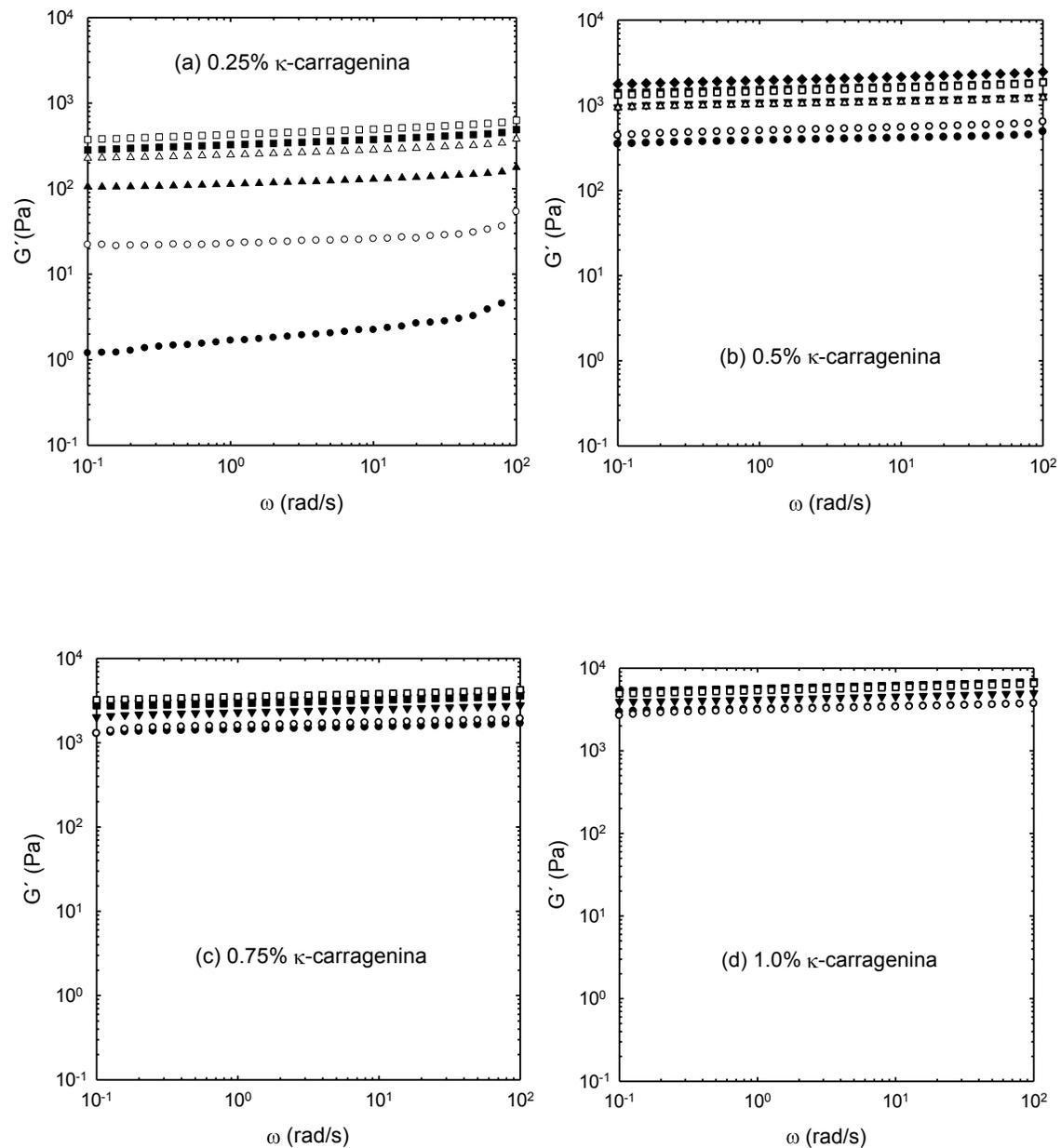


Figura 51. Módulo de almacenamiento de diferentes mezclas WPI- κ C con diferentes concentraciones (%) de κ C, a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75 y d) 1.0 y de WPI, 0.5 (círculos negros) 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos) 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos). La deformación aplicada fue del 1.0% para todas las combinaciones, excepto para 0.5% WPI con 0.25% κ C con las que fue del 10.0%

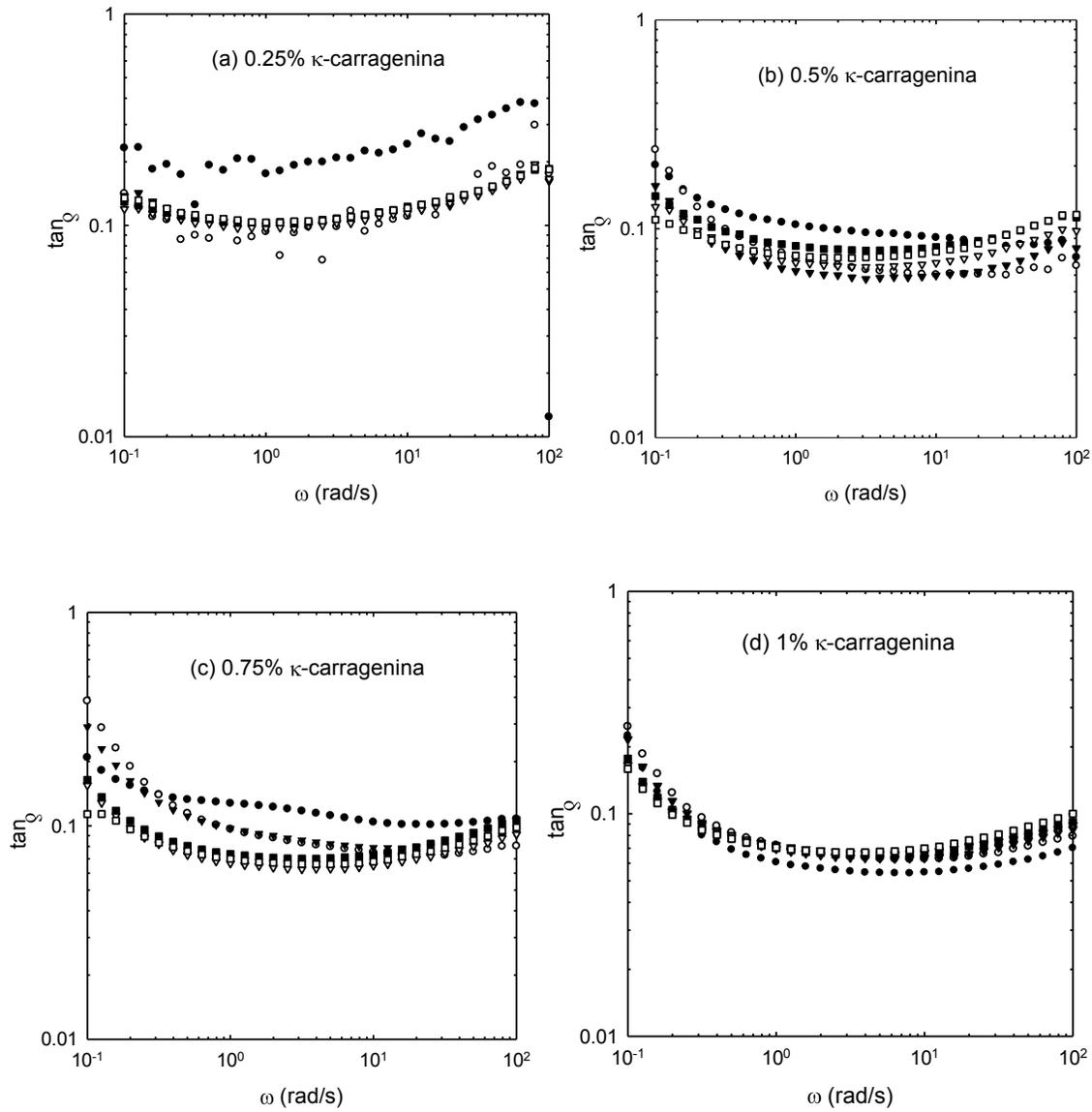


Figura 52. Variación de $\tan \delta$ con la frecuencia para diferentes mezclas WPI- κ C con diferentes concentraciones (%) de κ C, a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75 y d) 1.0 y de WPI, 0.5 (círculos negros) 1.0 (círculos blancos), 2.0 (triángulos negros invertidos) 3.0 (triángulos blancos invertidos), 3.5 (cuadrados negros) y 3.9 (cuadrados blancos).

En la Tabla 15 se muestra el esquema de separación de fases que se realizó para la observación visual de la separación de fases mostrado en el cuadro ocurre para todas las mezclas con 3.9 % de WPI sin importar la concentración de κ C. Entre los 40 °C y T_{gel} , la gelificación de la proteína ocurre con el incremento de G' . Durante el periodo isotérmico a 90 °C, G' tiende a ser constante. Cuando las mezclas son enfriadas de 30 a 40 °C, G' se

incrementa debido a la gelificación. Entonces, la carragenina está separada del WPI en su propio dominio.

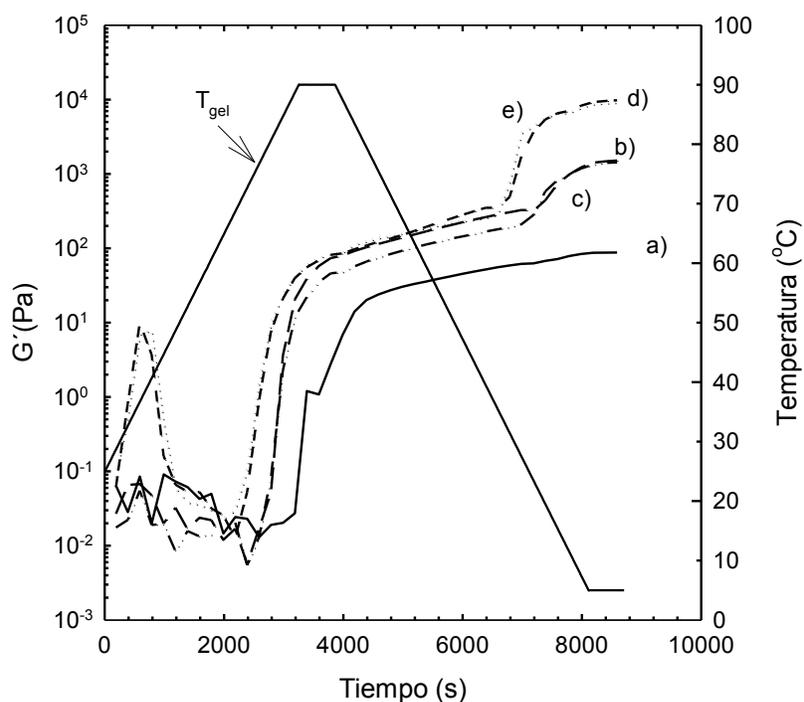


Figura 53. Variación de G' (Pa) durante el calentamiento (la línea continua muestra el perfil de temperatura) para (a) 3.9% WPI; (b) 3.9% WPI + 0.25% κ C; (c) 3.9% WPI + 0.50 % κ C; (c) 3.9% WPI + 0.75% κ C; (d) 3.9% WPI + 1.0% κ C.

Tabla 15. Observación visual de la separación de fases

κ C (%)	WPI (%)							
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	3.9
0.15	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	++	++	++	++	++
0.5	+	+	++	++	++	++	++	++
0.75	+	++	++	++	++	++	++	++
1.0	+	++	++	++	++	++	++	++

+ una fase, ++ dos fases.

8.6.3 Microscopia confocal de barrido láser

La Figura 54 muestra las imágenes de confocal de las mezclas WPI- κ C. Los agregados de proteína formados como consecuencia del tratamiento térmico aparecen en azul,

mientras que en rojo se observa el medio continuo formado por la κ C. En la imagen en azul existen partes oscuras debido a la falta de fluorescencia y al excitar el marcador de la carragenina que fluoresce en rojo, esas partes oscuras aparecen formando un medio continuo en ese color. La imagen colocalizada de la mezcla 2.0% WPI + 0.75% de κ -carragenina aparece en rosa. En ella se aprecia que un sistema formado por agregados de proteína rodeados de κ -carragenina. Cuando la β -lactoglobulina es calentada a pH neutro, la proteína se desnaturaliza exponiendo los grupos amino cargados positivamente, los cuales podrían estar disponibles para su interacción con las cadenas aniónicas de la κ -carragenina, dando como resultado la formación de complejos (de la Fuente et al., 2004). Cuando este es el caso, generalmente hay una notable separación de fases ya que se forman coacervados complejos. La formación de este tipo de sistemas no se observó en estas mezclas.

8.6.4 Discusión

La Figura 55 muestra la variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de WPI, para diferentes concentraciones de κ -carragenina. El comportamiento del WPI ha sido discutido en la sección previa. La adición de 0.25% de κ -carragenina resultó en un incremento notable de G' con respecto al WPI solo sobre todo el intervalo de concentraciones de proteína de suero (cuadrados en la Figura 55). La adición de 0.5, 0.75 y 1.0% de κ -carragenina resultó en un incremento de G' con respecto a los módulos obtenidos para WPI (triángulos, triángulos invertidos y rombos en la Figura 55), así como para las mezclas con 0.25% de κ -carragenina. Sin embargo, para una concentración constante de κ -carragenina, entre 0.5 a 1.0%, G' se incrementa moderadamente en el intervalo de concentraciones de WPI; 407 a 2111 Pa (5 veces), 1162 a 3737 Pa (3 veces) y 2906 a 5751 Pa (2 veces) para 0.5, 0.75 y 1.0% de κ -carragenina, respectivamente. Cabe resaltar que una mayor cantidad de κ -carragenina en la mezcla, debilita la contribución del WPI sobre la rigidez, G' , del sistema, es decir, la carragenina define el comportamiento viscoelástico de la mezcla aun para altas concentraciones de WPI.

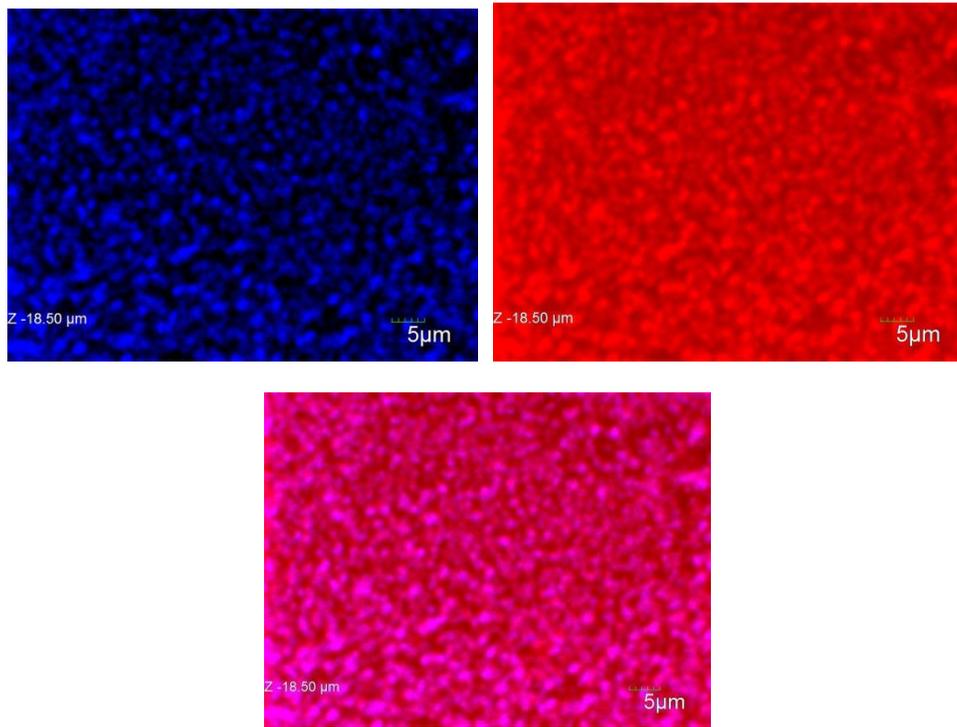


Figura 54. Imágenes en confocal de WPI (azul) y κ C (rojo). La imagen colocalizada de la mezcla 2.0% WPI + 0.75% κ C se observa en rosa.

Este comportamiento es producto de la habilidad de la κ -carragenina de formar geles inclusive en concentraciones de 0.25%, aunque para esta concentración, el gel es más débil que para las otras concentraciones. La gelificación de κ -carragenina es el resultado de la interacción del polisacárido con contraiones de sodio añadidos y los cationes presentes en la preparación comercial. Por lo tanto, la interacción con iones sodio y potasio permite la formación del gel. La interacción con iones potasio es más fuerte que con iones sodio (Rochas & Rinaudo, 1980) y por tanto los geles de κ -carragenina formados con iones potasio son más fuertes que los formados con ion sodio.

Las propiedades viscoelásticas de las mezclas fueron definidas por la κ -carragenina, lo que sugiere un menor grado de interacción con las proteínas del suero, posiblemente debido a las condiciones de pH neutro. La variación en la rigidez de geles de WPI- κ -carragenina ha sido atribuida a los cambios de estructura de hebras finas a estructuras de partículas (Turgeon & Beaulieu, 2001; Mleko et al., 1997). Este fenómeno puede ser explicado por la formación de complejos entre proteínas del suero y la κ -carragenina; las moléculas largas y lineales de carragenina “conectadas” a los glóbulos de proteína hacen que aumente la densidad electrónica del medio circundante (Mleko et al., 1997). La influencia de la

concentración de proteína sobre la gelificación de mezclas WPI- κ -carragenina demuestra que G' y G'' se incrementan con la concentración de WPI hasta 2.0% y para 0.25% de κ -carragenina. Este incremento puede estar relacionado con el mejoramiento de la agregación de proteínas bajo condiciones donde ocurre separación de fases. Probablemente hay un balance entre la contribución de la mezcla κ -carragenina-WPI a la rigidez existente del gel.

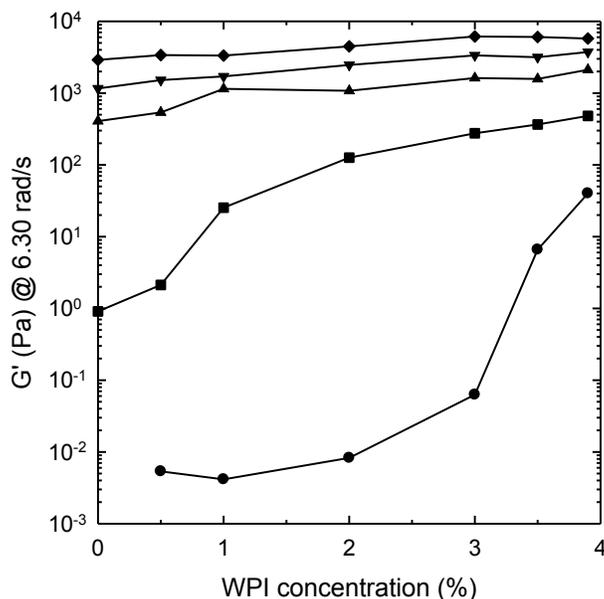


Figura 55. Variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de WPI para diferentes concentraciones (%) de κ C: 0.0 (círculos), 0.25 (cuadrados), 0.50 (triángulos), 0.75 (triángulos invertidos) y 1.0% (diamantes).

8.7 Almidón ceroso químicamente modificado (CH10)- κ -carragenina

8.7.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Tabla 16 muestra las temperaturas de transición y las entalpías de los termogramas mostrados en la Figura 56. Las entalpías de las mezclas son menores que aquellas de los componentes individuales. Esto es particularmente notable en el caso del pico de fusión de la κ C; la presencia de histéresis térmica muestra que hay una transición asociada con la formación de un gel. Como se mencionó anteriormente, la κ C forma geles menos rígidos en presencia de sodio, sin embargo, la estructura que resulta de la asociación de hélices de carragenina es reforzada por los gránulos hinchados de almidón, como se analiza en la siguiente sección.

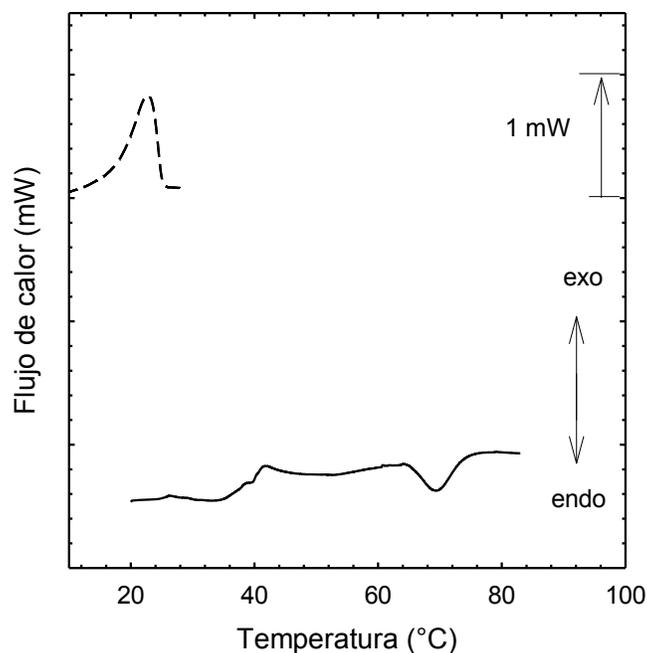


Figura 56. Termograma correspondiente a 1.0% CH10 + 0.75% κC. La línea continua indica el calentamiento y la línea punteada indica el enfriamiento. (1.2 °C/min)

Tabla 16. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para la mezcla 1.0% CH10 + 0.75% κC.

Concentración (%)	T _{ini} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH (J/g de muestra)
0.75 κ-carragenina (fusión)	24.003	31.434	39.06	0.169
1.0 CH10	63.88	69.099	73.40	0.127
0.75 κ-carragenina (gelificación)	24.403	22.15	16.56	-0.202

8.7.2 Propiedades viscoelásticas

Los espectros mecánicos (Figura 57) muestran que los módulos dinámicos dependen de la frecuencia en diferentes grados, de acuerdo con la combinación particular κC-CH10. Siguiendo el mismo tipo ley de potencia expresada como $G' \propto \omega^a$ y $G'' \propto \omega^b$, los parámetros a y b a 25 °C se muestran en las Tabla D del Anexo. Estos parámetros expresan la

dependencia logarítmica de G' y G'' con ω y representan la pendiente de la recta obtenida de una gráfica del $\log G'$ contra el logaritmo de la frecuencia, lo mismo para $\log G''$. Para todas las mezclas, G' muestra una ligera dependencia con la frecuencia ($0.037 \leq a \leq 0.18$). El exponente 0.037 corresponde a la mezcla 4.0% CH10 + 1.0% κ C; concentraciones mayores tanto de κ C como de CH10 disminuyen el valor del exponente, es decir, en todo el intervalo de frecuencia, la dependencia es menor. El módulo G'' muestra una mayor dependencia con la frecuencia ($0.079 \leq b \leq -0.37$), en el intervalo de 0 a 1.0 rad/s. Las diferencias entre la dependencia de los módulos con la frecuencia se muestran en la Figura 58 (a, b, c y d), en la cual se presenta la variación de la $\tan \delta$ para todos los geles. Los geles que contienen una mayor cantidad de κ C presentan el mismo tipo de comportamiento, es decir $G' > G''$. La variación de los módulos G' y G'' con la concentración de κ -carragenina se muestra en la Figura 57. Mayores concentraciones de κ -carragenina resultan en un aumento de G' y G'' . Las pastas de almidón preparadas en presencia de κ -carragenina muestran módulos dinámicos mayores que las pastas de almidón sólo. Es importante resaltar la sinergia exhibida por las mezclas con un comportamiento tipo sólido en el cual $G' > G''$, con ambos módulos independientes de la frecuencia por debajo de 0.1 rad/s. La adición de κ -carragenina aumentó los módulos sobre los del almidón solo. Los gránulos hinchados de almidón forman la fase dispersa de la suspensión, mientras que la carragenina está en la fase continua. Debido a la modificación química, los gránulos de CH10 son más resistentes a la desintegración y esto reduce considerablemente su rompimiento. El CH10 es un material interesante porque está libre de amilosa y tiene una mayor resistencia a tratamientos térmicos y mecánicos. Es posible aprovechar las condiciones que promueven el hinchamiento de los gránulos sin destruirlos, evitando o minimizando la presencia de amilopectina en la fase continua. De hecho puede ocurrir una disolución parcial del componente durante el cocimiento, pero es tan baja que se considera que no tiene influencia alguna en el comportamiento viscoelástico de esta fase. Con este tipo de almidón, se espera que los gránulos hinchados se encuentren dispersos en la fase constituida sólo por agua o una solución acuosa del hidrocoloide añadido (Tecante & Doublier 1999).

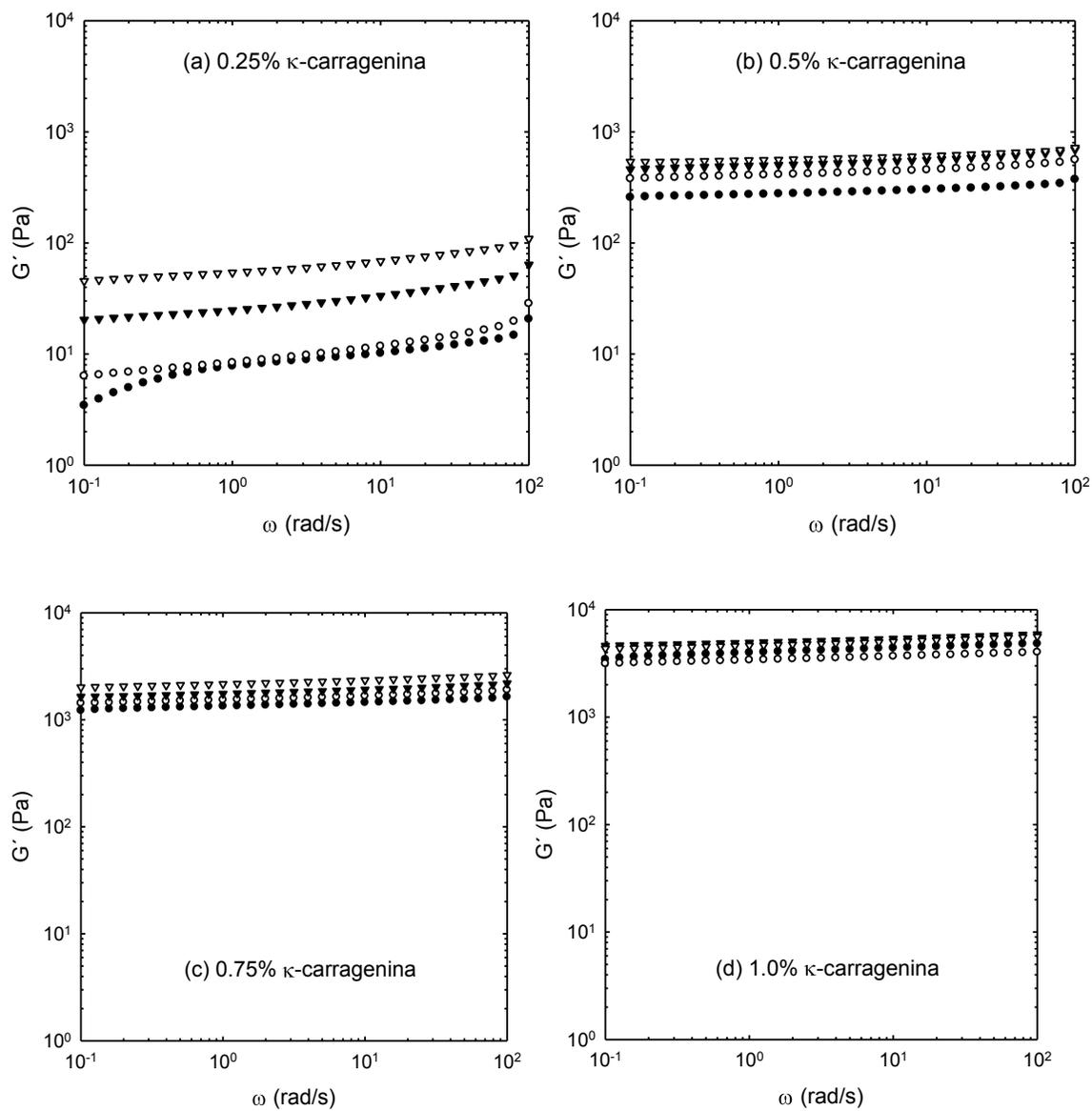


Figura 57. Espectro mecánico de mezclas κ C-CH10 con diferentes concentraciones (%) de κ C; a) 0.25, b) 0.50, c) 0.75, d) 1.0 y almidón; 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulos negros invertidos) y 4.0 (triángulos blancos invertidos). La deformación aplicada en las mezclas 0.25% κ C- CH10 fue de 10.0% para 1.0% CH10 y para 2.0, 3.0 y 4.0% de CH10 de 1.0%. Para las mezclas 0.5% κ C-CH10, 10% de deformación. Para 0.75% κ C-CH10, 1.0% de deformación y para 1.0% κ C-CH10 se aplicó 0.3% de deformación.

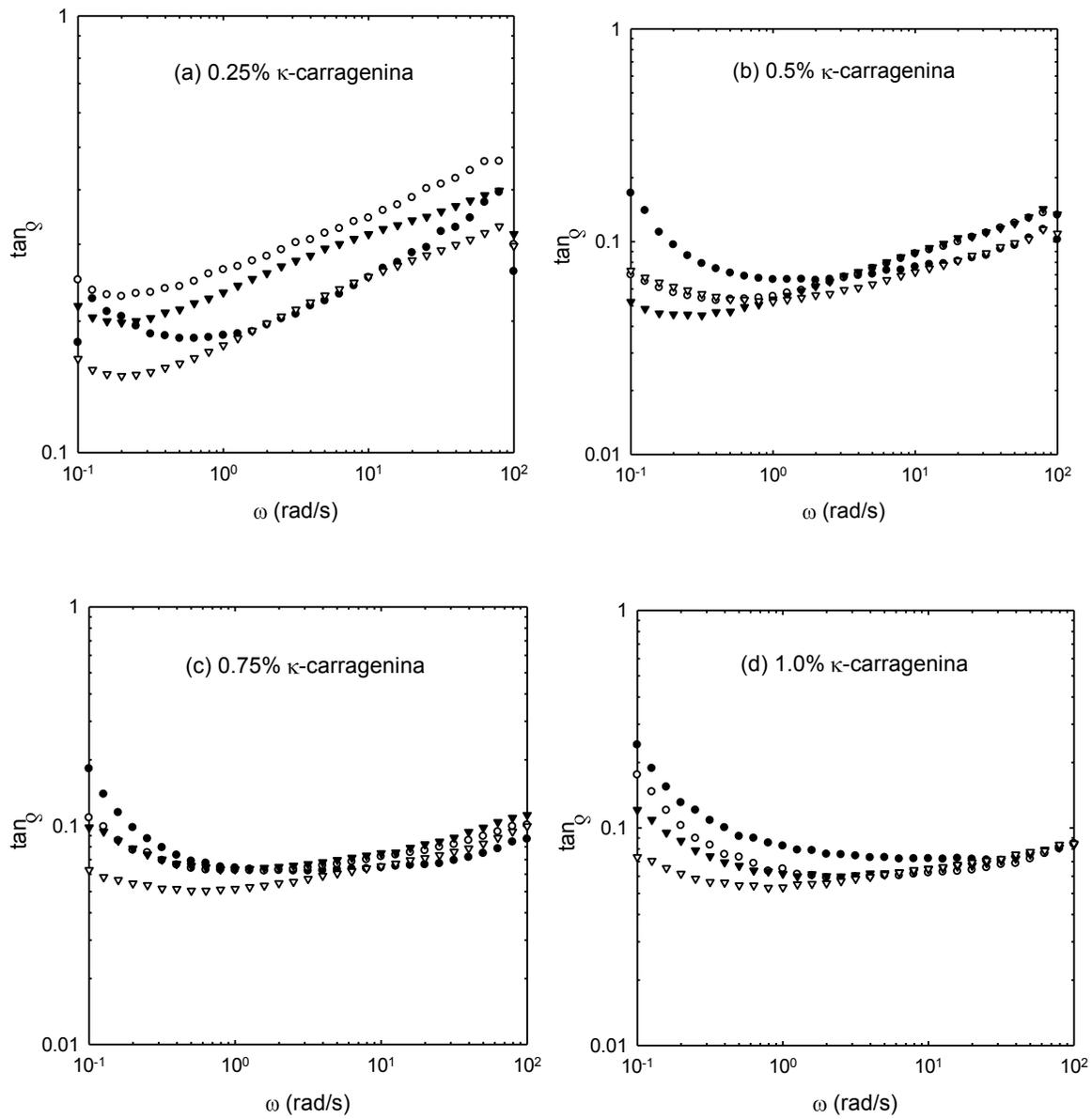


Figura 58. Variación de $\tan \delta$ con la frecuencia para diferentes concentraciones (%) de κ C; a) 0.25, b) 0.5, c) 0.75, d) 1.0 y almidón; 1.0 (círculos negros), 2.0 (círculos blancos), 3.0 (triángulos negros invertidos) y 4.0 (triángulos blancos invertidos).

8.7.3 Microscopia confocal de barrido láser

La Figura 59 muestra las imágenes de confocal de CH10, κ -carragenina y la mezcla 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina. Los gránulos de almidón se observan en verde, aunque también se observan en rojo cuando se excita el fluorocromo de la κ -carragenina. La imagen colocalizada aparece en amarillo, sugiriendo que los gránulos no están inmersos en la κ -carragenina, sino que está en la vecindad o incluso adsorbida sobre su superficie. Si existiera alguna interacción entre ambos componentes se esperaría que estuviera conformada por puentes de hidrógeno. Sin embargo, esto es consistente con el comportamiento viscoelástico de la mezcla particular.

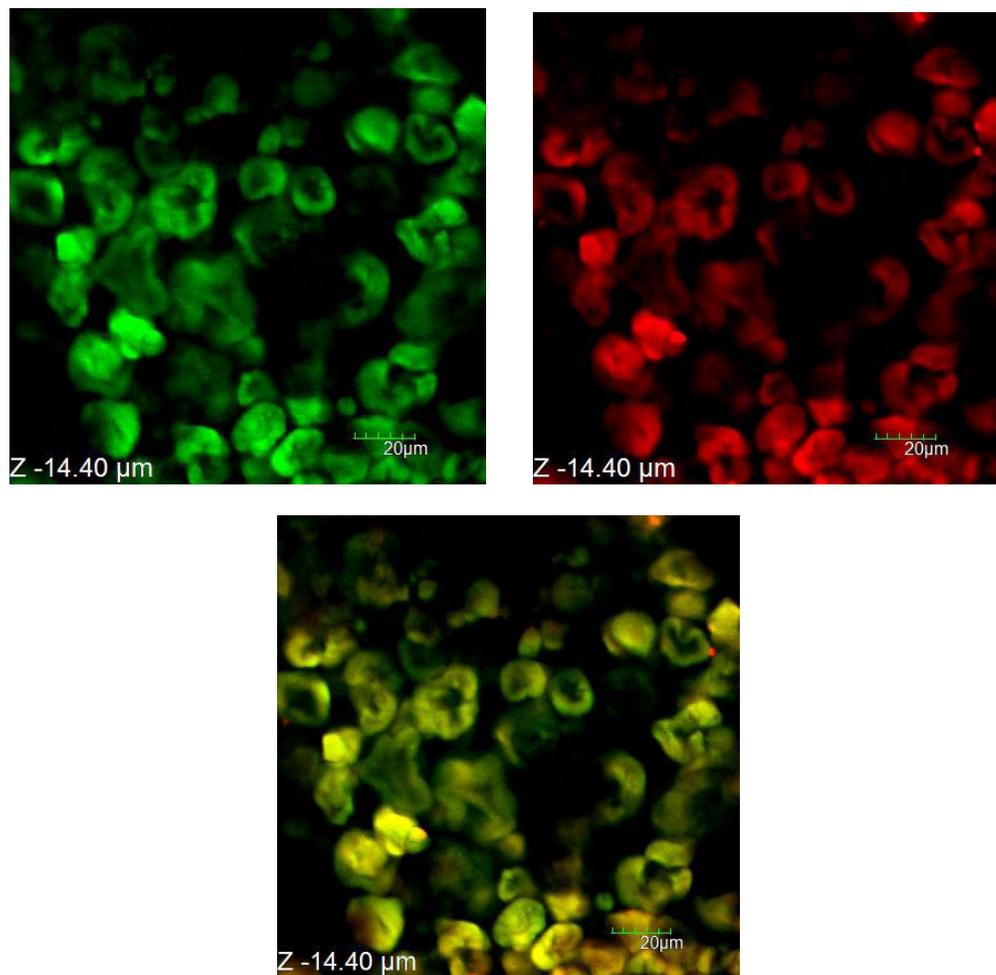


Figura 59. Imágenes de confocal de CH10 (verde), κ C (rojo) y de la imagen colocalizada correspondiente a la mezcla 1.0% CH10 + 0.75% κ C (verde-amarillo).

Savary et al. (2008), estudiaron la estructura de geles formados con κ C-CH10 y pectina con CH10 por reología y microscopía confocal, entre sus principales conclusiones afirman,

que el hinchamiento de los gránulos de almidón permite la abertura de los poros en la superficie del gránulo y permite a la κ C introducirse en el gránulo de almidón, sin embargo, en estas micrografías no se pueden confirmar las mismas observaciones de Savary et al., una de las diferencias incluidas en la forma de preparación de las muestras, es el uso de un buffer ácido en la preparación de las muestras para tener un pH de 3.8, lo cual sugiere la hidrólisis de la carragenina combinado con el tratamiento térmico.

8.7.4 Discusión

La Figura 60 muestra la variación de G' a 6.28 rad/s con la concentración de CH10 para diferentes concentraciones de κ -carragenina. El módulo de almacenamiento del CH10 (círculos en la Figura 60) se incrementa de 7.60 a 28.0 mPa para 1.0 y 2.0% de almidón, respectivamente, y luego se incrementa de 19 a 60 Pa para 3.0 y 4.0% de CH10, respectivamente. Dicho incremento es el resultado del aumento en la fracción volumen de los gránulos de almidón. El tipo específico de almidón es muy estable al tratamiento térmico y mecánico utilizado en este trabajo; los gránulos no se colapsan o se rompen como consecuencia de la cocción. Adicionalmente, el CH10 no forma geles al enfriarse, así que, las pastas individuales de almidón son sistemas en los cuales los gránulos hinchados están dispersos en la fase acuosa. La adición de κ -carragenina resulta en un incremento sustancial en G' para 1.0 y 2.0% de CH10 (cuadrados y triángulos en la Figura 60), pero el módulo de almacenamiento de las pastas con 3.0 y 4.0% CH10 (triángulos invertidos y rombos en la Figura 60), respectivamente; sólo se incrementa 1.6 y 1.06 veces más que el módulo para las pastas sin κ -carragenina para las mismas concentraciones de almidón. Sin embargo, para una concentración constante de κ -carragenina, la adición de 1.0 a 4.0% de CH10 resultó en un aumento en G' no mayor del doble, es decir, de 296 a 595 Pa, 1427 a 2299 Pa y 4318 a 1945 Pa para 0.5, 0.75 y 1.0% κ -carragenina, respectivamente. Sobre este mayor intervalo de concentraciones de κ -carragenina y para una concentración constante de CH10, de 1.0 a 4.0%, G' aumentó solamente dos o tres veces. Por otro lado, excepto para 0.25% de κ -carragenina, la adición de CH10, no resultó en un aumento significativo en G' en relación con los geles de κ -carragenina sola (0.0% CH10). En las mezclas CH10- κ -carragenina, los gránulos hinchados forman la fase dispersa y la κ -carragenina está en la

fase continua, formando un gel aun para una pequeña concentración de almidón, es decir, < 2.6% de este se disuelve en la fase continua. Las propiedades viscoelásticas de los geles compuestos dependen esencialmente de la fracción volumen de los gránulos de almidón que refuerzan la red de κ -carragenina (Tecante & Doublier, 1999).

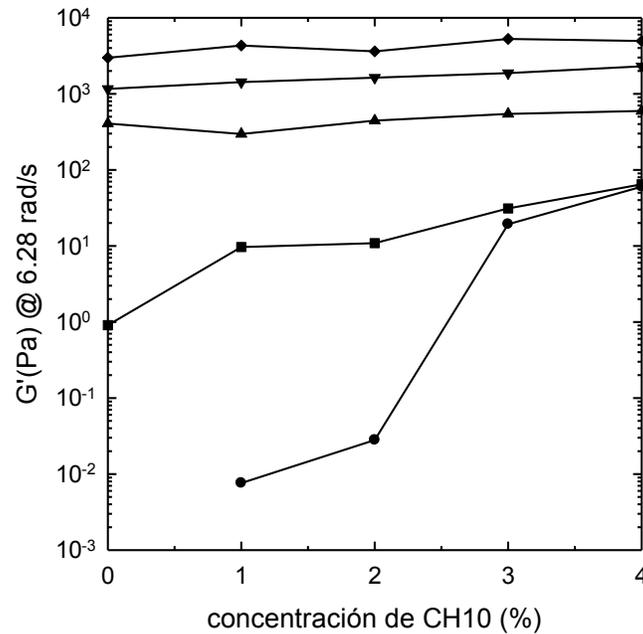


Figura 60. Variación de G' a 6.28 rad/s contra la concentración de CH10 para diferentes concentraciones (%) de κ C: 0.0 (círculos), 0.25 (cuadrados), 0.50 (triángulos), 0.75 (triángulos invertidos) y 1.0% (rombos).

8.8 Mezclas de tres componentes

8.8.1 Microcalorimetría de barrido diferencial

La Figura 61 muestra los termogramas para dos concentraciones diferentes de proteína, 2.0% WPI (línea punteada) y 3.5% WPI (línea continua), con 1.0% de CH10 y 0.75% de κ -carragenina. La Tabla 17 muestra los parámetros térmicos correspondientes. El pico de fusión de la κ -carragenina es más ancho en el segundo termograma a pesar de que es la misma concentración (0.75%). Esto se atribuye a que los agregados de proteína que se forman son de mayor tamaño y quedan recubiertos por la capa de κ -carragenina como se observa en la Figura 61.

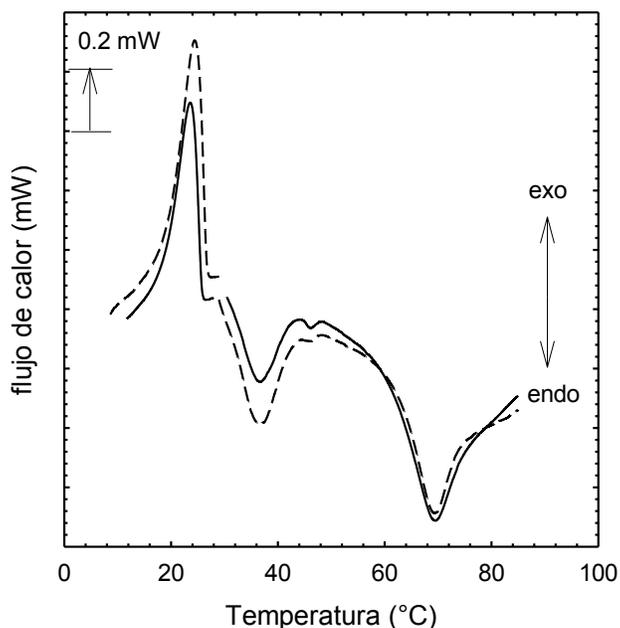


Figura 61. Termograma para 2.0%WPI + 0.75% κ-carragenina + 1.0% CH10 (línea punteada) y 3.5% WPI + 0.75% κ-carragenina + 1.0% CH10 (línea continua). (1.2 °C/min)

Tabla 17. Temperaturas de transición y entalpías (J/g muestra) para 2.0% WPI + 0.75% κ-carragenina + 1.0% CH10 y 3.5% WPI + 0.75% κ-carragenina + 1.0% CH10.

Concentración (%)	T _{ini} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{final} (°C)	ΔH (J/g de muestra)
0.75 κ-carragenina (fusión)	26.6	32.275	39.505	0.11
1.0 CH10 + 2.0 WPI	62.64	68.89	74.31	0.205
0.75 κ-carragenina (gelificación)	26.657	24.20	18.35	-2.228
0.75 κ-carragenina (fusión)	267.80	33.05	42.33	0.128
1.0 CH10 + 3.5 WPI	62.67	69.16	75.55	0.265
0.75 κ-carragenina (gelificación)	28.67	25.749	19.83	-0.249

El pico del primer termograma en 68.89 °C aparece en el segundo ligeramente desplazado en 69.1°C. Estos picos corresponden a la desnaturalización de la proteína, cuya endoterma tiene una entalpía de tipo cooperativo junto con la gelatinización del almidón. Se ha sugerido que la presencia del polisacárido causa la formación de agregados más grandes y polidispersos, modificando el arreglo de los bloques finales en la estructura de los geles

de proteína (Flett et al., 2009). Sin embargo, como en este trabajo no se interrumpió la formación de gel, el tamaño de los agregados para 3.5% de WPI es mayor que con 2.0% de proteína. Asimismo, la entalpía de transición es ligeramente mayor para 3.5% que para 2.0%. El despliegue de proteínas globulares durante la desnaturalización térmica, involucra la absorción de calor para romper los enlaces intermoleculares que son no covalentes y en algunos casos disulfuro dando por resultado una endoterma.

La agregación de las proteínas desnaturalizadas involucra la formación de nuevos enlaces intermoleculares que generan un pico endotérmico. Fitzimons et al. (2008) indican que a menor concentración de proteína, hay mayor disposición de agua y de NaCl presente, tanto para disminuir las repulsiones electrostáticas de la proteína, como para que la κ -carragenina cambie de hebra a hélice durante el calentamiento. Cabe mencionar que el estudio calorimétrico no se realizó para todas las mezclas de tres componentes debido a que este trabajo se enfocó solamente en la importancia de los estudios reológicos y de microestructura. Sin embargo, las pruebas de microcalorimetría que se hicieron, sirvieron para apoyar los datos reológicos y de microscopía confocal.

8.8.2 Propiedades viscoelásticas

La Figura 62 muestra el comportamiento viscoelástico de mezclas de tres componentes que contienen la misma concentración de CH10 y κ -carragenina, pero diferentes concentraciones de WPI. El comportamiento viscoelástico de cada mezcla corresponde al de un gel fuerte con G' mayor que G'' sobre todo el intervalo de frecuencia y con una $\tan \delta$ menor que 0.1. Algunas de las mezclas de dos componentes y todas las mezclas con tres componentes muestran un comportamiento característico. En las mezclas de tres componentes, la κ -carragenina fue el agente gelificante a pesar de su concentración, mientras que el WPI forma suspensiones de agregados de proteína o geles, es decir, redes de agregados de proteína, dependiendo de su concentración. El almidón no forma geles, pero contribuye con sus gránulos hinchados como ya se ha discutido en secciones previas.

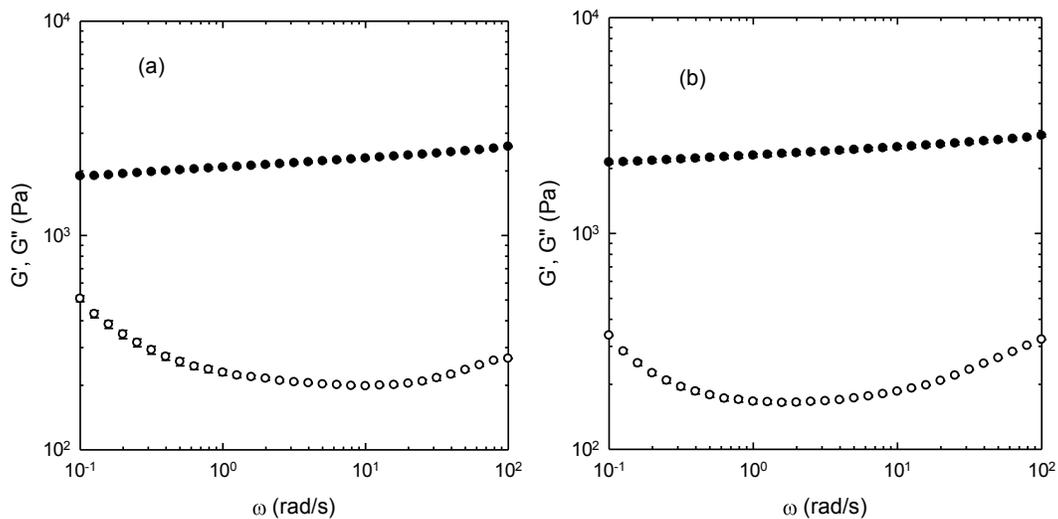


Figura 62. Variación de los módulos dinámicos con la frecuencia para: (a) 1.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ -carragenina y (b) 1.0% CH10 + 3.5% WPI + 0.75% κ -carragenina. G' (símbolos negros), G'' (símbolos blancos). La deformación aplicada fue de 1.0%.

En el caso de sistemas de tres componentes, es posible representar la contribución de cada uno de ellos sobre la respuesta viscoelástica de la mezcla de varias maneras. En este trabajo, el análisis se hizo considerando el efecto de la κ -carragenina, dado que este componente tiene la mayor influencia. Esto se corrobora con el análisis multifactorial de los resultados, es decir, la respuesta global de las mezclas depende principalmente de la concentración de κ -carragenina y su efecto es mayor que el mostrado por el CH10 y el WPI.

La Figura 63 muestra la variación de G' a 6.28 rad/s con la frecuencia para mezclas de WPI- κ -carragenina con diferentes concentraciones de almidón. Esta frecuencia fue seleccionada debido a que es un valor intermedio y por lo tanto, representativo de la tendencia global del comportamiento viscoelástico de las mezclas. La tendencia global de G'' para las mezclas fue esencialmente la misma. Por ello, el análisis se hizo considerando únicamente la variación de G' .

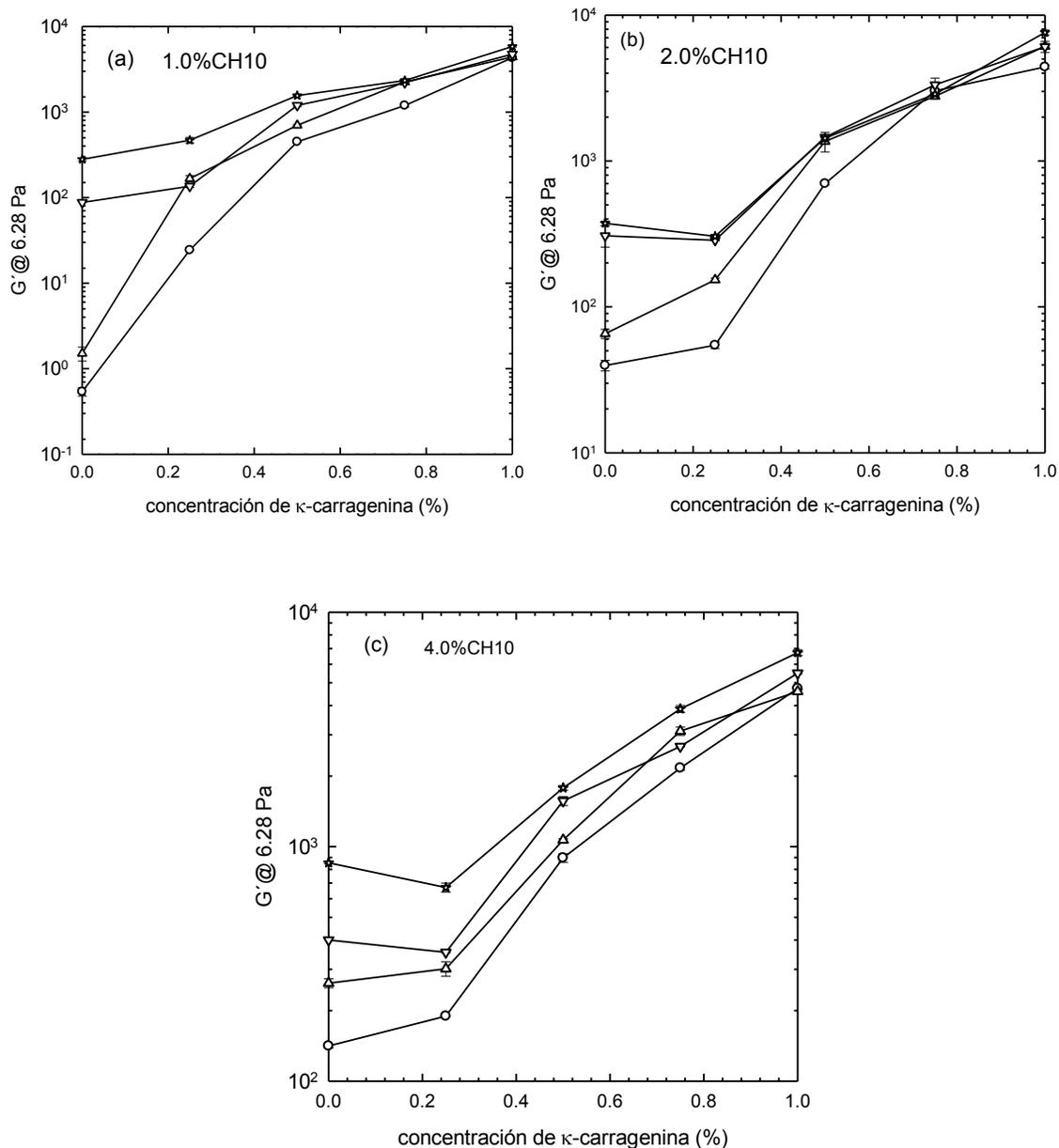


Figura 63. Variación de G' a 6.28 rad/s versus diferentes concentraciones de κ C para diferentes concentraciones de WPI y 1% CH10 (a), 2% CH10 (b) y 4% CH10 (c). 0.5% WPI (círculos), 2.0% WPI (triángulos), 3.5% (triángulos invertidos) and 3.9% (estrellas).

La Figura 63a muestra el cambio de G' a 6.28 rad/s con la concentración de κ -carragenina para diferentes concentraciones de WPI y 1.0% de CH10. Cuando la concentración de κ -carragenina es cero, los valores de G' corresponden a aquellos de la mezcla de dos componentes que contiene 1.0% de CH10 y diferentes concentraciones de WPI. Estos valores son más pequeños que aquellos de las mezclas con κ -carragenina. Por ejemplo, para la mezcla de dos componentes 1.0% CH10 + 0.5% WPI, G' es 0.537 Pa. La

adición de 0.25% de κ -carragenina aumenta G' a 24.4 Pa y el módulo aumenta gradualmente con el incremento en la concentración de κ -carragenina; así que para 1.0% de κ -carragenina, G' fue 4315 Pa. La adición de WPI resultó en un incremento significativo de estos módulos. Por ejemplo, para la mezcla 0.5% WPI + 0.25% κ -carragenina + 1.0% CH10 $G' = 24.4$ Pa, mientras que para la mezcla con 3.9% WPI+ 0.25% κ -carragenina + 1.0% CH10, $G' = 468$ Pa debido a que a esta concentración de proteína se forma un gel.

La Figura 63b demuestra el efecto de la adición de CH10. En ausencia de κ -carragenina, los valores de G' corresponden a aquellos para mezclas de dos componentes con 2.0% CH10 y diferentes concentraciones de WPI. La convergencia de G' para diferentes concentraciones de WPI a altas concentraciones de κ -carragenina, puede ser explicada por la formación de gel de la proteína para concentraciones superiores de 2.0%. En esta región, las proteínas de suero inducen la rigidez de los geles sobre la κ -carragenina. La concentración de CH10 de 2.0% es la frontera entre las dispersiones diluidas y las semidiluidas. Como consecuencia, la concentración de 2.0% de CH10 podría representar un valor de transición para este componente, por debajo de la cual la fracción volumen es tan pequeña, que la adición de pequeñas cantidades de κ -carragenina y WPI tiene un efecto significativo sobre el módulo de las mezclas de tres componentes, mientras que concentraciones superiores, cuya fracción volumen de gránulos hinchados es lo suficientemente grande para tener un efecto dominante en la rigidez de las mezclas provoca que la contribución de κ -carragenina y WPI sea marginal.

La Figura 63c muestra el efecto de una concentración de 4.0% de CH10. En este caso, en ausencia de κ -carragenina, G' corresponde a las mezclas con dos componentes con 4.0% de CH10 y diferentes concentraciones de WPI. Estos valores son más bajos para 0.5, 1.0 y 2.0% de WPI que para aquellos con 0.25% de κ -carragenina. Tomando en cuenta que el WPI no forma geles para concentraciones de 0.5 a 2.0%, el incremento en G' puede ser atribuido al efecto reforzador de la κ -carragenina. Sin embargo, para 3.0, 3.5 y 3.9% de WPI, la adición de 0.25% κ -carragenina resultó en un ligero incremento en G' , el cual fue muy cercano a la mezcla de dos componentes. La contribución del WPI a la rigidez de las mezclas está de alguna manera debilitando aquella de la κ -carragenina. La adición de 0.25% de κ -carragenina a las mezclas CH10-WPI con altas concentraciones de almidón no mejora la rigidez de los sistemas de dos componentes. Este efecto fue gradual para 2.0 y

3.0% CH10 (datos no mostrados). Sin embargo, solo para 0.25% κ -carragenina, la adición de WPI causó un incremento en G' . Para 0.5, 0.75 y 1.0% κ -carragenina, el incremento en la concentración de WPI no mejoró la rigidez del gel. Para 4.0% de CH10, los valores de G' fueron prácticamente independientes de la concentración de WPI. Esto es similar a lo que ocurre para altas fracciones volumen de gránulos hinchados, los cuales interfieren con la formación completa de las redes de κ -carragenina y WPI o bien interrumpen su continuidad, provocando que las mezclas de tres componentes tengan módulos más bajos, especialmente con 4.0% de CH10.

La variación de G' con la temperatura en la Figura 64 para diferentes concentraciones de WPI muestra una gran diferencia en el módulo de almacenamiento entre las mezclas de 1.0% WPI + 0.25 % κ C ((a) en el gráfico) y mezclas de tres componentes que contienen 4% CH10 con 1.0% WPI + 0.25% κ C, 2.0% WPI + 0.75% κ C , 3.0% WPI + 0.75% κ C y 3.9% WPI + 1.0% κ C (b, c, d y e respectivamente). El valor máximo G' debido a que la κ C se solubiliza a 38 °C, posteriormente el punto T_{gel} para WPI, cerca de 74 °C muy cercano a la temperatura de gelatinización del CH10. Durante el enfriamiento la gelificación de la κ C toma lugar alrededor de los 21 °C. El efecto de reforzamiento debido al hinchamiento de los gránulos de almidón es notable. El módulo de almacenamiento también se incrementa debido a la concentración de WPI. Este incremento es atribuido a la separación de fase segregativa como se observa en las imágenes de la Figura 65. La mezcla 1.0% WPI + 0.25% κ C no muestra separación de fase. La adición de 4.0% CH10 a esta mezcla es producida por un sistema de dos fases en la cuales los gránulos hinchados están insertados en una sola fase, que es a su vez, la fase continua. Las demás mezclas de tres componentes resultan en sistemas de tres fases, la separación de fase entre WPI y κ C probablemente ocurre antes de la gelatinización del almidón y la desnaturalización de WPI con la gelificación de κ C entre 21 y 35 °C dependiendo de la concentración en las mezclas.

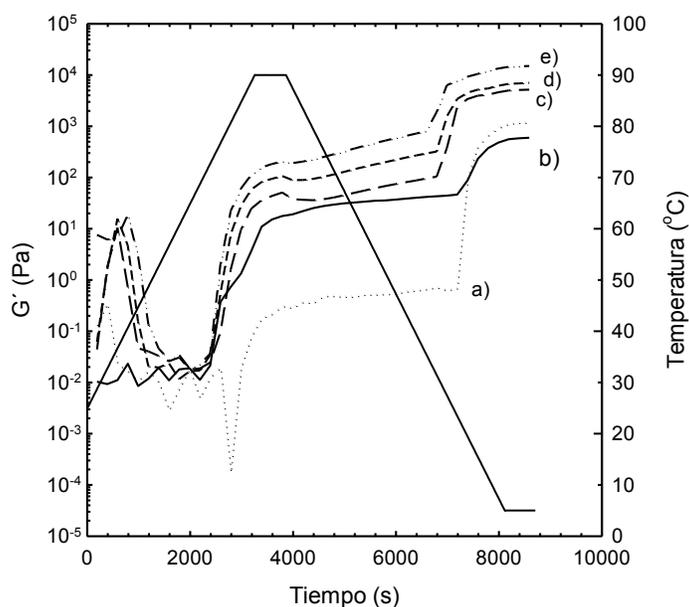


Figura 64. Variación de G' (Pa) durante el calentamiento (la línea continua muestra el perfil de temperatura) para: a) 1.0% WPI + 0.25% κ C; (b) 4.0% CH10 + 1.0% WPI + 0.25% κ C; (c) 4.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ C; (d) 4.0% CH10 + 3% WPI + 0.75% κ C; (e) 4.0% CH10 + 3.9% WPI + 1.0% κ C

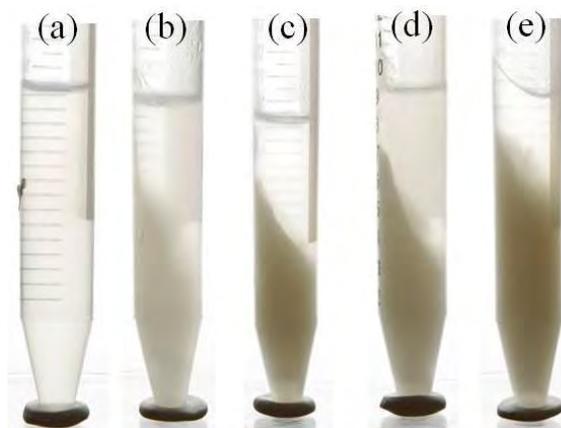


Figura 65. Mezclas después del tratamiento térmico y centrifugación: (a) 1.0% WPI + 0.25% κ C; (b) 4.0% CH10 + 1.0% WPI + 0.25% κ C; (c) 4.0% CH10 + 2.0% WPI + 0.75% κ C; (d) 4.0% CH10 + 3% WPI + 0.75% κ C; (e) 4.0% CH10 + 3.9% WPI + 1.0% κ C

8.8.3 Microscopia confocal de barrido láser

Las Figuras 66, 67, 68 y 69 muestran las imágenes individuales y colocalizadas de mezclas ternarias con 1.0% CH10 + 0.25% κ -carragenina + 2.0% WPI, 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 2.0% WPI, 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 3.5% WPI y finalmente 1.0% CH10 + 1.0% κ -carragenina + 3.5% WPI, respectivamente. Los gránulos hinchados de almidón están claramente rodeados por una fase continua, formada por WPI y κ -carragenina. En las Figuras 66 y 67, los agregados de WPI y κ -carragenina se aprecian claramente. Sin embargo, para 3.5% de WPI, en la Figura 68, la fase continua está esencialmente formada por una red de proteína con κ -carragenina, que probablemente la refuerza. Los agregados se aprecian en la imagen colocalizada, por lo que altas concentraciones de WPI producen mezclas en las cuales la interacción entre almidón y WPI, prevalece sobre la interacción entre almidón y κ -carragenina, tal como se observa también en la Figura 69. A bajas concentraciones de WPI, el mayor efecto se debe a la interacción sinérgica entre CH10- κ -carragenina (Tecante & Doublier, 1999). Estos autores han reportado que en presencia de 20 mM de KCl se forman geles, cuya rigidez depende de la concentración de almidón. La gelificación ocurre más rápido en dispersiones más concentradas de almidón, posiblemente debido a la concentración de la carragenina en la fase continua, la cual aumenta cuando la fracción volumen aumenta. Alloncle et al. (1989) propusieron que la concentración de κ -carragenina en la fase continua, se incrementaría con

el hinchamiento de los gránulos de almidón, como resultado en una reducción del volumen de la fase continua.

Por otro lado, tomando en cuenta la interacción entre WPI y κ -carragenina, Tolstoguzov (1986) ha resaltado la importancia del volumen excluido y de su efecto sobre la textura de los alimentos. La reducción en el volumen excluido se debe al incremento en la cantidad y la movilidad de las partículas que llenan espacios o agregados macromoleculares, formando una red de gel. También señala que la adición de pequeñas cantidades de un hidrocoloide, puede incrementar el módulo de almacenamiento de un gel debido a la exclusión mutua y a un incremento en la concentración de cada componente macromolecular en las mezclas. El tamaño de los agregados de WPI, está limitado por la presencia de los gránulos de almidón hinchados y su asociación entre las cadenas de κ -carragenina, promovida por el contenido total de iones sodio y potasio presentes en el WPI y la κ -carragenina, así como la adición de un ambiente iónico en la solución (100 mM NaCl). Mangione et al. (2005) han establecido que si la concentración de los iones sodio o potasio es suficiente (20 mM/100 mM), puede existir un comportamiento sinérgico entre los dos iones.

Para todas las mezclas de tres componentes, la proporción $[K^+]/[Na^+]$ fue menor de 0.33, lo cual sugiere que el mecanismo de gelificación está determinado por el ion sodio. Sólo para las mezclas con 3.5% WPI + 0.25% κ -carragenina y 3.9% WPI con 0.25% κ -carragenina, el mecanismo de gelificación podría ser dominado por el ion potasio, permitiendo la transición hebra→hélice→ doble hélice (ver Tabla E en el Anexo).

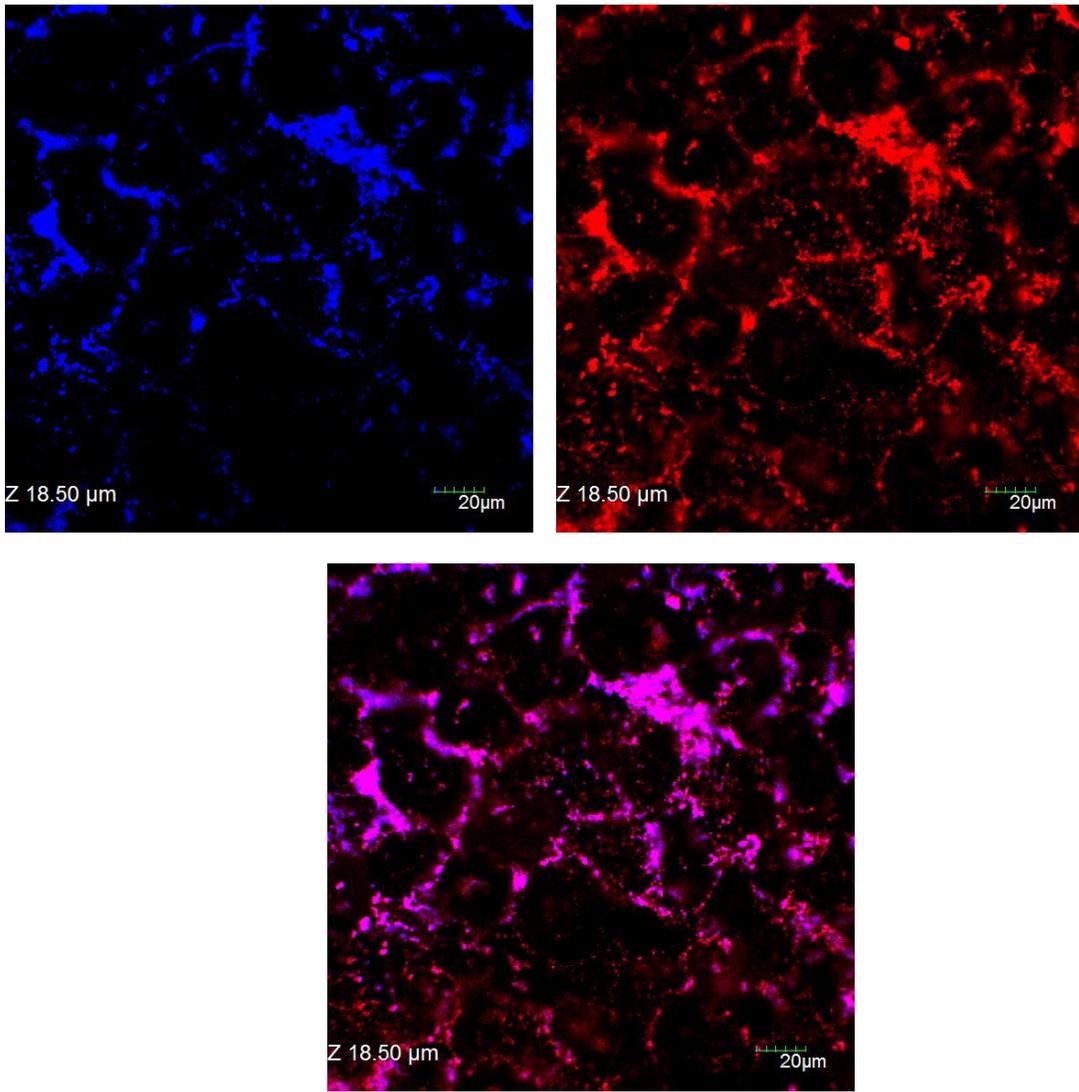


Figura 66. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.25% κ -carragenina + 2.0% WPI. Objetivo 60x.

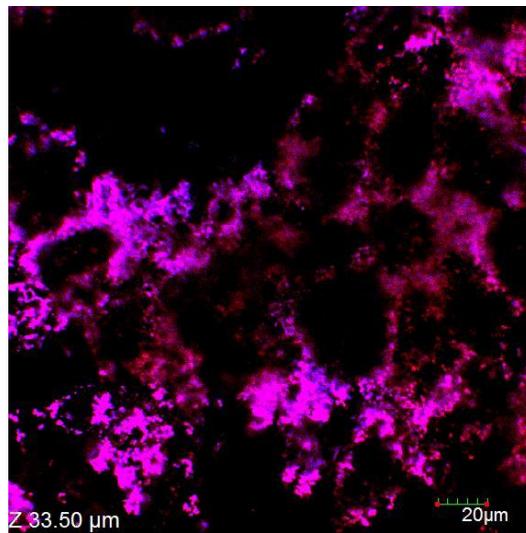
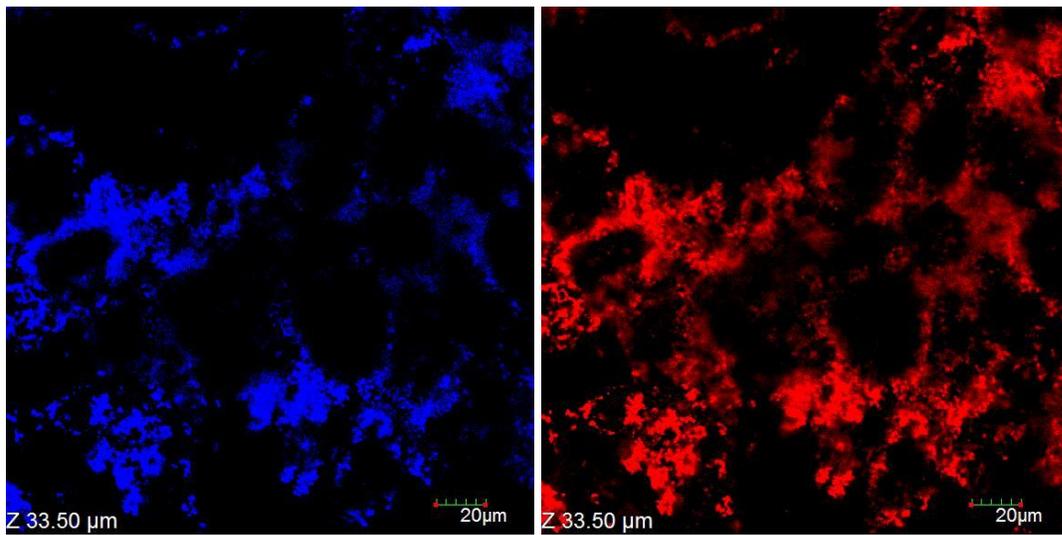


Figura 67. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 2.0% WPI. Objetivo 60x.

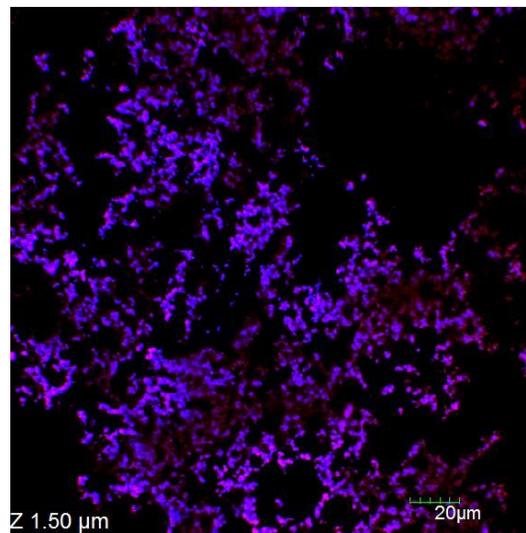
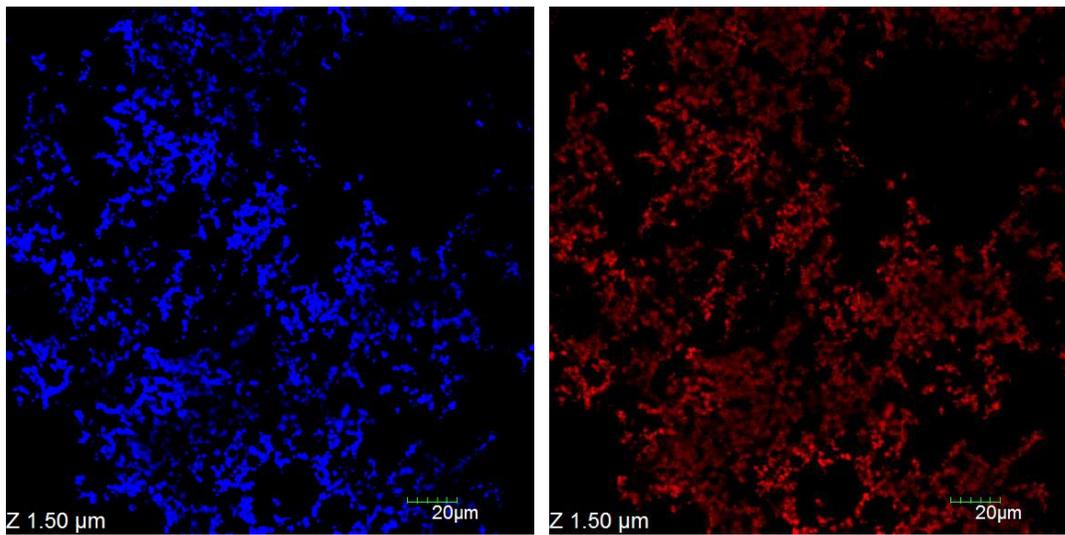


Figura 68. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 0.75% κ -carragenina + 3.5% WPI. Objetivo 60x.

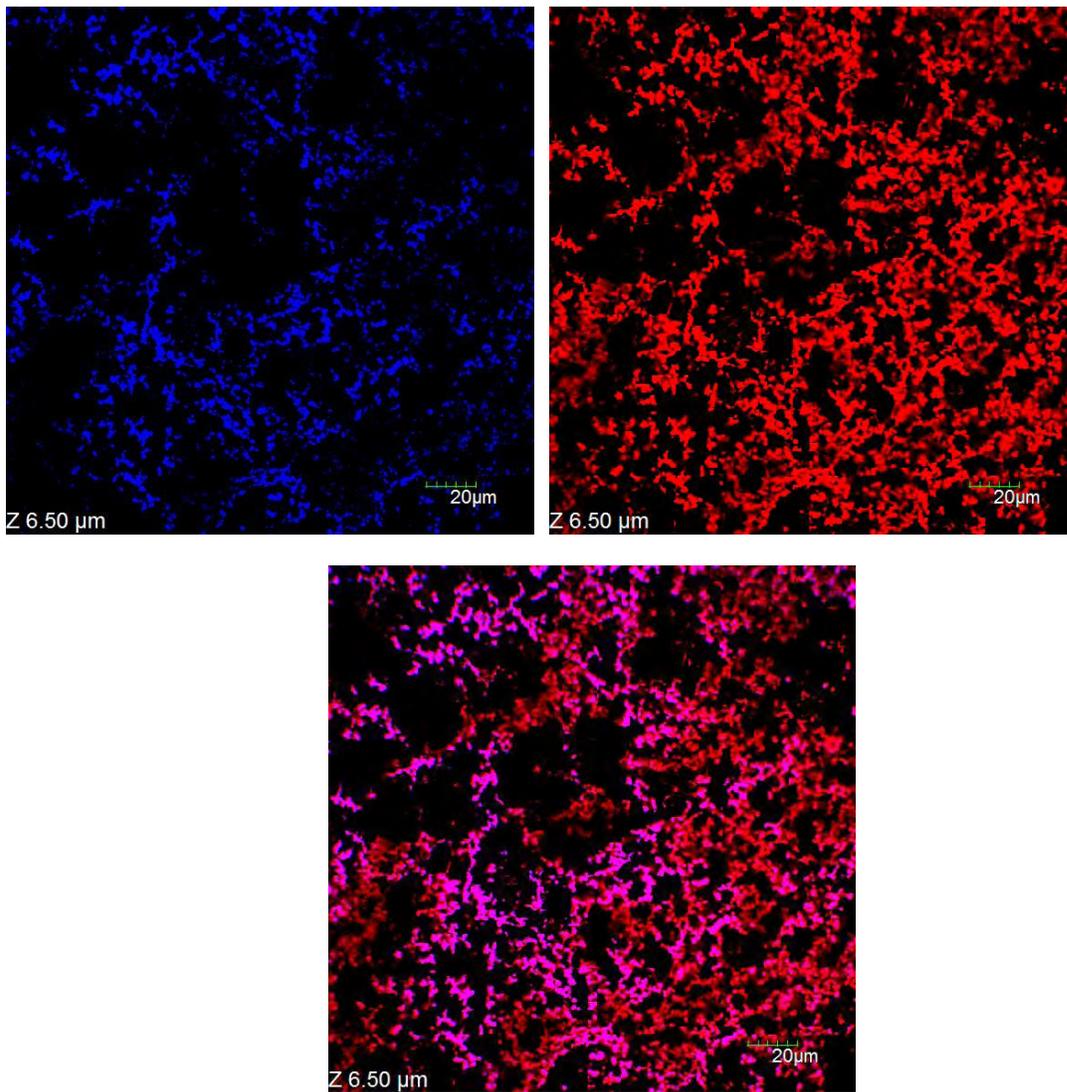


Figura 69. Imágenes individuales y colocalizadas de mezclas con 1.0% CH10 + 1% κ -carragenina + 3.5% WPI. Objetivo 60x.

8.8.4 Discusión

El hinchamiento de los gránulos de almidón puede estar afectado por la disponibilidad del agua en un sistema de dos fases. El estudio de sistemas de tres componentes es complejo, debido a la presencia simultánea de partículas agregadas de proteína, cadenas auto-asociadas de κ -carragenina y gránulos de almidón hinchados. Adicionalmente, la incompatibilidad termodinámica resultante de la combinación de constituyentes macromoleculares, juega un papel importante. Cada componente contribuye a la respuesta viscoelástica de las mezclas, pero su contribución depende de la concentración relativa de cada uno de ellos en la mezcla. Las interacciones entre los agregados de WPI y la κ -carragenina, el WPI y los gránulos hinchados de almidón, la κ -carragenina y los gránulos hinchados de almidón, pueden existir y contribuir a la respuesta viscoelástica. Los iones sodio son requeridos para disminuir las repulsiones electrostáticas de la proteína, así como para estabilizar la estructura de la κ -carragenina. La separación de fases entre el WPI y la κ C parece ocurrir antes de la gelatinización del almidón y la desnaturalización de la proteína.

Para poder entender las diferencias observadas en el comportamiento viscoelástico, se realizaron las observaciones de microscopia confocal de barrido láser, para caracterizar la fase continua y la fase dispersa del gel, por medio del marcaje de cada uno de los componentes. Fue posible visualizar las zonas ricas de polisacárido en la mezcla. Fue útil usar el ANSA, ya que este fluoresce en la zona de luz ultravioleta cuando se adsorbe en las zonas hidrofóbicas. Esto permite que las proteínas sean observadas sin el marcaje covalente. La κ -carragenina fue marcada de manera covalente con rodamina B, así, fue posible observar las mezclas de los tres componentes. Las Figuras 66 y 67 muestran que los gránulos de almidón conservan su integridad y que el medio continuo está formado por agregados de WPI y κ -carragenina.

9.3 Referencias bibliográficas

- Alloncle, M., Lefebvre, J., Llamas, G. & Doublier, J.L. (1989). A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. *Cereal Chemistry*, 66, 90-93.
- Acquarone, V.M. & Rao, M.A. (2003). Influence of sucrose on the rheology and granule size of cross-linked waxy maize starch dispersions. *Carbohydrate Polymers* 51, 451-458.
- Bagley, E.B. & Christianson, D.D. (1982). Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration. *Journal of Texture Studies* 13, 115-126.
- Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation and gelation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids* 13, 1-5.
- Chiotelli E., Pilosio G. & Le Meste M.,(2002) Effect of sodium chloride on the gelatinization of starch: a multimeasurement study. *Biopolymers* 63, 41-58.
- Choi, S. & Kerr, W. (2004). Effects of chemical modification of wheat starch on molecular mobility as studied by pulsed ^1H NMR. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36, 105-112.
- Croguennoc, P., Dirand, D., Nicolas, T. & Clark, A. (2001). Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides. 2. Heated mixtures of native β -lactoglobulin and κ -carrageenan. *Langmuir* 17, 4380-4385.
- de la Fuente, M. A., Hemar, Y. & Singh, H. (2004). Influence of κ -carrageenan on the aggregation behaviour of proteins in heated whey protein isolate solutions. *Food Chemistry*, 86, 1-9.
- Doublier, J.L. (1981). Rheological studies on starch flow behavior of wheat, maize, faba bean and smooth pea starches. *Journal of Cereal Science* 5, 247-262.
- Ferry, J.D. (1980). Viscoelastic properties of polymers 3a ed. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Fitzsimons, S., Mulvihill, D. & Morris, E; (2008). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry, *Food Hydrocolloids* 21, 638-644.
- Flett, K.L. & Corredig, M. (2009). Whey protein aggregate formation during heating in the presence of κ -carrageenan. *Food Chemistry*, 115, 1478-1485.
- Gaaloul, S., Turgeon, S. & Corredig, M. (2009). Influence of shearing on the physical characteristics and rheological behavior of an aqueous whey protein isolate-kappa-carrageenan mixture. *Food Hydrocolloids* 23, 1243-1252.
- Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids* 11, 145-15.
- Giboreau, A., Cuvelier, G. & Launay, B. (1994). Rheological behaviour of three biopolymers/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *Journal of Texture Studies* 25, 119-137.
- Kara, S., Tamerler, C., Bermek, H. & Pekcan, Ö. (2003). Cation effects on sol-gel and gel-sol phase transitions of κ -carrageenan-water system. *International Journal of Biological Macromolecules* 31, 177-185.
- Kaur, L., Singh, N. & Singh, J. (2004). Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. *Carbohydrate Polymer* 55, 211-223.

- Khuri, A. & Cornell, J. (1987). Response Surfaces Design and Analyses. Statistics: Textbooks and Monographs. 81. Marcel Dekker, New York.
- Li, J. & Yeh, A. (2001). Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food Engineering* 50 141-158.
- Lii, Ch., Tomasik, P., Hung, W.L. & Lai, V. (2002). Revised look at the interaction of starch with electrolyte: effect of salts of metals form the first non-transition group. *Food Hydrocolloids* 16, 35-45.
- Loisel, C., Tecante, A., Cantoni, P. & Doublier, J.L. (2000). Effect of temperature on the rheological properties of starch/carrageenan mixtures. In "Gums and Stabilizers for the Food Industry 10". P.A. Williams & G.O. Phillips. (eds.) Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 181-187.
- Mangione, M.R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V. & San Biagio, P.L. (2003). Thermoreversible gelation of k-carrageenan: relation between conformational transition and agregation. *Biophysical Chemistry* 104, 95-105.
- Mangione M., Giacomazza D., Bulone D., Martorana V., Cavallaro G. & San Biagio P.L. (2005). K⁺ and Na⁺ effects on gelation properties of κ-Carrageenan, *Biophysical Chemistry* 113,129-135.
- Milas, M. & Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate Polymers* 30, 177-184.
- Mleko, S., Li-Chan, E. & Pikus, S. (1997). Interaction of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. *Food Research International* 30, 427-434.
- Nayouf, M., Loisel, C. & Doublier, J.L. (2003). Effect of thermomechanical treatment on the rheological properties of crosslinked waxy corn starch. *Journal of Food Engineering* 59, 209-219.
- Ravindra P., Chan, E.S., Lee, B., & Upender, R.K. (2007). Whey proteins isolate-starch system-A critical review. *International Journal of Food Engineering* 3(6), Article 1. Available at: <http://www.bepress.com/ijfe/vol3/iss6/art1>
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counter-ions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers* 19, 1675-1687.
- Rochas, C & Rinaudo, M. (1982). Calorimetric determination of the conformational transition of kappa-carrageenan. *Carbohydrate Research* 105, 227-236.
- Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids* 15, 422-440.
- Savary, G., Handschin, S., Conde-Petit, B., Cayot, N. & Doublier, J.L. (2008). Structure of polysaccharide-starch composite gels by rheology and confocal laser scanning microscopy: Effect of composition and of the preparation procedure. *Food Hydrocolloids* 22, 520-530.
- Semenova, M., Plaschina I., Braudo E & Tolstoguzov V. (1988) Structure Formation in Sodium κ-Carrageenan Solutions, *Carbohydrate Polymers* 9, 133-145.
- Shim, J. & Mulvaney, S.J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and Starch / whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch / whey Protein mixed gels. *Journal of the Science of Food Agriculture* 81, 706-717
- Sosa-Herrera, M.G. (2002). Flujo estacionario y viscoelasticidad de sistemas formados por almidón de maíz ceroso modificado químicamente y gelana. Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Química. UNAM.

- Tecante, A. & Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch-k-carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers* 67, 551-557.
- Tester, R.F. & Karkalas, J. (1996). Swelling and gelatinization of oat starches. *Cereal Chemistry* 73, 271-277.
- Tromp, R.H., van de Velde, F., van Riel, J. & Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CLSM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International* 34, 931-938.
- Tolstoguzov, V. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. En: *Functional properties of food macromolecules*. Eds. J. R.Mitchell, & D. A. Ledward,. London: Elsevier Applied Science Publishers. 385-411.
- Turgeon, S. L. & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 15(4-6), 583-591.
- van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M.W., van der Linden, E. & Tromp, H. (2003). Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 159-168.
- Vu Dang, H., Loisel C., Desrumaux A. & Doublier, J. L. (2009). Rheology and microstructure of cross-linked waxy maize starch/whey protein suspensions. *Food Hydrocolloids* 23(7), 1678-1686.
- Ziegler, G.R., Thomason, D.B. & Cassanovas, J. (1993). Dynamic measurement of starch granule swelling during gelatinization. *Cereal Chemistry*, 30 247-251.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

9.1 Modelo de superficies de respuesta

El módulo de almacenamiento de las mezclas, se puede medir en función de las concentraciones de CH10 (X_1 , símbolo codificado), WPI (X_2) y κ -carragenina (X_3). Los niveles de CH10 son cinco (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0%), los niveles de WPI son siete (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 3.9%) y los niveles de κ -carragenina son cinco (0.0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0%). Los datos obtenidos se muestran en la Tabla F del Anexo. Estos datos fueron ajustados con el modelo bifactorial de segundo orden, dado que en este modelo, se pueden tomar en cuenta las interacciones entre los componentes (Khuri & Cornell, 1987)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2, > i}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (11)$$

Los resultados experimentales son interpretados en función de la determinación de la variación de Y dependiendo de diferentes X_i arreglados con modelos de superficie de respuesta de segundo orden como sigue:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (12)$$

En este modelo Y es la respuesta, G' módulo de almacenamiento promedio, ya que los experimentos se hicieron por duplicado. β_0 es un coeficiente constante, β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el coeficiente cuadrático, β_{ij} es el coeficiente de interacción y X_i y X_j son los valores codificados de las variables independientes. Las variables X_1 , X_2 y X_3 se codifican utilizando las transformaciones siguientes:

$$X_1 = ([\text{CH10}] - 2) / 2, \quad X_2 = ([\text{WPI}] - 2) / 3, \quad X_3 = ([\kappa\text{C}] - 0.5) / 0.5$$

Las variables codificadas son:

CH10 (%)	X ₁	WPI (%)	X ₂	κC (%)	X ₃
0.0	-1	0.0	-1	0.0	-1
1.0	-0.5	0.5	-0.66667	0.25	-0.5
2.0	0	1.0	-0.33333	0.50	0
3.0	0.5	2.0	0	0.75	0.5
4.0	1	3.0	0.33333	1.0	1
		3.5	0.66667		
		3.9	1		

La respuesta del modelo de superficies, puede ser ilustrada mediante gráficas tridimensionales por medio de la presentación de la respuesta, como función de los otros dos factores conservando uno constante. Se utilizó el “software” Statgraphics como paquete estadístico (Versión para Windows, Manugistics Inc., USA) para determinar el diseño experimental para analizar el modelo y generar las curvas de respuesta cuadrática en tres dimensiones, a partir de los datos experimentales, y su efecto sobre el módulo de almacenamiento. El análisis de varianza (ANOVA), se realizó con un nivel de confianza de 95%.

El modelo ajustado para la relación entre el módulo de almacenamiento y las diferentes concentraciones y su interacción, se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y = 932.2 + 224.0 \cdot X_1 + 628.4 \cdot X_2 + 2439.5 \cdot X_3 + 2.772 \cdot (X_1)^2 - 50.1 \cdot X_1 \cdot X_2 + 197.8 \cdot X_1 \cdot X_3 + 153.5 \cdot (X_2)^2 + 589.5 \cdot X_2 \cdot X_3 + 1680.1 \cdot (X_3)^2 \quad (13)$$

El valor F y su significancia estadística se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Significancia estadística de los coeficientes del modelo de respuesta.

	β_0	β_1	β_2	β_3	$\beta_1\beta_2$	$\beta_1\beta_3$	$\beta_2\beta_3$	β_1^2	β_2^2	β_3^2
β_i	932.2	224.0	628.4	2439.5	-50.1	197.8	589.5	2.772	153.5	1680.1
F		47.1*	325.6*	4472.1*	1.07	17.0*	136.2*	0.00	6.59*	867.5*

* $\alpha = 0.05$

De acuerdo con estos datos, se demuestra que la concentración de κ -carragenina tiene el mayor efecto sobre el aumento del módulo de almacenamiento. Este efecto está seguido por el término cuadrático de la concentración de κ C, al cual le sigue la concentración de WPI, posteriormente la interacción entre WPI y κ -carragenina y finalmente, la concentración de CH10, la interacción CH10- κ -carragenina y la concentración de proteína. La interacción CH10-WPI no es significativa, ni el término cuadrático de la concentración de almidón. Eliminando los términos que no tienen efectos significativos, se tiene la siguiente ecuación:

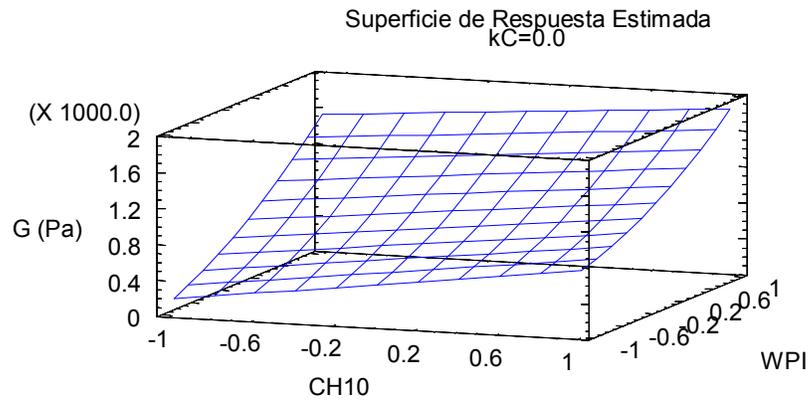
$$Y = 947.3 + 618.6 * X_2 + 2489 * X_3 - 12.1 * (X_1)^2 + 52.7 * X_1 * X_3 + 149.4 * (X_2)^2 + 596.4 * X_2 * X_3 + 1606.2 * (X_3)^2. \quad (14)$$

El modelo polinomial fue utilizado para obtener las gráficas de superficie de respuesta para todas las interacciones con la concentración de CH10, WPI y κ -carragenina. Los resultados del ANOVA para este modelo, indican un buen ajuste con $r^2 = 0.9479$. El valor de r^2 debe ser de al menos 0.88 para un buen ajuste del modelo (Ixtaina et al., 2010). El valor de r^2 implica que el 94.79% de las variaciones asociadas con el módulo de almacenamiento, son atribuidas a las variables independientes seleccionadas (concentración de CH10, WPI, κ -carragenina).

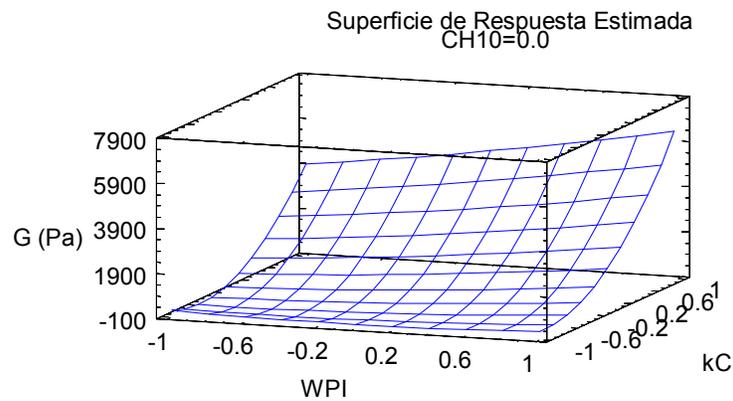
9.2 Análisis de la superficie de respuesta

Las superficies de respuesta tridimensionales para la concentración de CH10, WPI y κ -carragenina, fueron obtenidas por la variación de las otras variables dentro del intervalo experimental, manteniendo a las otras variables a partir del punto central. La superficie de respuesta se muestra en la Figura 70. Como se demuestra en la prueba estadística para los modelos de regresión discutidos arriba, la interacción entre la concentración de κ -carragenina y la concentración de WPI tiene el efecto más significativo que cualquier otro parámetro.

a)



b)



c)

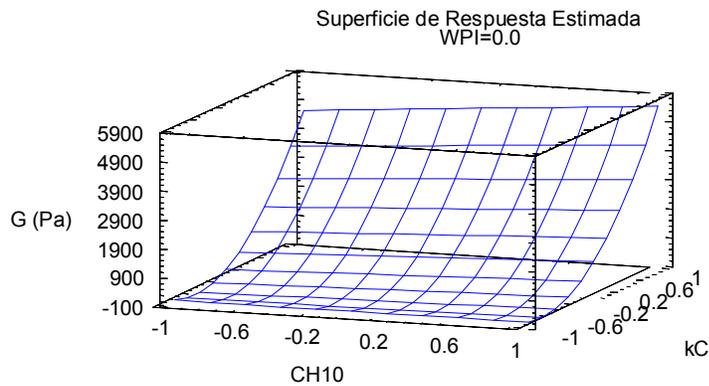


Figura 70. a) Efecto de la concentración de CH10 y WPI para 0.0% κ -carragenina en el módulo de almacenamiento (G'). b) Efecto de la concentración WPI y κ -carragenina a 0.0% CH10 en G' . c) Efecto de la concentración de CH10 y κ -carragenina en G' .

La Figura 70a demuestra el efecto de la concentración de CH10 y WPI para una concentración constante de κ -carragenina (0.0%). El módulo de almacenamiento se incrementa con la concentración de CH10 y dicho aumento tiene un efecto directamente proporcional con la concentración de WPI. Sin embargo, los valores de los módulos de almacenamiento son muy pequeños y como se observó en el análisis estadístico, no son significativos ($p > 0.05$); este resultado es consistente con la interacción poco significativa entre el CH10 y el WPI. La elevación en el módulo de almacenamiento, se debe a que los gránulos de almidón refuerzan a los agregados de proteína, dependiendo de la concentración de esta última, como se había explicado anteriormente. Para altas concentraciones de WPI, el módulo se incrementa debido a que la red de proteína es reforzada por los gránulos hinchados de almidón insertados en dicha red.

La Figura 70b muestra el efecto de la concentración de WPI y de la concentración de κ -carragenina para una concentración fija de CH10 (0.0%). El módulo de almacenamiento se incrementa al adicionar mayor cantidad de WPI y de κ -carragenina de manera lineal, lo cual se demuestra en el análisis estadístico y cuyos valores son los más altos.

La Figura 70c muestra el efecto de la concentración de CH10 y κ -carragenina para una concentración constante de WPI (0.0%). El módulo de almacenamiento se eleva con la concentración de CH10 y para altas concentraciones de κ -carragenina. Sin embargo, los valores de los módulos no son tan altos como para el WPI y la κ -carragenina, posiblemente por que los grupos hidrofóbicos del WPI a este pH, no están tan expuestos para interactuar con los grupos sulfato de la κ -carragenina, como ya se había explicado anteriormente.

Referencias Bibliográficas

- Ixtaina, V., Vega, A., Nolasco S., Tomás, M., Gimeno, M., Bárcana, E. & Tecante, A., (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids* 22, 192-199
- Khuri, A. & Cornell, J. (1987). Response Surfaces Design and Analyses. Statistics: Textbooks and Monographs. 81. Marcel Dekker, New York.

10. CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ El almidón cocido (CH10) está formado por gránulos hinchados, rodeados por una fase acuosa de baja viscosidad. El comportamiento reológico está controlado por los gránulos en suspensión y por su fracción volumen.
- ❖ El aislado de proteínas de suero lácteo, dependiendo de su concentración, se obtienen soluciones o geles.
- ❖ El comportamiento viscoelástico de la κ -carragenina, muestra la presencia de geles con diferente rigidez, aun para una concentración de 0.25%. En los geles, G' es mayor que G'' , sin embargo, existe una ligera dependencia de ambos módulos con la frecuencia. En presencia de iones de sodio externos, la κ -carragenina forma geles cuya rigidez depende de la concentración del polisacárido.
- ❖ En las mezclas CH10-WPI, los gránulos de almidón se encuentran embebidos en el WPI, formando un sistema de dos fases. Las mezclas muestran un efecto sinérgico, es decir, los módulos dinámicos de las mezclas son mayores que los de los componentes individuales.
- ❖ Se concluye que para concentraciones de WPI de 0.5 a 2.0%, los gránulos de almidón están suspendidos en soluciones de WPI, cuyos módulos de almacenamiento son mayores que en agua. Para concentraciones de WPI mayores que 2.0%, los gránulos hinchados refuerzan los geles de proteína actuando como relleno. No obstante, este efecto no es muy notable cuando la concentración del CH10 va de 2.0 a 4.0%.
- ❖ El análisis térmico refleja un solo pico en 68.43 °C, lo cual indica que la temperaturas de gelatinización del almidón y de desnaturalización de la proteína son muy cercanas.
- ❖ Para las mezclas WPI- κ -carragenina, la adición de κ -carragenina acelera la formación de agregados de WPI. A bajas concentraciones de proteína y polisacárido no hay separación de fases, sin embargo a altas concentraciones de proteína la separación de fases favorece el aumento en los módulos de almacenamiento y pérdida..

- ❖ El análisis térmico se observan tres picos, el primero que corresponde a la hidratación de la κ -carragenina en 32 °C, posteriormente la desnaturalización de la proteína en 70.3 °C y finalmente la gelificación de la κ -carragenina en 23.2 °C, lo cual favorece la separación de fases.
- ❖ Para la mezcla CH10- κ -carragenina, los gránulos de almidón refuerzan los geles de κ -carragenina aumentando su rigidez. Sin embargo, la adición de 0.5 a 1.0% de κ -carragenina para concentraciones de CH10 mayores de 2.0%, no produce incrementos significativos en el módulo de almacenamiento por sobre aquel de los geles individuales de este hidrocoloide.
- ❖ El análisis térmico refleja la existencia de tres picos. El primero indica la hidratación de la κ -carragenina en 32 °C, posteriormente la gelatinización del almidón en 69 °C y en el enfriamiento se observa la gelificación de la κ -carragenina en 22 °C.
- ❖ En las mezclas con los tres componentes, se forman sistemas de dos y tres componentes, con un amplio intervalo de comportamientos viscoelásticos. Los gránulos de almidón hinchados están insertados en una fase continua, formada por el WPI y la κ -carragenina, formando un sistema de dos fases. Para bajas concentraciones de CH10 y WPI, este último y la κ -carragenina permiten la formación de geles más fuertes ($\tan \delta < 1$), con módulos de almacenamiento mayores que aquellos que se obtienen con la mezcla CH10-WPI. Para mayores concentraciones de CH10 y WPI, la κ -carragenina muestra un comportamiento más débil, con módulos dinámicos más bajos. Los gránulos de CH10 actúan como relleno, reforzando las propiedades viscoelásticas de la fase circundante. Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada.
- ❖ La proporción de $[K^+]/[Na^+]$ confirma que para la mayoría de las mezclas que contienen WPI y κ -carragenina, el mecanismo de gelificación está determinado por los iones sodio. La interacción entre las proteínas del suero y la κ -carragenina determinada por la microestructura de las mezclas observadas, da como resultado su comportamiento mecánico.

PERSPECTIVAS

Debido a que la microcalorimetría de barrido diferencial, empleada en este trabajo, sólo se utilizó con el fin de saber si a la temperatura de trabajo provocaba el hinchamiento de los gránulos de almidón, la desnaturalización de la proteína y la transición fusión-gelificación de la κ -carragenina, no se realizó un estudio más profundo sobre el efecto de la concentración de estos componentes sobre los intervalos de temperatura y de energía necesarios para llevar a cabo las transiciones. En consecuencia, sería de gran interés estudiar estos sistemas, para complementar los resultados que se obtienen de los estudios reológicos y de microscopía.

El estudio de sistemas de tres componentes se vuelve muy complejo, ya que si no se sigue una estrategia adecuada, se puede caer en afirmaciones falsas. Sin embargo, uno de los elementos que está presente y que impacta en el comportamiento de estas macromoléculas, es el ambiente iónico. Este trabajo puede servir de base para entender el comportamiento de sistemas de tres componentes, pero variando la cantidad de sal para poder observar diferentes asociaciones y por lo tanto, diferentes respuestas viscoelásticas.

La técnica de microscopía confocal, es muy útil para observar la microestructura, sin embargo, es importante conocer toda la gama de experimentos que se pueden realizar con ésta técnica. Uno de ellos es mediante la técnica de deconvolución espectral, la cual permite separar la fluorescencia de las señales en una mezcla, a pesar de que la excitación de los diversos fluorocromos observados sea muy cercana. Cuando se trabajó con las mezclas de tres componentes, se tuvo que eliminar el FITC del almidón, ya que su señal se traslapaba con la de la κ -carragenina. Por ello, tal vez sería conveniente repetir los experimentos con esta técnica, para finalmente resolver la interrogante de si la κ -carragenina se adsorbe o no sobre la superficie de los gránulos de almidón.

Finalmente, sería de gran interés utilizar otro tipo de marcador debido a que el FITC y el RITC, se “fotoblanquean” muy rápido con la emisión de luz. Se podría buscar una alternativa, incluso para ver si alguno de ellos se introduce en los gránulos de almidón y poder realizar la proyección tridimensional del interior de los mismos.

11. ANEXOS

En el Cuadro A se muestran los valores de a y b en $G' \propto \omega^a$ y $G'' \propto \omega^b$ de los espectros mecánicos. Se indican dos valores debido a que los espectros tienen un punto de inflexión. Cada número, i.e. b_1 , b_2 , indica el intervalo de frecuencias para el cual su valor fue calculado. Este intervalo se muestra en el Cuadro B.

Cuadro A. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas CH10 y WPI.

	CH10 (%)			
WPI (%)	1.0	2.0	3.0	4.0
0.5	$a = 0.15$ ($r = 0.85$) $b_1 = 0.004$ ($r = 0.039$) $b_2 = 0.35$ ($r = 0.99$)	$a = 0.095$ ($r = 0.99$) $b_1 = 0.16$ ($r = 0.99$)	$a = 0.08$ ($r = 0.98$) $b_1 = 0.17$ ($r = 0.97$)	$a = 0.068$ ($r = 0.99$) $b_1 = 0.052$ ($r = 0.98$) $b_2 = 0.22$ ($r = 0.98$)
1.0	$a_1 = 0.11$ ($r = 0.97$) $a_2 = 0.18$ ($r = 0.94$) $b_1 = 0.09$ ($r = 0.86$) $b_2 = 0.53$ ($r = 0.99$)	$a = 0.085$ ($r = 0.98$) $b = 0.21$ ($r = 0.99$)	$a = 0.069$ ($r = 0.97$) $b = 0.31$ ($r = 0.99$)	$a = 0.071$ ($r = 0.98$) $b = 0.068$ ($r = 0.90$)
2.0	$a = 0.086$ ($r = 0.97$) $b_1 = 0.023$ ($r = 0.25$) $b_2 = 0.57$ ($r = 0.99$)	$a = 0.097$ ($r = 0.98$) $b_1 = 0.15$ ($r = 0.93$)	$a = 0.065$ ($r = 0.98$) $b_1 = -0.16$ ($r = -0.96$) $b_2 = 0.20$ ($r = 0.96$)	$a = 0.049$ ($r = 0.98$) $b_1 = -0.010$ ($r = -0.42$) $b_2 = 0.24$ ($r = 0.98$)
3.0	$a = 0.086$ ($r = 0.97$) $b_1 = 0.023$ ($r = 0.25$) $b_2 = 0.57$ ($r = 0.99$)	$a = 0.080$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.006$ ($r = -0.18$) $b_2 = 0.23$ ($r = 0.99$)	$a = 0.063$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.18$ ($r = -0.96$) $b_2 = 0.16$ ($r = 0.95$)	$a = 0.062$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.05$ ($r = -0.89$) $b_2 = 0.17$ ($r = 0.98$)
3.5	$a = 0.090$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.04$ ($r = 0.84$) $b_2 = 0.17$ ($r = -0.96$)	$a = 0.074$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.092$ ($r = -0.88$) $b_2 = 0.14$ ($r = 0.97$)	$a = 0.063$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.13$ ($r = -0.96$) $b_2 = 0.15$ ($r = 0.97$)	$a = 0.067$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.05$ ($r = -0.87$) $b_2 = 0.15$ ($r = 0.98$)
3.9	$a = 0.086$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.098$ ($r = -0.81$) $b_2 = 0.27$ ($r = 0.96$)	$a = 0.07$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.029$ ($r = -0.62$) $b_2 = 0.21$ ($r = 0.98$)	$a = 0.067$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.15$ ($r = -0.93$) $b_2 = 0.14$ ($r = 0.97$)	$a = 0.072$ ($r = 0.99$) $b_1 = -0.095$ ($r = -0.91$) $b_2 = 0.14$ ($r = 0.98$)

Cuadro B. Intervalo de frecuencias (rad/s) usado para determinar a y b mostrados en el Cuadro A.

	CH10 (%)			
WPI (%)	1.0	2.0	3.0	4.0
0.5	a = 0.1 a 25 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 100
1.0	a1 = 0.1 a 1.0 a2 = 1.25 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 79	a = 0.1 a 100 b = 3.16 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 20.0
2.0	a = 0.1 a 31.62 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b = 0.1 a 79	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 2.51 b2 = 3.16 a 100
3.0	a = 0.1 a 31.6 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 2.51 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 3.98 b2 = 5 a 79	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100
3.5	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 2.51 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100
3.9	a = 0.1 a 63 b1 = 0.1 a 3.98 b2 = 5 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 3.16 b2 = 3.98 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100	a = 0.1 a 100 b1 = 0.1 a 1.0 b2 = 1.25 a 100

Cuadro C. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas WPI y κC. El intervalo de frecuencias fue 0.1 a 100 rad/s.

WPI (%)	κC (%)			
	0.25	0.50	0.75	1.0
0.5	a=0.03 (r=0.99) b=-0.49 (r=-0.99)	a=0.045(r=0.99) b=-0.22(r=-0.94)	a=0.04(r=0.99) b=-0.16(r=-0.90)	a=0.03 (r= 0.99) b=-0.49(r= -0.94)
1.0	a=0.04 (r= 0.99) b=-0.44 (r=-0.94)	a=0.034 (r=0.98) b=-0.44(r=-0.95)	a=0.043(r=0.96) b=-0.49(r=-0.97)	a=0.04(r=0.99) b=-0.44 (r=-0.94)
2.0	a=0.035(r=0.99) b=-0.43(r=-0.94)	a=0.032 (r=0.99) b=-0.35(r= -0.95)	a=0.040 (r= 0.99) b=-0.40(r= -0.95)	a=0.035(r= 0.99) b=-0.043(r=-0.94)
3.0	a=0.039 (r=0.99) b=-0.28 (r= 0.93)	a=0.039(r=0.99) b=-0.24(r=-0.97)	a=0.036 (r= 0.99) b=-0.31(r= -0.94)	a=0.039(r= 0.99) b=-0.28(r= -0.95)
3.5	a=0.036 (r=0.99) b=-0.34(r= -0.93)	a=0.045 (r=0.99) b=-0.19 (r=-0.95)	a=0.039 (r= 0.99) b=-0.29 (r= -0.94)	a=0.036 (r= 0.99) b=-0.34 (r= -0.93)
3.9	a=0.034 (r=0.99) b=-0.28 (r=-0.93)	a=0.044 (r=0.99) b=-0.13 (r=-0.96)	a=0.038 (r= 0.99) b=-0.19 (r= -0.97)	a=0.039 (r= 0.99) b=-0.28 (r= -0.93)

Cuadro D. Valores de a y b del barrido de frecuencia para las mezclas CH10 y κC. El intervalo de frecuencias fue 0.1 a 100 rad/s.

CH10 (%)	κC (%)			
	0.25	0.50	0.75	1.0
1.0	a=0.18 (r=0.96) b*=0.027(r= 0.99)	a=0.042 (r=0.97) b*=-0.35 (r= -0.92)	a=0.037 (r=0.98) b*=-0.38 (r= -0.93)	a=0.04 (r= 0.99) b*=-0.37 (r= -0.95)
2.0	a=0.16 (r=0.96) a=0.27 (r=0.98)	a=0.049 (r=0.97) b=0.18 (r= 0.93)	a=0.038 (r=0.99) b*=-0.20 (r=-0.91)	a=0.034 (r=0.99) b*=-0.39 (r=-0.95)
3.0	a=0.13 (r=0.97) b=0.24 (r= 0.99)	a=0.051 (r=0.97) b=0.22 (r= 0.98)	a=0.039 (r= 0.98) b=-0.17 (r= -0.94)	a=0.035 (r= 0.99) b=-0.26 (r= -0.95)
4.0	a=0.11(r=0.97) b=0.23(r= 0.99)	a=0.037 (r=0.96) b=0.12 (r=0.84)	a=0.03 (r= 0.99) b=0.11 (r= 0.91)	a=0.037 (r= 0.99) b=0.079 (r= 0.82)

* El intervalo de frecuencias fue de 0.1 a 1.0 rad/s.

Cuadro E. Relación de iones [K⁺]/[Na⁺] para cada una de las mezclas κC-WPI.

WPI %	Kc %	[K ⁺] g	[Na ⁺] g	K ⁺ /Na ⁺
0.5	0.25	0.0412	0.5790	0.0711
0.5	0.5	0.0582	1.1577	0.0502
0.5	0.75	0.0751	1.7363	0.0433
0.5	1	0.0921	2.3150	0.0398
1	0.25	0.0654	1.1577	0.0565
1	0.5	0.0824	1.1581	0.0711
1	0.75	0.0993	1.7367	0.0572
1	1	0.1163	2.3154	0.0502
2	0.25	0.1138	0.5802	0.1961
2	0.5	0.1308	1.1589	0.1128
2	0.75	0.1477	1.7375	0.0850
2	1	0.1647	2.3162	0.0711
3	0.25	0.1622	0.5810	0.2792
3	0.5	0.1792	1.1597	0.1545
3	0.75	0.2203	1.7387	0.1267
3	1	0.2131	2.3170	0.0920
3.5	0.25	0.1864	0.5814	0.3206
3.5	0.5	0.2034	1.1601	0.1753
3.5	0.75	0.2203	1.7387	0.1267
3.5	1	0.2373	2.3174	0.1024
3.9	0.25	0.2057	0.5817	0.3537
3.9	0.5	0.2227	1.1604	0.1919
3.9	0.75	0.2397	1.7390	0.1378
3.9	1	0.2567	2.3177	0.1108

Para cantidades donde la relación [K⁺]/[Na⁺] es menor a 0.33 significa que el mecanismo de gelificación está determinado por el sodio (hebra-hélice) y solamente en una combinación donde está presente el WPI en 3.9 con 0.25% κc se tiene que el mecanismo está determinado por el potasio (hebra - doble hélice). Otra combinación cercana a este mecanismo es 3.5% WPI con 0.25% κc.

INTRODUCCIÓN A LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está afectada por varios factores cuantitativos. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione los valores razonables de la variable de respuesta. Cuando se dice que el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada es modificada por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k , esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, \dots, X_k (que se supone continua en $X_i, \forall i = 1, \dots, k$) que proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (1)$$

de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon \quad (2)$$

donde ε es el error observado en la respuesta. La relación $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie a la que se denomina superficie de respuesta. Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional consiste en representar la gráfica de contornos de la superficie, en la que se trazan líneas denominadas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano $X_1 X_2$ (plano cuyo ejes coordenados vienen dados por los niveles X_1 y X_2 de los factores).

Geoméricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano $X_1 X_2$ de una sección de la superficie de respuesta al intersectar con un plano paralelo al $X_1 X_2$. La gráfica de contorno resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta. La existencia de gráficas de contorno no está limitada a tres dimensiones a pesar de que en el caso en que haya más de tres factores de influencia no es posible la representación geométrica. No obstante, el hecho de poder representar gráficas de contorno para problemas en que haya dos o tres factores permite visualizar más fácilmente la situación general.

Superficies de respuesta polinómicas. Modelos de primero y segundo orden

La forma de la función f que determina la relación entre los factores y la variable de respuesta es en general desconocida. Por ello el primer objetivo de la RSM consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función f . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores (X_1, X_2, \dots, X_k) y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que hay que realizar las observaciones experimentales que se utilizarán para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto (por ejemplo, a través del método de mínimos cuadrados) y una estimación de la variación del error experimental (para lo cual es necesario tener al menos dos observaciones por cada tratamiento). Entonces, se contrastan las estimaciones de los parámetros y el ajuste del modelo. Si el modelo se considera adecuado, entonces puede utilizarse como función de aproximación. En tal caso, el estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, pues su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real.

Los polinomios usados con mayor frecuencia como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos, los cuales proporcionan, respectivamente, los siguientes modelos:

$$\text{Primer orden} \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad (3)$$

$$\text{Segundo orden} \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad (4)$$

Utilización de variables codificadas

En la construcción de modelos de superficies de respuesta es muy común la codificación de los valores reales de los niveles de los factores, pues las distancias medidas sobre los ejes de las variables codificadas en el espacio k -dimensional se convierten en estándar, lo que facilita considerablemente los cálculos que deben llevarse a cabo para obtener el modelo de aproximación e incrementa el ajuste en la estimación de los coeficientes. Una fórmula que suele resultar útil para codificar los valores de los factores es la siguiente:

$$X_i = \frac{X_i - \left(\frac{X_{i\text{Inf}} + X_{i\text{Sup}}}{2} \right)}{X_{i\text{Sup}} - X_{i\text{Inf}}} = \frac{X_i - (\tilde{X}_i)}{X_{i\text{Sup}} - X_{i\text{Inf}}} \quad i = 1, 2, \dots, k \quad (5)$$

donde X_{iNInf} es el valor del nivel más bajo del factor i , X_{iNSup} es el valor del nivel más alto del factor i y

$$\tilde{X}_i = \frac{X_{iNInf} + X_{iNSup}}{2} \quad (6)$$

es la media entre los valores más alto y más bajo del nivel $i = 1, \dots, n$. La fórmula anterior verifica que $\sum_{i=1}^k x_i = 0$ y transforma las medias

$$\tilde{X}_1, \dots, \tilde{X}_k$$

en el punto $(x_1, \dots, x_k) = (0, \dots, 0)$ al que se denomina centro del diseño. Las fórmulas empleadas para la codificación dan lugar a transformaciones biyectivas entre variables reales y codificadas. Por lo tanto, a partir de ahora se trabaja con variables codificadas pues las conclusiones obtenidas sobre ellas pueden extrapolarse a las variables reales.

Modelos de primer orden

Cuando no se tiene suficiente información acerca de la forma que presenta la superficie de respuesta, el primer intento de ajuste se hace, generalmente, aproximando a través de un modelo de primer orden. La forma general de un modelo de primer orden con k factores, X_1, X_2, \dots, X_k es:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad (7)$$

donde Y es la variable de respuesta, β_0 y β_i son coeficientes desconocidos y ε es el error aleatorio. El equivalente de la ecuación (7) en forma matricial es

$$Y = \mathbf{X} \beta + \varepsilon \quad (8)$$

donde la matriz \mathbf{X} puede escribirse alternativamente como $\mathbf{X} = [1:D]$, en la cual D es la matriz de combinaciones de niveles de los factores, denominada matriz de diseño. Si la

matriz X es de rango completo, entonces el estimador de β obtenido por el método de mínimos cuadrados es

$$b = (X'X)^{-1} X'Y \quad (9)$$

que es, de hecho, el mejor estimador lineal no sesgado de β y la matriz de varianzas-covarianzas de b viene dada por

$$\text{Var}(b) = (X'X)^{-1} \sigma^2 \quad (10)$$

El modelo de primer orden ajustado es, entonces:

$$\hat{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i \quad (11)$$

Si el modelo está bien ajustado, la parte no aleatoria del modelo representa la respuesta real esperada y ε es el error experimental. Sin embargo, si el modelo no está ajustado a la función respuesta real, lo que ocurre cuando la relación entre la respuesta y los factores está demasiado simplificada, ε contiene, además del error experimental, una parte de error no aleatorio que se debe a la falta de ajuste.

Modelos de segundo orden

Cuando no existe curvatura en la superficie de respuesta, el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada y es necesario utilizar un modelo que se ajuste mejor. Se emplea entonces el modelo de segundo orden. La forma general de un modelo de segundo orden con k factores, X_1, X_2, \dots, X_k es:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2, > i}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (11)$$

donde Y es la variable de respuesta, $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ son coeficientes desconocidos y ε es el error aleatorio. De manera análoga a los modelos de primer orden se obtiene que el modelo ajustado de segundo orden es:

$$\hat{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2, > i}^k b_{ij} X_i X_j \quad (12)$$

Naturaleza secuencial de la RSM

La RSM es una técnica secuencial. A menudo, la estimación inicial de las condiciones óptimas de operación está alejada del óptimo real, así que el objetivo es, usando un método lo más simple y menos costoso posible, moverse rápidamente hacia las cercanías del óptimo. En general, se sabe muy poco o nada acerca de la relación existente entre la variable respuesta y los factores, así que, en un principio, se propone el modelo de aproximación más simple posible, el de primer orden, que suministra la base para ejecutar un conjunto inicial de experimentos que proporcionan datos correspondientes a los puntos de diseño de primer orden. Si los datos recogidos permiten hacer una estimación de la varianza del error, se puede llevar a cabo un contraste para evaluar el ajuste del modelo. La segunda etapa consiste en localizar áreas de región experimental en las que se sospeche que pueden estar los valores más deseables de la variable de respuesta. La estrategia a seguir es conocer los valores máximos de la respuesta, con el método de máxima pendiente en ascenso o en descenso si lo que se desea es minimizar los valores de la respuesta.

Método de máxima pendiente en ascenso

El método de máxima pendiente en ascenso consiste en ejecutar una secuencia de experimentos a lo largo de la línea de máximo incremento de la respuesta. Si el modelo ajustado de primer orden es adecuado, la información que este proporciona se utiliza para determinar una dirección en la cual se espere observar mayores valores de la variable de respuesta. A medida que se avanza sobre la superficie ajustada en la dirección en que se incrementan los valores de la respuesta y se va llegando a una región en la que haya curvatura en la superficie real, el incremento en la respuesta se estabilizará en el punto más alto de la superficie ajustada. Si se continúa en esta dirección y la altura de la superficie disminuye, se lleva a cabo un conjunto de experimentos y se ajusta de nuevo el modelo de primer orden. Se determina una nueva dirección hacia valores crecientes de la respuesta y se ejecuta otra secuencia de experimentos en la dirección determinada. Este proceso continúa hasta que se hace evidente que a partir del modelo no se puede obtener un incremento en la respuesta o este es muy pequeño.

Si las pruebas de ajuste detectan que puede haber curvatura en la superficie, se aumenta un grado al modelo añadiéndole los términos del producto cruzado o los términos cuadráticos puros y se completa el diseño de primer orden añadiéndole los puntos necesarios para ajustar el nuevo modelo de segundo orden. Si el modelo de segundo orden para localizar, en el lugar en el que la pendiente de la superficie ajustada es cero, las coordenadas del punto estacionario, que es el punto que proporciona el valor óptimo de la variable de respuesta y , si se detecta que este se encuentra dentro de los límites de la región experimental, se pasa a determinar su naturaleza, i.e. si es máximo, mínimo o punto de silla. Si, por el contrario, el punto estacionario no se halla dentro de la región experimental, se realiza una nueva experimentación en la dirección en la que este se encuentra. Una vez que se ha localizado el punto que proporciona valores óptimos de la variable respuesta, se describe la superficie en un entorno próximo a este.

Diseños de superficies de respuesta

La elección de un diseño adecuado del experimento a realizar es fundamental para modelar y explorar la superficie de respuesta usada para ajustar el modelo polinómico al conjunto de datos recogidos en los puntos de diseño. Así, sería deseable que el diseño tuviera, de las características que se enumeran a continuación, y dado que algunas de ellas resultan conflictivas entre sí, las que más sirvan al interés del experimento:

1. Generar una distribución razonable de puntos y , por tanto, de información, en toda la región de interés, pero utilizando el menor número posible de puntos experimentales.
2. Asegurar que, para cada punto x , el valor ajustado, $\hat{Y}(x)$, está tan cerca como sea posible del valor real, $Y(x)$.
3. Permitir la detección de falta de ajuste en el modelo.
4. Permitir la ejecución de los experimentos en bloques.
5. Permitir la construcción secuencial de diseños en orden creciente.
6. Proporcionar una estimación interna de la varianza del error.
7. Asegurar simplicidad en los cálculos de las estimaciones de los parámetros del modelo.

Además de las propiedades mencionadas será muy conveniente que el diseño elegido sea ortogonal o invariante por rotación. Un diseño ortogonal es aquel en el que los términos del modelo ajustado están relacionados y , por tanto, también las estimaciones de los parámetros lo son, en cuyo caso, la varianza de la respuesta esperada en cualquier punto de la región

experimental se puede expresar como la suma ponderada de las varianzas de los parámetros estimados del modelo.

Por otro lado, en un diseño invariante por rotación, la varianza $\hat{Y}(x)$, que depende de la situación del punto x , es función únicamente de la distancia del punto al centro de diseño, lo que significa que es la misma en todos los puntos equidistantes del centro de diseño. Teniendo en cuenta que el objetivo de la RSM es la optimización de la respuesta y que se desconoce la localización del óptimo antes de ejecutar el experimento, esta propiedad resulta muy interesante, puesto que garantiza que el diseño proporciona estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones. Dado que la naturaleza de los datos y de las combinaciones experimentales se ajustan mejor a un modelo de segundo orden, se describen a continuación los criterios para diseños de segundo orden.

Diseños de segundo orden

Los diseños de segundo orden tener, al menos, $(k + 1)(k + 2)/2$ puntos, que es precisamente el número de coeficientes del modelo que se necesita estimar y deben involucrar, como mínimo tres factores, dado que el modelo contiene términos cuadráticos puros. Por otro lado, sería conveniente, por las razones que se han comentado, que fueran ortogonales o invariantes por rotación. Así pues, se consideran los diseños factoriales $3k$, que son ortogonales, pero no invariantes por rotación, y los diseños compuestos centrales, que verifican ambas propiedades.

Diseños factoriales $3k$

En los diseños factoriales $3k$ cada uno de los k factores presenta tres niveles, de manera que el número de observaciones experimentales es $N = 3k$. Este número puede hacerse excesivamente grande, especialmente cuando se están estudiando muchos factores, de manera que en ocasiones conviene más considerar diseños fraccionales $3k-m$ de los diseños factoriales $3k$, tal y como se hizo para los diseños factoriales $2k$. Los diseños $3k$ y sus fracciones presentan el inconveniente de que, aunque son ortogonales, no son invariantes por rotación, lo que hace que no sean muy buena elección como diseños de superficies de respuesta de segundo orden (Khuri, 1987).

El análisis de respuestas por el método de superficies ha sido aplicado al estudio de optimización de extracción de aceite de semilla de chía (Ixtaina et al. 2010), la

optimización del proceso de extracción de proteína de avena (Guan & Yao, 2008) y la extracción supercrítica del aceite de semilla de rosa mosqueta (Machmudah et al., 2007).

Referencias Bibliográficas

- Guan, X., Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 106, 345-351.
- Ixtaina, V., Vega, A., Nolasco S., Tomás, M., Gimeno, M., Bázquez, E. & Tecante, A., (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids* 22, 192-199
- Khuri, A. & Cornell, J. (1987). Response Surfaces Design and Analyses. Statistics: Textbooks and Monographs. 81. Marcel Dekker, New York.
- Machmudah, S., Kawahito, Y., Sasaki, M. & Goto, M. (2007). Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids* 41, 421-428.

Cuadro F. Valores estadísticos decodificados para el análisis de respuesta por métodos de superficie.

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G´(Pa)	Desv. Estandar.
-1	-1	-1	0	0	0	0	0
-0.5	-1	-1	1	0	0	0.008	0.001
0	-1	-1	2	0	0	0.028	0
0.5	-1	-1	3	0	0	19.269	1.003
1	-1	-1	4	0	0	60.149	0.848
-1	-0.6667	-1	0	0.5	0	0.005	0
-0.5	-0.6667	-1	1	0.5	0	0.538	0.06
0	-0.6667	-1	2	0.5	0	39.677	3.285
0.5	-0.6667	-1	3	0.5	0	143.025	2.356
1	-0.6667	-1	4	0.5	0	141.247	2.847
-1	-0.3333	-1	0	1	0	0.005	0.001
-0.5	-0.3333	-1	1	1	0	0.416	0.016
0	-0.3333	-1	2	1	0	63.783	7.727
0.5	-0.3333	-1	3	1	0	105.6	0
1	-0.3333	-1	4	1	0	172.412	4.359
-1	0	-1	0	2	0	0.008	0
-0.5	0	-1	1	2	0	1.511	0.282
0	0	-1	2	2	0	65.464	4.78
0.5	0	-1	3	2	0	124.985	15.828
1	0	-1	4	2	0	261.924	11.639
-1	0.33333	-1	0	3	0	0.027	0
-0.5	0.33333	-1	1	3	0	87.727	0
0	0.33333	-1	2	3	0	144.466	18.903
0.5	0.33333	-1	3	3	0	321.025	23.193
1	0.33333	-1	4	3	0	400	0
-1	0.66667	-1	0	3.5	0	6.39	0
-0.5	0.66667	-1	1	3.5	0	328.615	43.773
0	0.66667	-1	2	3.5	0	307.676	50.867
0.5	0.66667	-1	3	3.5	0	435.925	12.488
1	0.66667	-1	4	3.5	0	618.013	12.313
-1	1	-1	0	3.9	0	40.06	3.56
-0.5	1	-1	1	3.9	0	279.867	12.093
							12.907
0	1	-1	2	3.9	0	374.187	

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G´(Pa)	Desv. Estandar.
0.5	1	-1	3	3.9	0	720.899	15.736
1	1	-1	4	3.9	0	853.981	8.573
-1	-1	-0.5	0	0	0.25	0.908	0.089
-0.5	-1	-0.5	1	0	0.25	9.648	0
0	-1	-0.5	2	0	0.25	10.859	0.463
0.5	-1	-0.5	3	0	0.25	31.076	1.641
1	-1	-0.5	4	0	0.25	64.623	4.86
-1	-0.6667	-0.5	0	0.5	0.25	2.121	0.122
-0.5	-0.6667	-0.5	1	0.5	0.25	24.35	0.129
0	-0.6667	-0.5	2	0.5	0.25	54.587	2.786
0.5	-0.6667	-0.5	3	0.5	0.25	115.523	1.261
1	-0.6667	-0.5	4	0.5	0.25	189.43	0.436
-1	-0.3333	-0.5	0	1	0.25	25.305	2.831
-0.5	-0.3333	-0.5	1	1	0.25	60.106	5.313
0	-0.3333	-0.5	2	1	0.25	54.562	4.051
0.5	-0.3333	-0.5	3	1	0.25	160.858	5.299
1	-0.3333	-0.5	4	1	0.25	235.675	18.467
-1	0	-0.5	0	2	0.25	125.777	7.901
-0.5	0	-0.5	1	2	0.25	166.702	13.627
0	0	-0.5	2	2	0.25	153.545	4.919
0.5	0	-0.5	3	2	0.25	196.575	16.934
1	0	-0.5	4	2	0.25	301.628	21.623
-1	0.33333	-0.5	0	3	0.25	275.615	2.079
-0.5	0.33333	-0.5	1	3	0.25	135.921	4.429
0	0.33333	-0.5	2	3	0.25	243.14	0.604
0.5	0.33333	-0.5	3	3	0.25	289.459	8.452
1	0.33333	-0.5	4	3	0.25	354.613	2.3
-1	0.66667	-0.5	0	3.5	0.25	314.739	23.934
-0.5	0.66667	-0.5	1	3.5	0.25	218.837	3.831
0	0.66667	-0.5	2	3.5	0.25	286.219	1.828
0.5	0.66667	-0.5	3	3.5	0.25	374.089	7.276
1	0.66667	-0.5	4	3.5	0.25	405.182	8.999
-1	1	-0.5	0	3.9	0.25	481.032	20.613

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G'(Pa)	Desv. Estandar.
-0.5	1	-0.5	1	3.9	0.25	467.901	35.226
0	1	-0.5	2	3.9	0.25	304.919	5.294
0.5	1	-0.5	3	3.9	0.25	505.703	40.243
1	1	-0.5	4	3.9	0.25	669.827	29.8
-1	-1	0	0	0	0.5	406.953	38.131
-0.5	-1	0	1	0	0.5	295.963	9.124
0	-1	0	2	0	0.5	444.708	15.348
0.5	-1	0	3	0	0.5	544.571	4.868
1	-1	0	4	0	0.5	594.459	8.735
-1	-0.6667	0	0	0.5	0.5	538.04	40.423
-0.5	0	0	1	2	0.5	699.49	13.823
0	0	0	2	2	0.5	1364.09	209.521
0.5	0	0	3	2	0.5	1106.31	112.043
1	0	0	4	2	0.5	1067.59	12.692
-1	0.33333	0	0	3	0.5	1620.76	25.618
-0.5	0.33333	0	1	3	0.5	1196.49	34.779
0	0.33333	0	2	3	0.5	1065.94	38.514
0.5	0.33333	0	3	3	0.5	1065.94	38.514
1	0.33333	0	4	3	0.5	1566.45	68.018
-1	0.66667	0	0	3.5	0.5	1571.96	51.407
-0.5	0.66667	0	1	3.5	0.5	1323.82	104.201
0	0.66667	0	2	3.5	0.5	1456.96	37.028
0.5	0.66667	0	3	3.5	0.5	1570.36	26.401
1	0.66667	0	4	3.5	0.5	1523	52.578
-1	1	0	0	3.9	0.5	2111.08	132.562
-0.5	1	0	1	3.9	0.5	1560.38	30.831
0	1	0	2	3.9	0.5	1434.19	45.924
0.5	1	0	3	3.9	0.5	1362.57	56.657
1	1	0	4	3.9	0.5	1782.13	40.282
-1	-1	0.5	0	0	0.75	1162.45	23.393
-0.5	-1	0.5	1	0	0.75	1427.44	82.732
0	-1	0.5	2	0	0.75	1634.21	2.458
0.5	-1	0.5	3	0	0.75	1874.79	141.556

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G'(Pa)	Desv. Estandar.
1	-1	0.5	4	0	0.75	2298.79	108.023
-1	-0.6667	0.5	0	0.5	0.75	3029.65	115.142
-0.5	-0.6667	0.5	1	0.5	0.75	1190.29	42.156
0	-0.6667	0.5	2	0.5	0.75	3024.65	111.06
0.5	-0.6667	0.5	3	0.5	0.75	2426.94	158.637
1	-0.6667	0.5	4	0.5	0.75	2165.29	42.266
-1	-0.3333	0.5	0	1	0.75	1707.77	133.122
-0.5	-0.3333	0.5	1	1	0.75	949.241	51.047
0	-0.3333	0.5	2	1	0.75	2543.1	27.377
-1	0	0	0	2	0.5	1076.7	0
0.5	0.33333	0.5	3	3	0.75	3041.41	102.63
1	0.33333	0.5	4	3	0.75	2676.12	2.494
-1	0.66667	0.5	0	3.5	0.75	3163.46	213.743
-0.5	0.66667	0.5	1	3.5	0.75	2463.26	48.851
0	0.66667	0.5	2	3.5	0.75	3330.53	375.286
0.5	0.66667	0.5	3	3.5	0.75	3282.24	332.71
1	0.66667	0.5	4	3.5	0.75	3651.48	58.571
-1	1	0.5	0	3.9	0.75	3737.18	30.116
-0.5	1	0.5	1	3.9	0.75	2335.36	104.042
0	1	0.5	2	3.9	0.75	2875.62	81.029
0.5	1	0.5	3	3.9	0.75	3198.05	12.509
1	1	0.5	4	3.9	0.75	3869.12	127.896
-1	-1	1	0	0	1	2905.77	27.1
-0.5	-1	1	1	0	1	4317.94	155.759
0	-1	1	2	0	1	3618.16	243.835
0.5	-1	1	3	0	1	5265.95	84.899
1	-1	1	4	0	1	4945.25	72.244
-1	-0.6667	1	0	0.5	1	3391.64	237.368
-0.5	-0.6667	1	1	0.5	1	4315.28	97.722
0	-0.6667	1	2	0.5	1	4262.27	23.213
0.5	-0.6667	1	3	0.5	1	4578.56	347.779
1	-0.6667	1	4	0.5	1	4726.59	33.24
-1	-0.33333	1	0	1	1	3331.59	27.246

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G'(Pa)	Desv. Estandar.
-0.5	-0.3333	1	1	1	1	4084.43	55.636
0	-0.3333	1	2	1	1	4637.25	59.343
0.5	-0.3333	1	3	1	1	4387.41	186.88
1	-0.3333	1	4	1	1	4622.53	270.959
-1	0	1	0	2	1	3618.16	243.835
-0.5	0	1	1	2	1	4402.83	65.532
0	0	1	2	2	1	6108.2	273.49
0.5	0	1	3	2	1	5547.64	180.348
1	0	1	4	2	1	4586.18	55.669
0	0.33333	0.5	2	3	0.75	3253.78	191.75
-1	1	1	0	3.9	1	5751.81	125.083
-0.5	1	1	1	3.9	1	5826.79	78.082
0	1	1	2	3.9	1	7599.71	294.135
0.5	1	1	3	3.9	1	8081.05	64.564
1	1	1	4	3.9	1	6723.72	194.269
-0.5	-0.6667	0	1	0.5	0.5	448.877	3.794
0	-0.6667	0	2	0.5	0.5	699.491	13.822
0.5	-0.6667	0	3	0.5	0.5	598.149	2.957
1	-0.6667	0	4	0.5	0.5	895.14	37.836
-1	-0.3333	0	0	1	0.5	295.963	9.124
-0.5	-0.3333	0	1	1	0.5	542.554	7.452
0	-0.3333	0	2	1	0.5	605.84	22.772
0.5	-0.3333	0	3	1	0.5	778.807	0.598
1	-0.3333	0	4	1	0.5	988.929	26.798
1	0.66667	1	4	3.5	1	5994.22	125.871
0.5	-0.3333	0.5	3	1	0.75	2356.83	38.714
1	-0.3333	0.5	4	1	0.75	2417.72	28.079
-1	0	0.5	0	2	0.75	2465.08	59.772
-0.5	0	0.5	1	2	0.75	2244.03	26.283
0	0	0.5	2	2	0.75	2779.17	61.682
0.5	0	0.5	3	2	0.75	2834.41	50.353
1	0	0.5	4	2	0.75	3111.66	128.643
-1	0.33333	0.5	0	3	0.75	3357.15	39.482

Variables Codificadas			Valores de la concentración % peso			Variables de respuesta	
CH10	WPI	kC	CH10	WPI	kC	G'(Pa)	Desv. Estandar.
-0.5	0.33333	0.5	1	3	0.75	2209.91	81.984
-1	0.33333	1	0	3	1	6157.1	103.434
-0.5	0.33333	1	1	3	1	4746.47	268.966
0	0.33333	1	2	3	1	6109.14	373.51
0.5	0.33333	1	3	3	1	6140.8	92.248
1	0.33333	1	4	3	1	5497.2	48.859
-1	0.66667	1	0	3.5	1	6048.83	185.3
-0.5	0.66667	1	1	3.5	1	4765.71	228.635
0	0.66667	1	2	3.5	1	6071.94	530.159
0.5	0.66667	1	3	3.5	1	6666.73	216.119